

ЦИТОКИНЫ ВО ВЛАГЕ ПЕРЕДНЕЙ КАМЕРЫ ГЛАЗА И ИХ РОЛЬ В РАЗВИТИИ СИСТЕМНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА НА АНТИГЕНЫ ТКАНЕЙ ГЛАЗА

Куликова И.Г., Слепова О.С., Денисова Е.В., Ковалева Л.А., Макаров П.В., Ловпаче Д.Н.

ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Работа посвящена исследованию связи между концентрацией различных цитокинов во влаге передней камеры глаза (ВПК) и развитием системного клеточного иммунного ответа на антигены тканей глаза, рассматриваемого в аспекте нарушения феномена «иммунного отклонения, связанного с передней камерой глаза (ИОПК)». Исследования проводились параллельно с помощью мультиплексного анализа цитокинов (использовался проточный цитометр) и реакции торможения миграции лейкоцитов. Обследовано 26 пациентов с различными формами офтальмопатологии (uveиты – 18, кератouveиты – 3, глаукома – 5). Показано, что снижение уровня TGF- β 1 и увеличение ряда провоспалительных, хемотаксических цитокинов в ВПК ассоциируется с развитием органоспецифической сенсibilизации.

Ключевые слова: цитокины, передняя камера глаза, органоспецифический аутоиммунитет, мультиплексный анализ, реакция торможения миграции лейкоцитов, офтальмопатология

CYTOKINES IN ANTERIOR EYE CHAMBER LIQUID: THEIR ROLE IN DEVELOPMENT OF SYSTEMIC IMMUNE RESPONSE TO OCULAR TISSUE ANTIGENS

Kulikova I.G., Slepova O.S., Denisova E.V., Kovaleva L.A., Makarov P.V., Lovpache D.N.

The Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Abstract. The work is dedicated to studies of interrelations between the cytokine contents in the liquid from anterior eye chamber (AEC), and development of systemic immune response to ocular tissue antigens, described in terms of an anterior eye chamber-associated immune disturbance (ACAID phenomenon). The immune assays were conducted in parallel, using multiplex cytokine analysis (flow cytometry technique), and leukocyte inhibition migration reaction. Twenty-six patients with different forms of ophthalmic pathology were examined, including cases of uveitis (18), keratouveitis (3), glaucoma (5). It is shown that the reduced TGF- β 1 levels and increased concentrations of proinflammatory, chemotactic cytokines in AEC liquid are associated with development of organ-specific immune sensitization.

Keywords: cytokines, anterior eye chamber, organ-specific autoimmunity, multiplex analysis, migration inhibition test, leukocytes, ophthalmopathology

Адрес для переписки:

Куликова Ирина Геннадьевна
ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней
им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ
105062, Россия, Москва, ул. Садовая-Черногрязская, 14/19.
Тел.: 8 (926) 386-40-29.
E-mail: ig-kulikova@yandex.ru

Address for correspondence:

Kulikova Irina G.
The Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases
105062, Russian Federation, Moscow, Sadovaya-
Chernogryazskaya str., 14/19.
Phone: 7 (926) 386-40-29.
E-mail: ig-kulikova@yandex.ru

Образец цитирования:

И.Г. Куликова, О.С. Слепова, Е.В. Денисова, Л.А. Ковалева, П.В. Макаров, Д.Н. Ловпаче, «Цитокины во влаге передней камеры глаза и их роль в развитии системного иммунного ответа на антигены тканей глаза» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 2. С. 179-182.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-2-179-182

© Куликова И.Г. и соавт., 2015

For citation:

I.G. Kulikova, O.S. Slepova, E.V. Denisova, L.A. Kovaleva, P.V. Makarov, D.N. Lovpache, "Cytokines in anterior eye chamber liquid: their role in development of systemic immune response to ocular tissue antigens", *Medical Immunology*, 2015, Vol. 17, no. 2, pp. 179-182.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-2-179-182

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-2-179-182>

Введение

В настоящее время большое внимание уделяется расшифровке основных механизмов, лежащих в основе иммунной привилегированности глаза. Прежде всего это относится к АСАИД (anterior chamber associated immune deviation) – иммунному отклонению, которое проявляется при попадании растворимых антигенов в переднюю камеру глаз [4, 8]. Оно приводит (путем цепи сигнальных «цитокиновых» эффектов, проходящих через фильтрующую зону трабекулы и достигающих селезенки) к селективной антиген-специфической супрессии системного Th1-клеточного иммунного ответа и ГЧЗТ. Согласно современным представлениям, ключевая роль в реализации этого феномена отводится цитокинам [1, 3, 6, 7, 9]. В связи с этим вызывает интерес изучение концентрации цитокинов во влаге передней камеры (ВПК) глаза и их влияние на развитие системного иммунного ответа к антигенам тканей глаза в условиях офтальмопатологии.

Цель: изучение связи между развитием системного клеточного иммунного ответа на антигены тканей глаза и концентрацией цитокинов во влаге передней камеры глаза в условиях офтальмопатологии.

Материалы и методы

В исследование были включены 26 пациентов с разными клиническими формами патологии переднего отдела глаза, перенесшие хирургические вмешательства (осложненные увеиты – 18 чел., кератоувеиты с язвами роговицы – 3 чел., глаукома – 5 чел.). Материалом исследования служили: влага передней камеры больного глаза (ВПК), взятая во время операции, и периферическая кровь, взятая из локтевой вены в стерильные пробирки Vacuette с EDTA, непосредственно перед операцией.

В ВПК определяли одновременно содержание 16 цитокинов различного биологического действия: интерлейкины (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18), факторы некроза опухоли (TNF α , TNF β), интерфероны (IFN α , IFN γ), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-A); трансформирующий фактор роста (TGF- β 1). Исследование проводилось с помощью мультиплексного анализа на проточном цитофлуорометре FACS Canto II («Becton Dickinson», США) в программе BD FACS Diva с использованием наборов CBA (Th1/Th2 Cytokines Multiplex Kit, BD Biosciences, США); обработка данных – в программе FCSAP Array (SoftFlow, США).

Системный иммунный ответ на антигены тканей глаза (роговица, хрусталик, увеальная ткань, S-антиген сетчатки) оценивали с помо-

щью реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) в 96-луночных микропланшетах [2]. Количественный учет результатов РТМЛ производили на инвертированном микроскопе и оценивали по индексу миграции (ИМ) – соотношение площадей миграции лейкоцитов в опыте (реакция с антигеном) и контроле (среда RPMI 1640«Sigma» без антигена). При оценке результатов за норму принимали интервал ИМ от 0,80 до 1,20. Показатели ниже 0,80 и выше 1,20 считали положительной реакцией, отражавшей системный клеточный иммунный ответ на органоспецифические антигены глаза.

Статистическую обработку результатов проводили в программе «BIOSTATD» (t-критерий Стьюдента, критерий Фишера). Показатель статистической значимости: $p < 0,05$.

Результаты

Мультиплексный анализ показал, что из 16 исследованных цитокинов в ВПК обнаруживались всего 10, с разной частотой: от 13-27% (IL-2, IL-10, TNF α , IFN γ) до 46-77% (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, VEGF-A) и 100% (TGF- β 1); практически отсутствовали IL-4, IL-5, IL-12, IL-17 и TNF β , а уровни IFN α не превышали чувствительности теста.

Для выявления возможной связи между количественным содержанием какого-либо из цитокинов, присутствующих в ВПК больных глаз, и выявлением признаков системной органоспецифической аутосенсibilизации больные были разделены на две группы в зависимости от результатов РТМЛ: I-ая группа (8 чел.) – положительный ответ хотя бы на один тканевой антиген; II-ая группа (18 чел.) – отсутствие ответа на оба антигена.

Наиболее существенные различия были выявлены при исследовании TGF- β 1. Содержание его в ВПК «сенсibilизированных» больных (I-ая группа) оказалось значительно ниже, чем у «несенсibilизированных» (II-ая группа), что подтверждалось сравнением средних групповых уровней ($p = 0,031$) и результатами индивидуального анализа (табл. 1). Последний показал, что в I-ой группе явно преобладали уровни TGF- β 1 ниже 1000 пкг/мл, тогда как во II-ой группе более чем у половины больных они были выше 2000 пкг/мл.

Кроме того, в I-ой группе больных («сенсibilизированных») была отмечена общая тенденция к повышению секреции в ВПК целого ряда провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-18, IFN γ), более или менее выраженная для каждого из них (табл. 1).

Учитывая эту тенденцию, мы провели сравнительную оценку частоты одновременного

**ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ TGF-β1
В ВПК У «СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ»
И «НЕСЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ» АНТИГЕНАМИ
ТКАНЕЙ ГЛАЗА БОЛЬНЫХ**

Группы		I-ая группа РТМЛ пол. (n = 8)	II-ая группа РТМЛ отр. (n = 18)
Уровни TGF-β1 (пкг/мл)			
Средний групповой (M±m)		1366±290 p = 0,031	2134±179
Индивидуальные	< 1000	5 (62,5%)	3(16,7%)
	1000-2000	1 (12,5%)	5 (27,8%)
	> 2000	2 (25,0%)	10 (55,5%)

выявления указанных цитокинов, а также IL-8 и TNFα у пациентов двух групп. Анализ показал, что в I-ой группе в подавляющем большинстве случаев (6 из 8; 75,0%) в ВПК обнаруживались одновременно 4 и более из этих семи цитокинов (в среднем 4,0±0,46); во II-ой группе эти показатели были достоверно ниже: 4 из 18 случаев (22,2%; p = 0,026) и 2,83±0,20 (p = 0,012) соответственно.

Мы не выявили какой-либо связи между развитием клеточного иммунного ответа на антигены тканей глаза и наличием или отсутствием в ВПК таких цитокинов, как IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-17, TNFβ, IFNα, VEGF-A.

Обсуждение

Показатели нормы для цитокинов, содержащихся во внутриглазных жидкостях здорового человека, в частности в ВПК, неизвестны и, по понятным причинам, едва ли могут быть достоверно определены. Данные, полученные при исследованиях животных, свидетельствуют о явном преобладании в нормальной ВПК иммуно-

супрессивных факторов, что во многом обеспечивает реализацию феномена ИОПК – важного звена защиты глаза, способствующего, в частности, предотвращению аутоиммунных реакций [5, 10].

Результаты проведенного нами клинко-иммунологического исследования выявили связь между концентрацией ряда цитокинов, секретируемых в ВПК глаза, и развитием системного иммунного ответа на антигены тканей глаза (индикатором которого в данной работе явилась «положительная» РТМЛ), что может свидетельствовать о срыве механизма, ответственного за ИОПК.

Исходя из полученных нами данных, основными патогенетическими факторами (в рамках 16 исследованных цитокинов), способствующими развитию системной органоспецифической сенсibilизации при заболеваниях глаз, являются падение ниже определенного уровня концентрации TGF-β1 (важнейшего иммунорегуляторного медиатора) и увеличение содержания целого ряда цитокинов, обладающих провоспалительными, хемотаксическими свойствами (IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, IL-18, TNFα, IFNγ) и, что особенно важно, играющими ключевую роль в запуске иммунного ответа на различные антигенные стимулы (IL-1β, IL-2).

Мы полагаем, что результаты проведенного исследования могут иметь значение для понимания механизмов развития органоспецифической аутосенсibilизации в условиях офтальмопатологии, подтверждая теоретические представления о срыве феномена ИОПК. Кроме того, выявленные конкретные, количественные показатели сдвига в локальном цитокиновом статусе могут служить критериями раннего прогнозирования (или подтверждения) нарушений аутоиммунитета, что важно для клинической практики, в частности для определения тактики лечения.

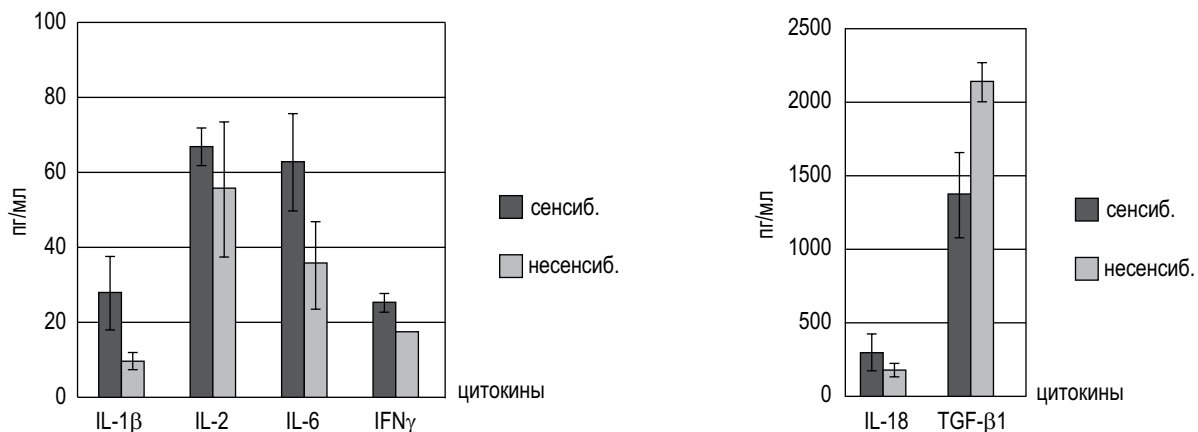


Рисунок 1. Средние уровни цитокинов в ВПК у «сенсibilизированных» и «несенсibilизированных» антигенами тканей глаза больных

Список литературы / References

1. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: ФОЛИАНТ, 2008. С. 497-533. [Ketlinsky S.A., Simbirtsev A.S. Cytokines]. St. Petersburg: FOLIANT, 2008, pp. 497-533.
2. Куликова И.Г., Слепова О.С., Илуридзе С.Л. Модификация тестов, направленных на выявление аутоиммунных реакций при заболеваниях глаз // РОЖ, 2013. Т. 6, № 1. С. 69-72. [Kulikova I.G., Slepova O.S., Iluridze S.L. Modification of tests aimed at identifying the autoimmune reaction in eye diseases. *Rossiyskiy oftol' mologtcheskiy zhurnal = Russian Ophthalmological Journal*, 2013, Vol. 6, no. 1, pp. 69-72. (In Russ.)]
3. Слепова О.С. Патогенетическая роль цитокинов при различных заболеваниях глаз как основа прогнозирования и выбора тактики иммунокорректирующего лечения // РОЖ, 2008. Т. 1, № 3. С. 36-42. [Slepova O.S. The pathogenetic role of cytokines in various eye diseases as basis for prognostication and the choice of immune correction tactics. *Rossiyskiy oftol' mologtcheskiy zhurnal = Russian Ophthalmological Journal*, 2008, Vol. 1, no. 3, pp. 36-42. (In Russ.)]
4. Dariene A. Dart, Reza Dana, Patricia D'Amore, Jerry Y. Niederkorn. Immunology, inflammation and diseases of the eye. *Academic Press*, 2013, pp. 50-57, 38-42.
5. Denniston A.K., Kottoor S.H., Khan I., Oswal K., Williams G.P., Abbott J., Wallace G.R., Salmon M., Rauz S., Murray P.I., Curnow S.J. Endogenous cortisol and TGF-beta in human aqueous humor contribute to ocular immune privilege by regulating dendritic cell function. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 1, pp. 305-11.
6. Horie S., Sugita S., Futagami Y., Kawaguchi T., Kamoi K., Shirato S., Mochizuki M. Human iris pigment epithelium suppresses activation of bystander T cells via TGFbeta-TGFbeta receptor interaction. *Exp. Eye Res.*, 2009, Vol. 88, pp. 1033-42.
7. Kitaichi N., Namba K., Taylor A.W. Inducible immune regulation following autoimmune disease in the immune-privileged eye. *J. Leukoc Biol.*, 2005, Vol. 77, pp. 496-502.
8. Stein-Streilein J., Streilein J.W. Anterior chamber associated immune deviation (ACAID): regulation, biological relevance, and implications for therapy. *Int Rev Immunol.*, 2002, Vol. 21, pp. 123-52.
9. Sugita S., Horie S., Nakamura O., Futagami Y., Takase H., Keino H., Aburatani H., Katunuma N., Ishidoh K., Yamamoto Y., Mochizuki M. Retinal pigment epithelium-derived CTLA-2alpha induces TGFbeta-producing T regulatory cells. *J. Immunol.*, 2008. Vol. 181, pp. 7525-36.
10. Taylor A.W. Ocular immunosuppressive microenvironment. *Chem Immunol. Allergy*, 2007, Vol. 92, pp. 71-85.

Авторы:

Куликова И.Г. — старший научный сотрудник, лаборатория иммунологии и вирусологии, ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Слепова О.С. — д.б.н., профессор, заведующий лабораторией иммунологии и вирусологии, ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Денисова Е.В. — к.м.н., старший научный сотрудник, отделение патологии глаз у детей, ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» МЗ РФ, Москва, Россия

Ковалева Л.А. — научный сотрудник, отделение инфекционных и аллергических заболеваний глаз, ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Макаров П.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник, отделение травматологии, реконструктивной, пластической хирургии и глазного протезирования, ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Ловпаче Д.Н. — к.м.н., научный сотрудник, отделение глаукомы, ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца» МЗ РФ, Москва, Россия

Authors:

Kulikova I.G., Senior Research Associate, Laboratory of Immunology and Virology, The Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Slepova O.S., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Virology and Immunology, The Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Denisova E.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Pediatric Ocular Pathology, The Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Kovaleva L.A., Research Associate, Department of Infectious and Allergic Eye Diseases, The Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Makarov P.V., PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Traumatology, Reconstructive Plastic Surgery and Ocular Prosthetics, The Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Lovpache J.N., PhD (Medicine), Research Associate, Department of Glaucoma, The Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Поступила 05.11.2014

Отправлена на доработку 07.11.2014

Принята к печати 02.03.2015

Received 05.11.2014

Revision received 07.11.2014

Accepted 02.03.2015