

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 617.764-008.8-02:617-089.243]-078.33

Терешков П.П., Максименя М.В., Фефелова Е.В., Витковский Ю.А., Караваева Т.М., Козлова А.В.

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ НЕКОТОРЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ У ЛИЦ, ПОЛЬЗУЮЩИХСЯ МЯГКИМИ КОНТАКТНЫМИ ЛИНЗАМИ

ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, 672090, г. Чита, Россия

Проведено определение методом иммуноферментного анализа концентраций сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF), растворимых форм рецептора VEGF I и II типа, хемотоксического протеина-1 и металлопротеиназы-9 в слезной жидкости у пациентов с миопией без осложнений при использовании силикон-гидрогелевых (СГЛ) и гидрогелевых контактных (ГЛ) линз и у пациентов с гипоксическими осложнениями контактной коррекции. Установлено, что применение ГЛ и СГЛ более 1 года сопровождается повышением в слезной жидкости концентрации определяемых веществ. При гипоксических осложнениях контактной коррекции уровни веществ значительно выше, чем у пациентов без осложнений, что позволяет обосновать возможность применения иммунологических показателей в качестве диагностических маркеров.

Ключевые слова: слезная жидкость; контактная коррекция; ростовые факторы; хемокин-1; металлопротеиназа-9.

P.P. Tereshkov, M.V. Maksimenia, E.V. Fefelova, Yu.A. Vitkovskii, T.M. Karavaeva, A.V. Kozlova

THE PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF PARTICULAR IMMUNOLOGICAL INDICATORS OF LACHRYMAL FLUID IN PATIENTS USING SOFT CONTACT LENSES

The Chita state medical academy of Minzdrav of Russia, Chita, Russia

The study was carried out to identify concentrations of vessel epithelium growth factor (VEGF), soluble forms of VEGF receptor type I and II, chemo-toxic protein I and metalloproteinase-9 in lachrymal fluid. The immune enzyme analysis was applied. The sampling included patients with myopia without complications while using silicone hydro-helium and hydro-helium contact lenses and patients with hypoxic complications of contact correction. It is established that application of hydro-helium and silicone hydro-helium contact lenses more than one year is followed by increasing of concentration of detected substances in lachrymal fluid. Under hypoxic complications of contact correction the levels of substances are significantly higher than in cases without complications. This occurrence makes it possible to substantiate possibility of application of immunologic indicators as diagnostic markers.

Key words: lachrymal fluid; contact correction; growth factor; chemokin-1; metalloproteinase-9.

Коррекция аномалий рефракции с помощью контактных линз – это широко распространенный во всем мире и эффективный способ оптической помощи населению [1, 2]. В отличие от очков контактная линза находится в непосредственном соприкосновении с роговицей и конъюнктивой, что может вызывать некоторые изменения переднего отрезка глаза. В 3–20% случаев эти изменения приобретают характер патологического процесса, требующего лечения, и классифицируются как осложнения [3]. К осложнениям контактной коррекции относятся стромальный отек, отек эпителия роговицы, микроцисты, лимбальная гиперемия, неоваскуляризация, полимегализм, токсико-аллергические и инфекционные заболевания глаз [4, 5].

Самой распространенной причиной развития осложнений при пользовании контактными линзами является гипоксия, возникающая из-за ограничения снабжения роговицы кислородом, что сопровождается сдвигами метаболических процессов в тканях. Кроме того, контактные линзы оказывают механическое и токсико-аллергическое воздействие на глаз. Гипоксия и другие факторы воздействия линзы запускают каскад воспалительных реакций, проявляющихся избыточной продукцией цитокинов, активно участвующих в регуляции процессов деления и ангиогенеза [6]. Степень выраженности изменений переднего отрезка глаза при ношении контактных линз зависит от их типа, адекватности подбора, а также индивидуальных особенностей глаза [3].

Актуальным остается поиск новых объективных критериев определения переносимости роговицей контактной линзы в выбранном режиме ее ношения. Это обусловлено, во-первых, тем, что правильная диагностика осложнений на начальных стадиях может быть затруднена, поскольку их признаки и симптомы могут во многом совпадать, пересекаться. Во-вторых, с бессимптомными, скрытыми субклиническими проявлениями непереносимости мягких контактных линз (МКЛ) связывают наиболее тяжелые осложнения контактной коррекции зрения при аметропиях [7].

В настоящее время при различной офтальмопатологии достаточно активно изучаются иммунологические показатели, основным объектом исследования обычно служит слезная жидкость (СЖ). В то же время в научной литературе представлены лишь единичные биохимические исследования, касающиеся оценки адекватности применения контактных линз [8, 9]. Цель исследования: выявить особенности изменений концентраций ростовых факторов, хемокина-1 и металлопротеиназы-9 в СЖ при применении различных видов контактных линз и оценить возможность использования данных показателей в качестве диагностических маркеров развития гипоксических осложнений контактной коррекции.

Материалы и методы. Для достижения поставленной цели была исследована СЖ 48 пациентов с миопией слабой и средней степени (в возрасте от 25 до 29 лет), пользующихся контактными линзами и наблюдавшихся в офтальмологическом центре («Центр охраны зрения», Чита) в период с 2007 по 2012 г. При проведении исследования соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, 2000 ред.).

Пациенты были разделены на группы. В 1-ю группу

Для корреспонденции:

Терешков Павел Петрович, зав. лаб. клин. и экспериментальной биохимии и иммунологии
Адрес: 672090, Чита, ул Горького, 39а
E-mail: tpp6915@mail.ru

Уровни VEGF, его растворимых форм рецепторов I и II типа, хемокина и MMP в СЖ у пациентов при использовании ГЛ в течение 24 мес (Ме (25-й; 75-й процентиля))

Показатель	VEGF, пг/мл	sVEGF R1/Flt-1, пг/мл	sVEGF R2/KDR/Flk-1, пг/мл	MCP-1, пг/мл	MMP-9, нг/мл
До коррекции (<i>n</i> = 15)	33,31 (12,09; 41,81)	227,21 (145,02; 304,17)	395,04 (290,45; 469,88)	92,46 (69,10; 101,72)	3,91 (2,47; 4,10)
Коррекция без осложнений (<i>n</i> = 15)	59,73 (43,01; 85,63)	326,84 (306,21; 529,96)	671,73 (585,24; 704,73)	129,15 (109,27; 167,73)	5,15 (4,84; 6,36)
<i>p</i> ₁	0,001	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Осложнения без неоваскуляризации (<i>n</i> = 11)	75,36 (52,84; 103,11)	496,31 (376,23; 671,21)	707,11 (607,54; 793,22)	194,32 (171,93; 257,11)	7,32 (6,93; 9,06)
<i>p</i> ₁	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>p</i> ₂	0,046	0,047		0,002	0,036
Васкуляризация (<i>n</i> = 7)	111,69 (92,43; 192,11)	667,88 (536,39; 866,87)	823,97 (742,88; 961,83)	325,97 (271,47; 471,25)	10,11 (8,32; 12,96)
<i>p</i> ₁	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>p</i> ₂	0,003	0,008	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<i>p</i> ₃	0,036	0,015	0,027	0,011	0,019

Примечание. *n* – число обследованных; *p*₁ – уровень статистической значимости различий в сравнении с показателем до контактной коррекции; *p*₂ – уровень статистической значимости различий по сравнению с периодом 24 мес у лиц без осложнений; *p*₃ – уровень статистической значимости различий между подгруппами с осложнениями; *p*, *p*₁₋₃ – критерий Манна–Уитни.

включены 15 пациентов, обратившихся впервые за подбором контактных линз; им были рекомендованы силикон-гидрогелевые линзы (СГЛ) “Air Optix Aqua” с биасферической поверхностью (материал Lotrafilcon B, влагосодержание 33%, пропускание кислорода 138 Dk/t). Во 2-ю группу вошли 33 пациента, которым были подобраны гидрогелевые линзы (ГЛ) “Maxima 55 UV” (материал 45% Окуфилдон Д, 5 % влагосодержание, пропускание кислорода 28,2 Dk/t).

Диаметр обеих линз 14,2 мм, радиус 8,6 мм, толщина в центре 0,07 мм., режим ношения дневной. Пациенты обеих групп производили обработку МКЛ раствором АОSept Plus (Ciba Vision).

В ходе исследования пациенты 2-й группы были разделены на 3 подгруппы. В 1-ю вошли 15 человек, которые носили ГЛ 2,5 года без осложнений, во 2-ю – 11 человек, у которых после 2 лет ношения линз возникли гипоксические осложнения в виде отека стромы роговицы, лимбальной гиперемии, эпителиальных микроцист без неоваскуляризации; в 3-ю – 7 пациентов, у которых после 2 лет ношения ГЛ развилась неоваскуляризация роговицы; в последующем все они были переведены на СГЛ. Контрольную группу составили 15 эмитропов.

Пациенты, пользующиеся МКЛ, находились под проспективным наблюдением в течение 2,5 года: каждые 3 мес проходили стандартное офтальмологическое обследование; кроме того, до начала применения МКЛ, а также через 12, 24 и 30 мес после начала их ношения проводили забор СЖ для анализа. Критериями исключения из исследования являлись: различные воспалительные и дегенеративные заболевания переднего отрезка глаза, психические, соматические, эндокринные заболевания, а также беременность, наличие вредных привычек. Для забора СЖ использовали дозатор со стерильной пластиковой насадкой; не применяли вещества, стимулирующие слезоотделение. Слезу собирали из нижнего конъюнктивального мешка обоих глаз в объеме около 10 мкл, хранили при температуре -20°C, во время исследования разводили в 100 раз буфером для цитокинов Cytokine Assay Buffer (Upstate-Millipore, Watford, Великобритания). В СЖ методом иммуноферментного анализа оценивали содержание VEGF, растворимых форм рецептора VEGF I типа (sVEGF R1/Flt-1) и II типа (sVEGF R2/KDR/Flk-1) с помощью тест-наборов фирм R&D Systems и Invitrogen; количество моноцитарного хемотаксического протеина-1 (MCP-1) и матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) – с помощью наборов Bender MedSystems (Германия). Статистический

анализ полученных данных проводили с использованием программы Statistika® 6.1 (StatSoft). Проверку на нормальность распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Шапиро–Уилка. Описательная статистика изучаемых параметров представлена медианой и межквартильным интервалом (25-го, 75-го перцентилей); сравнение независимых выборок проводилось с помощью U-критерия Манна–Уитни, зависимых выборок по критерию Вилкоксона для парных признаков. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез *p* < 0,05.

Результаты и обсуждение. До начала контактной коррекции значения изучаемых показателей у пациентов с миопией не отличались от контрольных. При ношении СГЛ в течение года наблюдается повышение уровня MCP-1 в СЖ; пользование СГЛ в течение 2 лет вызывает увеличение содержания растворимой формы рецептора sVEGF R2/KDR/Flk-1; после 30 мес коррекции регистрируется повышение концентраций VEGF и его обеих растворимых форм рецепторов. Применение ГЛ в течение 1 года сопровождается увеличением величин MCP-1, MMP-9, VEGF и его растворимых форм рецепторов VEGF I и II типа, которые со временем продолжают нарастать. Различия в концентрациях в зависимости от типа МКЛ появляются в срок 24 и 30 мес контактной коррекции – более существенное нарастание регистрируется у пациентов, пользующихся ГЛ (см. таблицу).

Исходя из полученных данных, можно заключить, что пользование ГЛ в течение длительного времени способствует изменению метаболизма роговицы, развитию гипоксического стресса эпителиальных клеток и приводит к бессимптомному хроническому воспалительному процессу.

Сравнительный анализ показателей в группах с осложнениями и без осложнений показал, что у пациентов с лимбальной гиперемией и стромальным отеком значения VEGF и sVEGF R1/Flt-1 были выше, чем у тех, кто пользовался ГЛ без осложнений в период “24 месяца коррекции”, и составляли от них 126,2% (*p* = 0,046) и 151,9% (*p* = 0,047) соответственно.

У лиц с неоваскуляризацией роговицы наблюдалось резкое повышение концентрации VEGF, которая на 87% (*p* = 0,003) превышала таковую в группе без осложнений, а также на 48,2% (*p* = 0,036) была выше, чем в подгруппе с лимбальной гиперемией и стромальным отеком. Кроме того, высоким было содержание sVEGF R1/Flt-1 и sVEGF R2/

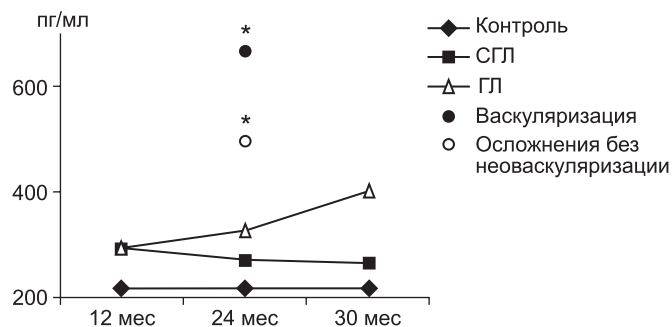


Рис. 1. Уровень sVEGF R1/Flt-1 в СЖ у пациентов с миопией в динамике ношения МКЛ.

* – здесь и на рис. 2, 3 достоверные различия с группой лиц, носивших ГЛ без осложнений.

KDR/Flk-1 – 204,3% ($p = 0,008$) и 122,7% ($p < 0,001$) соответственно от показателей в группе без осложнений и 134,6% ($p = 0,015$) и 116,5% ($p = 0,027$) от значений в подгруппе лиц с лимбальной гиперемией и стромальным отеком.

Концентрации MPC-1 и MMP-9 в зависимости от глубины гипоксических повреждений менялись следующим образом (см. таблицу): у пациентов с лимбальной гиперемией и стромальным отеком уровень MPC-1 был на 50,5% ($p = 0,002$), а MMP-9 – на 42,1% ($p = 0,036$) выше, чем у лиц без осложнений. На фоне неоваскуляризации значения как MPC-1 – на 152,4% ($p < 0,001$), так и MMP-9 – на 96,3% ($p < 0,001$) оказались больше, чем в группе без осложнений, а также выше, чем в подгруппе пациентов с лимбальной гиперемией и стромальным отеком – на 67,7% ($p = 0,011$) и 38,1% ($p = 0,019$) соответственно.

Таким образом, при гипоксических осложнениях контактной коррекции регистрируются существенные изменения концентраций изучаемых иммунологических показателей. При более глубоких повреждениях роговицы, а именно неоваскуляризации, изменения более выражены.

Сравнительный анализ показал, что высокие цифры сосудисто-эндотелиального фактора роста, а также VEGF R2/KDR/Flk-1, регистрируемые у пациентов, пользующихся ГЛ без осложнений на 30 мес коррекции, находятся на уровне таковых у пациентов с развившимися лимбальной гиперемией и стромальным отеком, что исключает возможность использования данных показателей в качестве диагностических критериев именно этих осложнений.

Тем не менее цифры sVEGF R1/Flt-1 при лимбальной гиперемии и стромальном отеке были на 23,4% ($p = 0,048$) выше, чем у пользующихся ГЛ без видимых осложнений (рис. 1).

На фоне неоваскуляризации концентрация VEGF превышала таковую у пользующихся ГЛ в течение 30 мес без осложнений на 40,9% ($p = 0,020$), уровень sVEGF R1/Flt-1 –

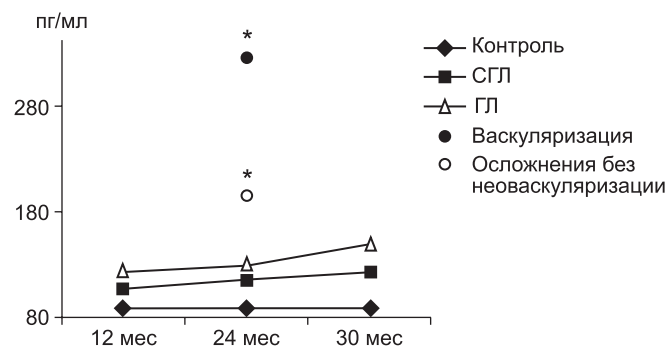


Рис. 2. Уровень MPC-1 в СЖ у пациентов с миопией в динамике ношения МКЛ.

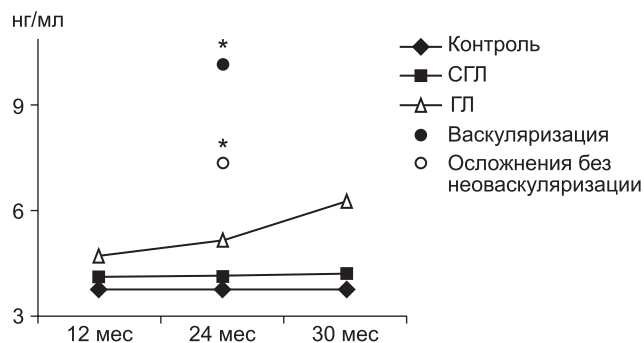


Рис. 3. Уровень MMP-9 в СЖ у пациентов с миопией в динамике ношения МКЛ.

на 66,0% ($p = 0,001$), значения VEGF R2/KDR/Flk-1 – на 11,1% ($p = 0,041$).

На сегодняшний день физиологическая активность VEGF вызывает огромный интерес. Экспрессия VEGF стимулируется множеством проангиогенных факторов, включая эпидермальный и другие ростовые факторы и интерлейкин-1 β . Кроме того, гипоксия индуцирует экспрессию VEGF. Последний свои эффекты реализует через рецепторы, стимулирует секрецию важных для ангиогенеза соединений, таких как антиапоптотические белки, молекулы клеточной адгезии и металлопротеиназы [10]. VEGF активирует эндотелиальные клетки, побуждает их пролиферировать, мигрировать, и формировать сеть сосудов, усиливать проницаемость сосудистой стенки [11].

Весьма значимым, на наш взгляд, является то, что при лимбальной гиперемии и стромальном отеке количество MPC-1 было на 30,3% ($p = 0,001$) выше, чем у лиц 2-й группы без видимых осложнений через 30 мес после начала ношения ГЛ; на фоне васкуляризации роговицы – на 118,6% ($p < 0,001$) (рис. 2). MPC-1 – хемокин, контролирующий миграцию различных видов лейкоцитов из кровяного русла в ткани [12]. Помимо этого, он принимает участие в регуляции гемопоэза, ангиогенеза, реконструкции сосудов. Особенно важна его роль в патогенезе хронического субклинического воспаления (low-grade) [13].

Уровень матриксной металлопротеиназы (MMP) при осложнениях, но без неоваскуляризации тоже был выше, чем у пользующихся ГЛ на фоне отсутствия гипоксических осложнений на 17,1% ($p = 0,048$), а при неоваскуляризации – на 61,8% ($p = 0,002$) (рис. 3). MMP представляют собой семейство структурно связанных протеолитических ферментов, содержащих ион Zn²⁺ в активном центре. Установлена важная роль MMP в разных процессах жизнедеятельности, в том числе в ангиогенезе, апоптозе, ремоделировании тканей, заживлении ран, так как они обладают способностью модулировать активность факторов роста, цитокинов или их рецепторов [14]. Повышение содержания и активности MMP часто ассоциируется с прогрессированием воспалительных заболеваний [15]. Экспериментально доказано, что активация энзимов происходит под влиянием оксидативного стресса [16].

Заключение. Регистрируемые изменения в иммунологических показателях СЖ при пользовании контактными линзами вполне закономерны и указывают на наличие выраженных в той или иной степени скрытых воспалительных реакций даже при отсутствии регистрируемых осложнений. Полученные результаты, на наш взгляд, позволяют разработать по показателям СЖ диагностические критерии для оценки риска развития гипоксических осложнений у пользующихся контактными линзами и обоснования подбора пациентам оптимального типа контактных линз. Увеличение sVEGF R1/Flt-1, повышение концентрации MPC-1 и MMP-9 в СЖ может прогнозировать развитие лимбальной гиперемии и стромального отека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоусов В.В. Контактные линзы в 2013 году: тенденции. *Вестник оптометрии*. 2013; 1: 31-4.
2. Nichols J.J. Deposition on silicone hydrogel lenses. *Eye. Contact. Lens*. 2013; 39 (1): 20-3.
3. Егоров Е.А., Свиринов А.В., Рыбакова Е.Г. *Неотложная офтальмология: учебное пособие. 2-е изд.* М.: ГЭОТАР-Медиа; 2005.
4. Гиллон М., Маиса С. Отдаленные эффекты влияния дневного ношения силикон-гидрогелевых контактных линз из сенофилкона А на ткани глаза. *Вестник оптометрии*. 2011; 3: 33-7.
5. Ковалевская М.А., Симбирцев А.С. Особенности диагностики клинических проявлений и терапии осложнений у пользователей контактными линзами. *Вестник оптометрии*. 2009; 7: 36-42.
6. Kaufman H.E. The practical detection of mmp-9 diagnoses ocular surface disease and may help prevent its complications. *Cornea*. 2013; 32 (2): 211-6.
7. Gregory De Naeyer W. Осложнения, связанные с ношением контактных линз: диагностика и оказание помощи. *Глаз*. 2010; 2: 2-7.
8. Fodor M. Effect of contact lens wear on the release of tear mediators in keratoconus. *Eye. Contact. Lens*. 2013; 39 (2): 147-52.
9. Poyraz C., Irkeç M., Mocan M.C. Elevated tear interleukin-6 and interleukin-8 levels associated with silicone hydrogel and conventional hydrogel contact lens wear. *Eye. Contact. Lens*. 2012; 38(3): 146-9.
10. Murdaca G., Spanò F., Miglino M., Puppo F. Effects of TNF- α inhibitors upon the mechanisms of action of VEGF. *Immunotherapy*. 2013; 2: 113-5.
11. Лихванцева В.Г., Белоус О.В., Арутюнян Е.В. VEGF-зависимая антиангиогенная терапия в офтальмологии. *Офтальмохирургия*. 2011; 1: 82-7.
12. Кетлинский С.А. *Цитокины*. СПб.: Фолиант; 2008.
13. Enríquez-de-Salamanca A., Calonge M. Cytokines and chemokines in immune-based ocular surface inflammation. *Expert Rev. Clin. Immunol*. 2008; 4 (4): 457-67.
14. Ecker S.M. Sequential in-office vitreous aspirates demonstrate vitreous matrix metalloproteinase 9 levels correlate with the amount of subretinal fluid in eyes with wet age-related macular degeneration. *Mol. Vis*. 2012; 18: 1658-67.
15. Sakimoto T. Upregulation of matrix metalloproteinase in tear fluid of patients with recurrent corneal erosion. *Jpn. J. Ophthalmol*. 2007; 51 (5): 343-6.
16. Zhong Q., Kowluru R.A. Regulation of matrix metalloproteinase-9 by epigenetic modifications and the development of diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2013; 62 (7): 2559-68.

REFERENCES

1. Belousov V.V. Contact lenses in 2013: trends. *Vestnik optometrii*. 2013; 1: 31-4. (in Russian)
2. Nichols J.J. Deposition on silicone hydrogel lenses. *Eye. Contact. Lens*. 2013; 39 (1): 20-3.
3. Egorov E.A., Svirin A.V., Rybakov E.G. *Emergency ophthalmology: textbook. 2nd ed.* Moscow: GEOTAR-Media; 2005. (in Russian)
4. Gillon M., Maisa C. Long-term effects influence daily wear silicone hydrogel contact lenses senofilkona And on the eye tissues. *Vestnik optometrii*. 2011; 3: 33-7. (in Russian)
5. Kovalevskaya M.A., Simbirtsev A.S. The diagnosis of clinical manifestations and treatment of complications in contact lens wearers. *Vestnik optometrii*. 2009; 7: 36-42. (in Russian)
6. Kaufman H.E. The practical detection of mmp-9 diagnoses ocular surface disease and may help prevent its complications. *Cornea*. 2013; 32 (2): 211-6.
7. Gregory De Naeyer W. Complications associated with wearing contact lenses: diagnosis and care. *Glaz*. 2010; 2: 2-7. (in Russian)
8. Fodor M. Effect of contact lens wear on the release of tear mediators in keratoconus. *Glaz. Contact. Lens*. 2013; 39 (2): 147-52.
9. Poyraz C., Irkeç M., Mocan M.C. Elevated tear interleukin-6 and interleukin-8 levels associated with silicone hydrogel and conventional hydrogel contact lens wear. *Eye. Contact. Lens*. 2012; 38 (3): 146-9.
10. Murdaca G., Spanò F., Miglino M., Puppo F. Effects of TNF- α inhibitors upon the mechanisms of action of VEGF. *Immunotherapy*. 2013; 2: 113-5.
11. Likhvantseva V.G., Belous O.V., Arutyunyan E.V. VEGF-dependent anti-angiogenic therapy in ophthalmology. *Oftal'mokhirurgiya*. 2011; 1: 82-7. (in Russian)
12. Ketlinskiy S.A. *Cytokines*. St. Petersburg: Foliant; 2008. (in Russian)
13. Enríquez-de-Salamanca A., Calonge M. Cytokines and chemokines in immune-based ocular surface inflammation. *Expert Rev. Clin. Immunol*. 2008; 4 (4): 457-67.
14. Ecker S.M. Sequential in-office vitreous aspirates demonstrate vitreous matrix metalloproteinase 9 levels correlate with the amount of subretinal fluid in eyes with wet age-related macular degeneration. *Mol. Vis*. 2012; 18: 1658-67.
15. Sakimoto T. Upregulation of matrix metalloproteinase in tear fluid of patients with recurrent corneal erosion. *Jpn. J. Ophthalmol*. 2007; 51 (5): 343-6.
16. Zhong Q., Kowluru R.A. Regulation of matrix metalloproteinase-9 by epigenetic modifications and the development of diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2013; 62 (7): 2559-68.

Поступила 14.05.14
Received 14.05.14