

УДК 616.7–007.681:612.017.1

ЛОКАЛЬНАЯ ЦИТОКИНОВАЯ РЕГУЛЯЦИЯ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЫ

А.С. Хохлова, А.В. Кириенко, Н.В. Филина, Е.В. Маркелова

Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Ключевые слова: глаукома, оптическая нейропатия, цитокины, иммунный ответ.

LOCAL CYTOKINE REGULATION AT DIFFERENT STAGES OF PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA

A.S. Khokhlova, A.V. Kiriyenko, N.V. Filina, E.V. Markelova
Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690950 Russian Federation)

Background. These studies of the last years about the role of humoral factors in the pathogenesis of primary open-angle glaucoma remains controversial.

Methods. 133 patients with various stages of glaucoma been tested. Was estimated the amount of pro- and anti-inflammatory cytokines in the lacrimal fluid.

Results. Local profile of cytokine under glaucoma characterized with pro-inflammatory nature with switching T helper immune response from 17th and 2nd type in the stage I on T-helper response type 1 in stage II and T-helper response type 2 with simultaneous overproduction of interleukin 1 β and 6 and Transforming Growth Factor- β_2 in disease stage III. The hallmark of the III stage of glaucoma was a local deficit of Transforming Growth Factor- β_1 .

Conclusions. For non-invasive diagnosis of early stages of primary open-angle glaucoma can be used the estimation of the interleukin-17 level in lachrymal fluid. Theoretically justified and prospective is the question of the application biologic response modifier therapy in patients with stage III.

Keywords: glaucoma, glaucoma associated optic neuropathy, cytokines, immune response.

Pacific Medical Journal, 2014, No. 4, p. 46–48.

Существует несколько теорий патогенеза глаукомной оптической нейропатии. Основные среди них – механическая (ретенционная), сосудистая (ишемическая), метаболическая, нейродегенеративная, склеральная, генетическая и инфекционная [1, 2, 13]. В отечественной и зарубежной литературе последних лет обсуждается вопрос о роли иммунно-опосредованных механизмов в патогенезе глаукомной оптиконеуропатии при первичной открытоугольной глаукоме. Есть также ряд исследований, посвященных аутоиммунному механизму развития глаукомной оптиконеуропатии [4, 12].

Данные, полученные при изучении роли гуморальных факторов в патогенезе глаукомы, противоречивы [3]. Выявлено увеличение в сыворотке крови пациентов концентрации γ -интерферона (IFN γ) и снижение уровня интерлейкина-(IL)-17 при повышении его содержания в слезе, а также снижение концентрации изоформы β_1 трансформирующего фактора роста- β (TGF- β) в сыворотке крови [6, 14]. Вместе с тем встречаются противоположные данные – о повышении концентрации TGF- β_1 в крови больных глаукомой и уменьшении содержания в ней IFN- γ [13, 15]. Обнаружено,

что увеличение продукции фактора некроза опухоли- α , IL-2, IL-4, IL-12p70, IL-6, IL-23 и IFN γ было связано с тяжестью глаукомного процесса [10]. Также, отмечено значение IL-1 α в прогрессировании глаукомной оптиконеуропатии [8, 9]. Есть доказательства того, что в ее развитие вносит вклад собой молекулярного контроля сигнального механизма TGF- β [14]. Предполагается, что этот фактор, стимулируя в тканях глаза выработку эндогенных антиоксидантов, служит нейротрофическим элементом защиты, но вместе с тем часто высказываются мнения о его негативной роли [5]. Так, уровни TGF- β_1 и TGF- β_2 при глаукомной оптиконеуропатии бывают повышенными, причем в широком диапазоне [7, 11].

Материал и методы. Локальный уровень цитокинов исследовали у 133 пациентов с первичной открытоугольной глаукомой I–III стадий: в возрасте до 59 лет – 32 и 60–74 года – 101 человек (преобладали женщины – 57,9%). Глаукому I стадии диагностирована в 39, II стадии – в 56 и III стадии – в 38 случаях. Контрольную группу сформировали 50 практически здоровых добровольцев (30 женщин и 20 мужчин) в возрасте 53,5 \pm 2,4 года. Во всех случаях выполнялось классическое офтальмологическое обследование, рекомендованное национальным руководством по глаукоме [4]: визометрия, биомикроскопия, офтальмоскопия, гониоскопия, тонометрия, пахиметрия, периметрия. Также для более точного определения уровня глаукомной оптической нейропатии проводилась оптическая когерентная офтальмоскопия на томографе Cirrus HD OCT.

Слезную жидкость забирали инсулиновым шприцем из внутреннего угла глаза после раздражения парами аммиака. В ней методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа с использованием специфических тест-систем R&D Diagnostics Inc. (США) определяли содержание интерлейкинов 1 β , 2, 4, 6, 10, 17, а также растворимого рецептора IL-2 (sIL-2), IFN γ , TGF- β_1 и TGF- β_2 . Результаты учитывали с помощью иммуноферментного анализатора Multiscan (Финляндия).

Обработка цифровых данных проводилась методами описательной, параметрической и непараметрической статистики с использованием компьютерных программ Statistica 6 и SPSS 16. Вычисляли среднюю арифметическую (M), ее среднюю ошибку (m), достигнутый уровень значимости (p), медиану (Me), минимальное и максимальное значения, нижний и верхний квартили (Q₂₅, Q₇₅). Зависимость переменных

оценивали по критерию согласия Пирсона (χ^2). Уровень доверительной вероятности был задан равным 95%.

Результаты исследования. В слезной жидкости пациентов, страдающих первичной открытоугольной глаукомой, выявлено достоверное увеличение содержания провоспалительных цитокинов. По сравнению с контролем содержание IL-1 β увеличивалось в 2–10 раз, IL-6 – в 1,5–2 раза, IL-2 – в 5–10 раз, а его растворимого рецептора – в 1,3–2 раза. Уровень IL-17 возрастал более чем в 6 раз, уровень IFN γ – в 1,5–8 раз (табл. 1).

При оценке профиля противовоспалительных цитокинов не выявлено статистически значимых отличий уровней IL-10 в основной и контрольной группах. Содержание IL-4 в слезной жидкости увеличивалось примерно в 2 раза, а содержание TGF- β_1 уменьшалось в то время как содержание TGF- β_2 возрастало (табл. 1).

Среди провоспалительных цитокинов наиболее высокое содержание на III стадии глаукомы продемонстрировали IL-1 β и IL-6, уровень IL-2 был достоверно выше нормы только во II стадии заболевания, а его растворимого рецептора – в I и II стадиях. Содержание IL-17 было повышено у всех обследованных, в большей степени – в I стадии глаукомы. Уровень IFN γ достоверно возрастал во II и III стадиях, а его наименьшие показатели зафиксированы у пациентов с I стадией заболевания, причем здесь они были ниже контрольных значений (табл. 2).

Среди противовоспалительных цитокинов на III стадии заболевания более низкий уровень был определен для IL-10. Содержание IL-4 на III стадии глаукомы достоверно повышалось по сравнению с I и II стадиями и контрольными показателями. Самая низкая концентрация TGF- β_1 и самая высокая концентрация TGF- β_2 установлена у пациентов с III стадией заболевания (табл. 2).

Обсуждение полученных данных. Таким образом, уже на ранней стадии глаукомы зарегистрирована гиперпродукция IL-17 и IL-10, умеренное повышение уровней IL-1 β , TGF β_2 , srIL-2 на фоне дефицита

Таблица 1

Цитокиновый профиль слезной жидкости пациентов с глаукомой

Цитокин	Показатели, пг/мл					
	Группа контроля			Пациенты с глаукомой		
	Me	Q ₂₅ –Q ₇₅	min–max	Me	Q ₂₅ –Q ₇₅	min–max
IL-1 β	2,6	1,6–3,2	0,9–10,0	10,94	3,22–37,19	0,47–265,08
IL-2	2,2	2,0–3,1	1,8–4,1	13,04	10,95–39,46	0,48–327,01
srIL-2	200,0	132,4–240,8	116,3–268,4	298,87	154,60–340,65	111,25–1375,24
IL-6	2,0	1,7–5,4	1,2–6,3	3,00	2,86–8,60	2,00–9,26
IL-17	5,3	2,1–8,9	0,8–16,5	36,70	5,80–98,20	4,20–126,10
IFN γ	22,8	10,0–26,5	4,0–34,1	47,00	17,50–146,40	16,00–210,30
IL-4	4,9	2,5–6,2	2,0–14,3	8,50	5,60–14,60	2,70–38,20
IL-10	14,1	7,1–26,3	5,2–42,0	13,29	6,65–34,51	0,60–63,10
TGF- β_1	360,0	270,0–425,0	240,0–500,0	270,00	180,00–330,00	50,00–380,00
TGF- β_2	168,5	110,0–206,4	98,2–264,8	252,43	201,21–295,31	120,96–343,88

Примечание: разница между группами статистически значима по всем показателям за исключением IL-10.

Таблица 2

Содержание цитокинов в слезной жидкости на разных стадиях первичной открытоугольной глаукомы

Цитокин	Показатели по стадиям заболевания, пг/мл					
	I стадия		II стадия		III стадия	
	Me	Q ₂₅ –Q ₇₅	Me	Q ₂₅ –Q ₇₅	Me	Q ₂₅ –Q ₇₅
IL-1 β	3,69 ¹	3,20–5,06	8,64 ^{1,2}	1,50–12,38	13,20 ^{1,2,3}	3,22–37,19
IL-2	5,18	1,95–8,60	16,19 ^{1,2}	8,46–30,50	3,25 ^{2,3}	1,20–6,84
srIL-2	296,34 ¹	154,00–328,60	309,17 ¹	268,42–394,12	228,95 ^{2,3}	136,77–289,17
IL-6	2,10	2,00–4,80	2,40	2,00–5,70	7,40 ^{1,2,3}	6,50–9,20
IL-17	47,80 ¹	13,20–158,20	19,60 ^{1,2}	7,32–72,50	16,76 ^{1,2}	8,00–62,14
IFN γ	22,83 ¹	10,00–26,50	54,30 ^{1,2}	27,20–146,00	44,36 ^{1,2}	18,64–82,00
IL-4	9,90	3,20–14,00	7,78	2,70–14,30	18,20 ^{1,2,3}	5,60–28,40
IL-10	34,51 ¹	6,20–45,63	3,90 ^{1,2}	6,30–14,31	7,66 ²	6,40–30,50
TGF- β_1	270,00 ¹	210,00–360,00	285,00 ¹	255,00–310,00	200,00 ^{1,2,3}	150,00–240,00
TGF- β_2	182,96 ¹	173,92–238,30	216,00 ¹	193,80–280,40	288,63 ^{1,2}	201,21–320,60

¹ Разница с группой контроля (см. табл. 1) статистически значима.

² Разница с I стадией статистически значима.

³ Разница со II стадией статистически значима.

IFN γ и TGF- β_1 . Расчет соотношения IFN γ /IL-4 позволил констатировать, что у этой категории пациентов превалировал Т-хелперный ответ 2-го типа на фоне гиперактивации Т-хелперного ответа 17-го типа: увеличение концентрации IL-17 в слезной жидкости, превышающей 27 пг/мл, было сопряжено с этой стадией заболевания ($\chi^2=8,64$).

Для анализа представленной модели – использование концентрации IL-17 как дополнительного критерия I стадии глаукомы – применены логистическая регрессия и ROC-анализ. Пошагово были исключены предикторы отрицательно классифицированных примеров. В окончательной модели регрессии сохранилось независимое влияние уровня IL-17, что определяло его пригодность для ранней диагностики заболевания (рис.).

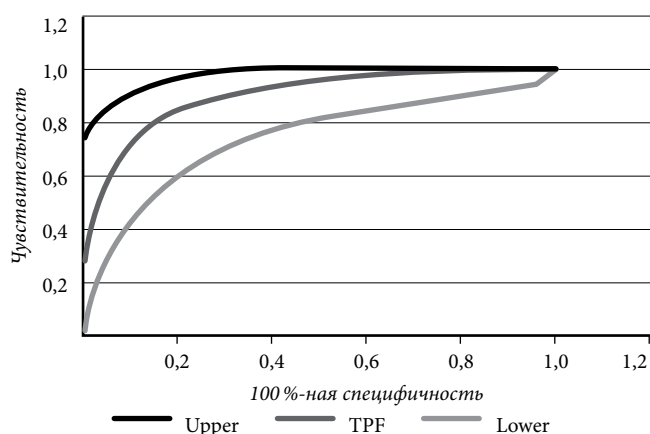


Рис. ROC-кривая для IL-17 на I стадии глаукомы.

На II стадии глаукомы отмечено увеличение локального уровня IFN γ – маркера Т-хелперного ответа 1-го типа, повышение содержания IL-1 β , IL-2 и его растворимого рецептора. Сохранялась гиперпродукция TGF- β_2 и IL-17, но значения последнего были достоверно ниже, чем на I стадии болезни. Выявлен пониженный уровень TGF- β_1 (неотличавшийся от такового на I стадии), определен дефицит IL-10. При комплексной оценке на этой стадии глаукомы определен 1-й тип Т-хелперного ответа с угнетением противовоспалительной активности клеточных элементов врожденного иммунитета.

На III стадии заболевания зафиксировано увеличение содержания как «ранних», так «поздних» провоспалительных цитокинов – IL-1 β и IL-6 – и повышенные, как и на II стадии, уровни IL-17 и IFN γ . Выявлено относительное снижение (до референсных величин) локальной концентрации IL-2 и его растворимого рецептора, что может свидетельствовать об истощении их продукции или повышенном образовании соответствующих комплексов.

Оценка противовоспалительных медиаторов в слезной жидкости при далеко зашедшей глаукоме показала изменение баланса в сторону усиления продукции и секреции большинства из них: в 4 раза увеличился уровень IL-4, нарастала концентрация TGF- β_2 , умеренно повышалось содержание IL-10. Отличительным признаком этой стадии болезни был локальный дефицит TGF- β_1 . Увеличение уровней IFN γ и IL-4 с превалированием последнего характеризует 2-й тип Т-хелперного иммунного ответа.

Таким образом, локальный профиль цитокинов при первичной открытоугольной глаукоме отличается выраженной провоспалительной направленностью с переключением с 17-го и 2-го типов Т-хелперного ответа на I стадии на 1-й тип ответа на II стадии и на 2-й тип Т-хелперного ответа с гиперпродукцией IL-1 β , IL-6 и TGF β_2 на III стадии заболевания. Учитывая обнаруженные изменения цитокинового профиля, для неинвазивной диагностики ранней стадии первичной открытоугольной глаукомы можно рекомендовать определение в слезной жидкости содержание IL-17. Полученные результаты можно считать теоретическим

обоснованием перспективности иммуотропной терапии у пациентов с далеко зашедшей первичной открытоугольной глаукомой.

Литература

1. Волков В.В. Глаукома открытоугольная. М.: Медицинское информационное агентство, 2008. 352 с.
2. Егоров Е.А., Астахов Ю.С., Шуко А.Г. Национальное руководство по глаукоме: руководство для поликлинических врачей. М.: Дом печати, 2008. 135 с.
3. Еричев В.П. Цитокиновый скрининг при первичной открытоугольной глаукоме // Глаукома. 2001. № 1. С. 11–16.
4. Лихванцева В.Г., Табибов А.Г., Соломатина М.В. Роль иммунных реакций в патогенезе оптической нейропатии при нормотензивной глаукоме // Глаукома. 2014. Т. 13, № 2. С. 17–28.
5. Никитин Н.А. Роль TGF- β в офтальмологии // Цитокины и воспаление. 2009. Т. 8, No. 1. С. 3–8.
6. Рукина Д.А., Догадова Л.П., Маркелова Е.В. Иммунологические аспекты первичной открытоугольной глаукомы // РМЖ. Офтальмология. 2011. № 4. С. 162–165.
7. Рукина Д.А. Особенности иммунного и цитокинового статусов у больных первичной открытоугольной глаукомой: дисс...канд. мед. наук. Владивосток, 2012. 134 с.
8. Соколов В.А., Мкхинини Науфель, Никифоров А.А. Цитокины при первичной открытоугольной глаукоме // Глаукома. 2011. № 3. С. 17–19.
9. Трунов А.Н., Трунова Л.А., Черных В.В. Особенности иммунобиохимических показателей слезной жидкости при начальной и развитой стадиях первичной открытоугольной глаукомы // Проблемы клин. медицины. 2005. № 2. С. 83–86.
10. Balaiya S., Edwards J., Tillis T. [et al.] Tumor necrosis factor-alpha levels in aqueous humor of primary open angle glaucoma // Clin. Ophthalmol. 2011. Vol. 5. P. 553–556.
11. Fuchshofer R. The role of TGF- β in the pathogenesis of primary open-angle glaucoma // Cell Tissue Res. 2012. Vol. 347, No. 1. P. 279–290.
12. Grus F.H., Joachim S.C., Wuenschig D. [et al.] Autoimmunity and glaucoma // J. Glaucoma. 2008. Vol. 17, No. 1. P. 79–84.
13. Huang P., Qi Y., Xu Y.S. [et al.] Serum cytokine alteration is associated with optic neuropathy in human primary open angle glaucoma // J. Glaucoma. 2010. Vol. 19, No. 5. P. 324–330.
14. Lütjen-Drecoll E. Morphological changes in glaucomatous eyes and the role of TGFbeta2 for the pathogenesis of the disease // Exp. Eye Res. 2005. Vol. 81, No. 1. P. 1–4.
15. Martinez G.J., Zhang Z., Nurieva R.I. [et al.] Role of TGF-beta signaling pathway in generation of Th17 and regulatory T cells // Int. Immunol. 2010. Vol. 22, No. 1. P. 94.

Поступила в редакцию 06.10.2014.

Локальная цитокиновая регуляция на разных стадиях первичной открытоугольной глаукомы

А.С. Хохлова, А.В. Кириенко, Н.В. Филина, Е.В. Маркелова
Тихоокеанский государственный медицинский университет
(690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Резюме. Определяли содержание про- и противовоспалительных цитокинов в слезной жидкости 133 человек с различными стадиями первичной открытоугольной глаукомы. Локальный цитокиновый профиль отличался выраженным провоспалительным характером с переключением Т-хелперного иммунного ответа с 17-го и 2-го типов на I стадии на Т-хелперный ответ 1-го типа на II стадии и на Т-хелперный ответ 2-го типа на III стадии заболевания. Для неинвазивной диагностики ранней стадии первичной открытоугольной глаукомы можно рекомендовать определение в слезной жидкости уровня интерлейкина-17. Теоретически обоснованным и перспективным следует считать рассмотрение вопроса о применении иммуотропной терапии у пациентов с III стадией этого заболевания.

Ключевые слова: глаукома, оптическая нейропатия, цитокины, иммунный ответ.