

УДК 671.735–007.281+617.747–097–092.18

Уровень фактора некроза опухоли- α и фактора роста эндотелия сосудов у больных регматогенной отслойкой сетчатки с разной степенью пролиферативной витреоретинопатии

Г. В. Левицкая, канд. мед. наук

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им.

В. П. Филатова НАМН Украины», отдел витреоретинальной и лазерной хирургии, г. Одесса

E-mail: kid_od@mail.ru

Ключевые слова: регматогенная отслойка сетчатки, пролиферативная витреоретинопатия, фактор некроза опухоли α , фактор роста эндотелия сосудов, стекловидное тело, витреальное содержимое.

Ключові слова: регматогенне відшарування сітківки, проліферативна вітреоретинопатія, фактор некрозу пухлини α , фактор росту ендотелію судин, скловидне тіло, вітреальний вміст.

Вступ. Відомо, що фактори росту, серед них фактор некрозу пухлини- α (ФНП- α) і фактор росту ендотелію судин (ФРЕС), здійснюють регуляцію міжклітинних і міжсистемних взаємодій, в тому числі мають здатність регулювати проліферативні процеси. Тому вивчення змін цитокінового профілю у хворих на регматогенне відшарування сітківки (РВС) являє інтерес для отримання більш повного уявлення про патогенез захворювання і розробки нових методів його лікування.

Мета — виявити особливості експресії ФНП- α і ФРЕС в склоподібному тілі та вітреальній рідині у хворих на РВС з різним ступенем проліферативної вітреоретинопатії (ПВР).

Матеріал і методи. У 79 хворих РВС проведено стандартне офтальмологічне обстеження. Пацієнти були розділені на три групи — зі ступенем ПВР А, В і С. В склоподібному тілі та вітреальній рідині визначено рівень ФНП- α і ФРЕС імуноферментним методом.

Результати. При ПВР ступеня А рівень ФНП- α в склоподібному тілі становить ($39,98 \pm 21,95$) пг/мл, а зі збільшенням проліферації — підвищується в 2 та 3,5 рази при ступенях В і С. У вітреальній рідині вміст ФНП- α при ступені В збільшується на 38,2 %, а при ступені С — в 2,5 рази відносно ступеня А. Концентрація ФРЕС в склоподібному тілі також збільшується при посиленні ПВР: при ступені В — в 1,7 рази, ступені С — у 2 рази. У вітреальному вмісті відмінності між рівнем ФРЕС в групах з ПВР ступеня А і В становлять 31,7 %, при ПВР ступеня С — 150 %. Між рівнем досліджуваних цитокінів в склоподібному тілі і вітреальній рідині та ступенем ПВР виявлено прямий сильний кореляційний зв'язок.

Висновки. В склоподібному тілі і вітреальній рідині у хворих на РВС виявлено зміну цитокінового профілю у вигляді підвищення концентрації ФРЕС і ФНП- α в залежності від ступеня ПВР.

The level of tumor necrosis factor α and vascular endothelial growth factor in patients with rhegmatogenous retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy of varying degrees

Levitskaya GV

SI «The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy NAMS of Ukraine», Odessa

E-mail: kid_od@mail.ru

Background. It is known that growth factors, including tumor necrosis factor α (TNF- α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) performs regulation of intercellular and intersystem interactions, also they possess the ability to regulate the proliferative processes. Therefore, the study of changes in cytokine profile in patients with rhegmatogenous retinal detachment (RRD) is necessary to gain a better understanding of the pathogenesis of RRD and to develop new methods of treatment.

Purpose. To detect expression patterns of tumour necrosis factor α (TNF- α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the vitreous and vitreous fluid of rhegmatogenous retinal detachment (RRD) patients with varying degrees of proliferative vitreoretinopathy (PVR).

Material and methods. Standard ophthalmic examination was performed in 79 RRD patients. Patients were divided into three groups — PVR A, PVR B and PVR C. In the vitreous and vitreous contents TNF- α and VEGF level was evaluated by ELISA.

Key words: rhegmatogenous retinal detachment, proliferative vitreoretinopathy, tumor necrosis factor α , vascular endothelial growth factor, vitreous, vitreous contents.

Введение. Патология глазного дна (дистрофические заболевания, отслойка сетчатки, ретинопатии при системных заболеваниях и т.п.) на протяжении пяти последних лет стабильно остается в тройке лидирующих инвалидизирующих офтальмопатологий, вес которой в структуре первичной инвалидности колеблется в пределах 16–19 %. Развитие этой группы заболеваний обусловлено сосудистыми дисрегуляторными, метаболическими, нейротрофическими повреждениями хориоидеи и сетчатки, что приводит к формированию деструктивных изменений [1].

Внутриглазная пролиферация является общим типом реакции тканей глаза на повреждение любой этиологии, характеризующейся ростом фиброзной или фиброваскулярной ткани в стекловидном теле, на обеих поверхностях сетчатки (чаще внутренней) и приводящей, в большинстве случаев, к необратимым последствиям. Для этого процесса характерны признаки хронического воспаления, центральной фигурой которого являются моноклеары и фибробласты [6].

На сегодняшний день получено достаточно доказательств участия цитокинов в патогенезе пролиферативных витреоретинальных заболеваний.

Известно, что пигментный эпителий в условиях нарушенной трофики высвобождает факторы роста эндотелия сосудов, стимулирующие ангиогенез [2]. Исследована экспрессия фактора роста гепатоцитов и фактора роста соединительной ткани в стекловидном теле при пролиферативной витреоретинопатии (ПВР) и показано, что повреждение сетчатки вызывается воспалением в ответ на увеличение уровня фактора роста гепатоцитов, вызванным формированием групп из мигрирующих клеток пигментного эпителия. Эти клетки контактируют со стекловидным телом, которое содержит фактор роста соединительной ткани. Трансформирующий фактор роста активируется, усиливая экспрессию фактора роста соединительной ткани, клетки пигментного эпителия формируют фиброзную мембрану с низким содержанием клеток. Трансформирующий фактор роста является основным цитокином, стимулирующим тканевый фиброз. Его уровень повышается в стекловидном

Results. In cases with PVR A tumour necrosis factor α level in vitreous was 39.98 ± 21.95 pg/ml and increased as increasing proliferation — 2 and 3.5 times in grades B and C. In vitreal contents it increased in PVR B — 1.4 times and PVR C — 2.5 times. Concentration of VEGF in vitreous was also increasing by enhancing PVR: grade A to B — 1.7 times, PVR grade A to C — 2 times. In vitreal contents VEGF level in PVR grade B group was higher by 31.7 % and in PVR grade C by 150 % than in PVR grade A group. A direct strong correlation was found between cytokines level in the vitreous and vitreous contents and degree of PVR.

Conclusion. In vitreous and vitreous humor of RRD patients cytokine profile changes were detected in terms of increasing VEGF and TNF- α concentrations depending on the PVR stage.

теле при ПВР, коррелируя со степенью выраженности процесса [7, 11]. По мнению авторов, факторы роста гепатоцитов и фактор роста соединительной ткани могут играть критическую роль как при развитии ПВР у человека, так и в культуре клеток пигментного эпителия *in vitro* и в условиях моделирования ПВР у животных [9].

У пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией в стекловидном теле и сыворотке определены ИЛ-1 β и ФНО- α , концентрация которых в стекловидном теле значительно превышала показатели в сыворотке и контроле. Увеличение уровня этих цитокинов, по мнению авторов, играет значимую роль в патогенезе заболевания, способствуя аномальной пролиферации клеток и неоваскуляризации [8].

Интерлейкины и факторы роста играют важную роль в патогенезе ПВР при регматогенной отслойке сетчатки (РОС). У больных РОС без и с ПВР был выявлен полиморфизм в распределении генотипа трансформирующего фактора роста. Установленная авторами связь между генетическим профилем этого фактора и развитием ПВР предполагает возможность наличия таковой и с другими клиническими признаками заболевания, что требует дальнейших исследований [12].

У пациентов с РОС в аспиратах стекловидного тела, полученных во время витрэктомии, были определены ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- α , интерферон- γ , трансформирующий фактор роста: ИЛ-6 и ФНО- α были выявлены чаще в случаях ПВР [10].

С целью выяснения роли клеток стекловидного тела в процессах пролиферации была определена экспрессия м-РНК фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС) и интерлейкина (ИЛ)-6. Показано, что клетки, полученные из стекловидного тела, стимулируют ИЛ-1a, ИЛ-1b и фактор некроза опухоли α (ФНО- α), а также продуцируют ФРЭС и ИЛ-6, которые способствуют пролиферации клеток эндотелия сосудов [13]. Однако в литературе не представлены данные об изменениях цитокинового профиля, развивающихся в жидкостях и тканях глаза после оперативного вмешательства, в частности, по поводу отслойки сетчатки. Поэтому

изучение исходного цитокинового уровня и изменения его профиля в послеоперационном периоде у больных РОС, в т.ч с различными степенями ПВР, представляет интерес для получения более полного представления о патогенезе заболевания и разработки новых методов его лечения.

Цель исследования — выявить особенности экспрессии ФНО- α и ФРЭС в стекловидном теле и витреальной жидкости у больных РОС с разной степенью пролиферативной витреоретинопатии.

Материал и методы

У 79 больных РОС (79 глаз), среди которых 36 мужчин, 43 женщины, проведено стандартное офтальмологическое обследование. На основании данных о степени пролиферативной витреоретинопатии все обследуемые были разделены на три группы.

По степени пролиферации пациенты были распределены следующим образом: легкая степень А и В была выявлена у 15 и 50 человек, что составляет 19,0 и 63,3 % соответственно, в 17,7 % случаев (14 человек) была определена степень пролиферации С.

В стекловидном теле (27 образцов) и витреальном содержимом (60 образцов) был определен уровень ФНО- α и ФРЭС иммуноферментным методом. В целом, исследовано 87 образцов, что на 8 больше, чем число обследуемых пациентов, т.к. в некоторых случаях была возможность получить и стекловидное тело, и витреальную жидкость.

Забор стекловидного тела проводили во время витрэктомии, витреального содержимого — в послеоперационном периоде, во время проведения дополнительной заместительной газовой тампонады с целью увеличения объема газового пузыря в витреальной полости для полноценного блокирования нижних разрывов сетчатки [4].

В витреальном содержимом (60 образцов) и стекловидном теле (27 образцов) определяли уровень цитокинов ФНО- α и ФРЭС иммуноферментным методом с использованием тест систем и соответствующих инструкций по применению наборов реагентов для количественного определения человеческих интерлейкинов в биологических жидкостях и культуральных средах [2].

При статистическом анализе результатов использовали непараметрический критерий Крускала-Уоллиса — для одномоментного сравнения более чем двух групп и критерий ранговой корреляции Спирмена — для определения корреляционной связи [3].

Результаты и их обсуждение

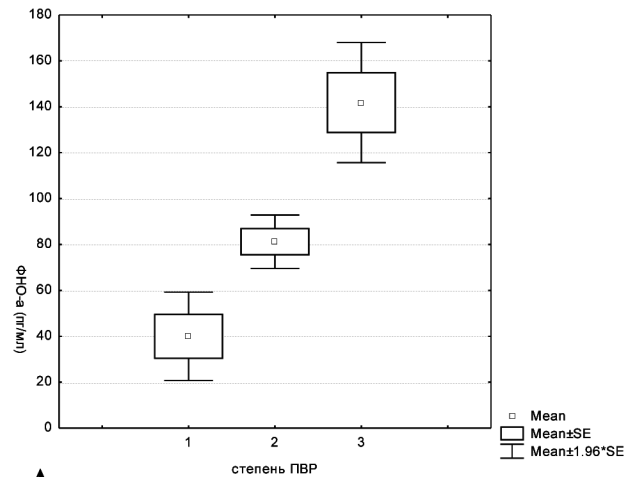
При анализе уровня исследуемых цитокинов в стекловидном теле и витреальном содержимом у больных РОС в зависимости от степени ПВР было выявлено следующее.

Как было показано нами ранее [5], уровень ФНО- α ($M \pm SD$) в стекловидном теле составляет ($89,28 \pm 43,54$) пг/мл, а в витреальном содержимом — ($129,3 \pm 61,03$) пг/мл.

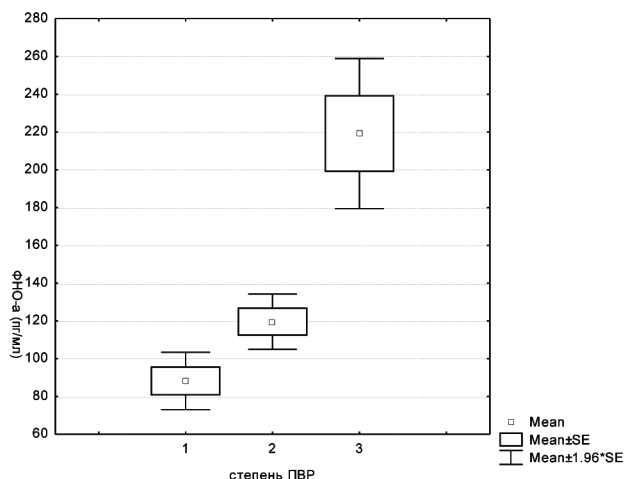
Учитывая данные относительно степени пролиферативного процесса, осложняющего течение регматогенной отслойки сетчатки, установлено, что при ПВР в стадии А (минимальные проявления пролиферации) уровень ФНО- α составляет ($39,98 \pm 21,95$)

пг/мл. По мере увеличения степени пролиферации уровень ФНО- α повышается до ($81,19 \pm 23,01$) пг/мл и ($141,83 \pm 35,32$) пг/мл при ПВР степени В и С соответственно (рис. 1). Различия уровней ФНО- α в стекловидном теле у пациентов РОС с разной степенью ПВР являются достоверными по критерию Крускала-Уоллиса ($\chi^2=12,58$, $df=2$, $p=0,0019$).

Аналогичная направленность изменений выявлена и в витреальном содержимом, однако эти изменения менее выражены. Содержание ФНО- α при ПВР степени А составляет ($88,20 \pm 24,50$) пг/мл, при степени В увеличивается на 38,2 %, а при тяжелой степени — в 2,5 раза. Различия уровней ФНО- α в витреальном содержимом у пациентов РОС с разной степенью ПВР также являются достоверными по критерию Крускала-Уоллиса ($\chi^2=12,82$, $df=2$, $p=0,0016$).



А



Б

Рис. 1. Уровень ФНО- α в стекловидном теле (А) и витреальном содержимом (Б) у больных регматогенной отслойкой сетчатки с разной степенью ПВР.

Примечание. 1 — ПВР степени А, 2 — ПВР степени В, 3 — ПВР степени С.

Уровень ФРЭС, как было показано ранее, в стекловидном теле составлял $(929,0 \pm 351,8)$ пг/мл, а в витреальном содержимом — $(1388,1 \pm 401,5)$ пг/мл, что выше соответствующих данных, характеризующих содержание ФНО- α в настоящем материале.

Для ФРЭС также характерно увеличение концентрации по мере усиления ПВР. У пациентов со степенью ПВР А этот показатель составляет $(560,3 \pm 257,8)$ пг/мл, при стадии В увеличивается в 1,7 раза, при стадии С — вдвое (рис. 2). Данные анализа свидетельствуют о том, что различия уровней ФРЭС в стекловидном теле у пациентов с ПВР разной степени выраженности являются статистически значимыми по критерию Крускала-Уоллиса ($\chi^2=12,58, df=2, p=0,0019$).

В витреальном содержимом различия между уровнем ФРЭС в группах с ПВР со стадиями А и В составляют 31,7 % ($1069,6 \pm 263,2$ пг/мл и $1408,3 \pm 399,4$ пг/мл соответственно). У пациентов с ПВР стадии С уровень ФРЭС увеличен в 1,5 раза. Результаты статистического анализа показали, что различия уровней ФРЭС в витреальном содержимом у пациентов с ПВР разной степени выраженности являются достоверными по критерию Крускала-Уоллиса ($\chi^2=9,40, df=2, p=0,0091$).

Определение зависимости между уровнем исследуемых цитокинов в стекловидном теле и витреальном содержимом у больных РОС и степенью ПВР как одного из основных факторов, характеризующих тяжесть патологического процесса, выявило наличие прямой сильной корреляционной связи во всех случаях (табл. 1).

В целом, полученные результаты свидетельствуют о целесообразности определения уровня вышеуказанных цитокинов в качестве дополнительного объективного критерия степени тяжести патологического процесса и согласуются с данными других авторов [9,10,12].

Заключение

Таким образом, в стекловидном теле и витреальном содержимом у больных с РОС выявлено существенное изменение цитокинового профиля в

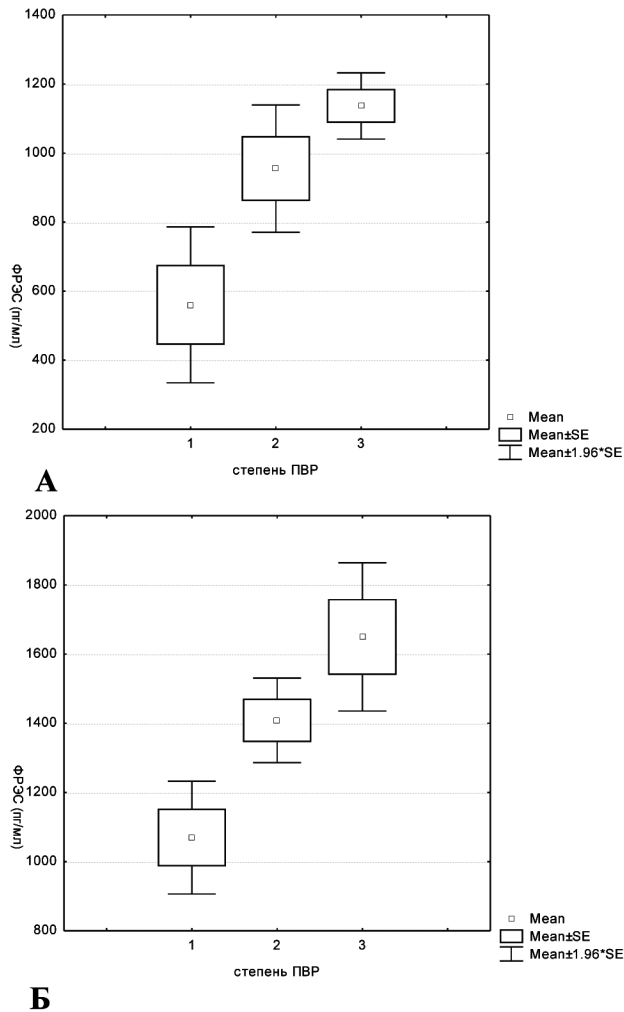


Рис. 2. Уровень ФРЭС в стекловидном теле (А) и витреальном содержимом (Б) у больных регматогенной отслойкой сетчатки с разной степенью ПВР.

Примечание. 1 — ПВР степени А, 2 — ПВР степени В, 3 — ПВР степени С.

виде повышения концентрации ФРЭС и ФНО- α в зависимости от степени ПВР, что соответствовало нарастанию тяжести клинической картины заболевания.

Таблица 1. Ранговая корреляционная связь между уровнем цитокинов и степенью ПВР у больных регматогенной отслойкой сетчатки

Исследуемые цитокины	Стекловидное тело			Витреальное содержимое		
	п	г Спирмена	р	п	г Спирмена	р
ФНО- α	27	0,812008	0,000000	60	0,534013	0,000011
ФРЭС	27	0,606626	0,000795	60	0,397181	0,001677

Примечание: р — уровень значимости различий; п — количество исследуемых образцов.

Литература

1. **Аліфанова Т. А.** Динамічні спостереження нозологічної структури первинної інвалідності по зору в Україні / Т. А. Аліфанова, О. Л. Чуйко, Ю. Ю. Гладченко // Матеріали науково-практичної конференції офтальмологів з міжнародною участю «Філатовські читання», присвяченої 80-річчю тканинної терапії за методом академіка В. П. Філатова. — Одеса, 23–24 травня 2013 р. — С. 302.
2. **Будзинская М. В.** Система новых подходов к диагностике и лечению субретинальной неоваскулярной мембраны: автореф. дис. ... докт. мед. наук: 14.01.07 «Глазные болезни» / М. В. Будзинская. — Москва, 2011. — 44 с.
3. **Гланц С.** Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер. с англ. — М.: Практика, 1998. — 459 с.
4. **Левицька Г. В.** Спосіб комплексного втручання при лікуванні регматогенного відшарування сітківки з розривами сітківки будь-якої локалізації // Левицька Г. В. // Пат. № 62269, опубл. 25.08.2011.
5. **Левицкая Г. В.** Уровень фактора некроза опухоли α и фактора роста эндотелия сосудов у больных с разной степенью тяжести отслойки сетчатки / Г. В. Левицкая // Проблемы экологической та медичної генетики і клінічної імунології: зб. наук. праць. — Київ-Луганськ, 2013. — в печати.
6. **Хороших Ю. И.** Фундаментальные аспекты патогенеза внутриглазной пролиферации / Ю. И. Хороших, О. И. Кривошеина, И. В. Запужалов // Материалы 10 научно-практической конференции «Современные технологии лечения витреоретинальной патологии — 2012», проводимой в рамках празднования 85-летия со дня рождения академика С. Н. Федорова. — Москва, 22–23 марта 2012 г. — С. 193–195.
7. **Bornstein P.** Thrombospondins as matricellular modulators of cell function / P. Bornstein // J. Clin. Invest. — 2001. — V. 107. — P. 929–934.
8. **Demircan N.** Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy / N. Demircan, B. G. Safran, M. Soylu et al. // Eye. — 2006. — V. 20. — P. 1366–1369.
9. **Hinton D. R.** Novel growth factors involved in the pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy / D. R. Hinton, S. He, S. J. Ryan et al. // Eye. — 2002. — V. 16. — P. 422–428.
10. **Limb G. A.** Cytokines in proliferative vitreoretinopathy / G. A. Limb, B. C. Little, A. Meager et al. // Eye. — 1991. — V. 5. — P. 686–693.
11. **Pfeffer B. A.** Transforming growth factor beta 2 is the predominant isoform in the neural retina, retinal pigment epithelium-choroid and vitreous of the monkey eye / B. A. Pfeffer, K. C. Flanders, C. J. Guerin et al. // Exp. Eye Res. — 1994. — V. 59. — P. 323–333.
12. **Ruiz-Colmenares M. R. S.** Cytokine gene polymorphisms in retinal detachment patients with and without proliferative vitreoretinopathy: a preliminary study / M. R. S. Ruiz-Colmenares, J. C. P. Jimeno, A. G. Adrados et al. // Acta Ophthalmol. Scand. — 2006. — V. 84. — P. 309–313.
13. **Tojo N.** Interactions between vitreous-derived cells and vascular endothelial cells in vitreoretinal diseases / N. Tojo, Y. Kashiwagi, K. Nishitsuka et al. // Acta Ophthalmologica. — 2010. — V. 88. — P. 564–570.

Поступила 01.08.2013

References

1. **Alifanova TA, Chuiko OL, Gladchenko YuYu.** Dynamic observations of nosological structure of primary eye invalidity in Ukraine. Proceedings of scientific practical conference of ophthalmologists with international participation in Ukraine «Filatov Memorial Lectures», dedicated to the 80th anniversary of Filatov's tissue therapy. Odessa, 23–24 May.
2. **Budzinskaya MV.** System of new approaches to diagnostics and treatment of subretinal neovascular membrane: author's abstract...Doc. Of Med. Sc.: 14.01.07 «Eye diseases». Moscow; 2011. 44 p.
3. **Glantz S.** Medical biological statistics. Transl. from English. M.: Praktika; 1998. 459 p.
4. **Levitskaya GV.** Method of combined operation in treatment of rhegmatogenous detachment of the retina with retinal hole of any localization. Pat. № 62269, publ. 25.08.2011.
5. **Levitskaya GV.** Level of necrosis factor of tumor α and vascular endothelial growth factor in patients with various severity of retinal detachment. Problemy ekologichnoi ta medychnoi genetiki I klinichnoi imunologii. Kiev-Lugansk; 2013. In press.
6. **Khoroshikh YuI, Krivosheina OI, Zapuskalov IV.** Fundamental aspects of pathogenesis of intraocular proliferation. Proceedings of the 10th scientific practical conference «Modern technologies of treatment of vitreoretinal pathology». Moscow, 22–23 March 2012; 193–5.
7. **Bornstein P.** Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. J. Clin. Invest. 2001; 107: 929–34.
8. **Demircan N, Safran BG, Soylu M et al.** Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy. Eye. 2006; 20: 1366–9.
9. **Hinton DR, He S, Ryan SJ et al.** Novel growth factors involved in the pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy. Eye. 2002; 16: 422–8.
10. **Limb GA, Little BC, Meager A et al.** Cytokines in proliferative vitreoretinopathy. Eye. 1991; 5: 686–93.
11. **Pfeffer BA, Flanders KC, Guerin CJ et al.** Transforming growth factor beta 2 is the predominant isoform in the neural retina, retinal pigment epithelium-choroid and vitreous of the monkey eye. Exp. Eye Res. 1994; 59: 323–33.
12. **Ruiz-Colmenares MRS, Jimeno JCP, Adrados AG et al.** Cytokine gene polymorphisms in retinal detachment patients with and without proliferative vitreoretinopathy: a preliminary study. Acta Ophthalmol. Scand. 2006; 84: 309–13.
13. **Tojo N, Kashiwagi Y, Nishitsuka K et al.** Interactions between vitreous-derived cells and vascular endothelial cells in vitreoretinal diseases. Acta Ophthalmologica. 2010; 88: 564–70.

Received 01.08.2013