

Уровень экспрессии маркеров активации лимфоцитов CD 54 (ICAM-1), CD 5, CD 95 (FAS) и маркера активации нейтрофилов CD 15 в периферической крови пациентов со средним увеитом и у здоровых лиц

Л. Н. Величко¹, д-р мед. наук; А. В. Зборовская¹, д-р мед. наук; Н. Б. Курыльцев², канд. мед. наук; А. В. Богданова¹, канд. биол. наук.

¹ ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П.Филатова НАМН Украины»
Одесса (Украина)

² Львовский национальный медицинский университет им. Д. Галицкого
Львов (Украина)

E-mail: kuryltsivnb@gmail.com

Ключевые слова:

средний увеит, маркеры активации лимфоцитов – CD 54 (ICAM-1), CD 5, CD 95 (FAS), CD 15

Актуальность. В основе патогенеза воспалительных заболеваний увеального тракта лежат иммунологические нарушения. Изучение молекулярных механизмов развития различных форм эндогенных увеитов с позиции современной иммунологии представляется актуальным и перспективным не только в теоретическом, но и в практическом отношении. Это позволит определить направление дальнейших исследований по разработке патогенетически оправданных методов лечения увеитов.

Цель. Изучить уровень экспрессии маркеров активации лимфоцитов CD 54 (ICAM-1), CD 95 (FAS), CD 5 и активации нейтрофилов CD 15 в периферической крови у пациентов со средним увеитом и у здоровых лиц.

Материал и методы. Забор крови проводился перед лечением у 14 больных со средним увеитом (34,0±11,0 лет) и у 26 практически здоровых лиц контрольной группы (36,0±10,0 лет). Применялся иммуногистохимический метод с использованием моноклональных антител.

Результаты. Уровень экспрессии молекулярных маркеров активации на лимфоцитах периферической крови больных со средним увеитом, был достоверно выше по сравнению с контрольной группой. Процентное и абсолютное количество CD54 (ICAM-1) составило 29,6±3,5% и 674,18±63,4 кл/мкл (в контрольной группе – 14,2±3,1% и 165,5±32,1 кл/мкл соответственно). Показатели CD 95 (FAS) – 28,5±4,9% и 534,2±59,5 кл/мкл (у здоровых лиц – 18,9±3,1% и 254,5±42,1 кл/мкл); CD 5 – 23,3±4,1% и 622,8±53,5 кл/мкл (в контрольной группе соответственно 10,3±1,96% и 165,5±32,1 кл/мкл). Маркер активации нейтрофилов CD 15 также был повышен и составил 28,7±5,8%, и 980,19±58,4 кл/мкл соответственно (у здоровых лиц 14,2±3,1% и 152,11±10,13 кл/мкл), ($p<0,05$). Повышение маркеров активации лимфоцитов может указывать на нарушение механизмов аутоиммунитетности и избыточный иммунный ответ, приходящий к воспалительным процессам в тканях глаза. Увеличение уровня экспрессии CD 54 (ICAM-1), CD 95 (FAS) может являться прогностическим признаком усиления воспалительного процесса в глазу.

Выводы. Иммунологический статус больных средними увеитами характеризуется значительным повышением уровня экспрессии молекулярных маркеров аутоактивации лимфоцитов CD 5, межклеточной адгезии лимфоцитов CD 54 (ICAM-1), апоптоза CD 95 (FAS), активации нейтрофилов CD 15. Дальнейшее изучение динамики данных показателей может быть актуальным для оценки эффективности лечения и прогноза клинического течения среднего увеита.

Актуальность. Средний увеит является одной из самых тяжелых форм воспалительных заболеваний глаз, характеризующихся сложностью патогенеза и высокой частотой осложнений. Увеит – пятая по значимости причина нарушения зрения в развитых странах, и на него приходится около 10% случаев зарегистрированной слепоты [9]. Высокая социальная значимость проблемы заключается в том, что заболевание развивается у людей трудоспособного возраста,

а его последствия накладывают ограничения на дальнейшую профессиональную деятельность и возможность активной жизни.

По мнению ряда авторов, в основе патогенеза значительной части воспалительных заболеваний увеального тракта лежат иммунологические нарушения

[5, 9, 10]. Проведенный анализ литературных данных показал, что механизмы реализации и протекания воспалительного процесса, особенности иммунопатогенеза, характер и тип иммунных нарушений, иммунологические критерии прогнозирования хронического течения и рецидивов при среднем увеите изучены недостаточно. Осложненное протекание увеитов имеет место при различных нарушениях в клеточной и гуморальной системах иммунитета [5, 12]. Известно, что при активации клеточного иммунитета к очагу воспаления мигрируют нейтрофилы и макрофаги. Активированные клетки вырабатывают цитокины, участвующие в формировании системного и местного иммунного ответа. Изучение иммуноопосредованных воспалительных реакций увеального тракта является актуальной проблемой.

Цель. Изучить уровень экспрессии маркеров активации лимфоцитов: CD 54 (ICAM-1) – маркера межклеточной адгезии, CD 95 (FAS) – маркера апоптоза (программированной клеточной гибели), CD 5 – маркера аутоактивации лимфоцитов и маркера активации нейтрофилов CD 15 в периферической крови пациентов со средним увеитом и у здоровых лиц.

Материал и методы

Изучение экспрессии маркеров активации лимфоцитов и нейтрофилов проведено у 14 больных (средний возраст – $34,0 \pm 11,0$ лет) со средним увеитом (СУ) и у 26 практически здоровых лиц контрольной группы (средний возраст – $36,0 \pm 10,0$ лет) иммуногистохимическим методом с использованием моноклональных антител (ПАП-метод с применением иммунного комплекса пероксидаза – антипероксидаза) [2]. Забор крови проводился до начала лечения из локтевой вены пациента с помощью одноразовой вакуумной системы. В процессе постановки реакции получали очищенные клеточные суспензии лимфоцитов и нейтрофилов, к которым добавляли моноклональные антитела различной специфичности [2]. Для иммунофенотипирования использовали панель моноклональных антител (МКАТ), включавшую антитела, реагирующие с антигенами CD 5, CD 54 (ICAM-1), CD 95 (FAS), CD 15. Подсчет результатов иммунофенотипирования проводился методом микроскопирования.

CD 54 (ICAM-1) – молекула межклеточной адгезии (intercellular adhesion molecule-1) принадлежит к суперсемейству иммуноглобулиновых белков (IgSF, молекулярная масса 90-110 кД). Обладает высоким уровнем экспрессии на клеточной поверхности лейкоцитов, на активированных эндотелиальных клетках, регулирует миграцию лейкоцитов в места воспаления. Экспрессия CD54 (ICAM-1) индуцируется на клеточной поверхности лейкоцитов, нейтрофилов макрофагов, эпителиальных, эндотелиальных клетках и фибробластах при действии цитокинов (ФНО, ИЛ-1, ИФγ). Экспрессия этих молекул может быть постоянной или индуцибельной.

CD 95 (FAS) – антиген апоптоза, или Fas-антиген с молекулярной массой 45 кД. Опосредует сигналы, индуцирующие апоптоз. Трансмембранная молекула, относящаяся к суперсемейству рецепторов ФНО. Обладает высоким уровнем экспрессии на активированных Т- и В-клетках.

CD 5 – фенотипический маркер лимфоцитов при аутоиммунных заболеваниях – трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой 67 кДа. Экспрессируется на зрелых Т- и В-клетках, в большинстве тимоцитов.

CD 15 – маркер активации нейтрофилов, экспрессирован на зрелых гранулоцитах, моноцитах, нормальных и лейкоэмических клетках миеломоноцитарного ряда [7].

Исследование выполнялось в соответствии с Хельсинкской декларацией прав человека и соответствующими законами Украины. При выполнении работы были предусмотрены меры по соблюдению морально-этических норм, обеспечению прав, безопасности и здоровья пациентов.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась стандартными методами вариационной статистики с использованием программы статистического анализа Statistica 6.0 для Windows, вычисляя среднюю вариационного ряда (М), ее ошибку (m), достоверность различий по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни.

Результаты

Проведено изучение количественного содержания лимфоидных клеток, экспрессирующих маркеры активации лимфоцитов CD 5, CD 54 (ICAM-1), CD 95 (FAS) и нейтрофилов CD 15 у больных СУ и у здоровых лиц.

Проведенные исследования показали высокий уровень экспрессии молекулярного маркера CD54 (ICAM-1) на лимфоцитах больных средним увеитом: он составил в процентном значении – $29,6 \pm 3,5\%$, в абсолютном – $674,18 \pm 63,4$ кл/мкл, (n=14). Результаты представлены в таблице 1.

У здоровых лиц уровни молекулярного маркера активации CD54 (ICAM-1) были значимо ниже и составили $14,2 \pm 3,1\%$ и $165,5 \pm 32,1$ кл/мкл, (n=26), (p<0,05 по критерию Манна-Уитни). Учитывая, что в настоящее время ICAM-1 рассматривается как функциональный биомаркер воспаления, основной функцией которого является обеспечение адгезии нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов к активированному сосудистому эндотелию с последующей их миграцией в очаг воспаления, его достоверное увеличение в группе больных СУ, говорит об активности воспалительного процесса в глазу.

Как видно из данных, представленных в таблице 1, отмечен высокий уровень экспрессии молекулярного маркера апоптоза CD 95 (FAS) на лимфоцитах у больных средним увеитом. Этот показатель превысил нормативные значения и составил в процентном значении $28,5 \pm 4,9\%$, в абсолютном – $534,2 \pm 59,5$ кл/мкл

Таблица 1. Уровень экспрессии маркеров активации лимфоцитов CD 54 (ICAM-1), CD 5, CD 95 (FAS) и маркера активации нейтрофилов CD 15 периферической крови в контрольной группе и у больных средним увеитом

Исследуемая группа	Уровень экспрессии маркеров активации			
	CD 54 (ICAM-1)	CD 5	CD 95 (FAS)	CD 15
Контрольная группа, %, n=26	14,2±3,1	10,3±1,96	18,9±3,1	12,0±4,0
Контрольная группа, абс. n=26,	165,5±32,1	152,11±10,13	254,5±42,1	173,5±22,1
Больные средним увеитом, %, n=14	29,6±3,5*	23,3±4,1*	28,5±4,9*	28,7±5,8*
Больные средним увеитом, абс., n=14	674,18±63,4*	622,8±53,5*	534,2±59,5*	980,19±58,4*

Примечание: * – уровень значимости различий $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни.

(n=14) (у здоровых лиц эти показатели составили соответственно 18,9±3,1 % и 254,5±42,1 кл/мкл, (n=26), ($p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни).

Наши исследования показали высокий уровень экспрессии маркера активации нейтрофилов CD 15: у больных средним увеитом он составил в процентном значении – 28,7±5,8%, в абсолютном – 980,19±58,4 кл/мкл, (n=14). У здоровых лиц эти показатели были значительно ниже и составили соответственно 14,2±3,1% и 165,5±32,1 кл/мкл, (n=26), ($p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни).

Нарушение гематофтальмического барьера больного глаза сопровождается выходом в кровь тканеспецифических антигенов, что ведет к появлению в крови аутоантител [10]. Проведенные исследования показали, что уровень экспрессии маркера активации аутоиммунного воспаления CD 5 у больных средним увеитом составил в процентном значении – 23,3±4,1%, в абсолютном – 622,8±53,5 кл/мкл, (n=14). У здоровых лиц эти показатели были равны соответственно 10,3±1,96 % и 152,11±10,13 кл/мкл, (n=26), ($p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни). Полученные данные свидетельствуют о вовлечении аутоиммунного компонента в воспалительный процесс в группе обследуемых больных. Анализ количества клеток, экспрессирующих маркеры ранней и поздней активации, позволяет характеризовать тип, силу и характер иммунного ответа при среднем увеите.

Таким образом, проведенные исследования показали достоверное значительное повышение у больных СУ уровня экспрессии молекулярных маркеров аутоактивации лимфоцитов CD 5, межклеточной адгезии лимфоцитов CD 54 (ICAM-1), апоптоза CD 95 (FAS), активации нейтрофилов CD 15, в сравнении с контрольной группой здоровых лиц.

Обсуждение

В настоящее время нет сомнения в том, что важная роль в возникновении и развитии увеита принадлежит иммунной системе. Отмечается, что сосудистая оболочка глаза при увеите может являться мишенью для иммунных реакций [13].

По данным некоторых авторов, Т-клетки памяти в течение длительного времени могут сохраняться в

стекловидном теле, радужной оболочке, цилиарном теле и сосудистой оболочке и участвовать в развитии рецидивов внутриглазного воспаления. Повышение проницаемости капилляров, увеличение количества нейтрофилов приводит к увеличению сосудистой проницаемости и развитию острого деструктивного процесса [11].

В свете важной роли расстройств в функционировании иммунной системы в развитии внутриглазного воспаления, [4] оценка активности молекулярных маркеров, экспрессированных на поверхности лимфоцитов, и функциональной активности маркеров активации нейтрофилов периферической крови, выглядит востребованной с позиций дальнейшего изучения патогенеза и поиска эффективных средств иммунокорригирующей терапии при увеите.

Следует учесть, что в доступной нам литературе существует очень малое количество научных работ, посвященных данной проблеме.

В современной литературе имеются сведения о корреляции высокого уровня экспрессии молекулярного маркера адгезии CD 54 (ICAM-1) и наличием воспалительного процесса при аутоиммунной патологии [10]. Патогенетические механизмы развития увеита включают сложный и разнообразный комплекс иммунных реакций. При этом иммунная система далеко не всегда несет защитную или ограничительную функцию. Гиперактивность иммунного ответа предполагает развитие иммунопатологических реакций, деструктивных процессов в тканях глаза с неблагоприятным прогнозом. Результаты наших исследований по изучению уровня экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов в периферической крови больных со средним увеитом согласуются с данными, полученными при обследовании пациентов с передним увеитом [12]. При хроническом течении воспалительного процесса уровни экспрессии молекулярного маркера CD 54 (ICAM-1) и CD 95 (FAS) были выше, чем у пациентов с благоприятным исходом воспалительного процесса [12]. В процессе воспаления значительная экспрессия CD 54 (ICAM-1) отмечается не только на клетках лимфатической системы, но и на эндотелиальных и тканевых клетках. CD 54 (ICAM-1) также участвует в контактных взаимодействиях клеток

в иммунных реакциях: Т-лимфоцита с моноцитом, цитотоксического Т-лимфоцита с клеткой-мишенью. CD 54 (ICAM-1) важен для миграции лимфоцитов из крови через эндотелий сосудов в лимфатические узлы или воспаленные ткани, такие как поверхность глаза [10].

Участвующие в воспалительных иммунных реакциях активированные лимфоциты, впоследствии подвергаются апоптозу через так называемый «рецептор быстрой смерти», FAS-рецептор, который при перекрестном связывании своим FAS-L-лигандом, активирует каспазный каскад, через каспазу-8, что приводит к гибели клетки [8]. В современной науке одной из актуальных проблем экспериментальной и клинической медицины является изучение патогенетической роли нарушений молекулярных механизма апоптоза в развитии целого ряда заболеваний [1]. В работах ряда исследователей показано существование взаимосвязи между нарушениями регуляции процесса апоптоза и развитием онкологических, и воспалительных заболеваний, сопровождаемое снижением эффективности иммунологического надзора [6]. Однако научные работы, изучающие процесс апоптоза при среднем увеите практически отсутствуют.

Расширение знаний о патогенезе увеита необходимо для снижения рисков развития осложнений, количества рецидивов и инвалидизации. Понимание молекулярного патогенеза среднего увеита может помочь в выявлении новых биомаркеров, а также терапевтических мишеней для своевременного лечения увеита.

Так, некоторые авторы отмечают повышение числа клеток, на поверхности которых экспрессированы маркеры поздней активации CD 95 (FAS) при увеитах смешанной и моновирусной этиологии. При этом глубина иммунологических поражений коррелировала с тяжестью клинической картины [3].

По результатам проведенного исследования, процентные и абсолютные значения экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов: CD54 (ICAM-1) – маркера межклеточной адгезии, CD 95 (FAS) – маркера апоптоза (программированной клеточной гибели), CD5 – маркера аутоактивации лимфоцитов и маркера активации нейтрофилов CD15 в периферической крови пациентов со средним увеитом, были достоверно выше нормы.

Таким образом, данное повышение можно считать индикатором воспалительного процесса при увеальном воспалении. Дальнейшее детальное изучение экспрессии маркеров ранней и поздней активации лимфоцитов и нейтрофилов и их межклеточных взаимодействий позволит серьезно расширить знания о патогенезе и хронизации увеита.

Заключение

Иммунологические нарушения при среднем увеите, характеризуются значительным повышением уровня экспрессии молекулярных маркеров аутоактивации лимфоцитов CD 5, межклеточной адгезии лимфоцитов CD 54 (ICAM-1), апоптоза CD 95 (FAS), активации

нейтрофилов CD 15, в сравнении с контрольной группой здоровых лиц.

Дальнейшее изучение динамики данных показателей может быть актуально для прогнозирования течения воспалительного процесса и определения особенностей терапии. Понимание механизмов реализации и регуляции клеточной адгезии и апоптоза может быть актуально для лечения и прогнозирования среднего увеита.

Литература

1. Величко Л. Н. Уровень экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов периферической крови у больных с увеальной меланомой с различной эффективностью органосохранного лечения / Л. Н. Величко // Офтальмол. журн. – 2013 – № 5. – С. 9-13.
2. Глузман Д. Ф., Складенко Л. М., Надгорная В. А., Крячок И. А. Диагностическая иммуноцитохимия опухолей. – К.: Морион, 2003. – 155 с.
3. Гулямова М. Д. Иммунологическая характеристика больных хроническими увеитами герпетического и цитомегаловирусного генеза / М. Д. Гулямова, А. П. Ризопулу, Х. М. Камилов [и др.] // Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 7. – № 5-6. – С. 543-550.
4. Земсков А. М., Земсков В. М., Караулов А. В. Клиническая иммунология // под редакцией А. М. Земскова – М.: Гэотар-медиа, 2008. – 426 с.
5. Камилов Х.М. О специфической и неспецифической иммунологической реактивности у больных с эндогенным увеитом / Х. М. Камилов, Д. Б. Файзилова // Офтальмология. – 2013. – Т. 10. – № 4. – С. 45-48.
6. Полякова С.И. Сравнительная характеристика уровня экспрессии молекулярных маркеров активации лимфоцитов периферической крови у больных меланомой хориоидеи стадии T1 малых размеров и здоровых лиц / С. И. Полякова, Л. Н. Величко, А. В. Богданова [и др.] // Офтальмол. журн. – 2017. – № 1. – С. 25-28.
7. Сидоренко С.П. Поверхностные антигены клеток человека, систематизированные международными рабочими совещаниями по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека / С. П. Сидоренко // Иммунология і алергологія. – 1998. – № 3 – С. 16-38.
8. Фильченков А. А. Участие системы FAS/FAS-лиганд в регуляции гомеостаза и функционировании клеток иммунной системы / А. А. Фильченков, Ю. М. Степанов, В. М. Липкин // Аллергология и иммунология. – 2002. – Т. 3. – № 1. – С. 24-35.
9. Храменко Н. И. Особенности гемодинамики глаза и мозга у больных передним увеитом, осложненным отеком макулы / Н. И. Храменко, Н. В. Коновалова // Офтальмол. журн. – 2020. – № 4. – С. 14-22.
10. Храменко Н. И. Особенности экспрессии маркера молекул межклеточной адгезии-1 (ICAM-1) на лимфоцитах в крови больных стромальным герпетическим кератитом в разные периоды заболевания / Н. И. Храменко, Т. Б. Гайдамака, Г. И. Дрожжина [и др.] // Офтальмол. журн. – 2020. – № 3. – С. 23-27.
11. Forrester J. V. Perspective autoimmunity, autoinflammation, and infection in uveitis / J. V. Forrester, L. Kuffova, A. D. Dick // Am J Ophthalmol. – 2020. – Vol. 189. – P. 77-85. doi: 10.1016/j.ajo.2018.02.019.

12. Юлдашева С. А. Современный взгляд на этиологию, патогенез и распространенность увеитов / С. А. Юлдашева, Х. Д. Карим-заде, С. Саторов // Вестник Авиценны. – 2015. – № 1. – С. 141-146.
13. Khramenko N. I. Peculiarities of expression of the ICAM-1 intercellular adhesion molecule marker and CD-95 apoptosis marker in patients with uncomplicated anterior uveitis and complicated macular edema / N. I. Khramenko, V. Y. Usov, N. V. Konovalova [et al.] // DOG 2020 [Электронный ресурс]. – 2020. – poster 387. – P. 163-164. <https://doi.org/10.1007/s00347-020-01197-0>
14. Rosenbaum J. T. Innate immune singals in autoimmune and autoinflammatory uveitis / Kim H. W. // Int Rev Immunol. – 2013. – V. 32. – P. 68-75.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, которые могли бы повлиять на их мнение относительно предмета или материалов, описанных и обсуждаемых в данной рукописи..

Поступила 13.07.21

Рівень експресії маркерів активації лімфоцитів CD 54 (ICAM-1), CD 5, CD 95 (FAS) та маркера активації нейтрофілів CD 15 у периферичній крові пацієнтів із середнім увеїтом та у здорових осіб

Величко Л.М., Богданова О.В., Курильців Н.Б., Зборовська О.В.

ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМНУ», Одеса (Україна)
Львівський національний медичний університет ім. Д. Галицького, Львів (Україна)

Актуальність. В основі патогенезу запальних захворювань увеального тракту лежать імунологічні порушення.

Мета. Вивчити рівень експресії маркерів активації лімфоцитів: CD 54 (ICAM-1), CD 95 (FAS), CD 5 та активації нейтрофілів CD 15 у здорових осіб і у пацієнтів з середнім увеїтом.

Матеріал та методи. Проводився імуноцитохімічний метод з використанням моноклональних антитіл. Забір крові проводився перед лікуванням у 14 хворих з середнім увеїтом (вік – 34 ± 11 років) та у 26 практично здорових осіб контрольної групи (вік – 36 ± 10 років).

Результати. Відмічений високий рівень експресії молекулярних маркерів CD 54 (ICAM-1), CD 95 (FAS), CD 15, CD 5 на лімфоцитах хворих з середнім увеїтом, який склав $29,6 \pm 3,5\%$, $28,5 \pm 4,9\%$, $28,7 \pm 5,8\%$ та $23,3 \pm 4,1\%$, що в абсолютному значенні

– $674,18 \pm 63,4$ кл/мкл, $534,2 \pm 59,5$ кл/мкл, $980,19 \pm 58,4$ кл/мкл та $622,8 \pm 53,5$ кл/мкл. У здорових осіб відповідно $14,2 \pm 3,1\%$, $18,9 \pm 3,1\%$, $14,2 \pm 3,1\%$ та $10,3 \pm 1,96\%$ ($165,5 \pm 32,1$ кл/мкл, $254,5 \pm 42,1$ кл/мкл, $165,5 \pm 32,1$ кл/мкл та $152,11 \pm 10,13$ кл/мкл) ($p < 0,05$). Це свідчило про активацію запалення в оці та залучення аутоімунного компонента.

Висновки. Імунні порушення при середньому увеїті характеризуються не тільки змінами імунних показників крові, але і значним підвищенням рівня експресії молекулярних маркерів аутоактивації лімфоцитів CD 5, міжклітинної адгезії лімфоцитів CD 54 (ICAM-1), апоптозу CD 95 (FAS), активації нейтрофілів CD 15. Подальше вивчення динаміки даних показників може бути актуальним для лікування та клінічного прогнозування середнього увеїту.

Ключові слова: середній увеїт, імунологічні порушення, маркери активації лімфоцитів, CD 54 (ICAM-1), CD 5, CD 95 (FAS), CD 15