

Зборовская А.В., Величко Л.Н., Насинник И.О.,
Пасечникова Н.В., Богданова А.В., Дорохова А.В.

ПРИМЕНЕНИЕ ИНТЕРЛЕЙКИНА-10 В ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО УВЕИТА

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины», Одесса, Украина

Ключевые слова: *экспериментальный увеит, интерлейкин 10, иммунологические эффекты*

Проблема эндогенных увеитов является актуальной ввиду высокой заболеваемости в трудоспособном возрасте и приводит к развитию слепоты и слабовидения у 10 - 30 % переболевших [1].

Ряд исследований показали повышение уровней провоспалительных цитокинов в крови и внутриглазных жидкостях при увеитах различной этиологии [2, 3]. Тяжелое и длительное лечение увеита и неблагоприятный исход ассоциируется с более высокими уровнями провоспалительных цитокинов в слезной жидкости и крови. Уровень содержания цитокинов может служить одним из критериев иммунообусловленности воспаления [4, 5]. В настоящее время нет полного представления об особенностях местного и системного иммунного реагирования с участием цитокинов при поражении оболочек глаза вирусами и при увеитах, ассоциированных с системными ревматическими заболеваниями, а следовательно, недостаточно обоснованы направления патогенетически ориентированной коррекции нарушений цитокинового статуса.

Природа иммунного ответа определяется цитокинами, которые продуцируются активированными клетками иммунной системы. При повреждении тканей цитокины вызывают цепь событий, ведущих к миграции нейтрофилов из кровеносного русла и формированию острого воспаления. В основе механизма их действия лежит способность влиять на дифференцировку, пролиферацию и гибель клеток [6].

Интерлейкин 10 (ИЛ-10) является важным иммунорегуляторным цитокином, продуцируемым многими клеточными популяциями. Его основной биологической функцией является ограничение и прекращение воспалительных реакций и регуляция дифференцировки и пролиферации некоторых иммунных клеток, таких как Т-клетки, В-клетки, естественные киллеры, антиген-презентирующие клетки, тучные клетки и гранулоциты. Также есть данные, свидетельствующие о том, что ИЛ-10 также опосредует иммуностимулирующие свойства, которые помогают устранять инфекционные и неинфекционные частицы с ограничением воспаления [7].

Есть данные об исследовании роли ИЛ-10 при меланоме, карциноме, лимфоме, системной красной волчанке, аллергическом контактном дерматите, рассеянном склерозе, астме, а также по применению в клинической практике при ревматоидном артрите, псориазе, болезни Крона, гепатите С [7, 8, 9].

Были проведены исследования по применению ИЛ-10 при увеитах. В исследовании V.L. Calder с соавторами было установлено снижение уровня ИЛ-10 во водянистой влаге как при идиопатических передних увеитах, так и при увеитах, ассоциированных с системными заболеваниями [10].

В исследовании К.А. Broderick с соавторами показано, что субретинальная инъекция векторов на основе аденоассоциированных вирусов кодирующих мышинный ИЛ-10 мышам породы C57BL/6 значительно снижает тяжесть экспериментального аутоиммунного увеита. Авторы связывают это со снижением количества и активации инфильтрирующих моноцитов при экспериментальном аутоиммунном увеите [11].

В исследовании J.T. Rosenbaum и J.T. Angell 1995 г. Авторы оценивали способность ИЛ-10 ингибировать эндотоксининдуцированный увеит у кроликов и мышей. Было установлено блокирование воспалительных эффектов интравитреальной инъекции эндотоксина кишечной палочки при интравитреальном введении ИЛ-10. При интраперитонеальном введении эндотоксина противовоспалительные эффекты ИЛ-10 были дозозависимыми. Авторы считают, что их наблюдения совместимы с гипотезой, что местное введение ИЛ-10 действует через снижение синтеза цитокинов при этих моделях увеита [12].

В другом исследовании, проведенном под руководством S. Hayashi (1995), на модели увеита на мышах, вызванной подкожной инъекцией липополисахарида, исследовали противовоспалительные эффекты внутривенной инъекции ИЛ-10 (за 4 часа, 30 минут до инъекции и 8 часов после введения липополисахарида). Авторы установили, что ИЛ-10 снижает клеточную инфильтрацию при глазном воспалении, вызванном эндотоксином, и сделали предположение о потенциальной пользе применения ИЛ-10 в лечении тяжелого переднего увеита с выраженным клеточным компонентом [13].

Таким образом, ИЛ-10, будучи супрессивным цитокином, обладает способностью подавлять иммунное воспаление, является важнейшим регулятором цитокинов, во многом определяющим направленность иммунных реакций.

Цель исследования – провести оценку эффективности интравитреального введения интерлейкина-10 при экспериментальном увеите.

Материал и методы

Исследование проводилось на 16 кроликах породы Шиншилла на базе вивария ГУ «Институт Глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины». В процессе моделирования увеита животному проводилась общая сенсibilизация сывороткой лошадиной нормальной для бактериологических питательных сред. Сыворотка вводилась в бедро подкожно один раз в неделю в течение пяти недель. Затем вводилась разрешающая доза лошадиной сыворотки в переднюю камеру глаза. Для проведения эксперимента животные были разделены на две группы, по восемь кроликов в каждой группе. В первой группе за сутки перед введением разрешающей дозы в переднюю камеру было проведено интравитреальное введение 0,05 мл ИЛ-10. Во второй группе (контрольной) введение интерлейкина не проводилось. Длительность наблюдения составила 5 недель. Тяжесть увеита оценивалась по степени воспалительной реакции (гиперемия конъюнктивы, опалесценция влаги передней камеры, наличие гипопиона и экссудатов в передней камере, преципитаты, синехии), степени отека и васкуляризации роговицы. Осуществлялась биомикроскопия и фотографирование глаз кроликов.

Всем животным проводились развернутые иммунологические исследования – до начала эксперимента, перед введением ИЛ-10, перед введением разрешающей дозы в переднюю камеру, перед выводом из эксперимента. При иммунологическом исследовании определялись лейкоциты, лимфоциты, Т-лимфоциты, Т-лимфоциты-хелперы, Т-лимфоциты-супрессоры, иммунорегуляторный индекс, В-лимфоциты, естественные киллеры и фагоцитарная активность нейтрофилов. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы «Statistica 7.0». Определялись средние значения со стандартным отклонением ($M \pm SD$). Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На второй день после введения разрешающей дозы у всех кроликов в обеих группах развился передний увеит. В первой группе (опытной) у всех животных наблюдалась смешанная инъекция, отек роговицы, единичные преципитаты, опалесценция влаги передней камеры (феномен Тиндаля «+»), единичные задние синехии, отмечался розовый рефлекс глазного дна. Возникшая симптоматика соответствовала увеиту средней тяжести. У всех кроликов второй группы (контрольной) при осмотре выявлялись - смешанная инъекция, отек роговицы, преципитаты, опалесценция влаги передней камеры (феномен Тиндаля «++++»), гипопион и множественные задние синехии. Проведение офтальмоскопии не представлялось возможным из-за снижения прозрачности оптических сред глаза. Развившаяся клиническая картина расценивалась как увеит тяжелой степени. Отмеченные различия в интенсивности воспалительного процесса в опытной и контрольной группах, представлены на следующих фотографиях (рис. 1-4).

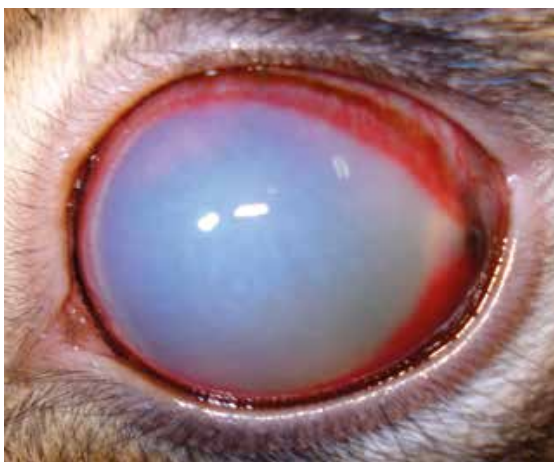


Рис. 1. Фотография переднего отрезка глаза кролика контрольной группы через пять дней после введения разрешающей дозы лошадиной сыворотки в переднюю камеру глаза. Отмечается смешанная инъекция, выраженный отек и неоваскуляризация роговицы

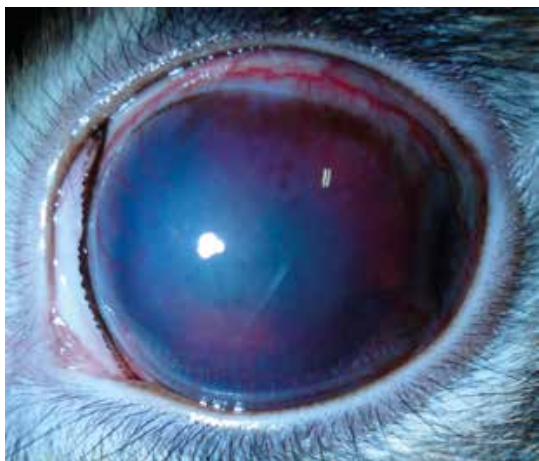


Рис. 2. Фотография переднего отрезка глаза кролика контрольной группы через пять недель после введения разрешающей дозы лошадиной сыворотки в переднюю камеру глаза. Отмечается выраженное помутнение и неоваскуляризация роговицы, гематокорнеа

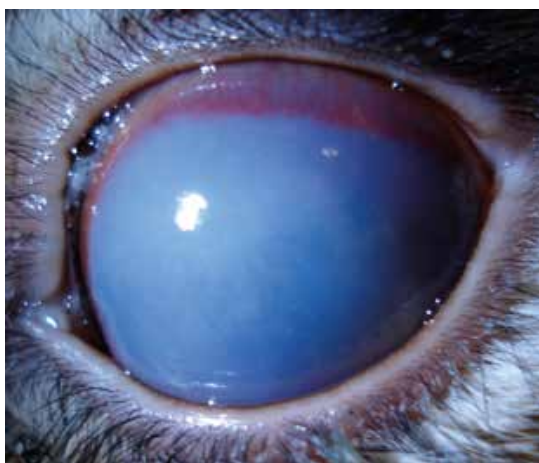


Рис. 3. Фотография переднего отрезка глаза кролика контрольной группы через пять дней после введения разрешающей дозы лошадиной сыворотки в переднюю камеру глаза. Отмечается смешанная инъекция, выраженный отек и неоваскуляризация роговицы. Офтальмоскопия глазного дна невозможна



Рис. 4. Фотография переднего отрезка глаза кролика контрольной группы через пять недель после введения разрешающей дозы лошадиной сыворотки в переднюю камеру глаза. Облаковидное помутнение роговицы. Участки атрофии радужки

Проведенные иммунологические исследования показали уменьшение количества лейкоцитов, лимфоцитов, нормализацию иммунорегуляторного индекса и увеличение содержания естественных киллерных клеток у кроликов опытной группы (получивших ИЛ-10) в сравнении со второй группой (контрольной).

Таким образом, наши исследования показали, что введение ИЛ-10 вызвало снижение воспалительного процесса в глазном яблоке. При этом в контрольной группе отмечалась интенсификация воспалительного процесса (смешанная инъекция, отек роговицы, преципитаты, опалесценция влаги передней камеры (феномен Тиндаля «+++»)). При иммунологическом исследовании уже на второй неделе после интравитреального введения ИЛ-10, отмечена нормализация содержания лейкоцитов ($4,9 \pm 0,1$ и $6,0 \pm 1,2$), количества

лимфоцитов ($1,76 \pm 0,07$ и $2,1 \pm 0,09$ %), иммунорегуляторного индекса ($2,09 \pm 0,05$ и $2,9 \pm 0,08$) по сравнению с контрольной группой. Достоверное увеличение процентного содержания естественных киллерных клеток ($13,6 \pm 0,57$ % и $10,3 \pm 0,67$ %) по сравнению с контрольной группой отмечено на четвертой неделе после интравитреального введения ИЛ-10.

Динамика изменения иммунорегуляторного индекса в опытной и контрольной группах животных представлена на рисунке 5.

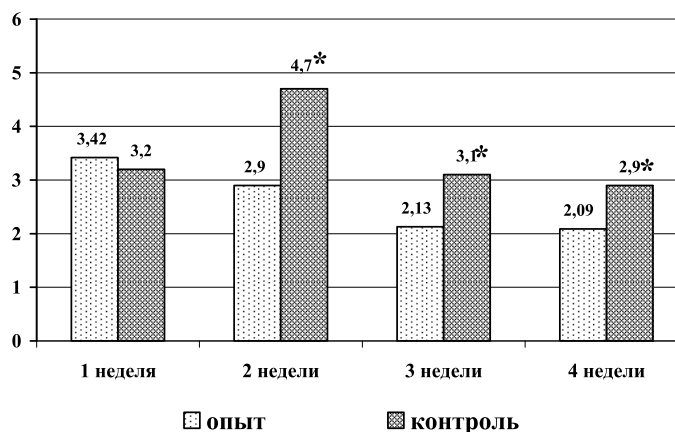


Рис. 5. Динамика изменения иммунорегуляторного индекса в опытной и контрольной группах животных (* - $p < 0,05$)

Динамика изменения процентного содержания естественных киллерных клеток в опытной и контрольной группах животных представлена на рисунке 6.

Следует отметить, что при воспалительных заболеваниях глаз патогенетически неблагоприятные реакции развиваются как на местном, так и на системном уровне. Рядом исследователей [6, 14] отмечено, что при сравнении уровней продукции противовоспалительных цитокинов местно (в передней камере глаза и слезной жидкости) и в сыворотке крови, местная продукция данных факторов значительно превосходит системные уровни продукции и может свидетельствовать об их внутриглазном синтезе. Таким образом, интравитреальное введение ИЛ-10 обеспечило противовоспалительный эффект при моделировании аутоиммунного увеита у кроликов.

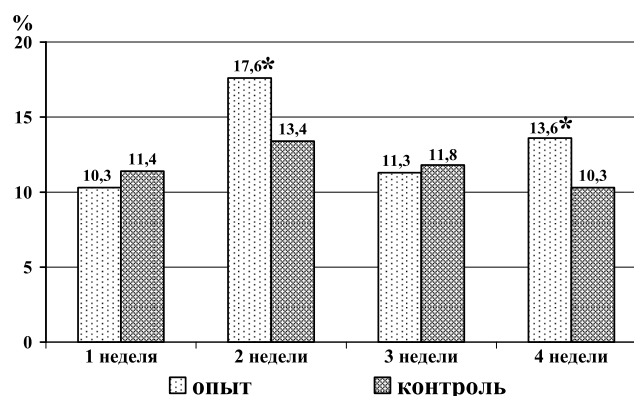


Рис. 6. Динамика изменения процентного содержания естественных киллерных клеток в опытной и контрольной группах животных (* - $p < 0,05$)

Заключение

Таким образом, интравитреальное введение ИЛ-10 на фазе инициации воспалительного процесса при моделировании увеита тяжелой степени на кроликах, приводит к снижению воспалительной реакции глаза. Проведенное нами экспериментальное исследование на модели аутоиммунного увеита у кроликов показало, что применение ИЛ-10 оказывает иммуномодулирующий эффект, заключающийся в нормализации содержания лейкоцитов и лимфоцитов, оптимизации иммунорегуляторного индекса, увеличении продукции естественных киллерных клеток.

LİTERATURA:

1. Сухина Л.А., Лысенко А.Г., Юлиш М.Е. Оптимизация диагностики и лечения хронических рецидивирующих увеитов у детей, обусловленных персистирующими внутриклеточными инфекциями // Офтальмология. Восточная Европа.- 2014.- № 2 (21).- С. 20-26.
2. Зайнутдинова Г.Х., Шевчук Н.Е., Мальханов В.Б., Сергеева О.А. Цитокиновый профиль и уровень гормонов щитовидной железы у пациентов с эндогенными увеитами // Цитокины и Воспаление.- 2011.- Т. 10.- № 2.- С. 70-74.
3. Kenneth G.-J., Galatowicz G, Calder V.L., Lightman S.L. Cytokines and Chemokines in Uveitis – Is there a Correlation with Clinical Phenotype? // Clin. Med. Res.- 2006.- V. 4.- № 4.- P. 294-309.
4. Шаимова В.А. Роль провоспалительных цитокинов при заболеваниях глаз (обзор литературы) // Офтальмохирургия и терапия.- 2004.- Т. 4.- № 3.- С. 30-32.
5. Imanishi J. Expression of cytokines in bacterial and viral infections and their biochemical aspects // J. Biochem.- 2000.- V. 127.- № 4.- P. 525-530.
6. Шаимова В.А. Роль провоспалительных цитокинов при заболеваниях глаз // Цитокины и Воспаление.- 2005.- Т. 4.- № 2.- С. 13-16.
7. Asadullah K., Sterry W., Volk H.D. Interleukin-10 therapy-review of a new approach // Pharmacol. Rev.- 2003.- V. 55.- № 2.- P. 241-269.
8. Moore K.W., de Waal M.R., Coffman R.L., O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor // Annu Rev. Immunol.- 2001.- V. 19.- P. 683-765.
9. Reich K., Garbe C., Blaschke V. et al. Response of psoriasis to Interleukin-10 is associated with suppression of cutaneous type 1 inflammation, downregulation of the epidermal interleukin-8/CXCR2 pathway and normalization of keratinocyte maturation // J Invest. Dermatol.- 2001.- V. 116.- P. 319-329.
10. Calder V.L., Shaer B., Muhaya M. et al. Increased CD4+ expression and decreased IL-10 in the anterior chamber in idiopathic uveitis // Investigative Ophthalmology and Visual Science.- 1999.- V. 40.- № 9.- P. 2019-2024.
11. Broderick C.A., Smith A.J., Balaggan K.S. et al. Local administration of an adeno-associated viral vector expressing IL-10 reduces monocyte infiltration and subsequent photoreceptor damage during experimental autoimmune uveitis // Molecular Therapy.- 2005.- V. 12.- № 2.- P. 369-373.
12. Rosenbaum J.T., Angell E. Paradoxical effects of IL-10 in endotoxin-induced uveitis // J. Immunol.- 1995.- V. 155.- P. 4090-4094.
13. Hayashi S., Guex-Crosier Y., Delvaux A., Velu T., Roberge F.G. Interleukin 10 inhibits inflammatory cells infiltration in endotoxin-induced uveitis // Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology.- 1996.- V. 234.- № 10.- P. 633-636.
14. Kijlstra A. The role of cytokines in ocular inflammation // Br.J.Ophthalmol. – 1994. – vol. 78, № 12. – P. 917-920

Zborovskaya A.V., Veliçko L.N., Nasinnik İ.O., Paseçnikova N.V., Boçdanova A.V., Doroxova A.V.

EKSPERİMENTAL UVEİTİN MÜALİCƏSİNDƏ İNTERLEYKİN-10-NUN TƏTBİQİ

“Ukrayna TEA V.P.Filatov ad. Göz xəstəlikləri və toxuma terapiyası institutu” Dövlət Müəssisəsi, Odessa şəh.

Açar sözlər: *eksperimental uveit, interleykin 10, immunoloji effektlər*

XÜLASƏ

Məqsəd – eksperimental uveit zamanı interleykin-10-nun intravitreal yeridilməsinin effektivliyini qiymətləndirmək.

Material və metodlar

Tədqiqatlar 16 dovşan üzərində aparılmışdır. Uveit modelinin yaradılması zamanı heyvana at zırdabı ilə ümumi sensibilizasiya keçirilmişdir. Eksperimentin aparılması üçün heyvanlar iki qrupa bölünmüşdür, hər qrupda 8 dovşan. Birinci qrupda gün ərzində yol verilən dozanın ön kameraya yeridilməsindən öncə 0,05 ml İL-10 intravitreal

yeridilmişdir. İkinci qrupda (kontrol) interleykin tətbiq edilməmişdir. Müşahidə dövrü 5 həftə təşkil etmişdir. İmmunoloji müayinə zamanı leykositlər, limfositlər, T-limfositlər, T-limfositlər-helperlər, T-limfositlər-supressorlar, immuntənзимedicі əmsal, B-limfositlər, təbii killerlər və neytrofillərin faqositar aktivliyi müəyyən edilmişdir. Məlumatların statistik işlənməsi «Statistica 7.0» proqramının istifadəsi ilə aparılmışdır. Standart normadan kənara çıxmanın orta rəqəmi təyin edilmişdir ($M \pm SD$). $P < 0,05$ qiyməti səviyyəsində fərqlər statistik dürüst hesab edilmişdir.

Nəticə

İnterleykin-10-nun yeridilməsi göz almasında iltihabi prosesin azalmasına səbəb olmuşdur. Bu zaman kontrol qrupda iltihabi prosesin güclənməsi qeyd edilmişdir (qarışıq inyeksiya, buynuz qişanın ödemi, presipitatlar, ön kamera mayesinin opalessensiyası (Tindal fenomeni “+++”). İmmunoloji müayinə zamanı kontrol qrupla müqayisədə leykositlər, T-limfositlər və T-limfositlər-helperlər səviyyəsinin əhəmiyyətli dərəcədə enməsi, eləcə də neytrofillərin faqositar aktivliyinin əhəmiyyətli dərəcədə artması qeyd edilmişdir.

Yekun

Dovşanlarda autoimmun uveit modeli üzərində aparılan eksperimental tədqiqat göstərmişdir ki, interleykin-10-nun yeridilməsi iltihabəleyhinə və immunmodullaşdırıcı effekt göstərir.

Zborovskaya A.V., Velichko L.N., Nasinnik I.O., Bogdanova A.V., Pasechnikova N.V., Dorokhova A.E.

APPLICATION OF INTERLEYKIN 10 IN TREATMENT OF EXPERIMENTAL UVEITIS.

SI “The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy NAMS of Ukraine”, Odessa, Ukraine

Key words: *experimental uveitis, interleukin 10, immunological effects*

SUMMARY

Aim - to study the nature of immunological effects in the intravitreal introduction of interleukin-10 on the model of autoimmune uveitis in rabbits.

Material and methods

The investigation was carried out in 16 rabbits. In the process of modeling the uveitis, the animal was subjected to a general sensitization with horse serum. For the experiment, the animals were divided into two groups, eight rabbits in each group. In the first group, an intravitreal injection of 0.05 ml of IL-10 was performed a day before the administration of the resolving dose to the anterior chamber. In the second group (control) interleukin wasn't administered. The duration of the observation was 5 weeks. Immunological examination was used to determine leukocytes, lymphocytes, T-lymphocytes, T- helpers, T- suppressors, B-lymphocytes, natural killers and phagocytic activity of neutrophils. Statistical processing of data was carried out using the programme "Statistica 7.0". Mean values were determined with standard deviation ($M \pm SD$). Differences were considered statistically significant at a significance level of $p < 0.05$.

Results

The introduction of interleukin-10 caused a decrease in the inflammatory process in the eye. At the same time, in the control group, the intensification of the inflammatory process was noted (mixed injection, corneal edema, precipitates, anterior chamber flare (Tyndall phenomenon "+++")). Immunological study showed a significant decrease in the content of leukocytes, T-lymphocytes and T-lymphocytes-helpers, as well as a significant increase in the phagocytic activity of neutrophils as compared with the control group.

Conclusion

The experimental study carried out on the model of autoimmune uveitis in rabbits showed that the introduction of interleukin-10 has an anti-inflammatory and immunomodulating effect.

Для корреспонденции:

Величко Людмила Николаевна – канд. мед. наук, заведующая лабораторией иммунологии ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины»

Адрес: ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины», Французский бульвар, 49/51, г. Одесса, 65061, Украина

Тел.: (+38 048) 729-84-58, (+38) 098-441-79-28

E-mail: aleximmun@mail.ru