

Особенности локальной и системной продукции провоспалительных, хемоаттрактантных медиаторов и сосудистых факторов роста при пересадках роговицы высокого риска

В.В. Нероев, Н.В. Балацкая, Е.В. Ченцова, И.Г. Куликова, Х.М. Шамхалова

ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, Москва

Features of local and systemic production of pro-inflammatory, chemoattractant mediators and vascular growth factors in high-risk corneal transplants

V.V. Neroev, N.V. Balatskaya, E.V. Chentsova, I.G. Kulikova, H.M. Shamkhalova

Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russia

Аннотация

Цель – изучить состав и содержание провоспалительных цитокинов, хемоаттрактантных медиаторов, факторов сосудистого роста в сыворотке крови (СК) и слезной жидкости (СЖ) у пациентов с КПВР.

Материалы и методы. Обследовано 106 пациентов с поствоспалительными бельмами роговицы и мутным сквозным трансплантатом. Контрольная группа – 20 практически здоровых донора. В СК и СЖ методом мультиплексного анализа на платформе xMAP (прибор MAGPIX, «Luminex Corporation», США) в программе LuminexxPONENT 3.1, с помощью наборов ProcartaPlex («Bioscience», Австрия) определяли цитокины: IL-2, IL-18, MCP-1 / CCL2, MIP-1 β / CCL4, RANTES/CCL5, Eotaxin / CCL11, IP-10/CXCL10, SDF-1 α /CXCL12, VEGF-A, VEGF-D, PIGF-1, HGF/SF.

Результаты. При исследовании уровней системной продукции иммуномедиаторов в группах больных были выявлены достоверные изменения концентраций MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, Eotaxin/CCL11, IP-10/CXCL10, SDF-1 α /CXCL12, а также ангиогенных факторов VEGF-A и HGF/SF по сравнению с таковыми в контроле. В группе первичной КПВР при наличии васкуляризации отмечается повышение продукции IL-18, RANTES/CCL5, Eotaxin / CCL11. Васкуляризация трансплантата при повторных (от 2 и выше) пересадках роговицы (II группа) ассоциировалась с достоверным увеличением в СК IL-2, PIGF-1 и HGF/SF ($p < 0,05$). Анализ содержания цитокинов в СЖ пациентов с повторной КПВР и васкуляризованным трансплантатом показал статистически значимое увеличение IP-10/CXCL10, MIP-1 β /CCL4, SDF-1 α /CXCL12 и VEGF-A. При ретроспективном анализе содержания цитокинов в СК в зависимости от исходов кератопластики, отмечалось достоверное повышение концентраций 7 из 11 изученных цитокинов, у пациентов группы КПВР с различными осложнениями в послеоперационном периоде, в том числе с развившейся реакцией отторжения

Summary

Purpose: to study the composition and content of pro-inflammatory cytokines, chemoattractant mediators, vascular growth factors in blood serum (SB) and lacrimal fluid (LF) in patients with KPHR.

Materials and methods. A total of 106 patients with post-inflammatory corneal spots and turbid transplant were examined. The control group consisted of 20 practically healthy donors. Cytokines: IL-2, IL-18, MCP-1 / CCL2, MIP-1 β / CCL4, RANTES / CCL5, Eotaxin / CCL11, IP-10 / CXCL10, SDF-1 α / CXCL12, VEGF-A, VEGF-D, PIGF-1, HGF / SF.

Results. The study of the levels of systemic production of immunomodulators in the groups of patients revealed significant changes in the concentrations of MCP-1 / CCL2, RANTES / CCL5, Eotaxin / CCL11, IP-10 / CXCL10, SDF-1 α / CXCL12, as well as angiogenic factors VEGF-A and HGF / SF compared to controls. In the group of primary KPHR in the presence of vascularization, an increase in the production of IL-18, RANTES / CCL5, Eotaxin / CCL11 was observed. 1 / CCL2, VEGF-A, PIGF-1 and HGF / SF ($p < 0.05$). Graft vascularization in repeated (2 and higher) corneal transplants (group II) was associated with significant increases in SC IL-2, PIGF-1, and HGF/SF ($p < 0.05$). Analysis of cytokine content in the LF of patients with repeated KPHR and vascularized graft showed a statistically significant increase in IP-10 / CXCL10, MIP-1 β / CCL4, SDF-1 α / CXCL12, and VEGF-A. A retrospective analysis of the content of cytokines in the SB, depending on the outcomes of keratoplasty, showed a significant increase in the concentration of 7 out of 11 studied cytokines in patients of the KPHR group with various complications in the postoperative period, including those with a developed graft rejection reaction.

Conclusions. It has been shown that the formation of vascularized corneal spots is associated with a significant increase in systemic production of IL-18, an increase in the concentration of chemokines with angiogenic activity RANTES / CCL5 and Eotaxin / CCL11 in the blood of patients

трансплантата. Выводы. Показано, что формирование васкуляризованного бельма ассоциируется с достоверным усилением системной продукции IL-18, увеличением концентрации хемокинов с ангиогенной активностью RANTES/CCL5 и Eotaxin/CCL11 в крови пациентов с КПВР. При васкуляризации трансплантата при повторной КПВР в СК и СЖ наблюдается одностороннее повышение уровней IL-2, MCP-1/CCL2, факторов роста VEGF-A и HGF/SF. Фактором развития отторжения трансплантата являются исходно высокие концентрации в СК пациентов с КПВР IL-2, IL-18, хемокинов RANTES/CCL5, MIP-1 β /CCL4, VEGF-A, PLGF, HGF/SF ($p < 0,05$), свидетельствующих об активации патологического ангиогенеза на фоне воспаления и доминирования адаптивного иммунного ответа.

Ключевые слова

Бельма роговицы, кератопластика высокого риска, васкуляризация, цитокины, хемоаттрактанты.

Актуальность

Пересадка роговицы относится к наиболее распространенным офтальмологическим хирургическим вмешательствам [1].

Высокий уровень успеха кератотрансплантации (до 90% приживаемости в течение 1 года) при отсутствии факторов риска обусловлен особыми механизмами в переднем отрезке глаза (функционально-структурном объединении роговицы и передней камеры (ПК)), реализуемыми посредством локальной (интраокулярной) и системной иммунорегуляции [2].

Известно, что роговица является иммунологически привилегированной тканью со слабой экспрессией молекул МНС, наличием факторов, строго регламентирующих миграцию иммунокомпетентных клеток (ИКК) в эпителии и иммуносупрессивных веществ (TGF- β 1, PDL-1, IDO и др.) во влаге передней камеры глаза [3, 4, 5].

В связи с отсутствием в роговице кровеносных и лимфатических сосудов перемещение ИКК между роговицей и системным кровотоком/лимфоидными органами ограничено.

Состояние аваскулярности поддерживается за счет баланса локально экспрессируемых антилимфо- и антиангиогенных факторов.

Эпителий роговицы продуцирует растворимую рецепторную форму sVEGFR-1, связывающего VEGF-A, ингибируя митогенный эффект последнего в отношении клеток эндотелия сосудов. Также и несигнальный sVEGFR-3, экспрессируемый конститутивно клетками эпителия роговицы, проявляет антиангиогенную активность в качестве рецептора-ловушки для VEGF-C

with KPHR. During vascularization of the graft with repeated KPHR in the SB and LE, a unidirectional increase in the levels of IL-2, MCP-1 / CCL2, growth of VEGF-A and HGF / SF is observed. A factor in the development of graft rejection is the initially high concentrations in the SB of patients with KPHR IL-2, IL-18, chemokines RANTES / CCL5, MIP-1 β / CCL4, VEGF-A, PLGF, HGF / SF ($p < 0.05$), indicating about the activation of pathological angiogenesis against the background of inflammation and an activated adaptive immune response.

Keywords

Corneal spots, high-risk keratoplasty, vascularization, cytokines, chemoattractants.

и VEGF-D, подавляя рост как кровеносных, так и лимфатических сосудов [6].

В роговице экспрессируется целый ряд и других антиангиогенных факторов, таких как: ангиостатин, ингибирующий пролиферацию и миграцию клеток эндотелия сосудов, эндостатин, блокирующий митогенную активность VEGF-A в отношении клеток сосудистого эндотелия и стимулирующий их апоптоз, фактор пигментного эпителия PEDF (англ. Pigment epithelium derived factor), синтезируемый клетками эндотелия роговицы и регулирующий экспрессию VEGF-A по принципу обратной связи, а также TSP-1 и PDL-1 способные ингибировать корнеальный гемангиогенез/лимфангиогенез [7, 8].

Действие повреждающих агентов (в частности, инфекции, травмы, в т.ч. хирургической (особенно, повторной)) может привести к срыву иммунной привилегии – патологической активации локальных и системных иммунологических механизмов: усилению продукции целого ряда медиаторов, ответственных за индукцию ангио- и лимфогенеза в роговице, направление иммунного ответа, хемотаксис клеток воспаления, аномальный фиброгенез и т.д. [9, 10].

Отторжение трансплантата, которое представляет собой иммунологическую реакцию против донорской роговичной ткани, является наиболее частой причиной неуспеха кератопластики (КП). В тридцати процентах случаев отмечается по меньшей мере один эпизод иммунной реакции, а при низком риске в одной трети из них данная реакция приводит к отторжению трансплантата [11, 12].

По данным ряда авторов, частота отторжения трансплантата составляет от 2,3 до 68%, что зависит от наличия факторов высокого риска отторжения, в частности от количества кератопластик в анамнезе и неоваскуляризации роговицы.

Пересадка трансплантата роговицы в невааскуляризованное и невоспаленное ложе носит название пересадки низкого риска и не требует назначения системной иммуносупрессивной терапии или тканевого типирования главного комплекса гистосовместимости [13].

Для пересадки высокого риска (КПВР), которую выполняют как повторную КП и/или в условиях наличия васкуляризации и воспаления ложа, риск отторжения трансплантата составляет более 65% в течение пяти лет даже на фоне проведения системной иммуносупрессивной терапии [14, 15].

Данные результаты хуже в сравнении с частотой неуспеха при трансплантации почек, сердца или печени [16].

Активация провоспалительных механизмов, лимфо- и ангиогенеза при аваскулярном ложе является мощным провоцирующим фактором в развитии иммунологического отторжения донорской роговичной ткани у экспериментальных животных после КП низкого риска и зависит от состояния системы про- и ангиогенных цитокинов [17, 18].

Однако в практической клинике, при пересадке роговицы, и особенно у пациентов группы высокого риска целенаправленные исследования локальной (на уровне глаза) и системной продукции (на уровне организма) вазоактивных, хемоаттрактантных и провоспалительных медиаторов практически не проводились, в доступной литературе нам встретились немногочисленные работы, посвященные этой проблеме.

Цель исследования: изучить состав и содержание провоспалительных цитокинов, хемоаттрактантных медиаторов, факторов сосудистого роста в сыворотке крови (СК) и слезной жидкости (СЖ) у пациентов с КПВР.

Материалы и методы

В исследование включены 106 пациентов в возрасте от 18 до 79 лет (57 мужчин и 49 женщин) с поствоспалительными бельмами роговицы и мутным сквозным трансплантатом (рис. 1, 2), находившихся на лечении в отделении реконструктивной хирургии и травматологии НМИЦ Глазных болезней им. Гельмгольца, где им была выполнена плановая КП. Критериями исключе-

ния явились: наличие ожоговой травмы глаза, системные воспалительные, аутоиммунные, эндокринные и онкологические заболевания.

В 54 случаях (51%) отмечали наличие поствоспалительного бельма роговицы, в 52 (49%) – мутный сквозной трансплантат. В зависимости от количества проведенных пересадок роговицы, пациенты были распределены на две группы: 54 больных перед проведением первой КП составили I-ю группу (51%), во II-ю группу вошли 52 пациента, госпитализированные для выполнения повторной трансплантации (49%). В каждой группе пациенты были разделены на подгруппы в зависимости от наличия васкуляризации бельма роговицы и мутного сквозного кератотрансплантата.

В I группе васкуляризованные бельма роговицы были отмечены в 24 случаях (44,4%) (рис. 1), поствоспалительные бельма без васкуляризации в 30 случаях (55,5%) (рис. 2). В 15 случаях (27,8%) проведена послойная кератопластика, у 39 (72,2%) – сквозная. Острота зрения до операции в планируемом для кератопластики глазу была крайне низкая и составляла от правильной проекции света до 0,02.

У 26 пациентов II группы (50%) определялся васкуляризованный мутный сквозной трансплантат (рис. 3). В половине случаев определялся мутный сквозной трансплантат без васкуляризации (рис. 4). 42 пациентам (80,8%) II группы была проведена сквозная кератопластика, 10 (19,2%) – послойная. Острота зрения составила от неправильной светопроекции до 0,02.

Иммунологические исследования выполнялись на базе отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России.

Забор крови и слезной жидкости (СЖ) проводили до каких-либо манипуляций. СЖ (без стимуляции) отбиралась стерильной градуированной пипеткой из нижнего конъюнктивального свода в объеме 25-50 мкл в микропробирки «Eppendorf». Кровь забирали из локтевой вены в стерильные вакуумные пробирки без активатора свертывания. Сыворотку крови (СК) получали, используя стандартные методики.

Контролем служили образцы СК (n=20) и СЖ (n=10) практически здоровых людей сопоставимых по полу и возрасту с пациентами исследуемых групп.

До проведения исследования собранный биоматериал хранился при температуре -70°C. В СК и СЖ методом мультиплексного анализа на платформе xMAP (прибор MAGPIX,



Рис. 1. Поствоспалительное бельмо



Рис. 2. Вакюляризованное бельмо роговицы

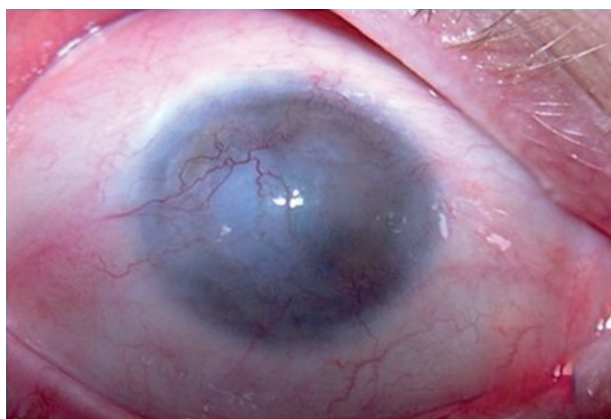


Рис. 3. Вакюляризованный кератотрансплантат

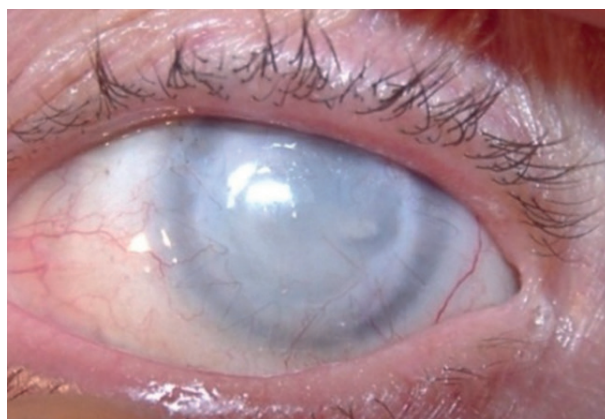


Рис. 4. Мутный кератотрансплантат

«Luminex Corporation», США) в программе LuminexPONENT 3.1, с помощью наборов ProcartaPlex («eBioscience», Австрия) определяли цитокины: непосредственно участвующий в иммунном ответе IL-2, IL-18- провоспалительный медиатор, хемокины: MCP-1/CCL2, MIP-1 β /CCL4, RANTES /CCL5, Eotaxin/CCL11, IP-10/CXCL10, SDF-1 α /CXCL12, факторы сосудистого роста: VEGF-A, VEGF-D, PlGF-1, HGF/SF.

Статистический анализ выполнен с использованием пакета прикладных программ Statistica 12.0 (StatSoft Inc., USA). Оценка нормальности распределения проведена методом Колмогорова-Смирнова. Учитывая распределение части параметров, отличное от нормального, сравнительный анализ проводился непараметрическими методами. Показатели содержания цитокинов в биологических жидкостях представлены в формате: $M \pm m$, где M – среднее значение, m – стандартная ошибка среднего значения. Для определения достоверности различий (p) показате-

телей двух независимых выборок использовали U-критерий Манн-Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным $p < 0,05$.

Результаты

Результаты исследования содержания цитокинов в СК пациентов с КПВР представлены в таблице 1.

Анализ результатов показал, что в СК контрольной группы практически здоровых людей из 12 исследуемых цитокинов определялись 9, среди которых в 70-100% проб обнаруживались хемоаттрактантные и вазоактивные медиаторы MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, Eotaxin/CCL11, IP-10/CXCL10, SDF-1 α /CXCL12, PlGF-1, HGF/SF, а также VEGF-A, в норме, как известные, выполняющие гомеостатические функции (Таблица 1).

В подавляющем количестве тест-проб СК пациентов с КПВР выявлялись 11 цитокинов: интересно, что IL-2 и IL-18, отсутствовавшие СК

Таблица 1. Концентрация цитокинов (пкг/мл) в сыворотке крови (СК) пациентов с первичной и повторной КПВР

| Цитокины | Группы | | I (первичная КПВР) | | | | II (повторная КПВР) | | | |
|---------------|-----------------|------------|--------------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|-------------|-------------|-----------------------|
| | Контроль (n=20) | | б/в (n=30) | | васк (n=24) | | б/в (n=26) | | васк (n=26) | |
| | % | M±m | % | M±m | % | M±m | % | M±m | % | M±m |
| IL-2 | 0 | < чувств. | 87 | 18,7+2,16* | 83 | 20,9+4,9* | 62 | 15,5+1,5* | 92 | 33,03+7,4** |
| IL-18 | 0 | < чувств. | 27 | 31,3+6,3* | 33 | 45,4+4,2** | 15 | 34,9+13,7* | 92 | 36,9+7,7* |
| Eotaxin/CCL11 | 100 | 43,4+8,97 | 100 | 79,6+6,2* | 100 | 98,8+3,7** | 100 | 74,9+9,6* | 100 | 79,3+8,4* |
| IP-10/CXCL10 | 90 | 14,1+2,8 | 100 | 21,6+3,63 | 100 | 28,8+3,8* | 100 | 28,9+6,9* | 100 | 26,5+3,1* |
| MCP-1/CCL2 | 90 | 51,2+16,2 | 100 | 37,6+11,7 | 100 | 56,3+7,5 | 100 | 49,1+12,5 | 100 | 72,4+3,6 |
| MIP-1β/CCL4 | 50 | 67,2+18,3 | 100 | 87,5+9,5 | 100 | 56,9+4,3# | 100 | 75,4+6,8 | 100 | 71,3+9,2 |
| SDF-1α/CXCL12 | 100 | 285,6+45,9 | 100 | 480,1+28,2* | 100 | 490,8+40,3* | 100 | 448,9+32,5* | 100 | 550,3+44,7* |
| RANTES/CCL5 | 100 | 19,7+5,6 | 100 | 13,1+1,6 | 100 | 29,6+5,02# | 100 | 16,9+1,6 | 100 | 19,2+6,5 |
| HGF/SF | 100 | 132,6+24,4 | 100 | 216,9+24,7* | 100 | 206,9+19,9* | 100 | 166,7+10,8 | 100 | 266,4+54,5** |
| PIGF-1 | 80 | 28,97+3,5 | 100 | 24,9+4,4 | 100 | 30,4+6,4 | 100 | 23,8+3,3 | 100 | 49,1+5,6 [†] |
| VEGF-A | 70 | 167,8+62,9 | 100 | 298,3+39,7* | 100 | 353,2+28,0* | 100 | 280,2+49,2* | 100 | 390,7+45,6* |
| VEGF-D | 0 | < чувств. | 0 | < чувств. | 0 | < чувств. | 0 | < чувств. | 0 | < чувств. |

Примечание:

n – количество человек в группе;

% – частота выявления цитокина в пробах биоматериала;

* – достоверность различия параметров у больных исследуемых групп по сравнению с группой контроля (p<0,05);

– достоверность различия параметров у пациентов с отсутствием и наличием васкуляризации в I группе (при первичной кератопластике) (p<0,05);

† – достоверность различия параметров у пациентов с отсутствием и наличием васкуляризации во II группе (при повторной кератопластике) (p<0,05).

группы контроля, обнаружены в крови больных в 97 и 27%, соответственно.

При исследовании уровней системной продукции иммуномедиаторов в группах больных были выявлены достоверные изменения концентраций 8 цитокинов: повышение содержания в СК практически всех исследуемых хемокинов: MCP-1/ CCL2, RANTES/ CCL5, Eotaxin/ CCL11, IP-10/ CXCL10, SDF-1α/CXCL12 за исключением MIP-1β/CCL4, а также ангиогенных факторов VEGF-A и HGF/SF по сравнению с таковыми в контроле (Таблица 1).

Анализ качественного и количественного состава сывороточных цитокинов в зависимости от количества проведенных пересадок роговиц в анамнезе не показал значимых отличий между I и II группами пациентов.

Интересные данные были получены в ходе исследования содержания иммуномедиаторов в СК пациентов каждой из групп с наличием васкуляризации бельма (I группа) и кератотрансплантата (II группа). Так в группе первичной КПВР при наличии васкуляризации отмечается статистически значимое изменение системной продукции 4 изучаемых цитокинов: повышение продукции IL-18, хемокинов RANTES/CCL5, Eotaxin/CCL11 при снижении концентрации MIP-1β/CCL4 (p<0,05). Васкуляризация трансплантата при повторных

(от 2 и выше) пересадках роговицы (II группа) ассоциировалось с достоверным увеличением в СК IL-2 (обнаруженного в 92% тест-проб) – цитокина иммунного ответа, сосудистых факторов роста PIGF-1 и HGF/SF (p<0,05) (Таблица 1).

Анализ содержания цитокинов в СЖ пациентов с повторной КПВР и васкуляризованным трансплантатом показал статистически значимое увеличение концентрации следующих цитокинов: IP-10/CXCL10, MIP-1β/CCL4, SDF-1α/CXCL12 и VEGF-A (Таблица 2).

Для более детального понимания патогенеза осложнений при трансплантации роговицы нами также был проведен ретроспективный анализ системной продукции основных провоспалительных, противовоспалительных и ангиогенных медиаторов в зависимости от исходов КП. Для этих целей было выделено 3 подгруппы больных (Таблица 3). В подгруппу А вошли 16 пациентов с абсолютно благополучным послеоперационным периодом, у 14 больных подгруппы Б выявлены осложнения в виде персистирующей эрозии (ПЭР), переднего увеита (ПУ), отека кератотрансплантата (ОТ), которые купировались усилением глюкокортикостероидной терапии. Подгруппу В составили 10 пациентов с развившейся реакцией отторжения, помутнением трансплантата (Таблица 3).

Таблица 2. Концентрация цитокинов (пкг/мл) в слезной жидкости пациентов с повторной КПВР

| Цитокины | Контроль (n=10) | | Повторная КПВР | | | |
|----------------|-----------------|------------|----------------|-------------|-------------|---------------|
| | | | б/в (n=26) | | васк (n=26) | |
| | % | M±m | % | M±m | % | M±m |
| IL-2 | 88 | 18,7±4,5 | 100 | 55,9±5,9* | 100 | 71,2±6,3* |
| IL-18 | 50 | 10,6±1,8 | 77 | 24±5,3 | 80 | 41,9±7,6* |
| Eotaxin/CCL11 | 100 | 12,8±1,97 | 100 | 8,7±0,42* | 100 | 10,02±0,65 |
| IP-10/CXCL10 | 100 | 236,6±88,7 | 100 | 31,4±4,9* | 100 | 141,8±32,5*# |
| MCP-1/CCL2 | 100 | 36,6±11,3 | 100 | 24,9±3,4 | 100 | 56,3±8,3# |
| MIP-1β/CCL4 | 0 | < чувств | 100 | 61,4±4,5* | 100 | 81,4±4,8*# |
| SDF-1α/ CXCL12 | 100 | 240±24,5 | 100 | 573,3±69,3* | 100 | 890,5±57,02*# |
| RANTES/ CCL5 | 100 | 17,8±4,9 | 100 | 13,7±3,04 | 100 | 18,3±3,7 |
| HGF/SF | 100 | 93,8±13,4 | 100 | 228,6±32,3* | 100 | 248,7±36,3* |
| PIGF-1 | 88 | 26,7±6,3 | 0 | <чувств | 0 | <чувств |
| VEGF-A | 88 | 112,6±15,7 | 100 | 83,8±13,3 | 100 | 187,6±39,02# |
| VEGF-D | 0 | <чувств | 0 | <чувств | 0 | <чувств |

Примечание:

n – количество человек в группе;

% – частота выявления цитокина в пробах биоматериала;

* – достоверность различия параметров у больных исследуемых групп по сравнению с группой контроля (p<0,05);

– достоверность различия параметров у пациентов с отсутствием и наличием васкуляризации (p<0,05).

Таблица 3. Ретроспективный анализ содержания цитокинов в СК (пкг/мл) пациентов в зависимости от исходов кератопластики

| Цитокины | Контроль (n=20) | Подгруппы | | |
|----------------|-----------------|---|---|--|
| | | А абсолютно благо- приятное течение (n=16) | Б осложнения в виде ПЭР, ПУ, ОТ с сохр ПТ (n=14) | В реакция отторжения трансплантата (n=10) |
| IL-2 | < чувств | 12,3±1,2* | 15,8±1,9 | 47,4±14,2 [□] |
| IL-18 | < чувств | 8,3±1,6* | 12±1,3 | 35,2±6,6 [□] |
| Eotaxin/ CCL11 | 43,4±8,97 | 88,9±9,5* | 88,4±8,3 | 88,9±12 |
| IP-10/ CXCL10 | 14,1±2,8 | 19,9±2,3 | 27,4±4,8 | 34,7±5,1 |
| MCP-1/CCL2 | 51,2±16,2 | 54,1±7,3 | 52,8±8,4 | 61,7±9,7 |
| MIP-1β/CCL4 | 67,2±18,3 | 56,1±3,8 | 74,2±5,4 [#] | 91,5±8,4 [□] |
| SDF-1α/ CXCL12 | 285,6±45,9 | 464,6±32,2* | 479,9±25,3 | 566,2±48,9 |
| RANTES/ CCL5 | 19,7±5,6 | 16,3±1,3 | 15,2±1,5 | 36,5±10 [□] |
| HGF/SF | 132,6±24,4 | 159,4±9,2 | 185,6±17,6 | 324,9±54,2 [□] |
| PIGF-1 | 28,97±3,5 | 24,4±2,9 | 24,6±3,7 | 53,9±10,7 [□] |
| VEGF-A | 167,8±62,9 | 165,1±18,4 | 262,5±26,8 [#] | 362,1±46,7 [□] |

Примечание:

n – количество человек в группе;

* – достоверность различия параметров у больных с абсолютно благоприятным течением (подгруппы А) по сравнению с группой контроля (p<0,05);

– достоверность различия параметров у пациентов подгрупп А и Б (p<0,05);

□ – достоверность различия параметров у пациентов подгрупп А и В (p<0,05).

Как видно из таблицы 3, достоверный подъём уровней сывороточных MIP-1β/CCL4 и VEGF-A (p<0,05) до КП статистически значимо ассоциировались с развитием осложнений в послеоперационном периоде, которые купировались

усилением стероидной терапии с сохранением прозрачности трансплантата.

Достоверное повышение концентраций 7 из 11 изученных цитокинов до трансплантации было выявлено в СК пациентов группы КПВР с

развившейся в дальнейшем реакцией отторжения трансплантата (Таблица 3).

Обсуждение

Известно, что частота неблагоприятных исходов КП в большей степени зависит от наличия и степени неоваскуляризации, количества пересадок роговицы [19].

Воспалительный процесс в роговице, в норме являющейся аваскулярной тканью, приводит к формированию новообразованных кровеносных и лимфатических сосудов [20]. В настоящее время значимая роль в патогенезе заболеваний, характеризующихся процессами неоваскуляризации, отводится факторам роста VEGF-A, PlGF-1, HGF/SF и др., а также хемоаттрактантным медиаторам с доказанными проангиогенными свойствами CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CCL11/Eotaxin.

VEGF-A является мощным митогеном для эндотелиальных клеток, повышает проницаемость сосудистой стенки, способствует синтезу медиаторов воспаления [21, 22].

По данным Z. Sharif и W. Sharif, 2019, VEGF-A играет важную роль в развитии поствоспалительной неоваскуляризации роговицы при герпесвирусном стромальном кератите (ГБК) [23].

В частности, было показано, что активное инфицирование герпесвирусом 1 типа и развитие ГБК приводит к ингибированию синтеза растворимого рецептора VEGF-A (sVEGFR-1) с более высокой скоростью по сравнению с VEGF-A, что приводит к дисбалансу между ними и повышению локальной концентрации VEGF-A вызывающего аномальный рост сосудов [24].

В нашей работе при анализе уровня цитокинов выявлено достоверное повышение уровня VEGF-A в СК всех пациентов. В группе повторной КПВР и васкуляризованным трансплантатом роговицы этот медиатор обнаруживался в среднем в более высоких концентрациях в крови (390,7+45,6пкг/мл) и СЖ (187,6+39,02 пкг/мл) ($p<0,05$), что отражало его активную системную и особенно локальную продукцию, и согласовывалось с данными литературы о важной роли VEGF-A в патогенезе осложнений КПВР, в частности, ассоциации с развитием реакции отторжения трансплантата [25].

По данным единичных зарубежных публикаций отмечается, что в развитии васкуляризации и отторжении трансплантата роговицы также принимают участие плацентарный фактор роста – PlGF-1, HGF/SF, а также VEGF-D [26, 27].

VEGF-D – фактор лимфо- и ангиогенеза, способствующий росту лимфатических сосудов, ин-

тракорнеальная экспрессия которого выявлялась в эксперименте Emami-Naeini Р.и соавт., в нашем исследовании в образцах СК и СЖ пациентов исследуемых групп и в контроле отсутствовал (Таблицы 1, 2).

PlGF, относящийся также к семейству VEGF, обладает высоким сродством к VEGFR-1, прямо и косвенно способствует ангиогенезу. Кроме того, PlGF может выступать в роли хемоаттрактанта для лейкоцитов, последние, в свою очередь способствуют усилению ангиогенеза и воспалительного ответа.

Фактор роста гепатоцитов, или рассеивающий фактор –HGF/SF является мощным митогеном для гепатоцитов, а также тесным образом связан с ангиогенезом, ростом, пролиферацией и дифференцировкой многих типов клеток. Известно, что HGF/SF способен индуцировать экспрессию вазопротерогенных факторов VEGF и PlGF тем самым опосредуя свои ангиогенные свойства [26].

Данные исследований о содержании PlGF и HGF/SF в биологических жидкостях пациентов с КПВР в доступной литературе найдены не были.

В нашем исследовании уровни системной продукции этих факторов роста были выше в группе повторной кератопластики у пациентов с васкуляризованным трансплантатом и составили, соответственно, 49,1+5,6пкг/мл для PlGF($p<0,05$) и 266,4+54,5пкг/мл для HGF/SF($p<0,05$), достоверно отличаясь от таковых при отсутствии васкуляризации (Таблица 1).

Известно, что умеренное повышение экспрессии провоспалительных медиаторов является закономерным тканевым ответом на оперативное вмешательство при КП даже в отсутствие факторов риска; при этом представлены многочисленные доказательства инициации и поддержания ангио- и лимфоангиогенеза стимулирующими сигналами целого ряда факторов провоспалительных цитокинов и хемоаттрактантных медиаторов – MCP-1/CCL2, MIP-1 β /CCL4, IP-10/CXCL1, RANTES/CCL5, Eotaxin/CCL11 и др. [28].

Белки-хемоаттрактанты изначально были описаны как медиаторы, ответственные за рекрутирование лейкоцитов в очаг воспаления. Однако в последние годы описано участие хемокинов как в физиологическом, так и в патологическом ангиогенезе при хроническом воспалении, а среди представителей как CC-, так и CXC-семейства выделяют соединения, обладающие либо ангиогенными либо ангиостатическими свойствами. К ангиогенным

относят, например, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, Eotaxin/CCL11, а к ангиостатическим IP-10/CXCL10.

В нашем исследовании при КПВР было отмечено достоверное увеличение системной продукции 5 из 6 изучаемых хемокинов по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Характерным для пациентов с первичной КП и васкуляризованными бельмами стало статистически значимое увеличение в крови концентраций проангиогенных хемокинов RANTES/CCL5 и Eotaxin/CCL11 (соответственно, до $29,6 \pm 5,02$ пкг/мл и $79,6 \pm 6,2$ пкг/мл) по сравнению с пациентами без васкуляризации в этой же группы.

Отличительной особенностью для II группы пациентов с васкуляризованным трансплантатом, перенесших две и более КП (с наивысшей степенью риска пересадки роговицы) явилось обнаруживаемое более чем в 90% тест-проб СК повышение концентраций цитокинов собственно иммунного ответа - IL-2 и IL-18 ($p < 0,05$), как правило, в норме отсутствующих в системном кровотоке (Таблица 1).

Формирование васкуляризации трансплантата группы повторной КП ассоциировалось с достоверным усилением системной продукции, а также статистически подтвержденным повышением локальных уровней 4 из 6 изучаемых хемокинов ($p < 0,05$) (Таблицы 1, 2).

Большой интерес представили результаты ретроспективного анализа: в СК пациентов группы КПВР с развившейся в дальнейшем реакцией отторжения трансплантата, исходно до операции были выявлены сдвиги 7 из 11 изученных цитокинов по сравнению с таковыми, определенными в крови пациентов

с абсолютно благополучным течением постоперационного периода: на фоне усиления системной продукции IL-2, IL-18 отмечалось достоверное повышение концентрации хемокинов с ангиогенной активностью RANTES/CCL5, MIP-1 β /CCL4, а также сосудистых факторов роста VEGF-A, PLGF, HGF/SF ($p < 0,05$) (Таблица 3).

Выводы

1. Таким образом, определены особенности системной и локальной продукции, охарактеризованы сдвиги провоспалительных, хемоаттрактантных медиаторов и сосудистых факторов роста при пересадках роговицы высокого риска.
2. Показано, что:
 - а) формирование васкуляризованного бельма ассоциируется с достоверным усилением системной продукции IL-18, увеличением концентрации хемокинов с ангиогенной активностью RANTES/CCL5 и Eotaxin/CCL11 в крови пациентов с КПВР.
 - б) при васкуляризации трансплантата при повторной КП в СК и СЖ наблюдается однонаправленное повышение уровней IL-2 (цитокина адаптивного иммунного ответа), и сосудистого фактора роста и HGF/SF.
3. Фактором развития отторжения трансплантата являются исходно высокие концентрации в СК пациентов с КПВР следующих медиаторов: IL-2, IL-18, хемокинов RANTES/CCL5, MIP-1 β /CCL4, VEGF-A, PLGF, HGF/SF ($p < 0,05$), свидетельствующих об активации патологического ангиогенеза на фоне воспаления и доминирования адаптивного иммунного ответа.

Литература

1. Crawford A. Z., Patel D. V., McGhee C. A brief history of corneal transplantation: From ancient to modern. *Oman J Ophthalmol.* 2013; 6(Suppl 1): S12-S17.
2. Марванова Л.Р., Шевчук Н.Е., Марванова З.Р., и др. Локальный иммунный ответ до и после сквозной кератопластики. *Вестник ОГУ* 2012; № 12 (118-2): 154-156.
3. Williams K.A., Coster D.J. The immunobiology of corneal transplantation. *Transplantation.* 2007; 84: 806-813.
4. Coster D.J., Williams K.A. The impact of corneal allograft rejection on the long-term outcome of corneal transplantation. *American journal of ophthalmology.* 2005; 140: 1112-1122.
5. Matsui T., Nishino Y., Maeda S., Yamagishi S. PEDF-derived peptide inhibits corneal angiogenesis by suppressing VEGF expression. *Microvascular research.* 2012; 84: 105-108. doi:10.1016/j.mvr.2012.02.006.
6. Hajrasouliha A.R., Funaki T., Sadrai Z., et al. Vascular endothelial growth factor-C promotes alloimmunity by amplifying antigen-presenting cell maturation and lymphangiogenesis. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2012; 53: 1244-1250. doi:10.1167/iovs.11-8668.
7. Matsui T., Nishino Y., Maeda S., et al. PEDF-derived peptide inhibits corneal angiogenesis by suppressing VEGF expression. *Microvascular research.* 2012; 84: 105-108. doi:10.1016/j.mvr.2012.02.006.
8. Cursiefen C., Maruyama K., Bock F., et al. Thrombospondin 1 inhibits inflammatory lymphangiogenesis by CD36 ligation on monocytes. *J Exp Med.* 2011; 208: 1083-1092. doi:10.1084/jem.20092277.
9. Слепова О.С. Патогенетическая роль цитокинов при различных заболеваниях глаз как основа прогнозирования и выбора тактики иммунокорректирующего лечения. *РОЖ* 2008; Том 1; № 3: 36-42.

10. Chauhan S.K., Dohlman T.H., Dana R. Corneal Lymphatics: Role in Ocular Inflammation as Inducer and Responder of Adaptive Immunity. *J Clin Cell Immunol.* 2014;
11. Dohlman T.H., Omoto M., Hua J., et al. VEGF-trap aflibercept significantly improves long-term graft survival in high-risk corneal transplantation. *Transplantation* 2015; 99: 678–686.
12. Dastjerdi M.H., Saban D.R., Okanobo A., et al. Effects of topical and subconjunctival bevacizumab in high-risk corneal transplant survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51: 2411–2417.
13. Dana M.R., Qian Y., Hamrah P. Twenty-five-year panorama of corneal immunology: Emerging concepts in the immunopathogenesis of microbial keratitis, peripheral ulcerative keratitis, and corneal transplant rejection. *Cornea.* 2000; 19: 625–643.
14. Zhu S. N., Yamada J., Streilein J.W., et al. ICAM-1 deficiency suppresses host allo-sensitization and rejection of MHC-disparate corneal transplants. *Transplantation.* 2000; 69: 1008–1013.
15. Макаров П.В., Балаян Т.Г., Оганесян О.Г. и др. Исследование эффективности применения циклоспорина у больных с высоким риском отторжения кератотрансплантата. Результаты клинического мониторинга. *Вестник офтальмологии.* 2007; 123(4): 14–19.
16. Qazi Y., Hamrah P. Corneal Allograft Rejection: Immunopathogenesis to Therapeutics. *J Clin Cell Immunol.* 2013; 2013(Suppl 9).
17. Chauhan S.K., Dohlman T.H., Dana R. Corneal Lymphatics: Role in Ocular Inflammation as Inducer and Responder of Adaptive Immunity. *Journal of clinical & cellular immunology.* 2014; 5: 256 doi:10.4172/2155-9899.1000256.
18. Bachmann B.O., Bock F., Wiegand S.J., et al. Promotion of graft survival by vascular endothelial growth factor a neutralization after high-risk corneal transplantation. *Archives of ophthalmology.* 2008; 126: 71–77. doi:10.1001/archophth.126.1.71.
19. Bachmann B., Taylor R.S., Cursiefen C. Corneal neovascularization risk factor for graft failure and rejection after keratoplasty: Anevidence-based meta-analysis. *Ophthalmology* 2010; 117: 1300–1305.
20. Dohlman T.H., Omoto M., Hua J., et al. VEGF-trap aflibercept significantly improves long-term graft survival in high-risk corneal transplantation. *Transplantation* 2015; 99: 678–686
21. Нероев В.В., Зайцева О.В., Балацкая Н.В., и др. Интраокулярная и системная продукция эндотелина, эритропоэтина и VEGF-A при осложненной пролиферативной диабетической ретинопатии. *Вестник КазНМУ* 2016; №1: 257–262.
22. Чехонин В.П., Шеин С.А., Корчагина А.А., и др. Роль VEGF в развитии неопластического ангиогенеза. *Вестник КРАМН* 2012; Т. 67, №2: 23–34. <https://vestnikramn.spr-journal.ru/jour/article/viewFile/342/280>.
23. Sharif Z., Sharif W. Corneal neovascularization: updates on pathophysiology, investigations & management. *Rom J Ophthalmol.* 2019 Jan-Mar; 63(1): 15–22.
24. Suryawanshi A., Mulik S., Sharma S., et al. Ocular neovascularization caused by herpes simplex virus type 1 infection results from breakdown of binding between vascular endothelial growth factor a and its soluble receptor. *J Immunol.* 2011; 186: 3653–3665.
25. Куликова И.Г., Слепова О.С., Денисова Е.В. и др. Цитокины во влаге передней камеры глаза и их роль в развитии системного ответа на антигены тканей глаза. *Медицинская иммунология* 2015; 17(2): 179–182. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2015-2-179-182>
26. D. Ellenberg, D.T. Azar, J.A. Hallak et al. Novel aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege. *Prog Retin Eye Res.* 2010 May; 29(3): 208–248.].
27. Emami-Naeini P, Dohlman T. H., Omoto M. et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-3 suppresses allo-sensitization and promotes corneal allograft survival. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2014 Nov; 52(11): 1755–1762.
28. Wallace G.R., John Curnow S., Wloka K., et al. The role of chemokines and their receptors in ocular disease. *Prog. Retin. Eye Res.* 2004; 23: 435–448.

Сведения об авторах:

Нероев Владимир Владимирович – директор Национального медицинского исследовательского центра глазных болезней имени Гельмгольца, академик РАН, Заслуженный врач РФ, Заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой глазных болезней ФПДО МГМСУ. тел.: (495) 607-7331

Н.В. Балацкая – канд. биол. наук, начальник отдела иммунологии и вирусологии.

Ченцова Екатерина Валериановна – профессор, д.м.н., начальник отдела, врач-офтальмолог, врач высшей категории.

ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, 105062, Москва, ул. Садовая-Черногрязская, д. 14/19

Поступила 13.11.2020 г.