КЛИНИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ЦИТОКИНОВ В ДИАГНОСТИКЕ ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

CLINICAL JUSTIFICATION OF THE APPLICATION OF CYTOKINES IN THE DIAGNOSIS OF OPHTHALMIC DISEASES

УДК 616-092.18

Эргашев Анвар Гайрат угли, студент 6 курса лечебного факультета Дальневосточного федерального университета, школы Биомедицины

Эргашева Венера Шукуруллаевна, ассистент кафедры медицинской и биологической химии Ташкентского Государственного Стоматологического Института

Туйчибаева Дилобар Миратиллаевна, доцент кафедры офтальмологии Ташкентского Государственного Стоматологического Института

Хамраева Мехринисо Абдурашидовна, ассистент кафедры медицинской и биологической химии Ташкентского Государственного Стоматологического Института, кардиолог, геронтолог

Эргашев А.Г. komiljon.k@yahoo.com

Аннотация

В данной статье приводятся данные по цитокинам и их роли в возникновении некоторых офтальмологических заболеваний, в том числе синдроме сухого глаза. Уровни цитокинов интерлейкина (ИЛ) -1b (P <0,05), IL-6 (P <0,001), IL-16 (P <0,001), IL-33 (P <0,05), G-CSF (P<0,001) и трансформирующий фактор роста (TGF) -a (P <0,05) были значительно выше у пациентов с с идромом сухого глаза, тогда как ряд цитокинов ИЛ-4 (P <0,001), ИЛ-12 (p40) (P <0,001), ИЛ-17A (P <0,05) и интерферон-c (P <0,001) были достоверно ниже. Уровни фракталкина (хемокин CX3CL1), MCP-1 (CCL2), MIP-1d (CCL15) и ENA-78 (CXCL5) (P < 0,001 соответственно) и растворимые рецепторы sIL-1RI (P <0,05), растворимый гликопротеин (sgp) 130 (P <0,05),

sIL-6R (P <0,001), рецептор растворимого эпидермального фактора роста (P <0,05), и растворимого рецептора фактора некроза опухоли 2 (P <0,001), были выше у пациентов с синдромом сухого глаза. Между этими молекулами и клинической тяжестью синдрома сухого глаза наблюдалась значительная корреляция.

Annotation

This article provides data on cytokines and their role in the occurrence of several ophthalmic diseases, including dry eye syndrome. Cytokine levels of interleukin (IL) -1b (P <0.05), IL-6 (P <0.001), IL-16 (P <0.001), IL-33 (P <0.05), G-CSF (P <0.001) and transforming growth factor (TGF) -a (P <0.05) were significantly higher in patients with dry eye, while a number of cytokines IL-4 (P <0.001), IL-12 (p40) (P <0.001), IL-17A (P <0.05) and interferon-c (P <0.001) were significantly lower. Fractalkine levels (chemokine CX3CL1), MCP-1 (CCL2), MIP-1d (CCL15) and ENA-78 (CXCL5) (P <0.001, respectively) and soluble sIL-1RI receptors (P <0.05), soluble glycoprotein (sgp) 130 (P <0.05), sIL-6R (P <0.001), soluble epidermal growth factor receptor (P <0.05), and soluble tumor necrosis factor receptor 2 (P <0.001) were higher in patients with dry eye syndrome. There was a significant correlation between these molecules and the clinical severity of dry eye syndrome.

Ключевые слова: цитокины; интерлейкины; фактор некроза опухоли; увеиты; синдром сухого глаза

Keywords: cytokines; interleukins; tumor necrosis factor; uveitis; dry eye syndrome

Актуальность. Болезнь сухого глаза (БСГ) - широко распространенное воспалительное заболевание слезных желез, имеет мультифакторное происхождение. БСГ может привести к хроническому заболеванию глазной поверхности и вызывает нарушение зрительной функции, что снижает качество жизни [6, 9, 14].

Хотя существуют разные патогенетические механизмы, ответственные - для БСГ появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что все формы БСГ характеризуются различным воспалением глазной поверхности.

Воспаление поддерживается постоянной активацией и инфильтрацией патогенных иммунных клеток, в первую очередь CD4 хелперных Т-клеток в конъюнктиве и CD11b в моноцитарных клетках роговицы [3, 7, 12]. Повышенная выработка и активация провоспалительных цитокинов и протеолитических ферментов пораженной роговицы, конъюнктивы и железистых эпителиальных клеток, а также воспалительные клетки, которые инфильтрируют ткань, были выявлены ранее [1]. Ранее были исследованы определены, что при БСГ наблюдается повышенная концентрация проинфламматорных цитокинов и хемокинов в слезах, таких как интерлейкин 1 (ИЛ-1), ИЛ-6, ИЛ-8 и фактор некроза опухоли-а (ФНО-а) [2, 4, 8, 10]. Кроме того, некоторые исследования показывают, что повышенные уровни некоторых воспалительных цитокинов коррелируют с клиническими параметрами при БСГ [11]. Исследования показали, что уровни цитокинов и хемокинов достоверно коррелируют с различными инструментами клинической диагностики, таких как проба Ширмера, время разрыва слезы (tBUT), скорость клиренса слезы, роговица и окрашивание конъюнктивы [13]. Однако, является ли воспаление как причина или следствие БСГ все еще неоднозначно, и какие цитокины или хемокины играют важную роль в патогенезе БСГ остаются неясными. Очень важно оценить биологические маркеры и диагностические приложения для точного определения стратегии лечения, например, чтобы охватить многофакторный характер БСГ.

Диагноз БСГ, особенно на ранней стадии, затруднительно поставить из-за отсутствия объективных тестов с достаточными и точными клиническими инструментами. Хотя симптомы БСГ обычны, нет корреляции между симптомами и признаками, в частности в основном при легкой степени БСГ. Кроме того, отсутствуют данные о клинической полезности объективных тестов в диагностике БСГ.

Мы предполагаем, что уровни некоторых цитокинов, хемокинов и растворимых рецепторов в слезной жидкости имеют важное клиническое значение. Кроме того, определение того, какие молекулы коррелируют с серьезностью БСГ приведет к лучшему пониманию патогенеза БСГ, какие молекулы можно использовать в качестве биомаркеров на ранней стадии болезни, и, в конечном итоге, какой актуальный модулятор можно использовать в качестве лечебного метода для селективного подавления патогенеза заболевания [15]. Чтобы проверить эту гипотезу, мы исследовали уровни цитокинов, хемокинов и растворимых рецепторов слезы и образцов от большого количества пациентов и здоровых людей из контрольной группы с использованием мультианалитического анализа на основе профильных шариков.

Цель исследования. Определить роль и значение цитокинов в патофизиологическом механизме возникновения некоторых глазных болезней и определить эффективность препаратов, влияющих на синтез данных биологически активных веществ.

Материалы и методы исследования. Для осуществления поставленной цели были обследованы 60 больных с болезнью сухого глаза и 30 абсолютно здоровых людей. Письменное информированное согласие на участие в эксперименте было получено у всех больных. Диагноз болезни сухого глаза был обоснован по клиническим симптомам, а также по тестам, среди которых симптом раздражения глаз (OSDI), проба Ширмера (без анестезии), время разрыва слезной пленки (tBUT). Эти тесты использовались для отбора пациентов в исследованиеи для оценки тяжести заболевания. Субъективные тесты оценивались по цифровой шкале от 0 до 4 с использованием показателя OSDI: 0-нет реакции, 1- иногда, 2-половина времени, 3-большая часть времени, 4-все время. 5 минутный тест Ширмера выполнялся стерильными полосками без анестезии. Полоска Ширмера помещалась в вырез нижнего свода и пациентов просили моргать и записывали время до появления дефекта в окрашенной слезной пленке. Цитокины, хемокины и растворимые рецепторы анализировали с помощью коммерческой системы набора иммуноанализов (Millipore MILLIPLEX Human Cytokine Human Cytokine/Chemokine Panel I Premixed 39 Plex [MPXHCYTO60KPMX39], Millipore MILLIPLEX Human Cytokine Human Cytokine/Chemokine Panel II Premixed 23 Plex [MPXHCYP2PMX23], and Millipore MILLIPLEX Human Cytokine Human Soluble Cytokine Receptor Panel, Premixed 14 Plex [HSCR-32KPMX14]; Millipore, Billerica, MA). Образцы слезы инкубировали веществом, покрытым антителами и помещали в бокс течение ночи при температуре 48°C. Полученные шарики дополнительно инкубировали меченными биотином антителами против цитокинов с помощью стрпетавидин-фикоэритрином. Статистическую обработку проводили с помощью программы ANOVA. Статистическое отклонение считали достоверным при $p<0,05$.

Результаты исследований. Демографические данные больных приведены в таблице 1.

Таблица 1. Демографические данные больных с синдромом сухого глаза.

Характеристики	1 стадия	2 стадия	3 стадия
Возраст	48.9 ± 17.26 (30 - 65)	54.9 ±13.78 (22 - 88)	53.2 ± 14.23 (17 - 80)
Пол (женский, %)	100	84	60
Оценка OSDI	50,3	32,7	20,4

<12%			
Оценка OSDI 12-32%	30,2	57,5	50,8
Оценка OSDI ≥33%	20,6	11,3	30,7
Осмолярность (мосм/л)	285.9 ±94.19	291.9 ± 36.12	284.4 ± 69.36
tBUT ≥10 s	0	0	0
tBUT 5-10 s	90,2	54,4	28,3
tBUT <5 s	10,5	42,3	55,4
Тест Ширмера ≥15 мм	60,6	10,4	3
Тест Ширмера (14-9 мм)	20,3	7	8
Тест Ширмера (8-4 мм)	10,6	45,2	35,4
Тест Ширмера <4 мм	10,2	39,5	55,7
Окрашивание роговицы 0 степень	0	0	0
Окрашивание роговицы 1 степень	80,2	48,4	13,7
Окрашивание роговицы 2 степень	10,3	45,5	55,6
Окрашивание роговицы 3 степень	10,3	7	33,4
Окрашивание роговицы 4 степень	0	1	0
Окрашивание конъюктивы 1 степень	100	38,7	15,6
Окрашивание конъюктивы 2 степень	0	56,2	49,3
Окрашивание конъюктивы 3 степень	0	6	36,8

Из 65 проанализированных молекул IL-1b, IL-6, Il-16, IL-33, трансформирующий фактор роста альфа (TGF-a), фактор стимуляции

колоний гранулоцитов (G-CSF), фракталкин (CX3CL1), моноцитарный хемотаксический белок-1 (MCP-1; CCL2), макрофагальный воспалительный белок-1 дельта (MIP-1d; CCL15) и эпителиальный нейтрофил-активирующий пептид (ENA-78; CXCL5) (рис. 1, 2) . В основной группе показатели были значительно выше по сравнению с контрольной группой. Среди этих молекул концентрации IL-1b, IL-16, TGF-a, фракталкин (CX3CL1), MIP-1 d (CCL15) и ENA-78 (CXCL5) постепенно увеличивался в соответствии с клиническими показателями степенями тяжести, которая предполагает, что концентрации молекул значительно коррелируют с клинической тяжестью. Но, с другой стороны, IL-12 (p40), интерферон гамма (IFN-c), IL-17A, и IL-4 в основной группе были значительно снижены по сравнению с контрольной группой (рис. 3).

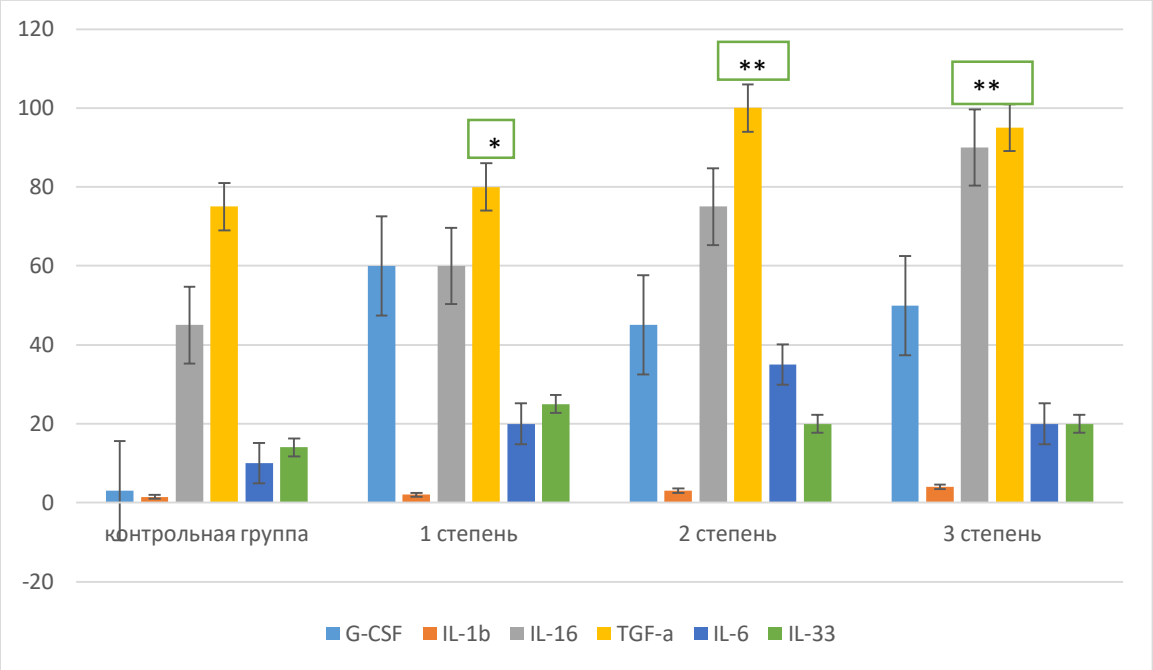

Рис. 1. Цитокины слезы у пациентов с синдромом сухого глаза с серийной степенью тяжести и контрольными группами. Значительно повышенные уровни IL-1b, IL-6, Il-16, IL-33, TGFa и G-CSF у пациентов с синдромом сухого глаза. Контроль по сравнению с пациентами с синдромом сухого глаза; * P <0,001, ** P <0,05

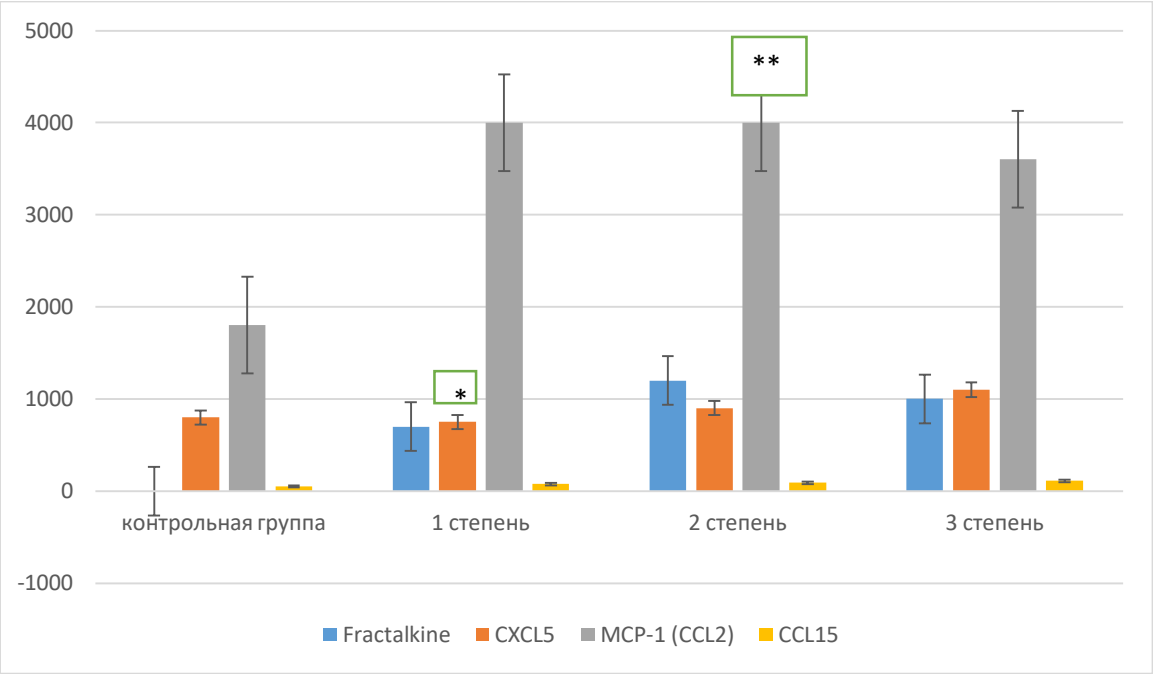

Рис. 2. Слезные хемокины пациентов с синдромом сухого глаза с серийной степенью тяжести и контрольными группами. Значительно повышенный уровень CXCR1, CCL2, CCL15 и CCL24 у пациентов с синдромом сухого глаза. Контроль по сравнению с пациентами с синдромом сухого глаза; * P <0,001, ** P <0,05.

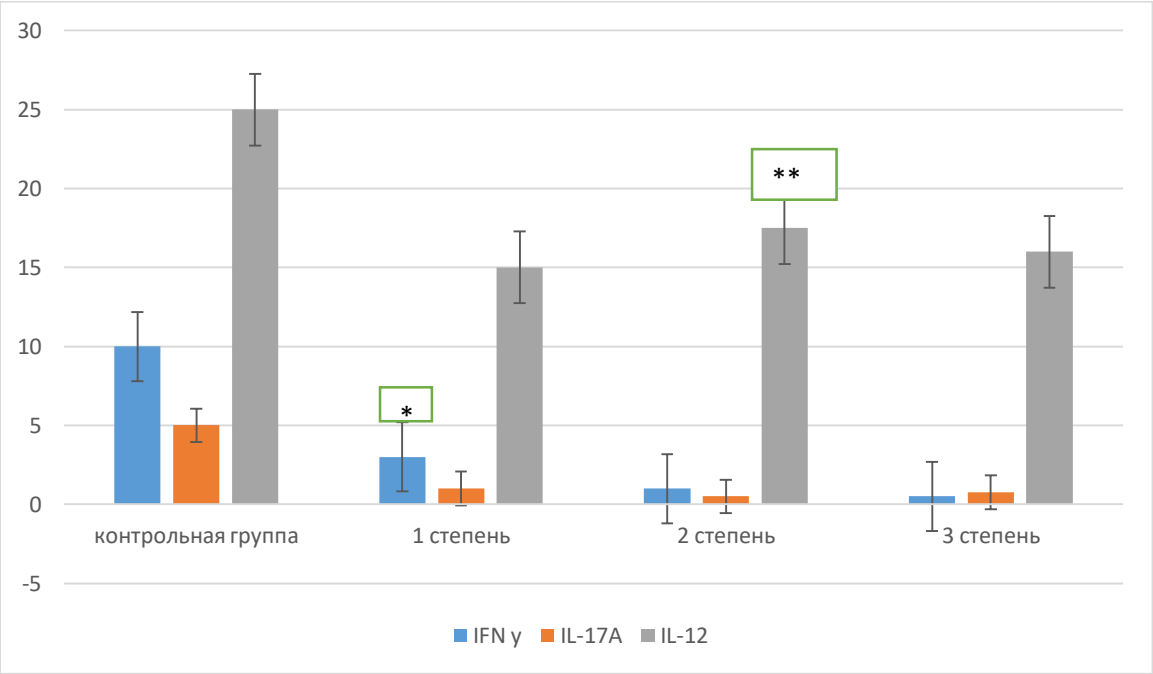

Рис. 3. Пациенты с синдромом сухого глаза с серийной степенью тяжести выявляют значительно более низкие уровни цитокинов, IL-12 (p40), IFN-c, IL-17A по сравнению с группой контроля. Контроль по сравнению с пациентами с синдромом сухого глаза; * P <0,001, ** P <0,05

Результаты нашего исследования показывают, что уровни IL-1b, IL-6 и их растворимые рецепторы sIL-1R1 и sIL-6R были значительно повышены в

слезах пациентов с синдромом сухого глаза. Кроме того, Ил-33, входящий в состав семейства цитокинов IL-1 также было повышено. Суперсемейство рецепторов IL-1 (IL1R) / толл-подобных рецепторов (TLR) играет важную роль в регуляции воспалительных и иммунных реакций. При связывании IL-1 с IL-1R1, дополнительный белок IL-1R (AcP) рекрутируется для образования высокоаффинного гетеродимерного рецептора IL-1R1 / IL-1RAcP, который инициирует воспалительный каскад передачи сигналов ниже по течению. Этот путь строго регулируется множеством ингибирующих молекул, включая мембраносвязанный IL-RII, секретируемый растворимый (-ые) IL-1R1, sIL-R2 и sIL-1RAcP, регуляторный IL-1R1 антагонист (IL-1R1a) и индуцированная сигналом IL-1R1 единственная связанная с IgIL-1R молекула. Эта система отрицательной обратной связи подавляет чрезмерную передачу сигналов IL-1 и дифференцировку клеток Th17.25,26 Одновременное повышение уровня IL-1b и sIL-1R1 предполагает, что естественный гомеостаз поддерживается для дальнейшего подавления системные аутоиммунные реакции после местного воспаления глазных поверхностей; это усиливается постепенным уменьшением в IL-17A в слезах пациентов с синдромом сухого глаза.

Сообщается, что содержание IL-6 увеличивается в слезах и эпителии конъюнктивы, и описывается как одна из ключевых молекул с син. Кроме того, экспрессия sIL-6R в слезах активируется в хронические воспалительные состояния глазной поверхности. Ряд активностей IL-6 имеет решающее значение для устранения врожденного иммунитета и укрепление приобретенного иммунитета; этот переход является центральным событием в разрешении любого воспалительного состояния, и нарушение этого иммунологического переключателя может потенциально исказить иммунный ответ, влияющий на начало аутоиммунного или хронического воспаления.

Уровни цитокинов интерлейкина (ИЛ) -1b ($P < 0,05$), IL-6 ($P < 0,001$), IL-16 ($P < 0,001$), IL-33 ($P < 0,05$), G-CSF ($P < 0,001$) и трансформирующий фактор роста (TGF) -a ($P < 0,05$) были значительно выше у пациентов с с идромом сухого глаза, тогда как ряд цитокинов ИЛ-4 ($P < 0,001$), ИЛ-12 (p40) ($P < 0,001$), ИЛ-17A ($P < 0,05$) и интерферон-с ($P < 0,001$) были достоверно ниже. Уровни фракталкина (хемокин CX3CL1), MCP-1 (CCL2), MIP-1d (CCL15) и ENA-78 (CXCL5) ($P < 0,001$ соответственно) и растворимые рецепторы sIL-1RI ($P < 0,05$), растворимый гликопротеин (sgp) 130 ($P < 0,05$), sIL-6R ($P < 0,001$), рецептор растворимого эпидермального фактора роста ($P < 0,05$), и растворимого рецептора фактора некроза опухоли 2 ($P < 0,001$), были выше у пациентов с синдромом сухого глаза. Между этими молекулами и клинической тяжестью синдрома сухого глаза наблюдалась значительная корреляция.

Выводы. Пятнадцать молекул цитокинов поднялись в у пациентов с синдромом сухого глаза; уровни четырех молекул цитокинов были уменьшены. Хотя уровни sIL-6R, sIL-6R и sgp130 могут быть потенциальными индикаторами гомеостатического процесса, повышение уровней IL-6 и IL-1b – являются самыми ранними наблюдаемыми изменениями у пациентов с синдромом сухого глаза. Дальнейшее изучение биомаркеров является основным в патогенезе синдрома сухого глаза и имеет значение в лечении.

Литература

1. Baudouin C, Liang H, Bremond-Gignac D, et al. CCR 4 and CCR 5 expression in conjunctival specimens as differential markers of T(H)1/ T(H)2 in ocular surface disorders. J Allergy Clin Immunol. 2005;116:614–619
2. Chauhan SK, Dana R. Role of Th17 cells in the immunopathogenesis of dry eye disease. Mucosal Immunol. 2009;2:375– 376.
3. The Definition and Classification of Dry Eye Disease Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007). Ocul Surf. 2007;5:75–92.
4. Goto E, Yagi Y, Matsumoto Y, Tsubota K. Impaired functional visual acuity of dry eye patients. Am J Ophthalmol. 2002;133: 181–186.
5. Hikichi T, Yoshida A, Tsubota K. Lymphocytic infiltration of the conjunctiva and the salivary gland in Sjogren's syndrome. Arch Ophthalmol. 1993;111:21–22
6. Lam H, Bleiden L, De Paiva CS, Farley W, Stern ME, Pflugfelder SC. Tear cytokine profiles in dysfunctional tear syndrome. Am J Ophthalmol. 2009;147:198–205.
7. Massingale ML, Li X, Vallabhajosyula M, Chen D, Wei Y, Asbell PA. Analysis of inflammatory cytokines in the tears of dry eye patients. Cornea. 2009;28:1023–1027.
8. Miljanovic B, Dana R, Sullivan DA, Schaumberg DA. Impact of ´ dry eye syndrome on vision-related quality of life. Am J Ophthalmol. 2007;143:409–415.
9. Pflugfelder SC. Anti-inflammatory therapy of dry eye. Ocul Surf. 2003;1:31–36.
10. Rivas L, Oroza MA, Perez-Esteban A, Murube-del-Castillo J. Morphological changes in ocular surface in dry eyes and other disorders by impression cytology. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 1992;230:329–334.
11. Rolando M, Barabino S, Mingari C, Moretti S, Giuffrida S, Calabria G. Distribution of conjunctival HLA-DR expression and the pathogenesis of damage in early dry eyes. Cornea. 2005;24:951–954.

12. Solomon A, Dursun D, Liu Z, Xie Y, Macri A, Pflugfelder SC. Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001;42:2283–2292.
13. Stern ME, Gao J, Schwalb TA, et al. Conjunctival T-cell subpopulations in Sjogren's and non-Sjogren's patients with dry eye. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002;43:2609–2614.
14. Tishler M, Yaron I, Geyer O, Shirazi I, Naftaliev E, Yaron M. Elevated tear interleukin-6 levels in patients with Sjogren syndrome. Ophthalmology. 1998;105:2327–2329.
15. Yoon KC, Jeong IY, Park YG, Yang SY. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in tears of patients with dry eye syndrome. Cornea. 2007;26:431–437.