

Местный воспалительный процесс как возможное проявление нарушений увеолимфатического оттока внутриглазной жидкости при глаукоме. Часть 2

Черных В.В., д.м.н., профессор, директор¹;

Бгатова Н.П., д.б.н., профессор, заведующая лабораторией ультраструктурных исследований³;

Ермакова О.В., врач-офтальмолог¹;

Орлов Н.Б., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики³;

Трунов А.Н., д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии^{1,2}.

¹ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава РФ, Новосибирский филиал, 630096, Российская Федерация, Новосибирск, ул. Колхидская, 10;

²ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Сибирского отделения РАН, 630117, Российская Федерация, Новосибирск, ул. Тимакова, 2;

³НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН», 630117, Российская Федерация, Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

Авторы не получили финансирование при проведении исследования и написании статьи.

Конфликт интересов: отсутствует.

Для цитирования: Черных В.В., Бгатова Н.П., Орлов Н.Б., Ермакова О.В., Трунов А.Н. Местный воспалительный процесс как возможное проявление нарушений увеолимфатического оттока внутриглазной жидкости при глаукоме. Часть 2. *Национальный журнал глаукома*. 2018; 17(2):3-11.

Резюме

ЦЕЛЬ. Изучить структурные изменения в трабекулярной зоне глаза человека с использованием методов световой и электронной микроскопии и дисбаланс провоспалительных цитокинов во внутриглазной жидкости при первичной открытоугольной глаукоме (ПОУГ).

МЕТОДЫ. Исследованы фрагменты энуклеированных по медицинским показаниям глаз больных (n=28). Основная группа — 17 глаз пациентов с диагнозом «терминальная стадия ПОУГ». Полученные препараты тканей глаза изучали в световом микроскопе Leica DME. Электронно-микроскопическое исследование тканей глаза проводили на электронном микроскопе JEM 1400 (Япония). Проведено исследование 45 образцов внутриглазной жидкости от пациентов с развитой стадией ПОУГ и 30 образцов от пациентов с неосложненной катарактой. Концентрацию 17 цитокинов определяли с использованием набора фирмы «Bio Rad» (США) — Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 17-plex Assay методом проточной флуориметрии на двухлучевом лазерном анализаторе — Bio-Plex 200, «Bio-Rad», США.

РЕЗУЛЬТАТЫ. В результате проведенного исследования во внутриглазной жидкости пациентов с развитой стадией ПОУГ установлено достоверное и взаимосвя-

занное повышение концентраций провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-17А, что позволяет сделать заключение о значимости местного воспалительного процесса в механизмах развития ПОУГ. Проведенное морфологическое исследование образцов трабекулярной зоны при терминальной стадии ПОУГ выявило воспалительную инфильтрацию, деструкцию, разнонаправленность, набухание и слияние соединительнотканых пластинок, большое содержание депозитов в субэндотелиальном слое шлеммова канала, увеличение количества лизосом, набухание митохондрий в эндотелии шлеммова канала, возрастание плотности межэндотелиальных контактов, что свидетельствует о наличии местного воспалительно-деструктивного процесса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Полученные в исследовании новые фундаментальные данные с использованием световой, электронной микроскопии и мультиплексного анализа расширяют современные представления о роли местного воспалительного процесса в механизмах развития ПОУГ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитокины, внутриглазная жидкость, трабекулярный аппарат, воспаление, первичная открытоугольная глаукома.

Для контактов:

Трунов Александр Николаевич, e-mail: trunov1963@yandex.ru

ENGLISH

Local inflammatory process as a possible manifestation of intraocular fluid uveolymphatic outflow defects in glaucoma. Part 2

CHERNYKH V.V., Professor, Med.Sc.D., Director¹;

BGATOVA N.P., Professor, Biol.Sc.D., Head of the Laboratory of Ultrastructural Research³;

ERMAKOVA O.V., M.D.¹;

ORLOV N.B., Ph.D., Senior Research Associate of the Clinical Immunogenetics Laboratory³;

TRUNOV A.N., Professor, Med.Sc.D., Deputy Director for scientific work, Chief Researcher of the Laboratory of Immunology^{1,2}.

¹S.N.Fyodorov's Eye Microsurgery Federal State Institution, Novosibirsk department, 10 Kolkhidskaya str., Novosibirsk, Russian Federation, 630071;

²Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 2 Timakova str., Novosibirsk, Russian Federation, 630117;

³Scientific Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Federal Research Center of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 2 Timakova str., Novosibirsk, Russian Federation, 630117.

Conflicts of Interest and Source of Funding: none declared.

For citations: Chernykh V.V., Bgatova N.P., Orlov N.B., Ermakova O.V., Trunov A.N. Local inflammatory process as a possible manifestation of intraocular fluid uveolymphatic outflow defects in glaucoma. Part 2. *Natsional'nyi zhurnal glaukoma*. 2018; 17(2):3-11.

Abstract

PURPOSE: To study the ultrastructure of human trabecular zone by electron and light microscopy and inflammatory cytokines in intraocular fluid in primary open-angle glaucoma (POAG).

METHODS: Fragments of eye tissues enucleated for medical indications (n=28) were studied. The main group included 17 eyes of patients diagnosed with terminal stage primary open-angle glaucoma. Obtained eye tissues were studied by means of Leica DME light microscope. Electron microscopy of the eye tissues was carried out using JEM 1400 electron microscope (Japan). 45 samples of intraocular fluid from patients with advanced POAG and 30 samples from patients with uncomplicated cataract were studied. Concentrations of 17 cytokines were detected by flow fluorimetry in double-beam laser analyzer (Bio-Plex 200, «Bio-Rad», USA) using Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 17-plex Assay set («Bio-Rad», USA).

RESULTS: Inflammatory cytokines IL-6, IL-8, and IL-17 were found to be significantly and interdependently increased

in intraocular fluid of patients with advanced POAG. These results allow making a conclusion on the importance of local inflammation in POAG pathogenesis. Morphological study using light and electron microscopy detected the following changes in trabecular zone and Schlemm's canal in terminal POAG: inflammatory infiltration, destruction, multidirectionality, swelling and merging of connected tissue fibers, a big amount of extracellular material in the basal membrane of Schlemm's canal wall, an increase of lysosomes number, mitochondrial swelling in endothelium, and inter-endothelial connections density increase. These results could be considered as evidence of local inflammation and destructive processes.

CONCLUSION: The study provided new basic science data obtained by light and electron microscopy, as well as multiplex assay, helps expand modern understanding of the role of local inflammation in POAG pathogenesis.

KEYWORDS: cytokines, aqueous humor, trabecular meshwork, inflammation, primary open-angle glaucoma.

В представленных ранее в научной литературе результатах проведенных нами иммуногистохимических исследований с использованием молекулярных маркеров эндотелиоцитов лимфатических сосудов и электронной микроскопии были выявлены и описаны структурные элементы лимфатической системы в цилиарном

теле (лимфатические каналы и структурированные интерстициальные пространства — тканевые щели), в структуре хориоидеи (лимфатические каналы и лимфатические лакуны), на границе между склерой и решетчатой пластинкой зрительного нерва и в его оболочках (лимфатические каналы) [1-3].

Полученные в указанных исследованиях данные, а также известная роль лимфатической системы в поддержании гомеостаза организма, в процессах выведения ксенобиотиков, продуктов жизнедеятельности клеток, развитии деструктивно-воспалительного процесса, метаболических нарушений и др. [4], позволили сформулировать положение о наличии лимфатического (увеолимфатического) пути оттока внутриглазной жидкости, направленного на выведение и утилизацию продуктов метаболизма и точечной деструкции, и сделать предположение, что структурные нарушения в нем имеют значимость в механизмах развития первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ) и, возможно, других патологических процессов в органе зрения.

На наш взгляд, указанное находит подтверждение в выявленных нами морфоструктурных нарушениях в исследуемых зонах органа зрения при ПОУГ. Так, в цилиарном теле выявлено расширение интерстициальных пространств, увеличение просветов венозных сосудов, а также уменьшение степени экспрессии маркера эндотелия лимфатических сосудов, что свидетельствует об отеке и воспалении в изучаемой области. В хориоиде показано расширение просветов кровеносных сосудов и лимфатических каналов, набухание и увеличение размеров перикапиллярных пространств, набухание стромы хориокапиллярной пластинки и нарушение связи якорных коллагеновых волокон с миофибробластами и пигментными клетками, что также свидетельствует об отеке и наличии местного хронического воспаления в изучаемой области [1-3].

Представленные в исследованиях данные позволяют считать обоснованным предположение, что выявленные структурные изменения являются следствием нарушений трофических процессов в структурах органа зрения, особенно во внесосудистой зоне, накопления крупномолекулярных, биологически реактивных продуктов, обладающих токсическими свойствами и способных осаждаться в области трабекулярной зоны, вызывая гипоксию, повреждение и развитие деструктивно-воспалительного процесса, играющего значимую роль в патогенезе ПОУГ.

Известно, что морфологические исследования трабекулярной зоны, в том числе с использованием методов электронной микроскопии, проводятся достаточно долгое время [5]. В этих исследованиях было показано, что при глаукоматозном процессе в трабекулярном аппарате выявляется дезорганизация коллагеновых и эластических волокон, пролиферация эндотелиальных клеток, облитерация шлеммова и коллекторных каналов. Установлено, что уже на начальной стадии патологического процесса у пациентов возникают признаки деструкции, дезорганизации соединительной ткани трабекулярной зоны, наблюдается фибриноидное набухание, а в более поздних стадиях развивается

гиалиноз с потерей архитектоники трабекулярной сети и прогрессирующим её склерозированием. В ряде исследований показано, что в развитии указанных процессов могут участвовать многие биологически активные молекулы [6-13].

Таким образом, представленные в научной литературе данные, на наш взгляд, могут быть интерпретированы как последствия возникающего в патогенезе глаукомы деструктивно-воспалительного процесса, значимую роль в инициации и развитии которого играют цитокины — биологически активные молекулы, являющиеся медиаторами межклеточных взаимоотношений.

В середине 2000-х годов нами было проведено исследование цитокинов в слезной жидкости пациентов с различными стадиями ПОУГ, в которых было показано достоверное изменение концентраций ряда иммунобиохимических показателей, свидетельствующих о развитии у обследованных пациентов воспалительного процесса (повышение концентраций тbc-реактивных продуктов, свидетельствующих о активации процессов перекисного окисления липидов, основного провоспалительного цитокина — ИЛ-1 β , аутоантител к антигенам нативной ДНК и др.) [14, 15]. Дальнейшие исследования в этой области позволили выявить повышение в слезной жидкости у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой концентраций матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) и трансформирующего фактора роста- β 2 (TGF- β 2), что также свидетельствует о развитии у обследованных пациентов деструктивно-воспалительного процесса [16].

На наш взгляд, правомочность такого подхода к изучению патогенеза ПОУГ была подтверждена в работах других исследователей, занимающихся изучением роли различных цитокинов, факторов роста и других биологически активных молекул в механизмах развития заболевания [17-20].

Необходимо отметить, что использование слезной жидкости для определения цитокинов при офтальмологической патологии вызвало определенную критику со стороны ряда исследователей, считавших, что она не отражает процессов, происходящих в органе зрения. Однако данные исследований последних лет свидетельствуют о наличии корреляционных взаимосвязей между содержанием ряда цитокинов в слезной и внутриглазной жидкостях [21, 22], а крайне малый объем доступной для забора внутриглазной жидкости не позволял провести определение значимой панели цитокинов у пациентов с глаукомой. Только с появлением мультиплексного анализа появилась возможность исследования, достаточного для понимания происходящих в органе зрения процессов, спектра цитокинов во внутриглазной жидкости.

В настоящее время в научной литературе представлены данные современных научных исследований, свидетельствующих о повышении концентраций

провоспалительных цитокинов во внутриглазной жидкости при ПОУГ [23-25], однако они достаточно малочисленны, а результаты, полученные в них, не всегда находят подтверждение в других исследованиях [26].

Изложенное выше позволяет считать актуальным дальнейшее углубленное изучение морфо-структурных нарушений в трабекулярной зоне при ПОУГ в сопоставлении с дисбалансом различных классов цитокинов во внутриглазной жидкости.

Цель настоящего исследования — изучить структурные изменения в трабекулярной зоне глаза человека с использованием методов электронной и световой микроскопии и дисбаланс провоспалительных цитокинов во внутриглазной жидкости при ПОУГ.

Материалы и методы

Для решения поставленных в настоящем исследовании цели и задач были взяты фрагменты энуклеированных по медицинским показаниям глаз больных (n=28). В основную группу вошли 17 глаз с диагнозом «терминальная стадия ПОУГ». В контрольную группу вошли 11 глаз с диагнозом «меланома хориоидеи». Меланома хориоидеи располагалась постэкваториально, без распространения на смежные ткани. Энуклеация проводилась по поводу заболевания, не влияющего на структурную организацию глаза.

Для определения наличия и активности местного воспалительного процесса были обследованы 45 пациентов (16 (35,5%) мужчин, 29 (64,5%) женщин, средний возраст $62,8 \pm 4,3$ года) с верифицированным на основании офтальмологического обследования диагнозом развитой стадии ПОУГ. У всех пациентов на начальных этапах проведения антиглаукоматозной операции было забраны образцы внутриглазной жидкости (75-100 мкл), которые были заморожены и хранились при -80°C до проведения исследования.

В качестве значений сравнения определяемых в настоящем исследовании показателей внутриглазной жидкости были использованы данные, полученные при хирургическом лечении 30 пациентов с диагнозом неосложненная катаракта, составивших группу сравнения.

В качестве критериев исключения из групп являлось наличие у пациентов острых и обострения хронических воспалительных заболеваний органа зрения, неоваскулярной глаукомы, увеита различной этиологии и локализации, тотального гемофтальма, опухолевых и аутоиммунных процессов любой локализации.

Офтальмологические методы исследования. Всем пациентам диагноз ставился на основании стандартного офтальмологического обследования, включающего определение остроты зрения, бино-

кулярной офтальмоскопии, сферопериметрии, эхоофтальмографии, оптической когерентной томографии, измерения внутриглазного давления.

Лабораторные методы исследования. Для морфологического изучения биологические образцы фиксировали в 4% растворе параформальдегида, обрабатывали по стандартной гистологической методике и заливали в парафин. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином и толуидиновым синим. Полученные препараты тканей глаза изучали в световом микроскопе Leica DME и фотографировали с помощью компьютерной программы Avigion.

Для исследования в электронном микроскопе образцы трабекулярного аппарата размером до 1 мм^3 фиксировали в 4% растворе параформальдегида, приготовленном на среде Хенкса, дофиксировали в течение 1 часа в 1% растворе OsO_4 на фосфатном буфере (pH=7,4), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон («Serva», Германия). Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм на ультратоме Leica UC7/FC7 (Германия/Швейцария), окрашивали толуидиновым синим, изучали под световым микроскопом LEICA DME и выбирали необходимые участки тканей для исследования в электронном микроскопе. Из отобранного материала получали ультратонкие срезы толщиной 70-100 нм, контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1400 (Япония).

Проведение определения цитокинов. Однократно замороженная внутриглазная жидкость размораживалась перед исследованием до комнатной температуры. Для удаления осадка проводили её центрифугирование при 4°C 10 000 об/мин 10 минут. Концентрацию 17 цитокинов определяли с использованием набора фирмы «Bio Rad» (США) — Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 17-plex Assay методом проточной флюориметрии на двухлучевом лазерном анализаторе Bio-Plex 200, «Bio-Rad», США. Во внутриглазной жидкости одновременно определялись G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17, MCP-1 (MCAF), MIP-1 β , TNF- α .

Для обработки данных применялось программное обеспечение Bio-Plex manager Software version 4.1. Концентрация цитокинов выражалась в пг/мл.

В настоящей статье будут представлены данные определения содержания 3 цитокинов, изменение концентраций которых способно подтвердить наличие у пациентов активности местного воспалительного процесса:

– ИЛ-6 является провоспалительным полипептидным цитокином, участвующим в процессах хронизации воспаления, аутоиммунного реагирования и антителообразования, способным регулировать синтез ряда провоспалительных цитокинов;

– ИЛ-8, провоспалительный цитокин, продуцируемый иммунокомпетентными клетками и являющийся по своим свойствам хемоаттрактантом, высокие концентрации которого приводят к активации миграции клеток иммунной системы в очаги повреждения при развитии воспалительно-деструктивного процесса;

– ИЛ-17А, провоспалительный цитокин, секретируемый лимфоцитами Т-ряда, он способен активировать синтез цитокинов, обладающих провоспалительными свойствами, молекул клеточной и межклеточной адгезии и др.

Статистические методы исследования. Полученные цифровые данные были подвергнуты статистическому анализу и представлены в виде таблицы и графиков. Анализ данных проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 10 производства StatSoftInc. (USA). Значимость различий вариационных рядов в несвязанных выборках оценивали с помощью критерия Манна – Уитни. Корреляция показателей вычислялась по методу Спирмена. Данные в таблице представлены в виде $M \pm m$, где M — средняя, m — ошибка средней. Достоверным считали различие между сравниваемыми рядами с уровнем достоверной вероятности 95% ($p < 0,05$).

Исследование было проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека», Федеральным законом Российской Федерации от 21 ноября 2011 г. № 323 «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации», а также требованиями Федерального закона от 27.07.2006 г. № 152 (ред. от 21.07.2014) «О персональных данных» (с изм. и доп., вступ. в силу с 01.09.2015). У всех пациентов было получено информированное согласие на операции, забор внутриглазной жидкости и энуклеированного глаза, а также использование данных исследования в научных целях.

Результаты

Первым этапом настоящего исследования было изучение содержания провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-17 во внутриглазной жидкости пациентов с развитой стадией ПОУГ. При определении концентраций выбранных цитокинов у лиц обследованных групп были выявлены закономерности, представленные в табл. 1.

Концентрация ИЛ-6, провоспалительного полипотентного цитокина, участвующего в процессах хронизации воспаления, аутоиммунного реагирования и антителообразования, способного регулировать синтез ряда провоспалительных цитокинов, во внутриглазной жидкости лиц, входивших в контрольную группу, составила $4,32 \pm 0,55$ пг/мл, а его

Таблица 1. Содержание исследуемых цитокинов во внутриглазной жидкости пациентов обследованных групп, пг/мл

Table 1. Cytokine level in the intraocular fluid of studied patients, pg/ml

Показатель Indicator	ИЛ-6	ИЛ-8	ИЛ-17А
Группа Group	IL-6	IL-8	IL-17A
Контрольная, n=30 Control group	$4,32 \pm 0,55$	$1,41 \pm 0,36$	$4,66 \pm 0,64$
ПОУГ, n=45 POAG	$22,52 \pm 6,94^*$	$5,70 \pm 1,74^*$	$9,18 \pm 0,48^*$

* – $p < 0,05$, достоверно отличается от значений контрольной группы.

* – $p < 0,05$, significantly differs from the values of the control group.

содержание в исследуемой биологической жидкости у пациентов с ПОУГ составило $22,52 \pm 6,94$ пг/мл, что было в 5,2 раза выше значений показателя у пациентов контрольной группы и достоверно от него отличалось ($p < 0,001$).

Концентрация ИЛ-8, провоспалительного цитокина, являющегося по своим свойствам хемоаттрактантом, высокие концентрации которого приводят к активации миграции клеток иммунной системы в очаги повреждения при развитии воспалительно-деструктивного процесса, во внутриглазной жидкости лиц, входивших в контрольную группу, составила $1,41 \pm 0,36$ пг/мл, а его содержание в исследуемой биологической жидкости у пациентов с ПОУГ составило $5,70 \pm 1,74$ пг/мл, что было в 4 раза выше значений показателя у пациентов контрольной группы и достоверно от него отличалось ($p < 0,01$).

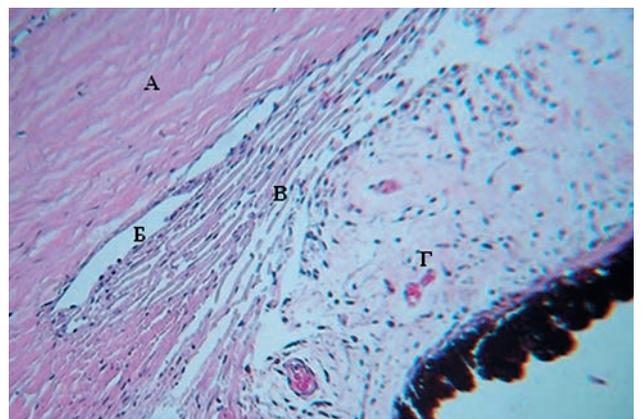


Рис. 1. Трабекулярная зона глаза человека, контрольная группа: А — склера; Б — шлеммов канал; В — трабекулярная сеть; Г — радужка. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 100$

Fig. 1. Trabecular zone of the human eye, control group: A — sclera; Б — Schlemm's canal; B — trabecular meshwork; Г — iris. Hematoxylin and eosin staining. Magnification $\times 100$

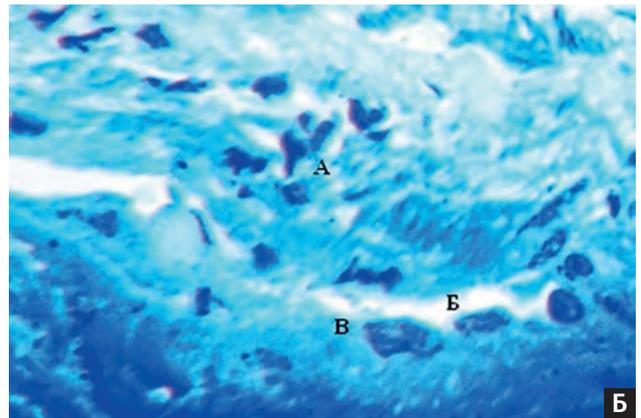
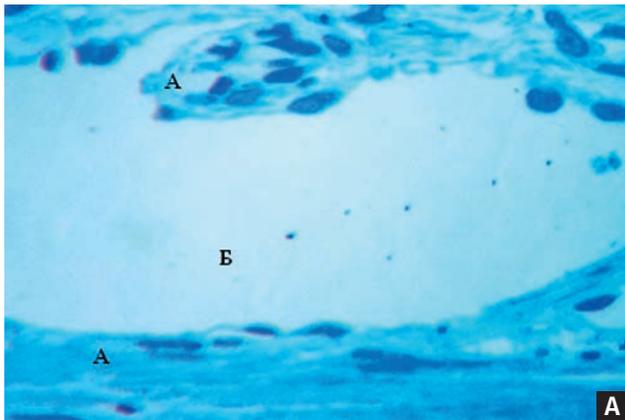


Рис. 2. Структурная организация трабекулярной сети глаза человека: А — контрольная группа (А — эндотелий, Б — просвет шлеммова канала); Б — терминальная стадия ПОУГ (А — клетки воспаления, Б — шлеммов канал, В — эндотелий). Окраска толуидиновым синим. Ув. $\times 400$

Fig. 2. Structural organization of the trabecular meshwork of the human eye: А — Control group (А — endothelium, В — lumen of the Schlemm's canal); Б — Terminal POAG (А — inflammatory cells, Б — Schlemm's canal, В — endothelium). Toluidine blue stain. Magnification $\times 400$.

Концентрация ИЛ-17А, провоспалительного цитокина, способного активировать синтез цитокинов, обладающих провоспалительными свойствами, молекул клеточной и межклеточной адгезии и др., во внутриглазной жидкости лиц, входивших в контрольную группу, составила $4,66 \pm 0,64$ пг/мл,

а его содержание в исследуемой биологической жидкости у пациентов основной группы составило $9,18 \pm 0,48$ пг/мл, что было в 1,95 раза выше значений показателя у пациентов контрольной группы и достоверно от него отличалось ($p < 0,03$).

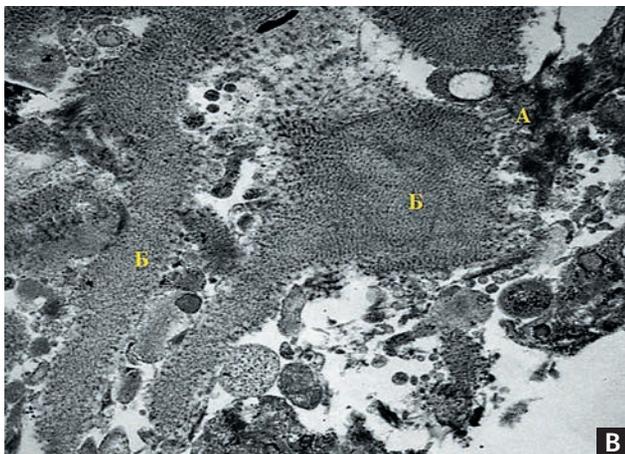
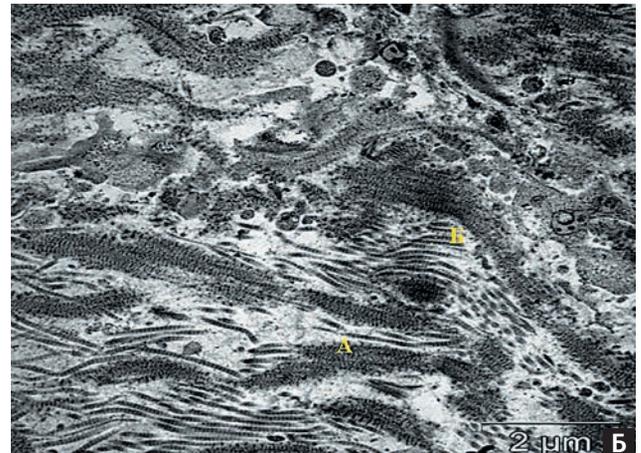
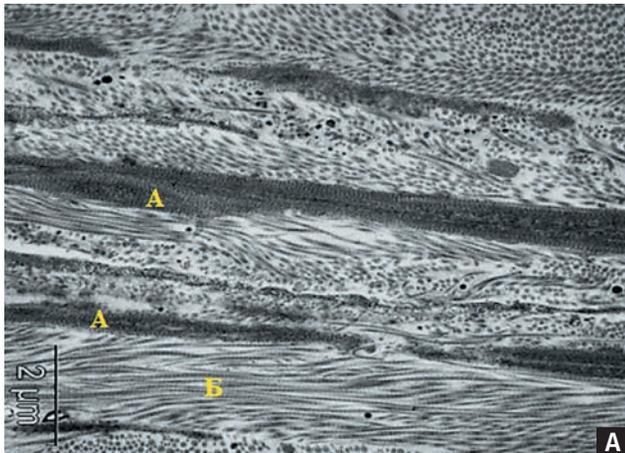


Рис. 3. Ультраструктурная организация трабекулярной сети глаза: А — контрольная группа — упорядоченное расположение трабекулярных пластинок, волокон (А), фибрилл (Б); Б — терминальная стадия ПОУГ — разнонаправленное расположение трабекулярных пластинок, волокон (А), фибрилл (Б); В — терминальная стадия ПОУГ — набухание и слияние трабекулярных волокон (А) и пластинок (Б). Ув. $\times 15\,000$

Fig. 3. Ultrastructural organization of the trabecular meshwork: А — control group — regular placement of trabecular beams, fibers (А) and fibrils (Б); Б — Terminal POAG — irregular placement of trabecular beams, fibers (А), and fibrils (Б); В — Terminal POAG — swelling and fusion of the trabecular fiber (А) and beams (Б). Magnification $\times 15\,000$

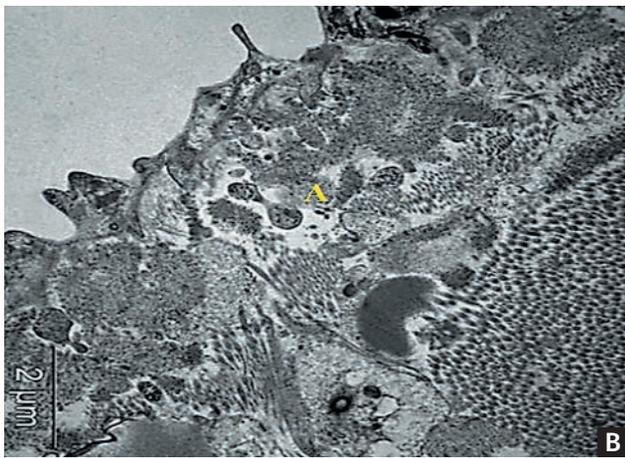
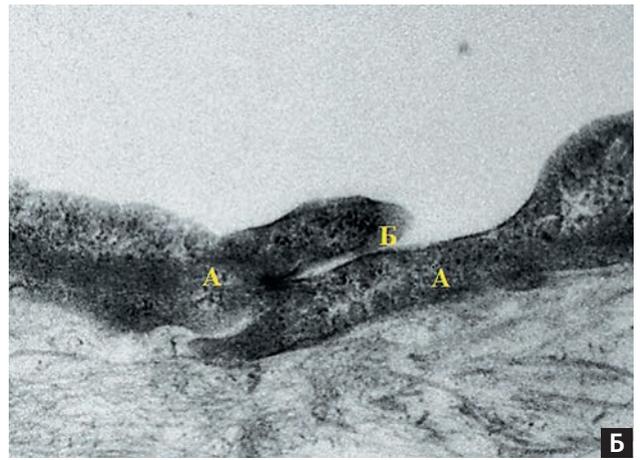
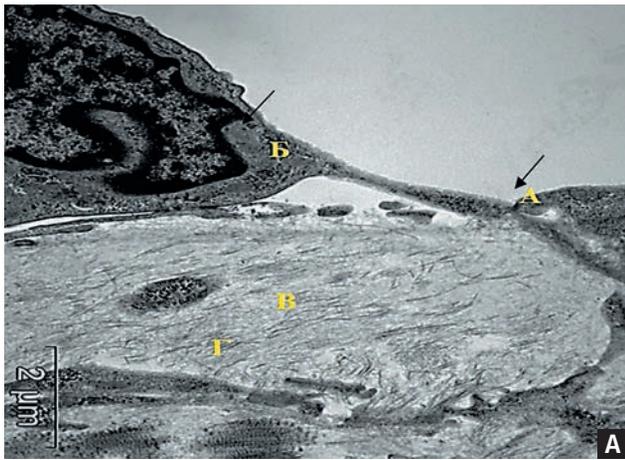


Рис. 4. Ультраструктурная организация стенки шлеммова канала трабекулярной сети глаза человека: А — контрольная группа — межклеточный контакт (А), эндотелий (Б), субэндотелиальный слой (В), отсутствие депозитов (Г); Б — контрольная группа — приоткрытый межклеточный контакт (Б); В — терминальная стадия ПОУГ — субэндотелиальный слой с депозитами (А); Г — терминальная стадия ПОУГ — плотный межэндотелиальный контакт (А), лизосомы (Б), набухание митохондрий (В). Ув. ×20 000

Fig. 4. Ultrastructural organization of the wall of the Schlemm's canal in the trabecular meshwork of the human eye: А — control group — intercellular contact (А), endothelium (Б), subendothelial layer (В), no deposits (Г); Б — control group — a slightly open intercellular contact (Б); В — terminal POAG — a deposit in subendothelial layer (Б); Г — terminal POAG — dense interendothelial contact (А), lysosomes (Б), mitochondrial swelling (В). Magnification ×20000

Проведенный корреляционный анализ позволил выявить прямые достоверные взаимосвязи между ИЛ-6 и ИЛ-17А ($r=0,5, p<0,05$), а также ИЛ-6 и ИЛ-8 ($r=0,33, p<0,05$), свидетельствующие о взаимозависимости нарастания концентраций провоспалительных цитокинов в механизмах развития ПОУГ.

Таким образом, проведенное исследование содержания провоспалительных цитокинов во внутриглазной жидкости пациентов с развитой стадией ПОУГ может свидетельствовать о развитии местного хронического воспалительного процесса.

Учитывая данные наших ранее опубликованных исследований, в которых было показано наличие морфологических признаков воспалительного процесса в зоне цилиарного тела и хориоиде при тер-

минальной стадии ПОУГ [1-3], представляло несомненный интерес изучение на ультраструктурном уровне трабекулярной зоны у данной категории пациентов.

В результате проведенных морфологических исследований были получены следующие данные.

На рис. 1 представлена зона трабекулярного аппарата глаза у пациентов без ПОУГ.

В отличие от данных, полученных при изучении трабекулярной зоны глаза пациентов контрольной группы, представленных на рис. 2А, при терминальной стадии ПОУГ в трабекулярной сети были выявлены изменения, которые можно расценить как последствия воспалительного процесса в переднем отрезке глаза. Об этом свидетельствует наличие в этой области клеток воспаления и воспалительной инфильтрации (рис. 2Б).

При электронно-микроскопическом исследовании была визуализирована нерегулярность, разнонаправленность, набухание и слияние соединительнотканых волокон трабекулярной сети при терминальной стадии ПОУГ (рис. 3Б, В).

В основном пути оттока внутриглазной жидкости из передней камеры глаза решающую роль играет состояние шлеммова канала, поэтому его структурное строение при электронной микроскопии рассмотрено более детально.

При электронно-микроскопическом исследовании в структуре стенки шлеммова канала при терминальной стадии ПОУГ было выявлено большое содержание депозитов внеклеточного материала в субэндотелиальном слое, возрастание количества лизосом и набухание митохондрий в эндотелии, а также возрастание плотности межэндотелиальных контактов, в отличие от полуоткрытых в контрольной группе (рис. 4).

Заключение

Проведенное с использованием мультиплексного анализа определение цитокинов во внутриглазной жидкости пациентов с развитой стадией ПОУГ в сравнении с данными, полученными у лиц с неосложненной катарактой, позволяет сделать заключение о выраженности и роли местного воспалительного процесса в механизмах развития ПОУГ. В пользу данного утверждения свидетельствует достоверное и взаимосвязанное повышение концентраций во внутриглазной жидкости провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-17А. Полученные в исследовании данные в определенной степени совпадают с немногочисленными результатами научных публикаций, в которых дисбаланс цито-

кинов рассматривается как фактор, определяющий роль воспаления в патогенезе глаукомы [23-25].

Выявленное в процессе исследования повышение концентраций провоспалительных цитокинов во внутриглазной жидкости на развитой стадии ПОУГ, а также представленные нами ранее данные о структурных нарушениях при терминальной стадии ПОУГ в лимфатическом (uveолимфатическом) пути оттока внутриглазной (тканевой) жидкости [2, 3], направленном на выведение и утилизацию крупномолекулярных продуктов метаболизма, а также биологически активных субстанций, появляющихся при развитии деструктивно-воспалительных, иммунных и др. процессов, позволили предположить, что их высокое содержание во внутриглазной жидкости способно вызывать морфоструктурные изменения в трабекулярном аппарате, связанные с развитием воспаления, и приводить к сужению просвета шлеммова канала и нарушению оттока.

Проведенное морфологическое исследование с использованием световой и электронной микроскопии подтвердило это предположение и показало, что при терминальной стадии ПОУГ в области трабекулярной зоны и шлеммова канала, в отличие от данных, полученных в группе сравнения, выявлены воспалительная инфильтрация, деструкция, разнонаправленность, набухание и слияние соединительнотканых пластинок, большое содержание депозитов в субэндотелиальном слое шлеммова канала, увеличение количества лизосом, набухание митохондрий в эндотелии, возрастание плотности межэндотелиальных контактов.

Таким образом, полученные в исследовании новые фундаментальные данные расширяют современные представления о роли местного воспалительного процесса в механизмах развития ПОУГ.

Литература

1. Бородин Ю.И., Бгатова Н.П., Черных В.В., Трунов А.Н. и др. Структура лимфатических капилляров ресничного тела глаза человека. *Морфология*. 2015; 148:43-47.
2. Черных В.В., Бородин Ю.И., Бгатова Н.П., Трунов А.Н. и др. Роль лимфатической системы в увеосклеральном оттоке внутриглазной жидкости. *Офтальмохирургия*. 2015; 2:74-79.
3. Черных В.В., Бородин Ю.И., Бгатова Н.П., Трунов А.Н. и др. Структурные элементы лимфатических путей оттока внутриглазной жидкости в хориоиде глаза человека в норме и при глаукоме. *Офтальмохирургия*. 2016; 3:11-16.
4. Бородин Ю.И., Коненков В.И., Любарский М.С. Лимфология. Новосибирск; 2011:566.
5. Chaudhry H.A., Dueker D.K., Simmons R.J., Bellows A.R., Grant W.M. Scanning electron microscopy of trabeculectomy specimens in open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 1979; 88(1):78-92.
6. Carreon T., van der Merwe E., Fellman R.L., Johnstone M., Bhattacharya S.K. Aqueous outflow - A continuum from trabecular meshwork to episcleral veins. *Prog Retin Eye Res*. 2017; 57:108-133. doi: 10.1016/j.preteyeres.2016.12.004.
7. Huang A.S., Mohindroo C., Weinreb R.N. Aqueous humor outflow structure and function imaging at the bench and bedside: a review. *J Clin Exp Ophthalmol*. 2016; 7(4):578. doi: 10.4172/2155-9570.1000578.

References

1. Borodin Yu.I., Bgatova N.P., Chernykh V.V., Trunov A.N. et al. Structure of lymphatic capillaries of the ciliary body of the human eye. *Morphology*. 2015; 148:43-47. (In Russ.).
2. Chernykh V.V., Borodin Yu.I., Bgatova N.P., Trunov A.N. et al. The role of the lymphatic system in the uveoscleral outflow of the intraocular fluid. *Ophthalmosurgery*. 2015; 2:74-79. (In Russ.).
3. Chernykh V.V., Borodin Yu.I., Bgatova N.P., Trunov A.N. et al. Structural elements of the lymphatic drainage channels of the intraocular fluid in the human choroid of the eye in normal and with glaucoma. *Ophthalmosurgery*. 2016; 3:11-16. (In Russ.).
4. Borodin Yu.I., Konenkov V.I., Lyubarsky M.S. Lymphology. Novosibirsk; 2011: 566. (In Russ.).
5. Chaudhry H.A., Dueker D.K., Simmons R.J., Bellows A.R., Grant W.M. Scanning electron microscopy of trabeculectomy specimens in open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 1979; 88(1):78-92.
6. Carreon T., van der Merwe E., Fellman R.L., Johnstone M., Bhattacharya S.K. Aqueous outflow - A continuum from trabecular meshwork to episcleral veins. *Prog Retin Eye Res*. 2017; 57:108-133. doi: 10.1016/j.preteyeres.2016.12.004.
7. Huang A.S., Mohindroo C., Weinreb R.N. Aqueous humor outflow structure and function imaging at the bench and bedside: a review. *J Clin Exp Ophthalmol*. 2016; 7(4):578. doi: 10.4172/2155-9570.1000578.

8. Lee N.Y., Park H.Y., Park C.K., Ahn M.D. Analysis of systemic endothelin-1, matrix metalloproteinase-9, macrophage chemoattractant protein-1, and high-sensitivity C-reactive protein in normal-tension glaucoma. *Curr Eye Res.* 2012; 37(12):1121-1126. doi: 10.3109/02713683.2012.725798.
9. Junglas B., Kuespert S., Seleem A.A., Struller T., Ullmann S., Bösl M., Bosserhoff A., Köstler J., Wagner R., Tamm E.R., Fuchshofer R. Connective tissue growth factor causes glaucoma by modifying the actin cytoskeleton of the trabecular meshwork. *Am J Pathol.* 2012; 180(6):2386-2403. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.02.030.
10. Sihota R., Goyal A., Kaur J., Gupta V., Nag T.C. Scanning electron microscopy of the trabecular meshwork: understanding the pathogenesis of primary angle closure glaucoma. *Indian J Ophthalmol.* 2012; 60(3):183-188. doi: 10.4103/0301-4738.95868.
11. Song M.M., Lei Y., Wu J.H., Sun X.H. The progress of studies on aqueous humor dynamics abnormality induced by trabecular meshwork and Schlemm canal endothelial cell senescence and its relation with glaucoma. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 2017; 53(11):868-873. doi: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2017.11.014.
12. Taurone S., Ripandelli G., Pacella E., Bianchi E. et al. Potential regulatory molecules in the human trabecular meshwork of patients with glaucoma: immunohistochemical profile of a number of inflammatory cytokines. *Mol Med Rep.* 2015; 11(2):1384-1390. doi: 10.3892/mmr.2014.2772.
13. Wang K., Read A.T., Sulchek T., Ethier C.R. Trabecular meshwork stiffness in glaucoma. *Exp Eye Res.* 2017; 158:3-12. doi: 10.1016/j.exer.2016.07.011.
14. Черных В.В. Влияние комплексной консервативной терапии на иммунобиохимические показатели в слезной жидкости у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой. *Глаукома.* 2005; 4:20-24.
15. Черных В.В., Шваюк А.П., Горбенко О.М., Сафронов И.Д. и др. Особенности патогенеза начальной и развитой стадии первичной открытоугольной глаукомы. *Аллергология и иммунология.* 2006; 1:28-31.
16. Трунов А.Н., Бгатовая Н.П., Еремина А.В., Дружинин И.Б. и др. Новые подходы к оценке выраженности воспалительных нарушений в патогенезе первичной открытоугольной глаукомы. *Аллергология и иммунология.* 2016; 17(2):107-111.
17. Еричев В.П., Ганковская Л.В., Ковальчук Л.В., Ганковская О.А. и др. Изменение некоторых иммунологических показателей слезной жидкости при избыточном рубцевании после антиглаукоматозных операций у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой. *Вестник офтальмологии.* 2010; 126(3):25-29.
18. Хохлова А.С., Кириенко А.В., Филина Н.В., Маркелова Е.В. Локальная цитокиновая регуляция на разных стадиях первичной открытоугольной глаукомы. *Тихоокеанский медицинский журнал.* 2014; 4:46-48.
19. Чередниченко Л.П., Барычева Л.Ю., Берновская А.А. Определение провоспалительных цитокинов в ранней диагностике первичной открытоугольной глаукомы. *Российский офтальмологический журнал.* 2013; 6(2):82-85.
20. Benitez-Del-Castillo Sánchez J., Morillo-Rojas M.D., Galbis-Estrada C., Pinazo-Duran M.D. Determination of immune response and inflammation mediators in tears: Changes in dry eye and glaucoma as compared to healthy controls. *Arch Soc Esp Ophthalmol.* 2017; 92(5): 210-217. doi: 10.1016/j.oftal.2016.12.009.
21. Чернявская М.А., Ефремов А.В., Черных В.В. Взаимосвязь цитокинов в слезной и внутриглазной жидкости при меланоме хориоидеи. *Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки.* 2015; 20(3):710-712.
22. Шпак А.А., Гехт А.Б., Дружкова Т.А., Козлова К.И., Гуляева Н.В. Соотношения нейротрофических факторов в слезной жидкости и влаге передней камеры у больных с возрастной катарактой. *Офтальмохирургия.* 2017; 1:16-20.
23. Chua J., Vania M., Cheung C.M., Ang M., Chee S.P. et al. Expression profile of inflammatory cytokines in aqueous from glaucomatous eyes. *Mol Vis.* 2012; 18:431-438.
24. Kokubun T., Tsuda S., Kunikata H., Yasuda M. et al. Characteristic profiles of inflammatory cytokines in the aqueous humor of glaucomatous eyes. *Ocul Immunol Inflamm.* 2017; 16:1-12. doi: 10.1080/09273948.2017.1327605.
25. Duvesh R., Puthuran G., Srinivasan K., Rengaraj V. et al. Multiplex cytokine analysis of aqueous humor from the patients with chronic primary angle closure glaucoma. *Curr Eye Res.* 2017; 42(12):1608-1613. doi: 10.1080/02713683.2017.1362003.
26. Tong Y., Zhou Y.L., Zheng Y., Biswal M. et al. Analyzing cytokines as biomarkers to evaluate severity of glaucoma. *Int J Ophthalmol.* 2017; 10(6):925-930. doi: 10.18240/ijo.2017.06.15.
8. Lee N.Y., Park H.Y., Park C.K., Ahn M.D. Analysis of systemic endothelin-1, matrix metalloproteinase-9, macrophage chemoattractant protein-1, and high-sensitivity C-reactive protein in normal-tension glaucoma. *Curr Eye Res.* 2012; 37(12):1121-1126. doi: 10.3109/02713683.2012.725798.
9. Junglas B., Kuespert S., Seleem A.A., Struller T., Ullmann S., Bösl M., Bosserhoff A., Köstler J., Wagner R., Tamm E.R., Fuchshofer R. Connective tissue growth factor causes glaucoma by modifying the actin cytoskeleton of the trabecular meshwork. *Am J Pathol.* 2012; 180(6):2386-2403. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.02.030.
10. Sihota R., Goyal A., Kaur J., Gupta V., Nag T.C. Scanning electron microscopy of the trabecular meshwork: understanding the pathogenesis of primary angle closure glaucoma. *Indian J Ophthalmol.* 2012; 60(3):183-188. doi: 10.4103/0301-4738.95868.
11. Song M.M., Lei Y., Wu J.H., Sun X.H. The progress of studies on aqueous humor dynamics abnormality induced by trabecular meshwork and Schlemm canal endothelial cell senescence and its relation with glaucoma. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 2017; 53(11):868-873. doi: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2017.11.014.
12. Taurone S., Ripandelli G., Pacella E., Bianchi E. et al. Potential regulatory molecules in the human trabecular meshwork of patients with glaucoma: immunohistochemical profile of a number of inflammatory cytokines. *Mol Med Rep.* 2015; 11(2):1384-1390. doi: 10.3892/mmr.2014.2772.
13. Wang K., Read A.T., Sulchek T., Ethier C.R. Trabecular meshwork stiffness in glaucoma. *Exp Eye Res.* 2017; 158:3-12. doi: 10.1016/j.exer.2016.07.011.
14. Chernykh V.V. Effect of complex conservative therapy on immunobiological indices in tear fluid in patients with primary open-angle glaucoma. *Glaucoma.* 2005; 4:20-24. (In Russ.).
15. Chernykh V.V., Shvyak A.P., Gorbenko O.M., Safronov I.D., et al. Peculiarities of the pathogenesis of the initial and advanced stage of primary open-angle glaucoma. *Allergy and Immunology.* 2006; 1:28-31. (In Russ.).
16. Trunov A.N., Bgatova N.P., Eremina A.V., Druzhinin I.B. et al. New approaches to assessing the severity of inflammatory disorders in the pathogenesis of primary open-angle glaucoma. *Allergy and Immunology.* 2016; 17(2):107-111. (In Russ.).
17. Erichev V.P., Gankovskaya L.V., Kovalchuk L.V., Gankovskaya O.A. et al. Changes in some immunological parameters of lacrimal fluid with excessive scarring after antiglaucomatous operations in patients with primary open-angle glaucoma. *Vestn oftalmol.* 2010; 126(3): 25-29. (In Russ.).
18. Khokhlova A.S., Kirienko A.V., Filina N.V., Markelova E.V. Local cytokine regulation at different stages of primary open-angle glaucoma. *Pacific Medical Journal.* 2014; 4:46-48. (In Russ.).
19. Cherednichenko L.P., Barycheva L.Yu., Bernovskaya A.A. Determination of proinflammatory cytokines in early diagnosis of primary open-angle glaucoma. *Russian Ophthalmological Journal.* 2013; 6(2):82-85. (In Russ.).
20. Benitez-Del-Castillo Sánchez J., Morillo-Rojas M.D., Galbis-Estrada C., Pinazo-Duran M.D. Determination of immune response and inflammation mediators in tears: Changes in dry eye and glaucoma as compared to healthy controls. *Arch Soc Esp Ophthalmol.* 2017; 92(5): 210-217. doi: 10.1016/j.oftal.2016.12.009.
21. Chernyavskaya M.A., Efremov A.V., Chernykh V.V. Interrelation of cytokines in the lacrimal and intraocular fluid with melanoma of the choroid. *Bulletin of Tambov University. Series: Natural and technical sciences.* 2015; 20(3):710-712. (In Russ.).
22. Shpak A.A., Gekht A.B., Druzhkova T.A., Kozlova K.I., Gulyaeva N.V. Ratios of neurotrophic factors in tear fluid and moisture in the anterior chamber in patients with age-related cataract. *Ophthalmosurgery.* 2017; 1:16-20. (In Russ.).
23. Chua J., Vania M., Cheung C.M., Ang M., Chee S.P. et al. Expression profile of inflammatory cytokines in aqueous from glaucomatous eyes. *Mol Vis.* 2012; 18:431-438.
24. Kokubun T., Tsuda S., Kunikata H., Yasuda M. et al. Characteristic profiles of inflammatory cytokines in the aqueous humor of glaucomatous eyes. *Ocul Immunol Inflamm.* 2017; 16:1-12. doi: 10.1080/09273948.2017.1327605.
25. Duvesh R., Puthuran G., Srinivasan K., Rengaraj V. et al. Multiplex cytokine analysis of aqueous humor from the patients with chronic primary angle closure glaucoma. *Curr Eye Res.* 2017; 42(12):1608-1613. doi: 10.1080/02713683.2017.1362003.
26. Tong Y., Zhou Y.L., Zheng Y., Biswal M. et al. Analyzing cytokines as biomarkers to evaluate severity of glaucoma. *Int J Ophthalmol.* 2017; 10(6):925-930. doi: 10.18240/ijo.2017.06.15.