

УДК: 617.713-007.64

Халимов А.Р., Шевчук Н.Е., Усубов Э.Л.

## ЛОКАЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ TGF- $\beta$ У ПАЦИЕНТОВ С КЕРАТОКОНУСОМ В ДИНАМИКЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО КРОССЛИНКИНГА РОГОВИЦЫ

ГБУ «Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней Академии наук Республики Башкортостан», г. Уфа, Российская Федерация

**Ключевые слова:** кератоконус, ультрафиолетовый кросслиндинг, трансформирующий фактор роста бета

Трансформирующий фактор роста  $\beta$  (Transforming growth factor, TGF- $\beta$ ) – один из многофункциональных цитокинов, влияющих на дифференцировку клеток, их пролиферацию и апоптоз. В организме человека присутствуют 3 изоформы данного фактора:  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 3$ , отличающиеся некоторыми структурными изменениями и, соответственно, функциональными особенностями. TGF- $\beta$  синтезируется различными типами клеток, в частности, фибробластами, макрофагами, лимфоцитами, и др. Фактор усиливает продукцию белков межклеточного матрикса, способствует заживлению ран, оказывает анаболическое действие. Трансформирующий фактор роста  $\beta 1$  участвует в регенераторных тканевых процессах. Установлено, что TGF- $\beta 1$  способен индуцировать активацию и трансформацию культуры корнеальных клеток в миофибробласты.

Повреждения роговицы, как правило, сопровождаются ростом уровня TGF- $\beta 1$  в ее эпителиальном слое и строме. В зоне роговичного дефекта отмечается повышение количества фибробластов и изменение структуры межклеточного матрикса, что может способствовать развитию фиброза [1, 2].

Трансформирующий фактор роста  $\beta 2$  – один из иммуносупрессивных цитокинов, который выявляется в глазных средах: слезной жидкости, переднекамерной влаге, стекловидном теле глаза. TGF- $\beta 2$  играет важную роль при повреждениях ткани, участвуя в продуцировании компонентов экстрацеллюлярного матрикса. При этом показана роль TGF- $\beta 2$  в избыточном рубцевании, в частности, после офтальмохирургических вмешательств [3].

TGF- $\beta 2$  ингибирует пролиферацию клеток и выступает как антагонист воспалительных цитокинов. TGF- $\beta 2$  синтезируется эндотелиальными клетками роговицы, трабекулярной сети и цилиарного тела.

В последнее десятилетие для лечения эктатических заболеваний роговицы, в частности, кератоконуса, успешно применяется ультрафиолетовый (УФ) кросслиндинг роговичного коллагена [4, 5]. В основе механизма такой процедуры лежит инициация свободно-радикальных процессов с участием активных форм кислорода, которые способствуют фотохимическим взаимодействиям, в том числе между фибриллами коллагена, вызывая их «сшивание». В результате повышаются прочностные свойства роговицы, происходит уплотнение стромы, приостановка прогрессирующей дегградации корнеального коллагена и стабилизация рефракции [3].

Особый интерес представляют исследования роли УФ кросслинкинга в системе до- и послеоперационного иммунного гомеостаза роговицы при кератоконусе.

**Цель** – оценить локальное содержание трансформирующего фактора роста  $\beta 1$  и  $\beta 2$  в динамике ультрафиолетового кросслинкинга роговицы у пациентов с кератоконусом.

### Материал и методы

В клинические наблюдения были включены 32 пациента с кератоконусом I, II стадии, находившихся на лечении в ГБУ «Уфимский НИИ глазных болезней АН РБ», в том числе мужчин было 18 (56,2%), женщин – 14 (43,8%). Возраст пациентов варьировал от 25 до 34 лет (в среднем  $29 \pm 1,5$  лет). Контрольную группу составили 12 практически здоровых лиц.

Ультрафиолетовый кросслиндинг роговицы проводился в условиях операционной. Под местной анестезией, после дезинтелизации роговицы диаметром около 8 мм, производились инстилляци протектора роговицы «Декстралинк», содержащего 0,1% рибофлавин с 20% декстраном (рег. удостоверение №ФСР 2010/09071) в течение 30 минут. Состоятельность насыщения роговицы рибофлавином оценивалась по люминесценции при биомикроскопии при помощи щелевой лампы с кобальтовым (синим) светофильтром. Для УФ облучения роговицы использовали устройство «УФалинк» (рег. удостоверение №ФСР 2009/05489) в режиме 3 мВт/см<sup>2</sup>, 30 минут, длина волны 370 нм с одновременными инстилляциями (1 капля в минуту) раствора «Декстралинк».

Забор слезной жидкости для изучения уровней TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2 осуществляли в динамике исследования – до УФ кросслинkinга, на 3, 7 и 14 сутки после процедуры. Определение содержания TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2 (в пг/мл) в слезной жидкости проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем «eBioscience» (Австрия). Учет результатов осуществляли с использованием автоматического фотометра «Multiscan» при длине волны 450 нм.

Математическую обработку данных проводили с помощью стандартных методов статистики в рамках программы Statsoft Windows 6.

### Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований гендерного различия в концентрации TGF- $\beta$ 1 и - $\beta$ 2 в слезной жидкости пациентов до и после УФ кросслинkinга не выявлено.

В слезе пациентов с кератоконусом установлено статистически достоверное ( $p < 0,01-0,001$ ) повышение локального уровня фактора роста:  $\beta$ 1 - в 10 раз и  $\beta$ 2 - более чем в 25 раз, по сравнению с данными группы контроля (рис. 1.) Это свидетельствует о включении компенсаторных механизмов, направленных на усиление коллагенсинтетических процессов в роговице с кератоконусом.

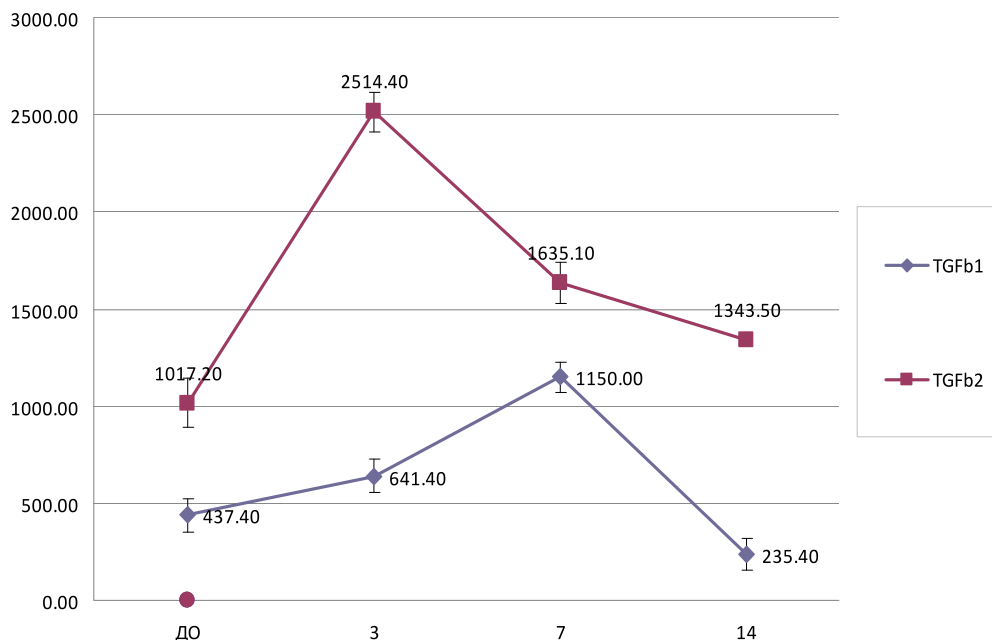


Рис.1. Содержание TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2 в слезной жидкости пациентов с кератоконусом после стандартного УФ кросслинkinга роговицы в динамике исследования (пг/мл)  
Контроль: уровни TGF- $\beta$ 1 –  $40,6 \pm 7,2$  пг/мл; TGF- $\beta$ 2 –  $36,8 \pm 5,5$  пг/мл. По оси абсцисс – период наблюдений (сут), по оси ординат – концентрация (пг/мл) TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2 в слезной жидкости

Исследование концентрации TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2 в слезе в динамике УФ кросслинkinга выявило значимое повышение факторов в раннем послеоперационном периоде (3 сут) соответственно в 1,5 раза и в 2 раза ( $p < 0,001$ ). При этом отмечали максимальный уровень TGF- $\beta$ 2. Клинически наблюдали практически завершенную эпителизацию дефекта роговицы, вызванного проведением стандартной процедуры УФ сшивания.

Концентрация трансформирующего фактора роста  $\beta$ 1 в слезной жидкости достигла максимальной величины на 7 сутки исследования, достоверно ( $p < 0,001$ ) отличаясь от дооперационного уровня и показателей контроля, тогда как значение TGF- $\beta$ 2, напротив, снизилось. Данные биомикроскопии в этот же срок: глаза пациентов спокойные, каких-либо проявлений роговичного синдрома не отмечали.

14-е сутки после проведенного УФ кросслинkinга характеризовались снижением локального уровня TGF- $\beta$ 1 и - $\beta$ 2, относительно предыдущего срока исследования, хотя концентрация факторов по-прежнему была достоверно ( $p < 0,01-0,001$ ) выше контрольных значений.

Ультрафиолетовый кросслинkinг роговицы сопровождается статистически значимым повышением уровня TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2 в слезной жидкости пациентов кератоконусом, свидетельствующим об индукции их синтеза клетками роговицы.

Известно, что укрепляющий эффект роговицы при выполнении УФ кросслинkinга возникает за счет перекрестного связывания коллагеновых фибрилл посредством образования новых межфибриллярных связей, возникающих в результате фотохимических реакций с участием активных форм кислорода [3], оказывающих также и повреждающий эффект, в частности, на кератоциты.

Как известно, одной из причин развития кросслинkinг-индуцированных осложнений (временные отеки, хейзы) является избыточный апоптоз кератоцитов, развивающийся в раннем послеоперационном периоде. Активация апоптоза при УФ кросслинkinге может быть опосредована не только свободно-радикальными механизмами, но и TGF- $\beta$ , которые способны активировать каскад Smad белков и другие сигнальные пути клеточной гибели. Так, TGF- $\beta$ 1 индуцирует апоптоз как через p53-зависимые, так и p53-независимые механизмы, посредством регуляции проапоптозных (Bax) и антиапоптозных (Bcl-2) белков. Однако, вместе с тем имеются сведения об ингибирующем действии TGF- $\beta$  на свободно-радикальные процессы за счет его способности непосредственно перехватывать образующиеся активные формы кислорода [1].

Дальнейшее изучение роли трансформирующих факторов роста бета как при кератоконусе, так и в условиях фототерапии методом ультрафиолетового кросслинkinга, приблизит нас к пониманию механизмов развития патологического процесса в роговице и, при необходимости, будет способствовать разработке патогенетически ориентированных способов коррекции цитокинового дисбаланса.

#### Заклучение

УФ кросслинkinг коллагена роговицы способствует усилению синтеза трансформирующих факторов роста  $\beta$ , что проявляется повышением их концентрации в слезе после процедуры. Рост уровня TGF- $\beta$ 1 происходит медленнее, его максимальное значение отмечается на 7-е сутки после УФ сшивания, тогда как TGF- $\beta$ 2 – уже на 3 сутки. Усиление синтеза указанных факторов может быть ответом на деэпителизацию роговицы и активацию процессов свободно-радикального окисления, индуцированных воздействием ультрафиолета. Кроме того, значительный локальный рост уровня TGF- $\beta$ 1 и - $\beta$ 2, очевидно, обусловлен запуском первичных механизмов «уплотнения» стромы, которые лежат в основе последующей стабилизации прочностно-механических свойств роговицы.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Wu X.Y., Yang Y.M., Guo H. et al. The role of connective tissue growth factor, transforming growth factor beta1 and Smad signaling pathway in cornea wound healing // Chin. Med. J. (Engl.), 2006, v.119(1), p.57-62.
2. Yamashita H., Tobarı I., Sawa M. et al. Functions of the transforming growth factor-beta superfamily in eyes // Nippon Ganka Gakkai Zasshi., 1997, v.101(12), p.927-947.
3. Бикбов М.М., Халимов А.Р., Усубов Э.Л. Ультрафиолетовый кросслинkinг роговицы // Вестн. Росс. акад. мед. наук, 2016, т.71, №3, с.224-232.
4. Бикбов М.М., Бикбова Г.М. Эктазии роговицы. М., 2011, 162 с.
5. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus // Am. J. Ophthalmol., 2003, v.135(5), p.620-627

Xalimov A.R., Şevçuk N.E., Usubov E.L.

### BUYNUZ QIŞANIN ULTRABƏNÖVŞƏYİ KROSSLINKİNQİ DİNAMİKASINDA KERATOKONUS İLƏ PASİYENTLƏRİN TGF-B LOKAL SƏVİYYƏSİ

“Ufa ET göz xəstəlikləri institutu Başkörtostan Respublikası EA” DBM, Ufa şəh., Rusiya

**Açar sözlər:** keratokonus, ultrabənövşəyi krosslinkinq, beta transformasiyaedici böyümə faktorı

#### XÜLASƏ

**Məqsəd** – keratokonusu olan pasiyentlərdə buynuz qişanın ultrabənövşəyi krosslinkinqi dinamikasında  $\beta$ 1 və  $\beta$ 2 transformasiyaedici böyümə faktorunun lokal səviyyəsini qiymətləndirmək.

**Material və metodlar**

Buynuz qişanın standart ultrabənövşəyi krosslinkinqindən 3, 7 və 14 sutka sonra keratokonusu olan 32 pasiyentin göz yaşı mayesində  $\beta 1$  və  $\beta 2$  transformasiyaedici böyümə faktorunun tərkibi tədqiq edilmişdir.

**Nəticə**

Keratokonuslu pasiyentlərdə müalicədən əvvəl  $\beta 1$  və  $\beta 2$  transformasiyaedici böyümə faktoru səviyyəsinin yüksək olması və ultrabənövşəyi krosslinkinqdən sonra əməliyyatdan sonrakı yaxın dövrdə onların daha da artması təyin edilmişdir. TGF- $\beta 1$  səviyyəsinin artımı tədriclə baş verir, onun maksimal göstəricisi ultrabənövşəyi bitişmədən sonra 7-ci sutkada, TGF- $\beta 2$  səviyyəsinin isə - 3 sutkada qeyd olunur.

**Yekun**

Buynuz qişa kollageninin ultrabənövşəyi krosslinkinqi transformasiyaedici böyümə faktorları sintezinin güclənməsinə şərait yaradır, bu da buynuz qişanın deepitelizasiyası və sərbəst-radikal oksidləşmə proseslərinin aktivləşməsi ilə, həmçinin stromanın "sıxlaşma" ilkin mexanizmlərinin işə düşməsi ilə şərtlənə bilər.

Khalimov A.R., Shevchuk N.E., Usubov E.L.

## THE LOCAL CONCENTRATION OF TGF-B IN PATIENTS WITH KERATOCONUS AFTER ULTRAVIOLET CORNEAL CROSS-LINKING

*State Budgetary Institution «The Ufa Eye Research Institute of the Academy of Sciences of the Republic of Bashkortostan», Ufa, Russian Federation*

**Key words:** *keratoconus, UV cross-linking, transforming growth factor beta*

### SUMMARY

**Aim** - to assess the local concentration of the transforming growth factor  $\beta 1$  and  $\beta 2$  after ultraviolet corneal cross-linking in patients with keratoconus

**Material and methods**

The level of transforming growth factors  $\beta 1$  and  $\beta 2$  in the tear fluid of 32 patients with keratoconus was studied on the 3rd, 7th and 14th days after the standard UV corneal cross-linking.

**Results**

Elevated levels of TGF $\beta 1$  and  $\beta 2$  in patients with keratoconus before the treatment and their growth in the early postoperative period after UV cross-linking were observed. The increase of the TGF- $\beta 1$  level occurs more slowly, its maximal concentration is observed on the 7th day after UV cross-linking, whereas the maximal concentration of TGF- $\beta 2$  is observed on the third day.

**Conclusion**

UV cross-linking of corneal collagen enhances the synthesis of transforming growth factors, which can be caused by de-epithelialization of the cornea, free radical oxidation processes induced by ultraviolet light, and by triggering the primary mechanisms of "densification" of the stroma.

### Для корреспонденции:

*Халимов Азат Рашидович, канд. биол. наук, зав. научно-производственным отделом ГБУ «Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней Академии наук Республики Башкортостан»*

*Усубов Эмин Логман оглы, канд. мед. наук, зав. отделением хирургии роговицы и хрусталика ГБУ «Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней Академии наук Республики Башкортостан»*

*Адресс: 450008, г. Уфа, ул. Пушкина, д. 90*

*Тел.: +7 (347) 2723775,*

*E-mail: eye@anrb.ru; azrakhal@yandex.ru; emines.us@inbox.ru, l\_c\_u@mail.ru;*