

УДК: 612.017.1; 617.723

Молекулярные маркеры воспаления при эндогенном увеите

З.Х. Дикинов

Медицинский факультет Кабардино-Балкарского государственного университета им. Х.М. Бербекова, Нальчик, Россия

Molecular markers of inflammation in endogenic uveitis

Z.H. Dikinov

Medical Faculty of H.M.Berbekov Kabardino-Balkarian State University, Nalchik, Russia

Аннотация

Цель работы - поиск надежных молекулярных маркеров внутриглазного воспаления при эндогенном увеите. Изучены частота выявления и динамика концентрации фактора некроза опухоли (ФНО), интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β) и неоптерина в слезной жидкости 107 пациентов с острыми и хроническими формами эндогенного увеита. Установлено, что неоптерин является наиболее надежным и информативным маркером внутриглазного воспаления.

Ключевые слова

Эндогенный увеит, слезная жидкость, неоптерин, цитокины

Развитие эндогенного увеита связано с целым рядом системных и локальных патологических состояний и характеризуется большим количеством клинических фенотипов. С воспалением увеального тракта ассоциировано около 10% всех зарегистрированных случаев потери зрения в возрасте до 65 лет. Долгое время ведутся поиски иммунных медиаторов, отвечающих за ключевые звенья патогенеза увеита и при этом отражающих выраженность воспалительного процесса. В биологических жидкостях и тканях воспаленных глаз выявляется целый ряд провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-1 β (ИЛ-1 β), ИЛ-2, ИЛ-6, интерферон- γ (ИФН- γ) и фактора некроза опухоли (ФНО) и, кроме того, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10 и трансформирующий ростовой фактор- β [1,2]. Также доказано участие во внутриглазном вос-

Summary

The purpose of the study was to find reliable molecular markers of intraocular inflammation in endogenic uveitis. The incidence of identification for tumor necrosis factor (TNF), interleukin-1 β (IL-1 β) and neopterin and dynamic changes of their concentration in tear fluid have been studied in 107 patients with acute and chronic forms of endogenic uveitis. Neopterin was found to be the most reliable and informative marker of intraocular inflammation.

Keywords

Endogenic uveitis, tear fluid, neopterin, cytokines

палении хемокинов: ИЛ-8, моноцитарного хемоттрактантного протеина-1, фракталкина, макрофагальных воспалительных протеинов-1 β и -1 γ . Однако при различных клинических формах и этиологии увеита наблюдается существенная вариативность цитокинового/хемокинового профиля [3]. Более того, в силу короткого периода жизни и паракринной природы цитокинов [4], их концентрация в доступных для исследования биологических жидкостях не всегда служит надежным критерием выраженности воспалительного процесса.

Слезная жидкость (СЖ) привлекает внимание как легкодоступный в различных клинических ситуациях биологический образец, близкий к арене основных патогенетических событий при увеите, для поиска информативных молекулярных маркеров внутриглазного вос-

паления. Потенциальными критериями выраженности последнего могут быть не только провоспалительные цитокины, такие как ИЛ-1 β и ФНО, но и неоптерин – более стабильный низкомолекулярный гетероциклический продукт моноцитов/макрофагов и некоторых других клеток. Его выработка отражает не только активность клеток макрофагального ряда, но и функцию Т-лимфоцитов, в частности Т-хелперов 1 типа, чьи продукты (ИФН- γ) стимулируют экспрессию неоптерина, впрочем, как и упомянутых выше ИЛ-1 β и ФНО [5]. В свете ключевой роли клеточных иммунных реакций в патогенезе увеита [6,7,8] неоптерин заслуживает особого внимания.

По содержанию этой молекулы в таких биологических жидкостях, как моча и сыворотка крови, можно судить об активности клеточного иммунитета при воспалительных процессах в различных органах. Продемонстрирована возможность определения концентрации неоптерина в моче как маркера активности идиопатического увеоретинита [9]. Единичные работы по исследованию уровня неоптерина в СЖ не позволяют сделать однозначного заключения о диагностической ценности определения этой молекулы в указанном биоматериале при увеите [10].

Целью работы является поиск в СЖ надежных молекулярных маркеров внутриглазного воспаления при эндогенном увеите с фокусом на неоптерин и провоспалительные цитокины.

Материалы и методы исследования

Обследовано 107 больных с острыми и хроническими увеитами различной этиологии, по-

ступивших на стационарное лечение в глазное отделение Республиканской клинической больницы (Кабардино-Балкарская Республика, г. Нальчик).

У 90 пациентов наблюдали острый передний увеит (иридоциклит), у 8 – острый серозный хориоретинит и у 2 – острый серозно-пластический панувеит. Хронический увеит в стадии обострения выявлен у 17 больных. Клинические формы заболевания представлены в таблице 1.

Активность воспалительного процесса при увеитах представляли в баллах, рассчитанных как общая сумма оценки основных проявлений воспалительного процесса: инъекция глазного яблока – 0 (есть), 1 (нет); слезотечение – 0 (есть), 1 (нет); светобоязнь – 0 (есть), 1 (нет); цилиарные боли – 0 (есть), 1 (нет); роговица вне раны – 0 (прозрачная), 1 (отек эндотелия), 2 (десцеметит), 3 (преципитаты); гипотония – 0 (есть), 1 (нет); влага передней камеры – 0 (прозрачная), 1 (опалесцирующая), 2 (экссудат); радужка – 0 (спокойная), 1 (отек), 2 (гиперермия, синехии); стекловидное тело – 0 (спокойное), 1 (экссудат).

Забор слезы проводили из нижнего конъюнктивного свода после предварительного стимулирования парами нашатырного спирта. Для исследования использовали неразведенную СЖ, образцы которой хранили при -20 $^{\circ}$ C, не допуская повторного оттаивания/замораживания

Определение молекулярных маркеров воспаления в СЖ проводили при поступлении (1-3-е сутки острого увеита или обострения хронического заболевания), затем на 7-8-е сутки, 14-15-е сутки, через 1 месяц и через 3 месяца.

Таблица 1. Распределение обследованных больных по клиническим формам увеита

Клиническая форма заболевания	Количество пациентов	
	Абс.	%
Острые увеиты		
Серозно-пластический	54	60,0
Фибринозно-пластический	23	25,6
Геморрагический иридоциклит	2	2,2
Гнойный иридоциклит	1	1,1
Острый серозный хориоретинит	8	8,9
Серозно-пластический панувеит	2	2,2
Хронические увеиты		
Хронический фибринозно-пластический иридоциклит	15	88,2
Хронический хориоретинит	2	11,8

Уровень ИЛ-1 β и ФНО в СЖ оценивали с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА) с применением тест-систем производства ООО «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург, Россия).

Уровень неоптерина в СЖ определяли методом твердофазного ИФА, используя тест-системы Neopterin ELISA («IBL-HAMBURG», Германия).

Для выявления референсных значений исследуемых показателей изучены образцы СЖ у 40 здоровых студентов медицинского факультета КБГУ им. Х.М.Бербекова в возрасте от 17 до 25 лет.

Полученные данные обрабатывали согласно общепринятым методам статистической обработки [11] с помощью программы STATGRAF и представляли в виде средней \pm стандартное отклонение. Характер распределения анализируемых параметров в выборках оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Межгрупповые сравнения проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента для нормально распределенных показателей и непараметрических критериев Манна-Уитни и Вилкоксона для распределений, отличных от нормального. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Связь между нормально распределенными количественными показателями и ее направленность оценивали, используя коэффициент корреляции Пирсона. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена рассчитывали при анализе связи порядковых признаков и переменных с ненормальным распределением.

Результаты исследования и их обсуждение

У всех больных уже при поступлении (то есть в первые 3 суток заболевания/обострения) наблюдалась высокая активность воспалительного процесса (11,2–12,2 баллов). Несмотря на проведение стандартного лечения, включающего стероидные препараты, антибиотики и нестероидные противовоспалительные средства, к 7–8-м суткам от начала заболевания активность воспалительного процесса несколько увеличилась и составляла в среднем 13,57 баллов. Только на 14–15-е сутки воспалительные проявления (инъекция глазного яблока, цилиарные боли, слезотечение) снижались до уровня таковых в начале заболевания (9,1 балла). Резорбция преципитатов на роговице и хрусталике происходила медленно, что, по крайней мере, отчасти может быть следствием угнетения активности нейтрофилов и макрофагов, вызванного длительным применением стероидов. Преципитаты наблюдали через 1 месяц от начала заболевания, а у некоторых больных – и через 3 месяца. К концу 1 месяца от начала лечения у 40–50% больных отмечалось наличие синехий и экссудата в передней камере.

Концентрации ФНО и ИЛ-1 β в СЖ были выше уровня обнаружения (20 пг/мл) примерно у половины здоровых доноров, неоптерина – у 100% из них (Рис. 1).

В первые дни заболевания частота выявления маркеров воспаления в СЖ не отличалась от таковой у здоровых лиц: ФНО обнаружили у 60 из 107 обследованных па-

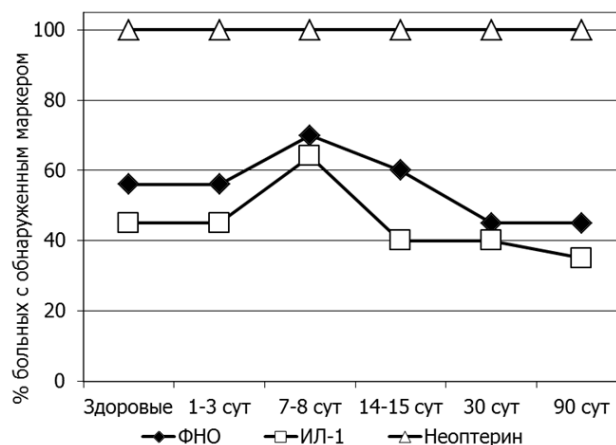


Рисунок 1. Частота выявления цитокинов в слезной жидкости пациентов с эндогенным увеитом

циентов (56,6%), ИЛ-1 β – у 49 (45,8%), неоптерин – у всех больных.

Доля пациентов с обнаруженными в СЖ провоспалительными цитокинами значительно повышалась на 7-8-е сутки, что по времени совпадало с наиболее выраженным клиническими проявлениями внутриглазного воспаления. Так, ФНО выявили в СЖ у 75 больных (70%), ИЛ-1 β – у 66 (55%).

В отдаленные сроки от начала заболевания/обострения частота детекции указанных цитокинов снижалась по мере стихания воспалительного процесса. На 14-15-е сутки ФНО обнаружили у 64 больных (60%), через 30 дней, а также через 3 месяца – у 48 больных (45%).

Частота выявления ИЛ-1 β в СЖ была несколько ниже во все сроки: к 14-15 дню и через 1 месяц этот цитокин обнаружен у 43 пациентов (40%), а через 3 месяца – у 37 (35%).

Неоптерин был выше уровня детекции у всех без исключения больных во все сроки исследования.

Несмотря на отсутствие увеличения частоты выявления провоспалительных цитокинов в СЖ у больных увеитом при госпитализации, в этот период отмечено увеличение среднего уровня ФНО почти в 6 раз, а ИЛ-1 в 3 раза в сравнении с референсными значениями (Табл. 2). Средняя концентрация неоптерина при поступлении в стационар была в 4 раза выше, чем в группе здоровых доноров.

На 7-8-е сутки заболевания/обострения среднее содержание провоспалительных цитокинов в СЖ существенно возрастала, в значительной степени благодаря увеличению частоты обнаружения этих молекул среди различных больных. Концентрации ФНО и ИЛ-1 β были выше контрольных значений в 8,4 и 5 раз, соответственно.

Содержание неоптерина возрастала до уровня, превышающего в 6,5 раз таковой у здоровых добровольцев.

В дальнейшем концентрации провоспалительных цитокинов начинали снижаться. При этом из-за высоких индивидуальных вариаций средний уровень ИЛ-1 β уже на 14-15-е сутки не отличался от референсных значений, тогда как содержание ФНО нормализовалось только через 3 месяца. Концентрация неоптерина оставалась стабильно высокой до 14-15-х суток заболевания/обострения и, несмотря на последующее постепенное снижение, достоверно превосходила норму даже через 3 месяца.

Концентрации провоспалительных цитокинов и неоптерина коррелировали с клиническими проявлениями заболевания, однако, в связи с тем, что содержание ФНО и особенно ИЛ-1 β было часто ниже уровня обнаружения используемых тест-систем, неоптерин представляется гораздо более информативным и надежным маркером выраженности внутриглазного воспаления.

Более длительное сохранение высоких концентраций неоптерина в СЖ в сравнении с изученными цитокинами, по крайней мере, отчасти можно объяснить тем, что эта гетероциклическая молекула отражает не только активность клеток моноцитарно-макрофагального ряда, но и выраженность Т-клеточных аутоиммунных реакций, для развития и завершения которых требуется больший период времени.

Выявленное существенное увеличение уровня провоспалительных медиаторов на высоте клинических проявлений эндогенного увеита говорит о целесообразности поиска эффективных средств, способных регулировать продукцию этих медиаторов в крови и тканях [12,13]. Для этих целей предложено использование, на-

Таблица 2. Изменения концентраций маркеров воспаления у больных с эндогенным увеитом

Маркеры воспаления в СЖ	Норма	Уровень маркеров воспаления в разное время от начала заболевания/обострения				
		1-3-е сутки (при поступлении)	7-8-е сутки	14-15-е сутки	Через 1 месяц	Через 3 месяца
ФНО (пг/мл)	80 \pm 82	454 \pm 443*	657 \pm 570*	524 \pm 499*	252 \pm 289*	129 \pm 157
ИЛ-1 β (пг/мл)	17 \pm 21	53 \pm 65*	85 \pm 71*	49 \pm 66	38 \pm 50	25 \pm 39
Неоптерин (нг/мл)	0,81 \pm 0,42	3,19 \pm 1,38*	5,24 \pm 1,89*	5,47 \pm 2,34*	4,20 \pm 2,1*	2,79 \pm 1,10*

Примечание: * – $p < 0,05$ в сравнении с нормой

пример, ингибиторов ФНО, в частности инфликсимаба и адалимумаба [14]. На наш взгляд, альтернативой этим средствам может стать аминофталгдрозид [15,16], который обладает меньшим числом побочных эффектов и при этом известен как модулятор продукции ИЛ-1 и ФНО [17,18]. Уже получены предварительные данные о его высокой эффективности в лечении увеитов вирусной, хламидийной, токсоплазменной этиологии [19].

Заключение

Результаты настоящего исследования говорят о целесообразности определения неоптерина в СЖ как дополнительного критерия оцен-

ки выраженности внутриглазного воспаления и эффективности проводимого лечения при эндогенных увеитах.

ИЛ-1 β и ФНО, обладая коротким периодом жизни, далеко не у каждого пациента с острыми и хроническими формами заболевания адекватно отражают тяжесть воспалительного процесса, а у многих больных их концентрация в СЖ оказывается ниже уровня обнаружения даже на высоте клинических проявлений заболевания.

Кроме того, полученные данные определяют вектор поиска эффективных средств коррекции избыточной продукции провоспалительных медиаторов, играющих ключевую роль в развитии различных форм эндогенного увеита.

Литература

- Sharma R.K., Rogojina A.T., Chalam K.V. Multiplex immunoassay analysis of biomarkers in clinically accessible quantities of human aqueous humor. *Mol Vis.* 2009; 15: 60-69.
- Takase H., Sugita S., Taguchi C. et al. Capacity of ocular infiltrating T helper type 1 cells of patients with non-infectious uveitis to produce chemokines. *Br J Ophthalmol.* 2006; 90 (6): 765-768.
- Ooi K.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; 4 (4): 294-309.
- Караулов А.В., Калюжин О.В. Цитокины: биологическое действие и клиническое применение. В сборнике «Успехи клинической иммунологии и аллергологии» под ред. А.В.Караулова. Т. 1. М.: РАЕН; 2000: 193-205.
- Свиридов Е.А., Телегина Т.А. Неоптерин и его восстановленные формы: биологическая роль и участие в клеточном иммунитете. *Успехи биологической химии.* 2005; Т. 45: 355-390.
- Калюжин О.В., Дикинов З.Х., Евсегнеева И.В. Иммунные механизмы экспериментальных увеоретинитов. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье».* 2011; 1: 153-159.
- Калюжин О.В., Дикинов З.Х., Евсегнеева И.В. Модели интраокулярного воспаления. *Имунопатология, аллергология, инфектология.* 2011; 2: 14-19.
- Caspi R.R. A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J Clin Invest.* 2010; 120 (9): 3073-3083.
- Palmer H., Giovannoni G., Stanford M. et al. Urinary neopterin in idiopathic retinal vasculitis. *Br J Ophthalmol.* 2001; 85 (1): 30-33. doi: 10.1136/bjo.85.1.30
- Чернышева А.Д., Онищенко А.Л., Колбаско А.В., Суржикова Г.С. Значение неоптерина в этиологической диагностике эндогенных увеитов. *Вестник офтальмологии.* 2011; 2: 25-29.
- Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2000.
- Абидов М.Т., Калюжин О.В., Нелюбов М.В. Иммуно-терапия острых и хронических воспалительных заболеваний. *Tera Medica Nova.* 2001; 2: 3-7.
- Абидов М.Т., Баштаненко А.Ф., Нелюбов М.В. и др. Регуляция иммунных реакций в лечении хронических и острых воспалительных заболеваний. *Якутский медицинский журнал.* 2004; 3 (7): 58-60.
- Rifkin L.M., Birnbaum A.D., Goldstein D.A. TNF inhibition for ophthalmic indications: current status and outlook. *BioDrugs.* 2013; 27 (4): 347-357. doi: 10.1007/s40259-013-0022-9.
- Абидов М.Т., Калюжин О.В., Гришина Т.И. Новый отечественный иммуномодулирующий и противовоспалительный препарат. *Военно-медицинский журнал.* 1999; 1: 41-45.
- Дикинов З.Х. Местная локальная иммунокоррекция в сочетании с оксигенотерапией в лечении острых гнойных заболеваний сосудистой оболочки глаз. *International Journal on Immunorehabilitation.* 2003; 5 (2): 242.
- Калюжин О.В., Абидов М.Т. Регуляция продукции интерлейкина-1 и фактора некроза опухоли галавитом. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 1999; Т. 127 (Прил. 2): 42-43.
- Никитин А.А., Абидов М.Т., Ковалевская Е.О., Калюжин О.В. Поиск эффективных модуляторов цитокин-продуцирующей функции макрофагов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2004; Т. 138. № 9: 293-295.
- Аджави Ш.М., Волик Е.И., Аджави С.М. Современные методы лечения задних увеитов вирусной, хламидийной, токсоплазмозной этиологии. *Кубанский научный медицинский вестник.* 2005; 3-4: 54-57.

Сведения об авторах:

Дикинов Залим Хасабиевич, к.м.н., доцент кафедры общей хирургии с курсом глазных болезней Медицинского факультета Кабардино-Балкарского государственного университета им. Х.М. Бербекова. Адрес: 360000, Россия, г. Нальчик, ул. Инессы Арманд, д. 1, E-mail: za2008@mail.ru

Поступила 3.09.2013 г.