

## КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПРО- И ПРОТИВО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В РАЗВИТИИ ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЫ

Барычева Л.Ю.<sup>1</sup>, Хайт Г.Я.<sup>2</sup>, Какулия М.Г.<sup>3</sup>, Берновская А.А.<sup>2</sup>, Какулия Д.М.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ставрополь;

<sup>2</sup>АНМО «Ставропольский краевой клинический консультативно-диагностический центр», Ставрополь, e-mail: skkdc@skkdc.ru;

<sup>3</sup>ГБУЗ «Ставропольская краевая клиническая больница», Ставрополь, e-mail: kkb@stv.runnet.ru.

**Цель исследования:** определить значение про- и противовоспалительных цитокинов в развитии первичной открытоугольной глаукомы. Было обследовано 70 больных, в том числе: 25 с подозрением на глаукому, 25 – с начальной стадией глаукомы, 20 – с развитой стадией. Прогрессирование глаукомы на ранних стадиях сопровождается достоверным повышением содержания в слезной жидкости провоспалительных цитокинов (ИФ- $\gamma$ , ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$ , а также ИЛ-17); на более поздних стадиях – противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10). У пациентов с начальными проявлениями глаукомы преобладает Th-1 вариант иммунного ответа. Увеличение Th-2 типа иммунного ответа отмечается только на развитой стадии глаукомы. Установлена отрицательная корреляционная связь между показателями ОСТ (толщиной СНВС, площадью и объемом НРП) и повышением в слезной жидкости провоспалительных цитокинов.

**Ключевые слова:** первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ), подозрение на глаукому, цитокины, интерлейкины, слезная жидкость.

## CLINICO-PATHOGENETIC VALUE PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN THE DEVELOPMENT OF PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA

Barycheva L.Yu.<sup>1</sup>, Khayt G.Ya.<sup>2</sup>, Kakuliya M.G.<sup>3</sup>, Bernovskaya A.A.<sup>2</sup>, Kakuliya D.M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Stavropol state medical university Health Ministry of Russian Federation, Stavropol;

<sup>2</sup>Stavropol Regional Clinical Diagnostic Center», Stavropol, e-mail:skkdc@skkdc.ru;

<sup>3</sup>Stavropol Regional Clinical Hospital, e-mail: kkb@stv.runnet.ru

**Objective:** To determine the value of pro- and anti-inflammatory cytokines in the development of primary open angle glaucoma. The study involved 70 patients, including: 25 – with suspected glaucoma, 25 – with an initial stage of glaucoma, 20 – with advanced stages of glaucoma. The progression of glaucoma at an early stage is accompanied by a significant increase in the tear fluid content of proinflammatory cytokines (IF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-17); at later stages – anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10). In patients with early signs of glaucoma predominant Th-1 variant of the immune response. Th-2 type of immune response The increase is observed only in the advanced stages of glaucoma. A negative correlation between the indicators OST (RNFL thickness, area and volume of the NPF) and an increase in proinflammatory cytokines of the tear fluid.

**Keywords:** primary open-angle glaucoma, a suspicion of glaucoma, cytokines, interleukins, dacryops.

На протяжении последних десятилетий изучение иммунорегуляции воспалительных и дистрофических процессов при первичной открытоугольной глаукоме остается важной медико-биологической проблемой [1,3,5].

В серии масштабных исследований показано значение ряда цитокинов и факторов роста в развитии глаукомы, установлена их роль в механизмах как нейропротекции, так и нейродегенерации [1,3-8].

При анализе цитокинов слезной жидкости установлено развитие иммунного ответа с увеличением функциональной активности Th-1, доказано, что нарушение соотношения Th1/Th2-клеток способствует развитию глаукомной нейропатии [2,5,8].

**Цель исследования:** определить клинико-патогенетическое значение про- и противовоспалительных цитокинов в развитии первичной открытоугольной глаукомы.

**Материал и методы исследования.** В работе представлены данные офтальмологического и иммунологического обследования 70 пациентов (108 глаз) с первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ) I и II стадии и с подозрением на глаукому на одном или обоих глазах. В группу I включены пациенты с подозрением на глаукому – 25 человек (42 глаза), из них 8 человек с подозрением на глаукому одного глаза, 17 человек – на глаукому двух глаз. В группу II вошли больные с начальной стадией первичной открытоугольной глаукомы – 25 человек (39 глаз), в группу III – больные с развитой стадией глаукомы – 20 человек (27 глаз). Критериями исключения служили: наличие травм, воспалительных или аллергических заболеваний переднего отрезка глаза, помутнение оптических сред (в том числе почти зрелая и зрелая катаракта), далеко зашедшая и терминальная стадии глаукомы, оперативные вмешательства на органе зрения в анамнезе. В контрольную группу включены 22 офтальмологически здоровых человека (44 глаза), сопоставимых по возрасту и полу. Допустимая офтальмопатология – миопия слабой степени, пресбиопия.

Средний возраст пациентов в группе с подозрением на глаукому составил  $59,86 \pm 2,19$  лет, в группе с начальной стадией глаукомы –  $63,16 \pm 1,72$ , в группе с развитой стадией глаукомы –  $66,45 \pm 2,78$  в контрольной группе –  $60,05 \pm 2,28$  лет.

Диагноз устанавливали с помощью стандартных методов исследования, на основании показателей визометрии, авторефрактометрии, полей зрения (стандартная автоматизированная периметрия «Humphrey» по пороговой стратегии, тест 30-2), аппланационной тонометрии по Маклакову, биомикроскопии переднего отрезка глаза, гониоскопии, прямой офтальмоскопии, тонографии по Нестерову, пахиметрии и специальных методов: исследование критической частоты слияния мельканий в центральной зоне, данные оптической когерентной томографии.

Уровень цитокинов в слезной жидкости (СЖ) пациентов определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем «Вектор-Бест». Математическую обработку представленных данных проводили с использованием стандартных пакетов прикладных программ «Biostat 4,0», «Attestat 10.5.1.». Для протяженных переменных рассчитывали средние величины и средние отклонения, результаты были представлены в виде  $X \pm s_x$ . При попарном сравнении параметров применяли дисперсионный анализ. При нормальном типе распределения использовали критерий Манна – Уитни, при несоответствии изучаемых показателей нормальному распределению применяли непараметрические критерии – Крускала – Уоллиса, Ньюмена – Кейлса, Данна.

Корреляционный анализ осуществляли с вычислением коэффициентов линейной корреляции Спирмэна. Анализ качественных признаков выполняли с помощью критерия  $\chi^2$ . Диагностическую ценность признаков определяли их чувствительностью, специфичностью, положительной и отрицательной предсказательной ценностью. Для оценки риска развития глаукомы вычисляли отношение шансов с определением 95 % доверительного интервала, строили кривые Каплана – Майера с оценкой достоверности различий с помощью логрангового критерия с поправкой Йетса.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Интерферон- $\gamma$  в слезной жидкости определялся у 73,8 % пациентов с подозрением на глаукому, у 64,1 % – с глаукомой начальной стадии, у 74,1 % – с развитой стадией глаукомы. Наиболее высокие показатели (20-50 пг/мл) выявлялись у пациентов групп I и II, что составило 12,9 % и 24 % соответственно, однако межгрупповых различий зарегистрировано не было.

При определении среднего содержания ИФ- $\gamma$  в слезной жидкости отмечено достоверное повышение его продукции у пациентов всех групп (табл. 1), с увеличением у пациентов с преглаукомой в 3,2 раза, у пациентов с начальной стадией глаукомы – в 3,8 раза, у больных с развитой стадией глаукомы – в 2,7 раза.

Максимальные уровни ИФ- $\gamma$  отмечались в слезной жидкости пациентов с начальными проявлениями глаукомы ( $p < 0,05$ ).

Таблица 1

Содержание цитокинов в слезной жидкости при глаукоме и подозрении на глаукому

Цитокины, пг/мл	Группа I n=25	Группа II n=25	Группа III n=20	Контрольная группа n=22	P
<b>ИФ-<math>\gamma</math></b>	12,90±0,83*	15,47±0,66*	11,16±0,51*	4,06±0,18	$P_{I-II} < 0,05$ $P_{II-III} < 0,05$
<b>ИЛ-1<math>\beta</math></b>	44,46±5,92*	67,93±5,14*	83,71±4,64*	16,86±0,81	$P_{I-II} < 0,05$ $P_{I-III} < 0,05$ $P_{II-III} < 0,05$
<b>ФНО-<math>\alpha</math></b>	49,82±3,27*	63,76±4,20*	87,86±6,08*	23,73±1,84	$P_{I-II} < 0,05$ $P_{I-III} < 0,05$ $P_{II-III} < 0,05$
<b>ИЛ-17</b>	0,92±0,08	1,13±0,10	1,37±0,13*	0,89±0,09	$P_{I-III} < 0,05$
<b>ИЛ-4</b>	9,86±1,20	10,09±1,49	17,39±2,74*	8,29±1,64	$P_{I-III} < 0,05$ $P_{II-III} < 0,05$
<b>ИЛ-10</b>	11,70±0,79	17,66±1,70*	16,08±1,58*	11,09±0,83	$P_{I-II} < 0,05$ $P_{I-III} < 0,05$

\* –  $p < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с контрольной группой,  $p_{I-II}$ ,  $p_{I-III}$ ,  $p_{II-III}$  – достоверность различий между группами I, II и III (критерий Ньюмена – Кейлса, критерий Данна), n – число образцов слезной жидкости.

Интерлейкин-1 $\beta$  в слезной жидкости определялся у 64,3 % пациентов с подозрением на глаукому, у 64,1 % пациентов с начальной стадией ПОУГ, у 74,1 % с развитой стадией ПОУГ. Наиболее высокие значения в пределах 100-200 пг/мл достоверно чаще

регистрировались у пациентов с развитой стадией глаукомы (30 %) по сравнению с группой I (7,4 %,  $p<0,05$ ) и группой II (16 %,  $p<0,05$ ).

При определении среднего содержания ИЛ-1 $\beta$  в слезной жидкости установлено повышение показателей у пациентов всех групп по отношению к контрольной группе. Максимальное увеличение уровня ИЛ-1 $\beta$  в слезной жидкости отмечалось у больных в группах II и III (табл. 1). При этом у пациентов с ПОУГ начальной стадии показатели ИЛ-1 $\beta$  в СЖ превышали значения в контрольной группе в 4 раза ( $p<0,05$ ), у пациентов с развитой стадией глаукомы – в 5 раз ( $p<0,05$ ), с подозрением на глаукому – в 2,6 раза ( $p<0,05$ ). При межгрупповых сравнениях выявлены различия показателей в зависимости от степени глаукомы. Максимальные уровни ИЛ-1 $\beta$  в слезной жидкости регистрировались в группе с развитой стадией глаукомы ( $p<0,05$ ).

ФНО- $\alpha$  в слезной жидкости определялся у 66,7 % обследуемых с подозрением на глаукому, у 61,5 % пациентов с начальной стадией ПОУГ, у 74,1 % – с развитой стадией ПОУГ. Максимальные значения (100–200 пг/мл) определялись у 3,6 % пациентов в группе I, у 2 % – в группе II. В группе III высокие показатели регистрировались у 55 % пациентов с достоверными отличиями от групп I и II ( $p<0,05$ ).

Средний уровень ФНО- $\alpha$  в слезной жидкости повышался у пациентов всех групп. Наиболее высокие уровни ФНО- $\alpha$  в слезной жидкости регистрировались при развитой стадии глаукомы ( $p<0,05$ ), наиболее низкие – в группе с подозрением на глаукому ( $p<0,05$ ).

Интерлейкин 17 в слезной жидкости в группе I определялся у 67 % больных, в группе II – у 66,7 %, в группе III – у 74,1 %. При оценке среднего содержания ИЛ-17 отмечена тенденция к его повышению в слезной жидкости у пациентов в группах I и II (табл. 1). При этом достоверные отличия от группы здоровых людей выявлялись только у пациентов группы III ( $p<0,05$ ).

При исследовании противовоспалительных цитокинов у пациентов с подозрением на глаукому ИЛ-4 в слезной жидкости выявлялся в 88,1 % случаев, с начальной стадией ПОУГ – в 79,5 % случаев, с развитой стадией ПОУГ – в 85,2 %, в контрольной группе – в 13,6 % ( $p<0,05$ ). Анализ среднего содержания ИЛ-4 в слезной жидкости не выявил достоверного увеличения показателей в группах с подозрением на глаукому и начальной стадией глаукомы (табл. 1). Максимальные показатели ИЛ-4 в слезной жидкости выявлялись при глаукоме развитой стадии,  $p<0,05$ .

Противовоспалительный ИЛ-10 в слезной жидкости в группе I выявлялся у 61,9 % пациентов, в группе II – у 58,9 %, в группе III – у 70,4 %. Показатели ИЛ-10 в слезной жидкости при подозрении на глаукому достоверно не изменялись. У пациентов с начальной и развитой стадиями глаукомы содержание ИЛ-10 в слезной жидкости возрастало по

сравнению со здоровыми людьми в 1,6 и 1,5 раза.

Для оценки поляризации иммунного ответа определяли соотношение уровней про- и противовоспалительных цитокинов в слезной жидкости (табл. 2).

Коэффициент соотношения ИФ- $\gamma$ /ИЛ-4 в слезной жидкости увеличивался в дебюте заболевания – при подозрении на глаукому и начальных проявлениях глаукомы,  $p < 0,05$ .

Таблица 2

Баланс про- и противовоспалительных цитокинов в слезной жидкости при глаукоме и подозрении на глаукому

Коэффициент соотношения	Группа I n=25	Группа II n=25	Группа III n=20	Контрольная группа n=22	P
ИФ- $\gamma$ /ИЛ-4	1,11 $\pm$ 0,19*	1,26 $\pm$ 0,22*	0,65 $\pm$ 0,12	0,38 $\pm$ 0,07	$P_{I-III} < 0,05$
ИФ- $\gamma$ /ИЛ-10	1,06 $\pm$ 0,09*	0,84 $\pm$ 0,08*	0,71 $\pm$ 0,09*	0,34 $\pm$ 0,04	$P_{I-III} < 0,05$
ИЛ-1 $\beta$ /ИЛ-4	3,53 $\pm$ 0,81	5,44 $\pm$ 1,08	4,62 $\pm$ 0,92	2,17 $\pm$ 0,56	
ИЛ-1 $\beta$ /ИЛ-10	3,81 $\pm$ 0,63*	3,98 $\pm$ 0,61*	5,19 $\pm$ 0,51*	1,38 $\pm$ 0,11	
ФНО- $\alpha$ /ИЛ-4	4,44 $\pm$ 0,76	5,32 $\pm$ 0,98	4,92 $\pm$ 0,91	2,86 $\pm$ 0,74	
ФНО- $\alpha$ /ИЛ-10	4,04 $\pm$ 0,36*	3,49 $\pm$ 0,42*	5,59 $\pm$ 0,69*	1,83 $\pm$ 0,23	$P_{I-III} < 0,05$ $P_{II-III} < 0,05$

\* –  $p < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с контрольной группой,  $p_{I-II}$ ,  $p_{I-III}$ ,  $p_{II-III}$  – достоверность различий между группами I, II и III (критерий Ньюмена – Кейлса, критерий Данна), n – число образцов слезной жидкости.

Показатели коэффициента ИФ- $\gamma$ /ИЛ-10 в слезной жидкости возрастали на всех стадиях глаукомного процесса ( $p < 0,05$ ). При этом максимальные показатели определялись при подозрении на глаукому.

Коэффициент соотношения ИЛ-1 $\beta$ /ИЛ-10 существенно увеличивался с увеличением показателей при подозрении на глаукому, начальной и развитой стадиях глаукомы в 2,8, 2,9, 3,8 раза по отношению к группе здоровых людей при отсутствии межгрупповых различий.

Показатели соотношения ФНО- $\alpha$ /ИЛ-4 соответствовали нормальным значениям.

Коэффициент ФНО- $\alpha$ /ИЛ-10 в слезной жидкости возрастал у пациентов всех клинических групп с увеличением при подозрении на глаукому в 2,2 раза, при начальной стадии глаукомы – в 1,9 раза, при развитой стадии глаукомы – в 3,1 раза.

Таким образом, результаты исследования цитокинов ИФ- $\gamma$ , ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-17, ИЛ-4, ИЛ-10 у пациентов с глаукомой выявили комплекс нарушений, свидетельствующих о преобладании провоспалительных реакций и их роли в прогрессировании глаукомного процесса.

При анализе клинических изменений в зависимости от иммунологических показателей отмечено, что уменьшение толщины слоя нервных волокон сетчатки и площади НРП коррелировало с повышением в слезной жидкости содержания ИЛ-1 $\beta$ , ИФ- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , объема НРП – с увеличением уровня ИФ- $\gamma$ .

Анализ роли взаимосвязей между показателями интерлейкинов и оптической

когерентной томографии в диагностике ПОУГ выявил, что большинство измененных показателей характеризовали высокую вероятность первичной открытоугольной глаукомы (табл. 3).

Максимальный риск выявления ПОУГ отмечался при значениях ИЛ-1 $\beta$  >25,6 пг/мл, ФНО- $\alpha$  >40 пг/мл, ИФ- $\gamma$  >9,4 пг/мл и КЧСМ < 38 Гц, высокий – при показателях СНВС < 82,6 мкм, ИЛ-10 >16,4 пг/мл.

Показатели СНВС <82,6 мкм, КЧСМ <38 Гц и уровни ИЛ-1 $\beta$  >25,6 пг/мл, ФНО $\alpha$  >40 пг/мл, ИФ- $\gamma$  >9,4 пг/мл, ИЛ-10 >16,4 пг/мл имели высокую положительную предсказательную ценность в диагностике глаукомы.

Высокой отрицательной предсказательной ценностью характеризовались КЧСМ < 38 Гц, ИЛ-1 $\beta$  > 25,6 пг/мл, ФНО- $\alpha$  > 40 пг/мл, ИФ- $\gamma$  > 9,4 пг/мл (табл. 3).

Таблица 3

Диагностическая значимость некоторых морфофункциональных и иммунологических показателей в верификации первичной открытоугольной глаукомы

Показатель	Se (%)	Sp (%)	PPV (%)	NPV (%)
СНВС <82,6 мкм	62	95	96,5	51,4
КЧСМ <38 Гц	97,7	89,5	89,7	93
ИЛ-1 $\beta$ >25,6 пг/мл	97	93,6	92,4	95
ФНО- $\alpha$ >40 пг/мл	93	92,9	91,5	86
ИФ- $\gamma$ >9,4 пг/мл	88,6	91,7	93,0	97,1
ИЛ-10 >16,4 пг/мл	56	84,1	94,7	44

*Примечание: Se – чувствительность, Sp – специфичность, PPV – положительная предсказательная ценность, NPV – отрицательная предсказательная ценность.*

Таким образом, изменение баланса про- и противовоспалительных цитокинов с повышением соотношения ИФ- $\gamma$ /ИЛ-4, ИФ- $\gamma$ /ИЛ-10, ИЛ-1 $\beta$ /ИЛ-10, ФНО- $\alpha$ /ИЛ-10 в слезной жидкости и ИЛ-1 $\beta$ /ИЛ-10 позволяет сделать вывод о Th1 – поляризации иммунного ответа у пациентов с подозрением на глаукому, начальной и развитой стадиями глаукомы [2,5,8].

Увеличение ИЛ-4 и ИЛ-10 преимущественно у пациентов с развитой стадией глаукомы позволяет говорить об увеличении интенсивности Th2 иммунного ответа лишь на поздних стадиях развития глаукомы. Синтез ИЛ-4 запаздывает и регистрируется только на развитой стадии глаукомы.

Сопряженность дисбаланса цитокинов с развитием первичной открытоугольной глаукомы подтверждается установленной в исследовании корреляционной взаимосвязью показателей ОСТ с уровнем провоспалительных цитокинов.

Уменьшение толщины слоя нервных волокон сетчатки и площади НРП коррелирует с повышением в слезной жидкости содержания ИЛ-1 $\beta$ , ИФ- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , объема НРП – с

увеличением уровня ИФ- $\gamma$ .

Взаимосвязь цитокиновых нарушений с характерными морфофункциональными изменениями в структурах диска зрительного нерва и волокон сетчатки при первичной открытоугольной глаукоме позволяет рассматривать их как одно из звеньев патогенеза и свидетельствует об участии иммунных реакций в процессах нейродегенерации.

Использование комплекса морфометрических, функциональных и иммунологических показателей в качестве диагностических параметров позволит улучшить диагностику первичной открытоугольной глаукомы на ранних доклинических этапах диагностического поиска.

### Список литературы

1. Особенности местного и системного цитокинового статуса у здоровых разного возраста и пациентов с начальной стадией первичной открытоугольной глаукомы / О.С. Слепова М.У. Арапиев, Д.Н. Ловпаче Д.Н. и др. // Национальный журнал глаукома. – 2016. – Т.15, № 1. – С.3-12.
2. Чередниченко Л.П., Барычева Л.Ю., Берновская А.А. Определение провоспалительных цитокинов в ранней диагностике первичной открытоугольной глаукомы /Л.П. Чередниченко, Л.Б. Барычева, А.А. Берновская // Российский офтальмологический журнал. – 2013, Т.6. – № 2. – С.82-85.
3. Cueva Vargas J.L., Belforte N., Di Polo A. The glial cell modulator ibudilast attenuates neuroinflammation and enhances retinal ganglion cell viability in glaucoma through protein kinase A signaling / J.L. Cueva Vargas, N. Belforte, A. Di Polo // Neurobiology of Disease, 2016. – V.93. – P.156-171.
4. Early pro-inflammatory cytokine elevations in the DBA/2J mouse model of glaucoma / G.N. Wilson, D.M. Inman, C.M. Dengler Crish et al. // Neuroinflammation 2015. – № 12. – P.176 (ИЛ1 бета, ИФ гамма, ИЛ6, ИЛ4, ИЛ10).
5. Helper1/T-Helper2 Cytokine Imbalance in the Iris of Patients with Glaucoma / M.S. Wong, P. Huang, W. Li et al. // PLoS One. 2015; 10(3): e0122184. Published online 2015 Mar 26. doi: 10.1371/journal.pone.0122184
6. Measurement of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, Fas ligand, interleukin-1 $\alpha$ , and interleukin-1 $\beta$  in the aqueous humor of patients with open angle glaucoma using multiplex bead analysis / A. Borkenstein, C. Faschinger, R. Maier et al. // Mol. Vis. – 2013. – № 19. – P.2306-2311.
7. Soluble tumor necrosis factor alpha promotes retinal ganglion cell death in glaucoma via

calcium-permeable AMPA receptor activation / J.L. Cueva Vargas, I. Osswald, N. Unsain et al. // J. Neurosci. 2015. – №35. – P.12088-12102 Как ФНО альфа умерщвляет клетки

8. Tezel G. Immune regulation toward immunomodulation for neuroprotection in glaucoma / G. Tezel // Curr. Opin. Pharmacol. – 2013. – №13. – P.23-31.