

Питання клінічної офтальмології

УДК 617.721.6-002:612.452]-092.4

Чутливість лімфоцитів периферичної крові до адреналіну та ацетилхоліну у пацієнтів з первинним та рецидивуючим заднім увеїтом

Н. І. Храменко, канд. мед. наук; Л. М. Величко, д-р мед. наук; О. В. Богданова, канд. біол. наук;
Н. В. Коновалова, д-р мед. наук; Ю. О. Журавок, канд. мед. наук

ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України»

Одеса(Україна)

Актуальність. Задній увеїт – поліетиологічна група захворювань із поліморфізмом клінічних проявів, тривалим хронічним та рецидивним характером перебігу процесу, частим ураженням обох очей, розвитком різноманітних ускладнень, втратою працездатності та інвалідизацією осіб молодого віку. Важливим завданням сучасної клінічної офтальмології є пошук біомаркерів, що вказують на тяжкість запалення та ймовірність рецидивів процесу.

Мета: визначити чутливість лімфоцитів периферичної крові до адреналіну та ацетилхоліну у пацієнтів з первинним та рецидивуючим заднім увеїтом у різні періоди захворювання.

Матеріал та методи. Обстежено 100 пацієнтів з заднім ідіопатичним увеїтом у різні періоди захворювання. Контрольна група – 16 здорових волонтерів аналогічного віку. Оцінку специфічної чутливості лімфоцитів до нейромедіаторів адреналіну та ацетилхоліну (рівень адренорецепції та ацетилхолінової рецепції Т-клітин) проводили за допомогою розробленої в ГУ «Інститут очних хвороб та тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України» комплексної методики оцінки індивідуальної чутливості організму до лікарських засобів (біорегуляторів), за допомогою методу паралельних проб-отримання лімфоцитів, проведення їх спеціальної культивування з досліджуваними препаратами, та подальшого застосування імуногістохімічного ПАП-методу з використанням моноклональних антитіл.

Результати. Абсолютний і відносний рівень адренорецепції у хворих заднім увеїтом був вищим за норму в 1,8-2,8 рази а рівень ацетилхолінової рецепції – в 1,6-2,4 рази. При рецидивуванні процесу в період активного запалення абсолютні показники рівня експресії рецепторів до адреналіну були на 12,6% вищими, а до ацетилхоліну – на 31,7% порівняно з періодом ремісії. Але і в період ремісії показники експресії рецепторів до адреналіну/ацетилхоліну у хворих на задній увеїт залишаються вищими за норму. Виявлено, що шанс виникнення підвищеного рівня експресії адренорецепції/ацетилхолінової рецепції на лімфоцитах периферичної крові при задньому увеїті відповідно у 67,5 рази та 23,6 рази вищий, ніж у нормі. Встановлено сильний прямий зв'язок експресії адренорецепції/ацетилхолінової рецепції на лімфоцитах з кількістю Т-клітин та Т-хелперів, менш сильний прямий зв'язок з В-клітинами, що відбиває переважно зв'язок з клітинним імунітетом, меншою – з гуморальним. Встановлено, що клітинні субпопуляції з біомаркерами ранньої активації лімфоцитів ЦД 5, аутоімунної агресії ЦД 25, молекули адгезії, як маркера запалення ЦД 54, маркера «апоптоза» CD-95 (Fas/ APO-1) мають пряму кореляцію.

Висновок. Рівень експресії адреналіну/ацетилхоліну на лімфоцитах периферичної крові може бути одним із неспецифічних біомаркерів активації запального процесу при задньому увеїті.

Ключові слова:

задній увеїт, адреналін, ацетилхолін, біомаркери активації лімфоцитів

Актуальність. Задній увеїт – поліетіологічна група захворювань, що відрізняється поліморфізмом клінічних проявів, тривалим хронічним та рецидивуючим характером перебігу процесу, частим ураженням обох очей, розвитком різних ранніх та пізніх ускладнень, що призводить до втрати працездатності на значний термін та інвалідизації осіб молодого віку. Незважаючи на значні успіхи сучасних методів дослідження, не завжди вдається встановити етіологію увеїту, спрогнозувати розвиток ускладнень та рецидиви процесу.

У цьому контексті величина такої типової патофізіологічної реакції як запальна реакція має вирішальне значення. Недостатні відповіді призводять до імунодефіциту, сприяючи поширенню збудника та призводячи до неконтрольованої проліферації трансформованих клітин. І навпаки, надмірні запальні реакції викликають ушкодження тканин, фіброз та імунопатологію, що характерно для аутоімунних захворювань (ревматоїдний артрит, хвороба Крона, розсіяний склероз і т.п.), алергії, атеросклерозу та діабету [1].

В даний час є уявлення про нервову систему як про імунорегуляторну систему, що бере участь в імунних реакціях. Зокрема, периферична нервова система через нейротрансмітери та нейропептиди працює паралельно з гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковою та гонадною системами, модулюючи запальні процеси та підтримуючи гомеостаз організму [2].

Моноаміни, а основними моноамінами є серотонін, дофамін і норадреналін, є групою важливих біоактивних речовин центральної нервової системи (ЦНС), які, як вважається, діють як нейромодулятори і регулюють важливі функції, такі як руховий контроль, пізнання, емоції та обробка пам'яті. Але ще відомо, що вони діють за межами ЦНС: виявлено непряме регулювання клітин натуральних кілерів (НК-клітин) серотоніном. Також імунні клітини людини експресують майже дофамінові рецептори. Найбільшу експресію дофамінових рецепторів мають В-клітини та НК-клітини. Норадреналін, а потім адреналін синтезуються із дофаміну. Ці моноаміни виявляються у сироватці крові в низьких концентраціях і можуть значно збільшуватися при гострому стресі або фізичному навантаженні.

Як норадреналін, так і адреналін, пов'язуються з адренергическими рецепторами, але різняться за рівнем їх активації. Адреналін є потужним стимулятором β -аренорецепції. НК-клітини експресують високі рівні β 2-адренорецепторів [3]. Досліджено роль адренергічного регулювання функцій натуральних кілерів [4]. Також відомо, що β 2-аренергічна рецепція контролює рециркуляцію Т- і В-лімфоцитів через лімфатичні вузли, вносячи внесок у добові коливання динаміки лімфоцитів і призводячи до значних змін адаптивної імунної відповіді [5]. Стверджується, що це лімфоцити мають адренергічні рецептори. Але різна щільність та чутливість адренергічних рецепторів на лімфоцитах можуть впливати на реакцію на стрес серед клітинних субпопуляцій. Наприклад, природні клітини-кілери мають як високу щільність, так і ви-

соку афінність β 2-адренорецепторів, В-клітини мають високу щільність, але нижчу афінність, а Т-клітини мають найнижчу щільність [6]. Таким чином, існує морфологічна база для комплексних нейроімунних змін, які беруть участь у забезпеченні адаптивних реакцій, що в кінцевому підсумку сприяє підтримці гомеостазу організму. Нейропептиди відіграють важливу роль в імунній функції та хронічному запаленні через їхню хемоаттрактивну здатність. Численні дослідження продемонстрували ключову роль симпатичної нервової системи та її нейротрансмітерів у регуляції хронічних запальних станів [7, 8]. Добре відомо, що симпатична нервова система грає вирішальну роль в регуляції запальних станів. Так, при ревматоїдному артриті спостерігається незбалансована активність симпатичної нервової системи [9]. У нашій попередній роботі виявлено взаємозв'язок між характером рецидивування герпетичного кератиту та посиленням тонуусу симпатичної нервової системи: при часто рецидивуючому процесі збільшується вплив симпатичної ланки вегетативної нервової регуляції на 27,2 % порівняно з рідко рецидивуючим процесом [10]. Також нами проведено дослідження адренорецепції та ацетихолінорецепції при передніх увеїтах, ускладнених макулярним набряком. Було виявлено, що в період рецидиву у хворих ускладненим переднім увеїтом рівень експресії адреналінових та ацетилхолінових рецепторів на лімфоцитах периферичної крові вищий, ніж у хворих на передній увеїт без ускладнень на 32,7% та на 25,2% відповідно [11].

Слід зазначити, що важливим завданням сучасної клінічної офтальмології є пошук біомаркерів, що вказують на тяжкість запалення та можливість рецидивуючого процесу. Така діагностика сприяла б розробці терапії та своєчасному усунуванню процесу. Дослідження за участю адрено- та ацетилхолінової рецепції на лімфоцитах у патофізіологічному процесі при увеїтах поодинокі.

Мета: визначити чутливість лімфоцитів периферичної крові до адреналіну та ацетилхоліну у пацієнтів з первинним та рецидивуючим заднім увеїтом у різні періоди захворювання.

Матеріал і методи

Обстеження на базі лабораторії імунології, відділу функціональних методів дослідження органа зору та лікування на базі відділення запальної патології очей ДУ «Інститут очних хвороб та тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України» отримали 100 пацієнтів із заднім ідіопатичним увеїтом. Серед цих хворих первинний процес (тривалість не більше трьох місяців) був у 22 хворих на вогнищевий хоріоретиніт. Рецидивуючий увеїт у період ремісії був у 22 осіб вогнищевим хоріоретинітом та у 20 осіб з дисемінованим хоріоретинітом. Рецидивуючий увеїт у період рецидиву був у 18 хворих вогнищевим хоріоретинітом і 18 осіб – дисемінованим хоріоретинітом. Вік пацієнтів дорівнював $37,2 \pm 1,5$ років. Термін рецидивуючого заднього увеїту

по анамнезу склав Me (mediana)=2920 днів (від 1080 до 5110 днів). Контрольну групу становили 16 здорових волонтерів аналогічного віку.

У роботі були передбачені заходи щодо забезпечення безпеки та здоров'я пацієнтів, дотримання їх прав, людської гідності та морально-етичних норм відповідно до принципів Гельсінкської Декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицині та відповідних законів України. Письмова інформована згода була отримана від кожного учасника після докладного пояснення характеру дослідження.

Всім пацієнтам проводилася візометрія, вимірювання внутрішньоочного тиску (ВОТ) офтальмоскопія, біомікроскопія, периметрія, дослідження електричної чутливості та лабільності зорового нерва за фосфеном.

Визначення субпопуляцій лімфоцитів і молекулярних маркерів активації лімфоцитів за допомогою моноклональних антитіл проводили гістоімуноцитохімічним методом. Для цього 4-5 мл гепаринізованої крові забирали з ліктьової вени одноразовою вакуумною системою, розводили 0,9% розчином NaCl в два рази.

Для оцінки специфічної реактивності лімфоцитів до нейромедіаторів адреналіну і ацетилхоліну використовували комплексну методику оцінки індивідуальної чутливості організму до лікарських речовин, що була розроблена в лабораторії імунології ДУ «Інститут очних хвороб та тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України» за допомогою методу паралельних проб [12]. Вона полягає в отриманні лімфоцитів, проведенні їх специфічної культивуванні з препаратами, що досліджуються і подальшим використанням імуногістохімічного ПАП-методу з використанням моноклональних антитіл. Основні етапи даної методики полягають в наступному:

- одержання лімфоцитарної суспензії шляхом центрифугування (розчин фіколу щільністю 1,076 г/см³) та дворазового очищення клітин;

- паралельна інкубація протягом 1 години при 37°C в імунологічному планшеті: 1) 0,05 мл клітинної суспензії лімфоцитів та 0,05 мл фізіологічного розчину; 2) 0,05 мл клітинної суспензії лімфоцитів та 0,05 мл 0,18% розчину адреналіну (для розведення використовувався готовий стерильний розчин, виробник – Дарниця, Україна); 3) 0,05 мл клітинної суспензії лімфоцитів та 0,05 мл 0,1% розчину ацетилхоліну хлориду (виробник НПФ Сінбіас, Україна), суху речовину розводили готовим фізіологічним розчином. Концентрація розчинів препаратів, що використовується, була розроблена попередніми дослідниками [13].

Далі використовувалася стандартна імуногістохімічна методика визначення Т-лімфоцитів (CD 3) [12, 14] з використанням моноклональних антитіл. При обліку результатів визначали кількість CD 3 у дослідних пробах (з адреналіном та ацетилхоліном) та кількість CD 3 у контрольних зразках (з фізіологічним розчином). Визначали абсолютний та відносний рівень експресії маркера міжклітинних молекул адгезії ICAM-1 (CD 54), CD 25, CD 5 та CD 95 на лімфоцитах перифе-

ричної крові. Забір крові проводили з ліктьової вени за допомогою одноразової вакуумної системи. Досліджували молекулярні маркери активації лімфоцитів за допомогою моноклональних антитіл крові імуноцитохімічним методом [12, 14].

CD 54 є глікопротеїном клітинної поверхні з молекулярною масою 60-114 кДа, складається з 5 Ig-подібних доменів, відноситься до суперсімейства Ig. ICAM-1 (CD 54) експресується на імунних, ендотеліальних та епітеліальних клітинах, індукується різними запальними цитокінами (інтерлейкіном-1-бета (IL-1 β), інтерфероном гама (IFN γ) або фактором некрозу пухлини (TNF α), служить як молекула адгезії та сигнального рецептора у багатьох типах клітин, щоб викликати запальні реакції, ініціювати дозвіл запалення та загоєння.

CD 25 – рецептор із суперродини білкових рецепторів з молекулярною масою 55 кДа, являє собою α (альфа) субодиницю рецептора інтерлейкіну-2 (IL-2R α). Він експресується в Т-лімфоцитах, активованих В-лімфоцитах, НКТ-клітинах, моноцитах, макрофагах. Його біологічне значення полягає у регуляції проліферації та диференціювання; підтримка клонального балансу лімфоцитів; запобігання надмірній активації імунної відповіді. Зміни його вираження виникають при запальних процесах будь-якої етіології. Є "раннім" маркером активації лімфоцитів, відображає їх здатність до проліферації та диференціювання [15, 16, 17].

Рецептор CD 5 є суперсімейством білкових рецепторів, які експресуються на Т- і В-лімфоцитах. CD 5 грає роль ключового імуномодулятора як при гомеостатичних, так і при запальних станах і вважається маркером аутоімунної агресії. CD 5 регулює генерацію, активність та виживання клітин Treg та гомеостаз Breg [18].

CD 95 – антиген (Fas/APO-1) з молекулярною масою 45 кДа, що є трансмембранною молекулою, відноситься до суперсімейства рецепторів фактору некрозу пухлини (ФНП), має високий рівень експресії на активованих Т-і В-клітинах, бере участь в індукції. Експресія маркера активується при інфекційних та аутоімунних захворюваннях, старінні [19].

Статистична обробка проводилася з використанням методів параметричного та непараметричного аналізу. Накопичення, коригування, систематизація вихідної інформації, візуалізація одержаних результатів та статистичний аналіз здійснювалися в електронних таблицях та проводився з використанням програми STATISTICA 8.0 (StatSoft.Inc). Кількісні показники оцінювалися щодо відповідності нормальному розподілу, при цьому використовувався критерій Колмогорова-Смирнова. Отримані дані за нормального розподілу об'єднувалися в варіаційні ряди, у яких проводився розрахунок середніх арифметичних величин (M) і стандартних відхилень (SD), меж 95% довірчого інтервалу (95% ДІ). При порівнянні середніх величин нормально розподілених сукупностей розраховувався t-критерій Стьюдента.

Сукупності кількісних показників, розподіл яких відрізнявся від нормального, описувалися за допомогою значень медіани (Me) та нижнього та верхнього квартилів (Q1-Q₃). Для їхнього порівняння використовувався U-критерій Манна-Уїтні. Номінальні дані описувалися із зазначенням абсолютних значень та відсоткових часток. Відмінності показників вважалися статистично значущими за рівня значущості $p < 0,05$. Силу кореляційних зв'язків досліджували за коефіцієнтом Спірмена та Пірсона. Для визначення значущості відмінностей двох коефіцієнтів кореляції використовували калькулятор порівняння двох коефіцієнтів кореляції в програмі STATISTICA 8.0.

Як кількісна міра ефекту при порівнянні відносних показників нами використовувався показник відношення шансів (ВШ) – Odds Ratio (OR), що визначається як відношення ймовірності настання події в групі, підданій впливу фактору ризику, до ймовірності настання події в контрольній групі. З метою проектування отриманих значень ВШ на генеральну сукупність нами розраховувалися межі 95% довірчого інтервалу (95% ДІ). Виходячи з отриманих даних, значимість взаємозв'язку результату та фактору вважалася доведеною у разі знаходження довірчого інтервалу за межами відсутності ефекту, що приймається за 1, тобто. значення його нижньої та верхньої меж більше 1.

Результати дослідження

За даними обстеження контрольної групи, експресія адренорецепції на лімфоцитах периферичної крові складала по медіані $Me = 115$ кл/мкл з варіюванням 86-203 кл/мкл за нижнім і верхнім квартилем. Даний показник у пацієнтів з первинним і рецидивуючим заднім увеїтом був значно вищий у 2,1-2,8 рази ($p < 0,05$) (табл. 1). Відносний показник рівня адренорецепції на лімфоцитах периферичної крові становить в контрольній групі $7,3 \pm 2,9\%$. У групах із заднім увеїтом цей показник був збільшений у 1,8-2,0 рази ($p < 0,05$) (табл. 1).

Рівень експресії рецепторів до ацетилхоліну на лімфоцитах периферичної крові в контрольній групі по медіані дорівнював $Me = 129$ кл/мкл з варіюванням 106-199 кл/мкл по нижньому та верхньому квартилям. Даний показник у пацієнтів з первинним та рецидивуючим заднім увеїтом був вищим у 1,7-2,4 рази ($p < 0,05$) (табл. 1). За відносними показниками у групі первинним та рецидивним увеїтом рівень експресії рецепторів до ацетилхоліну був підвищений у 1,6-2,0 рази ($p < 0,05$) (табл. 1).

За представленими даними в таблиці 1, є чітко виражена тенденція до вищих показників адрено- і ацетилхолінорецепції на лімфоцитах у період вираженого запального процесу, а в умовах ремісії – тенденція до їхнього зменшення. Нами було проведено угруповання

Таблиця 1. Показники рівня чутливості Т-лімфоцитів периферичної крові до адреналіну та ацетилхоліну у пацієнтів з первинним та рецидивуючим вогнищевим та дисемінованим хоріоретинітом у різні періоди захворювання

Нозологічна форма, період захворювання	Номер групи	n	Адреналін		Ацетилхолін	
			абсолютна кількість клітин /мл Me (Q ₁ -Q ₃)	% M±SD	абсолютна кількість клітин /мл, Me (Q ₁ -Q ₃)	% M±SD
Первинний вогнищевий хоріоретиніт	1	22	323 (209 – 504)	14,9±7,2	308 (204 – 448)	13,7±5,4
Рецидивуючий вогнищевий хоріоретиніт, рецидив	2	18	247 (193 – 358)	14,0±4,4	290 (220 – 374)	15,8±4,6
Рецидивуючий вогнищевий хоріоретиніт, ремісія	3	22	252 (182 – 281)	13,0±3,7	216 (158 – 291)	14,2±3,4
Рецидивуючий дисемінований хоріоретиніт, рецидив	4	18	286 (203 – 440)	15,3±5,4	318 (182 – 502)	15,5±4,2
Рецидивуючий дисемінований хоріоретиніт, ремісія	5	20	247 (194 – 323)	13,5±4,4	213 (211 – 291)	12,8±2,9
Контроль	6	12	115 (86-203)	7,3±2,9 (5,4-9,2)	129 (106-199)	7,8±1,9 (6,0-9,4)
Рівень значущих відмінностей			$p_{1-6} = 0,001$ $p_{2-6} = 0,0008$ $p_{3-6} = 0,005$ $p_{4-6} = 0,0003$ $p_{5-6} = 0,001$ $p_{1-3} = 0,07$ $p_{3-4} = 0,01$ $p_{4-5} = 0,07$	$p_{1-6} = 0,001$ $p_{2-6} = 0,0001$ $p_{3-6} = 0,000$ $p_{4-6} = 0,000$ $p_{5-6} = 0,003$	$p_{1-6} = 0,01$ $p_{2-6} = 0,002$ $p_{3-6} = 0,01$ $p_{4-6} = 0,002$ $p_{5-6} = 0,02$ $p_{4-5} = 0,04$	$p_{1-6} = 0,0006$ $p_{2-6} = 0,0005$ $p_{3-6} = 0,0000$ $p_{4-6} = 0,0003$ $p_{5-6} = 0,01$ $p_{2-5} = 0,04$ $p_{4-5} = 0,03$

Примітка. M – середнє значення показника; SD – середнє квадратичне відхилення; Me – медіана ;Q (l-u) – квартилі (нижній і верхній) ; n – кількість хворих

цих показників з урахуванням даного критерію – активація запалення та ремісія всіх груп із заднім увеїтом, що відображено в таблиці 2. Внаслідок чого статистичний аналіз показав значуще вищі абсолютні та відносні показники рівня адренорецепції у групі з активним запаленням на 12,6% ($p=0,01$), і на 10,8% ($p=0,04$) відповідно, ніж у період ремісії (табл. 2), а ацетилхолінорецепції на лімфоцитах – на 31,7% ($p=0,01$) та 9,4% ($p=0,03$) відповідно (табл. 2).

У хворих заднім увеїтом щодо відношення шансів (Odds Ratio – OR) найбільш сильна асоціація була з високим відносним рівнем експресії рецепторів до адреналіну OR = 67,5 (95% ДІ 8,0-565), менш виражена – з ацетилхоліном – OR 23,6 (95% ДІ 4,3-128) порівняно з контролем. Тобто, шанс підвищення рівня експресії адренорецепції на лімфоцитах периферичної крові при задньому увеїті був у 67,5 разів значно вище, ніж у нормі, а шанс підвищення рівня експресії ацетилхолінової рецепції – у 23,6 рази значно вище, ніж у нормі.

Щоб розібратися в суті взаєморегулюючого впливу адренергічної рецепції та ацетилхолінової рецепції на лімфоцитах з імунокомпетентними клітинами, проведено кореляційний аналіз (табл. 3). Як показник тісноти зв'язку між кількісними показниками використовувався коефіцієнт кореляції Спірмена. Кореляційний зв'язок (значущий; $p<0,05$) між абсолютною кількістю імунокомпетентних клітин і адренергічною та ацетилхоліновою їх рецепцією наведений в таблиці 3.

Інтерпретація сили кореляційного зв'язку проводилася шляхом визначення значущості відмінності коефіцієнтів кореляції. Так, значуще найбільш сильний зв'язок рівня адренорецепції був з абсолютною кількістю Т-клітин (CD3+) та абсолютною кількістю Т-хелперів (CD4+) ($p=0,006$) у порівнянні з кількістю Т-супресорів / цитотоксичні CD19+), як показника

Таблиця 3. Розподіл значущих ($p<0,05$) кореляційних зв'язків між кількістю імунореактивних клітин та лімфоцитів периферичної крові, що експресують рецептори до адреналіну та ацетилхоліну у пацієнтів із заднім увеїтом ($n = 116$).

Тип імунокомпетентних клітин (абсолютна кількість клітин /мл)	Адреналін (абсолютна кількість клітин /мл)	Ацетилхолін (абсолютна кількість клітин /мл)
CD3	$r=0,76$	$r=0,83$
CD4	$r=0,76$	$r=0,79$
CD8	$r=0,58$	$r=0,65$
CD16	$r=0,51$	$r=0,56$
CD19	$r=0,42$	$r=0,52$
CD4/8		$r=0,28$

Примітка. r – коефіцієнт кореляції Спірмена ($p<0,05$); n – кількість хворих

гуморального імунітету (табл. 3). Найбільш сильний зв'язок з ацетилхоліновою рецепцією був з абсолютною кількістю Т-клітин (CD3+) і абсолютною кількістю Т-хелперів (CD4+) ($p=0,01$) у порівнянні з кількістю Т-супресорів / цитотоксичні CD19+) (табл. 3).

Ми проаналізували наявність кореляційних зв'язків між абсолютною кількістю клітин з експресією рецепторів до адреналіну та ацетилхоліну та абсолютною кількістю лімфоцитів у субпопуляціях з біомаркерами ICAM-1 (CD 54), CD 25, CD 5 та CD 95 (табл. 4).

При інтерпретації сили кореляційного зв'язку за величиною коефіцієнтів кореляції було показано прямий кореляційний зв'язок між рівнем експресії рецепторів до адреналіну/ацетилхоліну та субпопуляціями лімфоцитів з моноклональними антитілами CD 5, CD

Таблиця 2. Показники рівня чутливості Т-лімфоцитів периферичної крові до адреналіну та ацетилхоліну у пацієнтів з заднім увеїтом у різні періоди захворювання.

Нозологічна форма, період захворювання	Номер групи	n	Адреналін		Ацетилхолін	
			абсолютна кількість клітин /мл Me (Q_1-Q_3)	% M±SD	(Абсолютна кількість клітин /мл) Me (Q_1-Q_3)	% M±SD
Первинний і рецидивуючий задній увеїт в період рецидива	1	58	285 203-404	14,8±5,0	315 220-448	14,9±4,2
Рецидивуючий задній увеїт, ремісія	2	42	249 185-299	13,2±4,0	216 198-291	13,5±3,2
Контроль	3	12	115 (86-203)	7,3±2,9 (5,4-9,2)	129 (106-199)	7,8±1,9 (6,0-9,4)
Рівень значущих відмінностей			$p_{1-2}=0,01$ $p_{1-3}=0,0000$ $p_{2-3}=0,000$	$p_{1-2}=0,04$ $p_{1-3}=0,004$ $p_{2-3}=0,007$	$p_{1-2}=0,01$ $p_{1-3}=0,0006$ $p_{2-3}=0,009$	$p_{1-2}=0,03$ $p_{1-3}=0,000$ $p_{2-3}=0,000$

Примітка. M – середнє значення показника; SD – середнє квадратичне відхилення; Me – медіана; Q (I-II) – квартилі (нижній і верхній); n – кількість хворих

Таблиця 4. Наявність значущих ($p < 0,05$) кореляційних зв'язків між абсолютним рівнем лімфоцитів периферичної крові з маркерами ICAM-1 (CD 54), CD 25, CD 5 і CD 95 і абсолютним рівнем лімфоцитів, що експресують рецептори до адреналіну та ацетилхоліну у пацієнтів із заднім увеїтом ($n = 56$).

Біомаркери субпопуляцій лімфоцитів периферичної крові (абсолютна кількість клітин /мл)	Адреналін (абсолютна кількість клітин /мл)	Ацетилхолін (абсолютна кількість клітин /мл)
CD 5	$r=0,64$	$r=0,71$
CD 54	$r=0,52$	$r=0,59$
CD25	$r=0,62$	$r=0,56$
CD95	$r=0,54$	$r=0,58$

Примітка. r – коефіцієнт кореляції Спірмена ($p < 0,05$); n – кількість хворих

54, CD 25, CD 95. При інтерпретації сили кореляційного зв'язку за величиною коефіцієнтів кореляції було показано, що сила кореляційного зв'язку між рівнем експресії рецепторів до адреналіну/ацетилхоліну і субпопуляціями лімфоцитів з моноклональними антитілами CD 5, CD54, CD25, CD95 не розрізняється (табл. 4), тобто всі маркери рівнозначно активуються при підвищенні адрено- і холінорецепції.

Таким чином, у пацієнтів на задній увеїт при активації запалення визначаються більш високі абсолютні показники рівня експресії рецепторів до адреналіну / ацетилхоліну на 12,6% / 31,7% відповідно, а також більш високі відносні показники експресії рецепторів до адреналіну / ацетилхоліну – на 10,8% / 9,4% відповідно.

Виявлено прямі кореляційні зв'язки рівня експресії рецепторів до адреналіну/ацетилхоліну з рівнем абсолютної кількості Т-клітин, Т-хелперів, Т-супресорів, а також В-клітин. При порівнянні коефіцієнтів кореляції найбільш сильний прямий зв'язок встановлений з кількістю Т-клітин і Т-хелперів, прямий зв'язок меншої сили з В-клітинами, що відображає переважно зв'язок з клітинним імунітетом, меншою – з гуморальним. Маркери ранньої активації лімфоцитів CD5, аутоімунної агресії CD25, молекули адгезії як маркера запалення CD54, маркер «апоптоз» CD95 (Fas/APO-1) рівнозначно підвищуються при підвищенні рівня експресії адреналіну/ацетилхоліну.

Обговорення

«Імунологічний гомеостаз» це один із визначальних компонентів здоров'я, оскільки недостатня чи надмірна активність імунної системи викликає захворювання. Активація гуморальної та клітинної імунної відповіді захищає від інвазії, очищає від детриту пошкоджену тканину та ініціює механізми загоєння рани та репарацію. Однак, імунна відповідь повинна підтримуватися в межах ретельно збалансованого діа-

пазону реакції між двома загрозами: недостатній імунітет, який дозволив би патогенам переважати, та надлишковий імунітет, який може вбити або пошкодити безпосередньо організму господаря.

Основні досягнення в нейробіології та імунології ХХ століття показали, що нейронні ланцюги підтримують гомеостаз під час імунних реакцій. Гомеостатичний контроль імунних відповідей відбувається за допомогою нейронних рефлекторних ланцюгів, які діють надзвичайно швидко, порівняно з гуморальними механізмами та механізмами переміщення клітин. Аферентні рефлекторні дуги виявляють патогенні молекули, цитокіни та інші продукти інфекції та пошкодження клітин, тим самим активуючи потенціали дії, які поширюються швидко, специфічно та спрямовано. Ці вхідні нейронні сигнали до ядра стовбура мозку стимулюють еферентні потенціали дії, які спрямовуються до основних органів імунної системи, включаючи селезінку, лімфатичні вузли та ретикулоендотеліальні органи. Поява потенціалів дії в цих імунних тканинах, що іннервуються, завершується вивільненням нейротрансмітерів, які взаємодіють зі специфічними рецепторами, експресованими моноцитами, макрофагами, лімфоцитами та іншими клітинами вродженої та адаптивної імунної систем. В даний час з'являється все більше досліджень з вивчення запального рефлексу, який є нервовим ланцюгом, що складається з аферентних і еферентних нейронів, які проходять по блукаючому нерву для регуляції імунітету. Дві ланки вегетативної нервової системи зазвичай діють, щоб збалансувати збудження (симпатична: «боротьба чи втеча») з гомеостазом (парасимпатична: «відпочинок та перетравлення»). У лімфоїдних органах відсутня парасимпатична іннервація, адренергічна передача сигналів є основним засобом зв'язку між нервовою системою та імунною системою. Адренергічна стимуляція призводить до швидкого вивільнення субпопуляцій лейкоцитів у кровоток [20].

Відомо, що більшість зрілих лейкоцитів переміщуються по тканинах тіла з метою виявлення та знищення мікроорганізмів та злоскісних клітин. Сигнальні молекули, розчинні або пов'язані з клітинами, спрямовують цей рух лейкоцитів, проникнення тканини і міграцію всередині тканин. До них відносяться хемокіни, цитокіни та молекули адгезії, що експресуються судинною мережею, тканинами та іншими імунними клітинами. На додаток до цих сигнальних молекул, нейротрансмітери, що виробляються нервовою системою та наднирковими залозами, також можуть впливати на міграцію та функції лейкоцитів. Як внутрішні, так і зовнішні шляхи для прямої міграції лейкоцитів перебувають під впливом нервових сигналів. Дослідження впливу нейротрансмітерів на лейкоцити в крові, зокрема катехоламінів норадреналіну та адреналіну (епінефрін), налічують понад століття, надаючи чіткі докази їх впливу на системний транспорт лейкоцитів [21, 22].

В даний час доведено, що всі лімфоцити мають адренергічні рецептори, які мають різну щільність та чутливість, що визначає різну реакцію клітин різних клітинних субпопуляцій. Природні клітини-кілери мають як високу щільність, так і високу афінність $\beta 2$ -адренорецепторів, В-клітини мають високу щільність, але нижчу афінність, а Т-клітини мають найнижчу щільність адренорецепторів [6].

Лімфоцити експресують більшість холінергічних компонентів нервової системи, включаючи ацетилхолін (АХ), холін-ацетилтрансферазу (ХАТ), мускаринові та нікотинові рецептори АХ (mAChR та nAChR відповідно) та ацетилхолінестеразу. Стимуляція Т- і В-клітин за допомогою ацетилхоліну або іншого агоніста мускаринового рецептора ацетилхоліну mAChR викликає внутрішньоклітинну передачу сигналів Ca^{2+} , збільшення синтезу оксиду азоту і індукує передачу сигналу IL-2 [23].

Також було показано, що при запальних станах лімфоцити експресують холін-ацетилтрансферазу та продукують ацетилхолін. Ацетилхолін (АХ), що походить з Т-клітин, широко вивчається як нейротрансмітер, він відіграє важливу роль у регуляції імунітету, стимулює вазодилатацію. Вазодилатація має вирішальне значення для імунних реакцій і є однією з ознак запалення, що полегшує проникнення імунних клітин в інфіковані тканини. Наприклад, визначено, що фермент холін-ацетилтрансфераза (ХАТ), який каталізує лімітуючу стадію продукції АХ, індукується як у CD4+, так і в CD8+ Т-клітинах під час інфекції вірусом лімфоцитарного хориомеїнігиту в IL-21-залежний спосіб. Видалення холін-ацетилтрансферази з пулу Т-клітин мишей зменшувало вазодилатацію у відповідь на інфекцію, міграцію противірусних Т-клітин в інфіковані тканини та, зрештою, порушувався контроль над хронічною інфекцією [22, 24].

Таким чином, сучасна література висвітлює роль нейроконтролю імунної відповіді, що забезпечує його швидкість, специфічність та спрямованість, а також роль адренергічної та холінергічної регуляції імунної відповіді при запальному процесі, функції основних нейротрансмітерів та клітинну рецепцію до них, які здатні регулювати міграцію, проліферацію, диференціювання та кооперацію імунокомпетентних клітин. Роль нейроконтролю та нейротрансмітерів у розвитку імунної відповіді при запальній офтальмопатології вивчені недостатньо.

У нашій роботі ми визначили рівень адренорецепції та ацетилхолінової рецепції Т-клітин у нормі у групі здорових волонтерів та у хворих на первинний та рецидивуючий задній увеїт (вогнищевий та дисемінований хориоретиніт). Абсолютний та відносний рівень адрено/ацетилхолінової рецепції у хворих на задній увеїт був підвищений у порівнянні з нормою в 1,8-2,8 разів/1,6-2,4 разів відповідно.

При рецидивуванні процесу в період активного запалення визначаються значуще вищі абсолютні по-

казники рівня експресії рецепторів до адреналіну / ацетилхоліну на 12,6% та 31,7% відповідно порівняно з періодом ремісії. Але і в період ремісії показники експресії рецепторів до адреналіну/ацетилхоліну у хворих на задній увеїт залишаються вищими за норму. Нами визначено, що такий шанс, що рівень експресії адренорецепції / ацетилхолінової рецепції на лімфоцитах периферичної крові при задньому увеїті підвищений – у 67,5 рази / 23,6 рази вищий, ніж у нормі. Також встановлений сильний прямий кореляційний зв'язок експресії адренорецепції / ацетилхолінової рецепції на лімфоцитах з кількістю Т-клітин і Т-хелперів, прямий зв'язок меншої сили з В-клітинами, що відображає переважно зв'язок з клітинним імунітетом, меншою – з гуморальним. Встановлений прямий кореляційний зв'язок середньої сили також з клітинними субпопуляціями з такими біомаркерами, як маркери ранньої активації лімфоцитів CD5, аутоімунної агресії CD25, молекули адгезії як маркера запалення CD54, маркер «апоптозу» CD95 (Fas/APO-1) з клітинними субпопуляціями з експресією рецепторів до адреналіну/ацетилхоліну.

Таким чином, на нашу думку рівень експресії адреналіну/ацетилхоліну на лімфоцитах периферичної крові може служити одним з неспецифічних біомаркерів активації запального процесу при задньому увеїті.

Література

1. Medzhitov R., Schneider D.S., Soares M.P. Disease tolerance as a defense strategy // *Science*. – 2012. – Vol.335. – P.936-941
2. Quatrini L., Vivier E., Ugolini S. Neuroendocrine regulation of innate lymphoid cells // *ImmunolRev*. – 2018. – Vol. 286 (1). – P.120-136.
3. Capellino S., Claus M, Watzl C. Regulation of natural killer cell activity by glucocorticoids, serotonin, dopamine, and epinephrine // *Cellular & molecular immunology*. – 2020. – Vol. 17 (7). – P.705–711.
4. Tarr A.J., Powell N.D., Reader B.F. et al. Beta-adrenergic receptor mediated increases in activation and function of natural killer cells following repeated social disruption // *Brain BehavImmun*. – 2012. – Vol. 26. – P.1226-1238.
5. Suzuki K., Hayano Y., Nakai A., Furuta F., Noda M. Adrenergic control of the adaptive immune response by diurnal lymphocyte recirculation through lymph nodes // *J ExpMed*. – 2016. – Vol. 14; 213(12). – P.2567-2574.
6. Segerstrom S.C., Miller G.E. Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry // *PsycholBull*. – 2004. – Vol. 130 (4). – P.601-30.
7. Rosenberger P., Schwab J.M., Mirakaj V., Masekowsky E., Mager A. et al. Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia // *Nat Immunol*. – 2009. – Vol. 10 (2). – P.195-202.
8. Härle P., Straub R.H., Wiest R., Mayer A., Schölmerich J. et al. Increase of sympathetic outflow measured by neuropeptide Y and decrease of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis tone in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: another example of uncoupling of response systems // *Ann Rheum Dis*. – 2006. – Vol. 65 (1). – P.51-6.

9. **Ribeiro-da-Silva M., Vasconcelos D.M., Alencastre I.S., Oliveira M.J., Linhares D. et al.** Interplay between sympathetic nervous system and inflammation in aseptic loosening of hip joint replacement // *SciRep.* – 2018. – Vol. 30; 8(1). – P.16044.
10. **Храменко Н.И., Пономарчук В.С., Гайдамака Т.Б., Дрожжина Г.И.** Особенности состояния вегетативной нервной системы и ее влияние на регионарную гемодинамику глаза у больных с различным характером течения рецидивирующего герпетического кератита // *Офтальм. журн.* – 2013. – №6. – P.5-11.
11. **Khramenko N., Usov V., Velychko L., Konovalova N., Bogdanova O.** Level of adrenoception and acetylcholine reception on lymphocytes in peripheral blood in patients with anterior uveitis complicated by macular edema // *DOG online.* – 2021. – Abstract number A-1213-0052-00519.
12. **Величко Л.М., Богданова О.В.** Патент № 103483 «Спосіб дослідження рецептор-модифікуючого впливу фармакологічних імуноотропних препаратів на маркери активності клітин». 2015, Бюл. № 24
13. **Дегтяренко Т.В., Макулькин Р.Ф.** Биогенные стимуляторы и иммунореактивность. В 2-х томах. Том 2. – Одесса: Маяк, 1997.
14. **Глузман Д.Ф., Скляренко Л.М., Нагорная В.А., Крячок И.А.** Диагностическая иммуноцитохимия опухолей. – Киев: Морион, 2003.
15. **Litvinova L.S., Gutsol A.A., Sokhnevich N.A., Kofanova K.A. et al.** Basic surface markers of functional activity T-lymphocytes // *Medical Immunology.* –2014. – Vol. 16(1). – P. 7-26. [In Russ]
16. **Bui T.M., Wiesolek H.L., Sumagin R.** ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis // *J Leukoc Biol.* – 2020. – Vol. 108 (3). – P.787-799.
17. **Sakamoto T., Takahira K., Sanui H., Kohno T., Inomata H.** Intercellular adhesion molecule-1 on rat corneal endothelium in experimental uveitis // *Exp Eye Res.* – 1993. – Vol. 56 (2). – P.241-6.
18. **Soldevila G., Raman C., Lozano F.** The immunomodulatory properties of the CD5 lymphocyte receptor in health and disease // *Curr Opin Immunol.* – 2011. – Vol. 23(3). – P.310-8.
19. **Sugita S., Taguchi C., Takase H., Sagawa K. et al.** Soluble Fas ligand and soluble Fas in ocular fluid of patients with uveitis // *Br J Ophthalmol.* – 2000. – Vol. 84 (10). – P.1130-4.
20. **Andersson U., Tracey K.J.** Reflex principles of immunological homeostasis // *Annu Rev Immunol.* – 2012. – Vol. 30. – P.313-35.
21. **Nourshargh S., Alon R.** Leukocyte migration into inflamed tissues // *Immunity.* – 2014. – Vol. 41. – P.694–707.
22. **Mueller S.N.** Neural control of immune cell trafficking // *J Exp Med.* – 2022. – Vol. 7; 219 (3). – e20211604.
23. **Kawashima K., Fujii T.** The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity // *Life Sci.* – 2003. – Vol. 26; 74 (6). – P.675-96.
24. **Cox M.A., Duncan G.S., Lin G.H.Y., Steinberg B.E., Yu L.X. et al.** Choline acetyltransferase-expressing T cells are required to control chronic viral infection // *Science.* – 2019. – Vol. 8; 363 (6427). – P.639-644.

Відомості про авторів та розкриття інформації

Автор листування: Храменко Наталія Іванівна, e-mail: khramenkona@gmail.com

Відмова від відповідальності: представлені у статті думки є виключно авторськими, вони не є офіційною позицією установи.

Джерела підтримки. Зовнішні джерела фінансування відсутні.

Декларація про конфлікт інтересів. Автори зазначають про відсутність конфлікту інтересів, які б могли вплинути на їх думку стосовно предмету чи матеріалів, описаних та обговорених в даній статті.

Надійшла 20.06.2022

Чувствительность лимфоцитов периферической крови к адреналину и ацетилхолину у пациентов с первичным и рецидивирующим задним увеитом

Храменко Н. И., Величко Л. Н., Богданова А.В., Коновалова Н.В., Журавков Ю.А.

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины»;

Одесса (Украина)

Актуальность. Задний увеит – полиэтиологическая группа заболеваний с полиморфизмом клинических проявлений, длительным хроническим и рецидивирующим характером течения процесса, частым поражением обоих глаз, развитием различных осложнений, утратой трудоспособности и инвалидизацией лиц молодого возраста. Важной задачей современной клинической офтальмологии является поиск биомаркеров, указывающих на тяжесть воспаления и вероятность рецидивов процесса

Цель: определить чувствительность лимфоцитов периферической крови к адреналину и ацетилхолину у пациентов с первичным и рецидивирующим задним

увеитом в разные периоды заболевания.

Материал и методы. Обследованы 100 пациентов с задним идиопатическим увеитом в разные периоды заболевания. Контрольная группа – 16 здоровых волонтеров аналогичного возраста. Оценку специфической реактивности лимфоцитов к нейромедиаторам адреналину и ацетилхолину (уровень адrenoцепции и ацетилхолиновой рецепции T-клеток) проводили с помощью разработанной в ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины» комплексной методики оценки индивидуальной чувствительности организма к лекарственным средствам (биорегуляторам), с помощью метода па-

раллельных проб-получения лимфоцитов, проведения их специальной культивации с исследуемыми препаратами, и последующим применением иммуногистохимического ПАП-метода с использованием моноклональных антител.

Результаты. Абсолютный и относительный уровень адренорецепции у больных задним увеитом был выше нормы в 1,8-2,8 раза, уровень ацетилхолинорецепции – в 1,6-2,4 раза. При рецидивировании процесса в период активного воспаления абсолютные показатели уровня экспрессии рецепторов к адреналину были на 12,6% выше, а к ацетилхолину – на 31,7% по сравнению с периодом ремиссии. Но и в период ремиссии показатели экспрессии рецепторов к адреналину/ацетилхолину у больных задним увеитом остаются выше нормы. Выявлено, что шанс встречаемости повышенного уровня экспрессии адренорецепции / ацетилхолиновой рецепции на лимфоцитах периферической крови

при заднем увеите соответственно в 67,5 раза и 23,6 раза выше, чем в норме. Установлена сильная прямая связь экспрессии адренорецепции / ацетилхолиновой рецепции на лимфоцитах с количеством Т-клеток и Т-хелперов, менее сильная прямая связь с В-клетками, что отражает в большей степени связь с клеточным иммунитетом, в меньшей – с гуморальным. Установлено, что клеточные субпопуляции с биомаркерами ранней активации лимфоцитов CD 5, аутоиммунной агрессии CD 25, молекулы адгезии как маркера воспаления CD 54, маркер «апоптоза» CD-95 (Fas/APO-1) имеют прямую корреляционную связь с уровнем экспрессии адреналина/ацетилхолина.

Вывод. Уровень экспрессии адреналина/ацетилхолина на лимфоцитах периферической крови может служить одним из неспецифических биомаркеров активации воспалительного процесса при заднем увеите.

Ключевые слова: задний увеит, адреналин, ацетилхолин, биомаркеры активации лимфоцитов