УДК 617.713-616.523:616-036.65:612.017.11

Уровень провоспалительных (TNF-α и IL -6) и противовоспалительных интерлейкинов (IL -10, IL- 4) в сыворотке крови у больных в зависимости от частоты рецидивирования офтальмогерпеса

Н. И. Храменко, канд. мед. наук; **Т. Б. Гайдамака**, д-р мед. наук; **Г. И. Дрожжина**, д-р мед. наук, проф.; **Л. Н. Величко**, д-р мед. наук

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

E-mail: khramenkon@gmail.com

Актуальность. Герпетический кератит (ГК) является основной причиной слепоты в мире вследствие патологии роговицы. Применяемые методы лечения рецидивирующих форм герпетических инфекций (ГИ) дают временные ремиссии, профилактика и прогнозы развития заболевания противоречивы. Это определяет не только медицинскую, но и социальную значимость проблемы. Механизм рецидивирования стромального ГК полностью не раскрыт, так как характеризуется сложностью патофизиологических механизмов, взаимоотношений иммунных факторов, в том числе и регуляции экспрессии цитокинов.

Цель. Исследовать уровень провоспалительных (TNF- α и IL-6) и противовоспалительных цитокинов (IL-10, IL-4) сыворотке крови у больных рецидивирующим офтальмогерпесом (стромальный герпетический кератит) в разные периоды течения заболевания в зависимости от частоты рецидивирования.

Материал и методы: исследование прошли 33 пациента с рецидивирующим стромальным герпетическим кератитом (СГК), находящиеся на стационарном лечении в отделении патологии роговицы Института глазных болезней и тканевой терапии им В.П.Филатова. Определение интерлейкинов - IL-4, IL-6, IL-10 и фактора некроза опухоли а (TNF-а) в сыворотке крови: у 15 человек с редко рецидивирующим течением СГК (не более 1 раза в год) и у 18 человек - с часто рецидивирующим (рецидив более 1 раза в год) течением СГК проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов для количественного определения концентрации интерлейкинов. Оценку результатов осуществляли фотометрически (микропланиетный иммуноферментный анализатор «Stat Fax 2100», США). Использовали референтные значения нормы, приведенные в инструкции для данных реагентов.

Результаты. Выявлена повышенная экпрессия провоспалительного цитокина TNF-а не только в период рецидива СГК- в 5,6 раз в среднем, но и в период ремиссии: при частых рецидивах – в 2,6 раза, при редких рецидивах – в 4 раза выше нормы, что подтверждает наличие воспалительного процесса без явной клинической картины. При рецидиве уровень экспрессии TNF-а повысился равновелико в среднем на 50% в группах как с редко-, так и часто рецидивирующим течением. Уровень экспрессии IL-6 при ремиссии рецидивирующего СГК не отличается от нормы, а в период рецидива выше в 3 раза, различий между группами с редко- и часто-рецидивирующим процессом не определяется. При редко решидивирующем СГК уровень IL-4 при решидиве и ремиссии в 8,5 раз выше нормы. При часто рецидивирующем процессе в период рецидива уровень II-4 на 39% выше, чем при рецидиве редкорецидивирующего процесса. При часто рецидивирующем стромальном ГК IL-4 в 22,5 раза выше нормы. При течении ГК с редкими рецидивами экспрессия интерлейкина IL-10 в период ремиссии и рецидива не имеет различий и в среднем выше нормы на 24%. При часторецидивирующем ГК уровень ІL-10 в крови при ремиссии и рецидиве выше на 74%, чем в группе с редкими рецидивами СГК, что в 2 раза выше значений нормы.

Заключение. Выявлено различие в экспрессии цитокинов при разной частоте рецидивирования СГК: часторецидивирующий СГК характеризуется особенностями регуляции экспрессии цитокинов, что выражается снижением уровня экспрессии TNF-а, повышением уровня экспрессии провоспалительного IL-6 и противовоспалителных интерлейкинов IL-10 и IL-4 и может отражать аутоиммунный механизм воспалительного ответа при таком течении ГК.

Ключевые слова:

стромальный герпетический кератит, цитокины, TNF- α и ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-4

Актуальность. Герпетический кератит (ГК) является основной причиной слепоты в мире вследствие патологии роговицы [1]. Применяемые методы лечения рецидивирующих форм герпетических инфекций (ГИ) дают временные ремиссии, профилактика и прогнозы развития заболевания противоречивы. Это определяет не только медицинскую, но и социальную значимость проблемы [2].

Герпетический кератит представляет собой хроническое иммуно-воспалительное состояние, которое развивается в ткани роговицы в ответ на воздействие вируса простого герпеса [3]. Заражение возникает в результате прямого контакта слизистой оболочки с вирусом простого герпеса-1 (ВПГ-1), приводя к репликации вируса в роговой оболочке (РО) [4]. ВПГ-1 входит в клетку-хозяина посредством многоэтапного процесса слияния между вирусной оболочкой и плазматической мембраной-мишенью через взаимодействие кодируемых ВПГ-1 гликопротеинов с их родственными рецепторами [5]. После размножения в начальном месте инфицирования вирус использует ретроградный аксонный транспорт для получения доступа к сенсорным нейронам в тройничных ганглиях, где затем он находится в латентном состоянии. После реактивации вновь созданные частицы вируса перемещаются по сенсорным нервным волокнам тройничного нерва к эпителиальным поверхностям, где они локально реплицируются заново [6]. Развитие кератита имеет доклиническую (1 неделя после заражения) и клиническую фазы (10-20 дней после заражения). Инфильтрация РО начинается в доклинический период, но ее максимальное поражение наступает в клиническую фазу [7].

Иммунологическое повреждение, которое также является двухфазным, в основном обусловлено миграцией СD4+Т-лимфоцитов и нейтрофилов в роговицу [4,8]. ВПГ вызывает целый спектр изменений, начиная от эпителиопатий роговицы до стромального кератита, кератоувеита, нейтротрофического кератита [9]. У человека индуцированный ВПГ стромальный кератит характеризуется смешанным инфильтратом, состоящим из воспалительных клеток, включая лимфоциты, нейтрофилы и мононуклеарные фагоциты [10].

На модели развития ГК у мышей показан иммунный ответ хозяина, который включает в себя как врожденный, так и адаптивный иммунитет, в том числе клетки натуральных киллеров, дендритные клетки, макрофаги, нейтрофилы и Т-клетки [11]. Эти клетки привлекаются к месту поражения и активируются с помощью цитокинов и хемокинов [11]. Повреждение ткани роговицы происходит вследствие избыточного количества нейтрофилов и CD4 Т-клеток. Запускаются многочисленные патологические процессы, вызывая необратимое повреждение ткани и образование рубцов. Следовательно, стратегии, способствующие снижению концентрации вируса, уменьшению количества нейтрофилов и CD4 Т-клеток в ткани роговицы, могут

быть очень эффективными в борьбе с ее вирусным поражением [3].

Цитокины представляют собой белки небольшого размера, высвобождаемые клетками, которые играют важную про- или противовоспалительную роль в модулировании процесса заболевания. Цитокины включают в себя такие категории, как интерфероны, $TGF-\beta$, интерлейкины и хемокины [12].

В литературе имеются немногочисленные данные о влиянии цитокинов на инфильтрацию нейтрофилов при ГК. [13] Фактическое повреждение ткани является следствием воспалительных явлений, происходящих главным образом от нейтрофилов, которые представляют собой основной клеточный компонент поражений на всех этапах патогенеза стромального ГК. Именно массивная клеточная инфильтрация, особенно нейтрофилов, в сочетании с медиаторами воспаления, секретируемыми иммунными клетками, в первую очередь ответственна за отек и разрушение роговицы [14].

Среди групп цитокинов, способствующих аттракции клеток, отмечаются IL-8 и IL-17. Помимо действия в качестве хемоаттрактанта для нейтрофилов, IL-17 также играет роль в их выживании и заставляет клетки продуцировать оксирадикалы и металлопротеиназы, вызывающие повреждение тканей. У мышей, у которых IL-17 был нейтрализован, была снижена инфильтрация нейтрофилов в роговице [15]. Доказано, что IL-17 играет важную роль в миграции нейтрофилов, но не играет роли в репликации вируса в роговице [16]. IL-17 продуцируется клетками Th17, а IFN- ү (Интерферон гамма), подавляет экспрессию Th17 и IL-17 [15]. IL-17 индуцирует выработку провоспалительного цитокина IL-6. IL-6 стимулирует воспаление роговицы, действуя аутокринно-паракринным способом, чтобы побудить клетки роговицы вырабатывать МІР-2 и МІР-1альфа, которые, в свою очередь, привлекают нейтрофилы в локус вирусного инфицирования.

На модели ГК у мышей наиболее заметными обнаруженными цитокинами были альфа-IL-1 и IL-6. Их концентрация была повышена на 2-й день после заражения, достигла пиковых уровней в роговице на 10-й день, а затем уменьшилась в течение следующих 10 дней. Роговицы, культивированные in vitro, самопроизвольно продуцировали IL-1 и IL-6, что указывает на то, что клетки, находящиеся в роговице, обладали способностью синтезировать эти провоспалительные цитокины. IL-4 был обнаружен с 7 по 14 дни после инфицирования ВПГ-1 [7].

Выявлено как in vivo, так и in vitro, что IL-6, продуцируемый из инфицированных вирусом клеток, может стимулировать неинфицированные клетки роговицы и другие воспалительные клетки паракринным способом, чтобы секретировать VEGF, мощный ангиогенный фактор. Нейтрализация антител к IL-6 приводила к значительному уменьшению количества VEGF-продуцирующих клеток в роговице. Таким образом, выявлена тесная связь между провоспалительными

цитокинами и VEGF-индуцированной неоваскуляризацией роговицы [17].

Ингибирование противовоспалительного цитокина IL-10 вызывает повышение уровня IL-6, что приводит к увеличению продукции MIP-2 и MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-2 и macrophage inflammatory protein-1alpha) – аттрактантов для нейтрофилов, и увеличивает тяжесть поражения. ΜΙΡ-1 α в свою очередь вовлекает в процесс как нейтрофилы, так и Т-лимфоциты, вырабатывается многими клетками, включая нейтрофилы, макрофаги и Т-клетки [18]. При более низком уровне цитокинов IL-2 и IFN- у наблюдали более низкий уровень МІР-1 α и меньшие степени поражения роговицы [19]. На моделях мышей, инфицированных ВПГ, были получены данные о повышении концентрации таких цитокинов, как IL-2, IFN- γ и TNF-α. Цитокин IL-2 может индуцировать выработку IFN- γ и TNF- α наряду с активацией нейтрофилов и предотвращением их апоптоза [20]. Противовоспалительный местно продуцируемый цитокин IL-10 действует аутокринно-паракринным способом, снижая выработку провоспалительных медиаторов и, таким образом, ограничивая воспаление роговицы, приводит к снижению инфильтрации ткани нейтрофилами [21, 22].

Одним из показателей тяжести поражения роговицы при ГК является неоваскуляризация, которая стимулируется фактором роста эндотелия сосудов (VEGF). Новообразованные сосуды исполняют двоякую роль: как обеспечивают нуждающуюся при воспалительной гипоксии ткань в кислороде и трофических веществах, так и несут про- и противовоспалительные компоненты. Показано, что степень тяжести гипоксии коррелирует со степенью инфильтрации нейтрофилов в роговицу при ГК [23].

В нормальной роговице присутствует VEGF, но он связывается с рецептором sVEGFR-1 и это препятствует созданию новых кровеносных сосудов в роговице. Дисбаланс между концентрациями VEGF и sVEGFR-1 приводит к избытку VEGF, что приводит к ангиогенезу [24].

Известно, что во время воспаления клетки РО, такие как эпителиальные клетки и фибробласты, а так же инфильтрирующие клетки, такие как макрофаги, могут продуцировать проангиогенные факторы роста, включая сосудистые эндотелиальные факторы роста (VEGFA, -С и -D), которые влияют на ангиогенез [25]. При ВПГ увеличивается экспрессия VEGF-A, и в то же время снижается концентрация sVEFGR-1 [17,25]. По данным литературы, дисбаланс этих факторов индуцирован выраженной экспрессией IL-17, IL-6, IL-1. Эти факторы вызывали усиленную продукцию VEGF-A, а IL-17 способствовал экспрессии MMP-2, MMP-8 и MMP-9; эти матричные металлопротеиназы расщепляют sVEGFR-1.

Таким образом, в патогенезе развития ГК важная роль принадлежит как провоспалительным цитоки-

нам и хемокинам, так и противовоспалительным. В то время как многие из вышеуказанных цитокинов, таких как IL-17, IL-6, IL-1 alpha и IFN- гамма и хемокинов, таких как MIP-2, MCP-1, MIP-1 alpha; и MIP-1 beta имеют провоспалительную роль в деструкции, вызванной ВПГ-1, включая инфильтрацию нейтрофилов и воспаление роговицы, другие хемокины и цитокины, такие как IL-10 и CCL3, могут играть защитную роль [13]. Также на моделях изучено влияние цитокинов на неоваскуляризацию роговицы, что приводит к дисбалансу продукции VEGF-A фактора и его рецепции.

Взаимодействие клеток-хозяев с ВПГ запускает воспалительный каскад, ответственный не только за исход вируса, но и за прогрессирующее помутнение роговицы вследствие инфильтрата воспалительных клеток, ангиогенеза и дистрофии нервных окончаний РО. Современные противовирусные методы лечения нацелены на репликацию вируса, чтобы уменьшить продолжительность, тяжесть и рецидив заболевания, но существуют и ограничения для применения этих средств.

В настоящее время на основе экспериментальных данных появляются попытки применения антител для блокирования воспалительных цитокинов с целью создания препаратов для лечения. Терапия, направленная на проникновение вируса в клетки, синтез белка, воспалительные цитокины и пути роста сосудистого эндотелиального фактора, изученная на животных, представляет собой многообещающие новые подходы к лечению рецидивирующего кератита ВПГ [26]. Существуют немногочисленные клинические исследования цитокинового профиля у больных различными формами офтальмогерпеса как в сыворотке крови, так и в слезе [2, 27].

Таким образом, механизм рецидивирования офтальмогерпеса полностью не раскрыт, так как характеризуется сложностью патофизиологических механизмов, взаимоотношений иммунных факторов, в том числе и цитокинов.

Цель: исследовать уровень провоспалительных (TNF-α и IL-6) и противовоспалительных цитокинов (IL-10, IL-4) сыворотке крови у больных рецидивирующим офтальмогерпесом (стромальный герпетический кератит) в разные периоды течения заболевания в зависимости от частоты его рецидивирования.

Материал и методы

Исследование прошли 33 пациента с рецидивирующим стромальным герпетическим кератитом, находящиеся на стационарном лечении в отделении патологии роговицы Института глазных болезней и тканевой терапии им В.П.Филатова. Длительность заболевания колебалась от 12 месяцев до 32 лет. Средний возраст 41±1,7 лет. Все пациенты прошли общеофтальмологическое обследование: визометрия, биомикроскопия, офтальмоскопия, рефрактометрия, исследованы поля зрения, электрическая чувствительность по фосфену, проведено измерение ВГД.

При выполнении работы были предусмотрены меры по обеспечению безопасности и здоровья пациентов, соблюдение их прав, человеческого досточиства и морально-этических норм в соответствии с принципами Хельсинкской декларации прав человека, Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине и соответствующих законов Украины.

Лабораторные методы исследования. Иммунологические исследования в лаборатории иммунологии Института глазных болезней и тканевой терапии им В.П.Филатова с определением интерлейкинов – интерлейкинов 4, 6, 10 и фактора некроза опухоли а (TNF-α) – были проведены в сыворотке крови у 33 больных рецидивирующим герпетическим кератитом, стромальной формой: у 15 человек с редко рецидивирующим течением и у 18 человек – с часто рецидивирующим (т.е. рецидив более 1 раза в год) течением ГК. Забор крови проводили натощак в утренние часы из локтевой вены. После образования сгустка кровь центрифугировали при 3000 оборотов в минуту в течение 10 минут. Отобранную сыворотку хранили при температуре -20°C до проведения иммунологических исследований. Определение цитокинов в сыворотке крови проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов для количественного определения концентрации интерлейкинов IL- 4, 6, 10 и фактора некроза опухоли - а (TNF-α) в биологических жидкостях человека (производитель - ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск) согласно прилагаемой инструкции. Оценку результатов осуществляли фотометрически (микропланшетный иммуноферментный анализатор «Stat Fax 2100», США). Использовали референтные значения нормы, приведенные в инструкции для данных реагентов.

Статистический анализ проводился с помощью прикладной программы STATISTICA 10.0 (StatSoftInc.). Нормальность распределения определяли по критерию Колмогорова-Смирнова. Представлены средние значения (М), медианы (Ме) и ошибка среднего m, квартили 25-75. Для уточнения парных различий использовался критерий Стьюдента, Вилкоксона, Манна-Уитни.

Результаты

Анализ уровня цитокинов в сыворотке крови показал, что у пациентов с редко рецидивирующим кератитом уровень фактора некроза опухоли (TNF- α) равен 2,0±0,1 пг/мл, а при рецидиве увеличивается на 50% (p=0,01), равняясь 3,0±0,1 пг/мл (табл. 1). У пациентов с часто рецидивирующим кератитом (более 1 раза в год) этот показатель равен 1,3±0,3 пг/мл в период ремиссии, а в период рецидива увеличивается также на 50% (p=0,003), достигая значения 2,6±0,3 пг/мл. При анализе значений TNF- α в период ремиссии в случае течения ГК с редким рецидивированием оказалось, что его уровень на 35% выше (p=0,003), чем при частом. Следует отметить, что при рецидиве этот показатель увеличивается равновелико – на 50% (табл. 1).

Полученные показатели значительно превосходят референтные (норма): в ремиссии при частых рецидивах – в 2,6 раз, при редких рецидивах – в 4 раза, при рецидивах – в 5,6 раз в среднем (табл. 1). Таким образом, в период ремиссии уровень провоспалительного цитокина TNF-α значительно превосходит нормальные значения, что вероятно может свидетельствовать о текущем воспалительном процессе без явной клинической картины.

Провоспалительный цитокин II-6 в группе обследуемых больных характеризовался высокой вариабельностью (88%), его значения колебались от 0 до 40 пг/мл. Во всех группах в период ремиссии этот интерлейкин по показателю медианы (Ме), не зависел от частоты рецидивирования, которая в период ремиссии составила 1,3 пг/мл (табл. 2) с разбросом данных от 0 до 3,5 пг/мл по квартилям. В период рецидива медиана повысилась до 2,2 пг/мл (р=0,09) при нижних и верхних квартилях 1,2-3,8 пг/мл. В среднем при ремиссии уровень II-6 равен 2,4 \pm 1,0 пг/мл, а при рецидиве в 2,6 раза увеличивается — 6,3 \pm 1,8 пг/мл, что превосходит норму в 3 раза, референтные значения которой составляют 2,0 пг/мл.

Таким образом, при рецидиве уровень IL-6 в крови заметно повышается, особенно при часторецидивирующем процессе (табл. 2), где медиана его значения самая высокая — 3,1 пг/мл. Высокая варибельность показателя во всех группах указывает на сложность и неустойчивость, «не жесткость», вероятную зависимость от многих факторов механизма регулирования экспрессии данного интерлейкина.

Изучение количества провоспалительного интерлейкина IL-4 в крови у больных ГК показало, что при редко рецидивирующем процессе его уровень в среднем равен $1,7\pm0,4$ пг/мл, не меняясь при рецидиве и ремиссии (табл. 3).

Часторецидивирующий процесс имеет другую картину: в период ремиссии значение IL-4 значительно – в 2,6 раза выше (p=0,001) и составляет 4,5±0,7 пг/мл, снижаясь на 38% (p=0,01) в период рецидива до 2,8±0,4 пг/мл. Следует отметить, что и в период рецидива при часторецидивирующих процессах уровень IL-4 выше на 39% (p=0,02), чем при рецидиве редкорецидивирующего процесса (табл. 3).

Уровень IL-4 в 8,5 раз выше нормы при редкорецидивирующем процессе и в 22,5 раза выше нормы при часторецидивирующем течении ГК (табл. 3).

Содержание противовоспалительного интерлейкина IL -10 в крови пациентов с редко рецидивирующим течением стромального ГК статистически не различается в период ремиссии и рецидива (табл. 4), в среднем равно $6,2\pm0,8$ пг/мл, что выше референтных значений на 24%. Уровень интерлейкина IL -10 в крови пациентов с часто рецидивирующим течением стромального ГК также не имел различий в группе ремиссии и рецидива, в среднем равнялся $10,8\pm1,8$ пг/мл. Этот показатель на 74% выше (p=0,01), чем в группе с редкими рецидивами стромального ГК и в 2 раза выше референтных значений (табл. 4).

Таблица 1. Уровень интерлейкина фактора некроза опухоли (TNF- α , пг/мл) в сыворотке крови у больных с разным характером течения стромального ГК

Примечание. р – уровень значимости различий

Группа	Период течения ГК	M±m	ДИ 95%	р
1	Редко рецидивирующий ремиссия	2,0±0,1	1,5-2,5	
2	Редко рецидивирующий, рецидив	3,0±0,1	2,5-3,4	p ₁₋₂ =0,01
3	Часто рецидивирующий, ремиссия	1,3±0,3	0,3-2,7	$p_{1-2} = 0,003$ $p_{3-4} = 0,003$ $p_{1-3} = 0,003$
4	Часто рецидивирующий, рецидив	2,6±0,3	1,6-3,7	1-1-3
5	Норма	0,5	0-6	

Таблица 2. Уровень провоспалительного интерлейкина IL-6, пг/мл в сыворотке крови у больных с разным характером течения стромального ГК

Примечание. р — уровень значимости различий

Группа	Период течения ГК	Me	Квартили 25-75	р
1	Редко рецидивирующий ремиссия	1,5	1,3-2,4	
2	Редко рецидивирующий, рецидив	1,8	1,1-5,9	p ₁₋₂ =0,2
3	Часто рецидивирующий, ремиссия	1,3	1,1-3,2	p ₃₋₄ =0,1
4	Часто рецидивирующий, рецидив	3,1	1,6-3,8	

Таблица 3. Уровень противовоспалительного интерлейкина IL-4 (пг/мл) в сыворотке крови больных с разным характером течения стромального ГК

Примечание. р — уровень значимости различий

Группа	Период течения ГК	M±m	ДИ 95%	р
1	Редко рецидивирующий ремиссия	1,7±0,6	0,3-3,0	
2	Редко рецидивирующий, рецидив	1,7±0,4	0,2-2,5	p ₁₋₂ =1,0 p ₃₋₄ =0,01
3	Часто рецидивирующий, ремиссия	4,5±0,7	3,4-5,5	p ₃₋₄ = 0,001 p ₁₋₃ = 0,002
4	Часто рецидивирующий, рецидив	2,8±0,4	2,1-3,7	F 2-4
5	Норма	0,2	0-4	

Таблица 4. Уровень противовоспалительного интерлейкина IL-10 (пг/мл) в сыворотке крови больных с разным характером течения стромального ГК

Примечание. р – уровень значимости различий

Группа	Период течения ГК	M±m	ДИ 95%	р
1	Редко рецидивирующий ремиссия	7,1±0,6	4,6-9,7	
2	Редко рецидивирующий, рецидив	6,2±1,0	2,6-9,5	p ₁₋₃ =0,001
3	Часто рецидивирующий, ремиссия	10,4±1,8	4,6-16,4	p ₁₋₃ =0,001 p ₂₋₄ =0,02
4	Часто рецидивирующий, рецидив	10,2±2,4	5,1-16,8	
5	Норма	5,0	0-20	

Обсуждение результатов

Рецидивирующий герпетический стромальный кератит характеризуется воспалительным ответом, в который включаются нейтрофилы, макрофаги, NК-клетки и Т-клетки. Факторами, которые ответственны за это воспаление, являются провоспалительные цитокины и хемокины, Многие из этих факторов были определены для первичного кератита, но относительно немногие были исследованы при рецидивирующем стромальном ГК. Рецидивирующее заболевание в ро-

говице является иммунопатологическим состоянием, которое инициируется возобновлением присутствия вируса в роговице, повторно стимулирущим иммунный ответ, приводя к воспалению роговицы и ее повреждению [28]. Воспалительный ответ как один из типичных патофизиологических ответов способствует утилизации агента инфекции и инфицированной ткани, но может быть разрушительным для роговицы хозяина, приводя к образованию рубцов и неоваскуляризации.

Анализ, проведенный нами, с учетом частоты рецидивирования стромального ГК, показал однонаправленность экспрессии изучаемых цитокинов, но различие по их «мощности» – т.е. по их уровню в сыворотке крови, что подтвердило необходимость учитывать характер течения СГК с различной частотой рецидивов.

TNF-α является мощным провоспалительным цитокином, вырабатываемым в основном клетками Th1, а также макрофагами, и участвует в опосредовании реакции острой фазы, хемотаксиса и активации воспалительных и антиген-презентирующих клеток [29]. Нами была выявлена повышенная экпрессия провоспалительного цитокина TNF-α не только в период рецидива – в 5,6 раза в среднем, но и в период ремиссии: при частых рецидивах – в 2,6 раза, при редких рецидивах – в 4 раза выше нормы, что подтверждает течение воспалительного процесса без явной клинической картины. При рецидиве уровень экспрессии TNF-а повысился равновелико в среднем на 50% в группе как с редко-, так и часто рецидивирующим течением. Наши данные согласуются с экспериментальными, хотя исследование авторами проводилось в клетках роговицы, а не крови: в роговицах мышей с рецидивом ГК TNF-α был значительно повышен в дни с 3 по 10 по сравнению с уровнями в день начала рецидива и превышал уровень TNF-а в контрольных роговицах в те же дни [30]. Отмечена гиперпродукция TNF-α при кератоувеите герпетической этиологии [27]. По нашим данным, уровень TNF-а в ремиссии при редких рецидивах выше на 35%, чем при частых рецидивах, что подтверждает снижение уровня регуляции экспрессии TNF-α при частых рецидивах и вероятную недостаточность противовоспалительного ответа, т.к. TNF-а играет противовирусную роль при первичной и рецидивирующей острой инфекции HSV-1 [31].

IL-6 является критически важным провоспалительным цитокином, который может значительно увеличить экспрессию хемокинов МІР-1α и МІР-2, тем самым привлекая нейтрофилы для инфильтрации инфицированной роговицы [32]. Результаты работы West DM и соавт. (2014) показывают, что в отличие от первичного заболевания, IL-6 не играет никакой роли в рецидивирующем ГСК [28]. По нашим данным, экспрессия IL-6 характеризовалась высокой вариабельностью (до 88%). Нами выявлено, что при ремиссии рецидивирующего стромального ГК уровень II-6 не отличается от нормы, а в период рецидива выше в 3 раза, различий между группами редко- и часторецидивирующим процессом мы не выявили.

Нами был проведен анализ экспрессии основных противовоспалительных цитокинов: IL-4 и IL-10. Известно, что IL-4 подавляет экспрессию воспалительных цитокинов и защищает от рубцевания роговицы, вызванного ВПГ-1. Что еще более важно, IL-4 может уменьшить репликацию вируса в роговице [33]. При редко рецидивирующем процессе уровень IL-4 не ме-

няется при рецидиве и ремиссии, в 8,5 раз выше нормы. При часто рецидивирующем процессе в период рецидива уровень IL-4 выше на 39% чем при рецидиве редкорецидивирующего процесса. При часто рецидивирующем стромальном ГК IL-4 в 22,5 раза выше нормы.

IL-10 экпрессируется клетками эпителия роговицы и фибробластами, является эндогенным иммунодепрессивным цитокином, играет защитную роль в воспалительном ответе, вызванном ВПГ-1. Один противовоспалительный механизм IL-10 заключается в подавлении пролиферации CD4 + и CD8 + Т-клеток и продукции воспалительных цитокинов и хемокинов, таких как IL-2, IL-6 и MIP-1α [34]. IL-10 способствует иммунной толерантности, разрешению воспаления и апоптозу при системных и глазных заболеваниях [35]. По результатам нашего исследования, при течении ГК с редкими рецидивами экспрессия интерлейкина IL-10 в период ремиссии и рецидива не имеет различий и в среднем выше нормы на 24%. Совсем другая картина определяется при часто-рецидивирующем ГК. Уровень IL-10 в крови также не различается при ремиссии и рецидиве, но выше на 74%, чем в группе с редкими рецидивами стромального ГК, что в 2 раза выше значений нормы. Интерлейкин 10 (IL-10) является иммунорегуляторным цитокином аутоиммунных заболеваний, является иммунодепрессивным цитокином, который ингибирует выработку хемокинов [36]. Существуют доказательства того, что цитокины семейства интерлейкинов IL-10 участвуют в аутоиммунных заболеваниях. Среди проанализированных цитокинов семейства IL-10 интерлейкин IL-19 продемонстрировал самую высокую экспрессию при эндогенном увеите, особенно при увеите, связанном с HLA-B27. В литературе имеются данные о дефиците IL-10 при кератите [27]. Мы отметили повышение экспрессии IL-10, особенно при часторецидивирующем стромальном ГК, что наводит на мысль о включении аутоиммунного механизма при этой форме ГК.

Следует отметить, что у больных рецидивирующим стромальным ГК даже в период ремиссии как при часто-, так и при редко рецидивирующем процессе, уровень провоспалительного интерлейкина TNF-α и противовоспалительных интерлейкинов IL-10 и IL-4 выше нормальных величин, что позволяет судить о течении воспалительного процесса без явной клинической картины. По результатам нашего исследования, часторецидивирующий стромальный ГК характеризуется особыми патофизиологическими механизмами регуляции воспалительного ответа, который отличается снижением уровня экспрессии TNF-α, повышением уровня экспрессии провоспалительного IL-6 и противовоспалительных интерлейкинов IL-10 и IL-4, что может быть механизмом аутоиммунного ответа при таком течении ГК.

Литература

- Darougar S., Wishart M.S., Viswalingam N.D. Epidemiological and clinical features of primary herpes simplex virus ocular infection // Br J Ophthalmol. 1985. Jan; 69(1). P.2-6.
- 2. **Черевко Н.А.** Иммунологические механизмы реактивации герпетической инфекции и ее связь с аллергопатологией. Дисс. ... д-ра мед. наук. 14.03.03. 2012. –Томск.
- Gaddipati S., Estrada K., Rao P., Jerome A. D., Suvas S. IL-2/anti-IL-2 antibody complex treatment inhibits the development but not the progression of herpetic Stromal Keratitis // The Journal of Immunology. 2015. Vol.194(1). P.273–282.
- Tang Q., Chen W., Hendricks R.L. Proinflammatory functions of IL-2 in herpes simplex virus corneal infection // J Immunol. 1997. Vol.158(3). P.1275-832.
- Karasneh G.A., Shukla D. Herpes simplex virus infects most cell types in vitro: clues to its success // Virol J. – 2011. – Vol. 26 (8). – P.481
- Miller C.S., Danaher R.J., Jacob R.J. Molecular aspects of herpes simplex virus I latency, reactivation, and recurrence // Crit Rev Oral Biol Med. – 1998. – Vol. 9(4). – P.541-62.
- Staats H.F., Lausch R.N. Cytokine expression in vivo during murine herpetic stromal keratitis. Effect of protective antibody therapy. J Immunol. 1993 Jul 1; 151(1):277-83.
- Thomas J., Gangappa S., Kanangat S., Rouse B.T. On the essential involvement of neutrophils in the immunopathologic disease: herpetic stromal keratitis. J Immunol. 1997;158:1383–1391,
- Tsatsos M, MacGregor C., Athanasiadis I., Moschos M.M., Hossain P., Anderson D. Herpes simplex virus keratitis: an update of the pathogenesis and current treatment with oral and topical antiviral agents // Clin Exp Ophthalmol. – 2016. – Vol. 44(9). – P. 824-837.
- Liesegang T.J. Ocular herpes simplex infection: pathogenesis and current therapy // Mayo Clin Proc. 1988. Vol. 63. P.1092–105.
- Frank G.M., Buela K.A., Maker D.M., Harvey S.A., Hendricks R.L. Early responding dendritic cells direct the local NK response to control herpes simplex virus 1 infection within the cornea // J Immunol. 2012. Vol.188. P.1350–1359.
- 12. **Zhang J., An J.** Cytokines, inflammation, and pain // International Anesthesiology Clinics. 2007. Vol.45(2). P.27–37.
- Azher T.N., Yin X.T., Stuart P.M. Understanding the Role of Chemokines and Cytokines in Experimental Models of Herpes Simplex Keratitis // J Immunol Res. – 2017. – 7261980. Epub 2017 Apr 9. doi: 10.1155/2017/7261980.
- 14. Daheshia M., Kanangat S., Rouse B.T. Production of key molecules by ocular neutrophils early after herpetic infection of the cornea // Exp Eye Res. – 1998. – Vol.67. – P. 619–24.
- Suryawanshi A., Veiga-Parga T., Rajasagi N.K. et al. Role of IL-17 and Th17 cells in herpes simplex virus-induced corneal immunopathology // J Immunol. –2011. Vol. 187(4). P.1919-30.
- Molesworth-Kenyon S. J., Yin R., Oakes J. E., Lausch R. N. IL-17 receptor signaling influences virus-induced corneal inflammation // Journal of Leukocyte Biology. 2008. Vol.83(2). P.401–408.
- 17. **Biswas P.S., Banerjee K., Kinchington P.R., Rouse B.T.** Involvement of IL-6 in the paracrine production of VEGF in ocular HSV-1 infection // Experimental Eye Research. 2006. Vol.82(1). P.46–54.

- Yan X.T., Zhuang M., Oakes J.E., Lausch R.N. Autocrine action of IL-10 suppresses proinflammatory mediators and inflammation in the HSV-1-infected cornea // Journal of Leukocyte Biology. – 2001. – Vol. 69(1). – P.149–157.
- 19. Tumpey T.M., Cheng H., Cook D.N., Smithies O., Oakes J.E., Lausch R.N. Absence of macrophage inflammatory protein-1α prevents the development of blinding herpes stromal keratitis // Journal of Virology. 1998. Vol. 72(5). P.3705–3710.
- Tang Q., Hendricks R. L. Interferon gamma regulates platelet endothelial cell adhesion molecule 1 expression and neutrophil infiltration into herpes simplex virus-infected mouse corneas // The Journal of Experimental Medicine. – 1996. – Vol.184(4). – P.1435–1447.
- Jan X.T., Zhuang M., Oakes J. E., Lausch R. N. Autocrine action of IL-10 suppresses proinflammatory mediators and inflammation in the HSV-1-infected cornea // Journal of Leukocyte Biology. – 2001. – Vol.69(1). – P.149–157.
- Tumpey T.M., Cheng H., Yan X.T. et al. Chemokine synthesis in the HSV-1 infected cornea and its suppression by interleukin-10 // J Leukoc Biol. 1998. Vol.63. P.486-92.
- 23. Suryawanshi A., Mulik S., Sharma S., Reddy P.B., Sehrawat S., Rouse B.T. Ocular neovascularization caused by herpes simplex virus type 1 infection results from breakdown of binding between vascular endothelial growth factor A and its soluble receptor // Journal of Immunology. 2011. Vol.186(6). P.3653–3665.
- 24. **Bock F., Maruyama K., Regenfuss B., Hos D. et al.** Novel anti(lymph)angiogenic treatment strategies for corneal and ocular surface diseases // Prog Retin Eye Res. 2013. Vol.34. P.89-124.
- 25. **Wuest T.R., Carr D. J.** VEGF-A expression by HSV-1-infected cells drives corneal lymphangiogenesis // The Journal of Experimental Medicine. 2010. –Vol. 207(1). P.101–115.
- Lobo A.M., Agelidis A.M., Shukla D. Pathogenesis of herpes simplex keratitis: The host cell response and ocular surface sequelae to infection and inflammation // Ocul Surf. 2019. Vol. 17(1). P.40-49.
- Дербасова Н.Н. Особенности иммунных нарушений при герпетической инфекции глаз и клинико-иммунологическая эффективность различных схем терапии. – Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. 14.00.36. – Владивосток, 2007.
- 28. **West D.M., Del Rosso C.R., Yin X.T., Stuart P.M.** CXCL1 but not IL-6 is required for recurrent herpetic stromal keratitis // J Immunol. 2014. Vol.192(4). P.1762-1767.
- 29. Sekine-Okano M., Lucas R., Rungger D. et al. Expression and release of tumor necrosis factor-alpha by explants of mouse cornea // Invest Ophthalmol Vis Sci. 1996. Vol.37. P.1302–10.
- 30. **Keadle T.L., Usui N., Laycock K.A., Miller J.K., Pepose J.S., Stuart P.M.** IL-1 and TNF-alpha are important factors in the pathogenesis of murine recurrent herpetic stromal keratitis // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000. Vol.41 (1). P.96-102.
- 31. **Minagawa H., Hashimoto K., Yanagi Y.** Absence of tumour necrosis factor facilitates primary and recurrent herpes simplex virus-1 infections // J Gen Virol. 2004. Vol. 85. P.343–347.
- 32. Fenton R.R., Molesworth-Kenyon S., Oakes J.E., Lausch R.N. Linkage of IL-6 with neutrophil chemoattractant expression in virus-induced ocular inflammation // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002. Vol. 43. P.737–43.
- 33. **Ghiasi H., Cai S., Slanina S.M., Perng G.C. et al.** The role of interleukin (IL)-2 and IL-4 in herpes simplex virus type 1

- ocular replication and eye disease // J Infect Dis. 1999. Vol.179. P.1086-93.
- 34. Sarangi P.P., Sehrawat S., Suvas S., Rouse B.T. IL-10 and natural regulatory T cells: two independent anti-inflammatory mechanisms in herpes simplex virus-induced ocular immunopathology // J Immunol. 2008. Vol. 180(9). P.6297-306.
- Atan D., Fraser-Bell S., Plskova J., Kuffova L. et al. Cytokine polymorphism in noninfectious uveitis // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010. Vol.51(8). P.4133-42.
- Ghasemi H., Ghazanfari T., Yaraee R. et al. Roles of IL-10 in ocular inflammations: a review // Ocul Immunol Inflamm.
 -2012. Vol. 20. P.406–418.
- 37. **Abu El-Asrar A.M., Berghmans N., Al-Obeidan S.A. et al.** Expression of interleukin (IL)-10 family cytokines in aqueous humour of patients with specific endogenous uveitic entities: elevated levels of IL-19 in human leucocyte antigen-B27-associated uveitis // Acta Ophthalmol. 2019 ιο Vol.97(5). e780-e784.

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

Поступила 22.06.2020

Рівень прозапальних (TNF-α і II-6) і протизапальних інтерлейкінів (ІЛ-10, ІЛ-4) в сироватці крові у хворих в залежності від частоти рецидивування офтальмогерпесу

Храменко Н.І., Гайдамака Т.Б., Дрожжина Г.І., Величко Л.М.

ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України; Одеса (Україна)

Актуальність. Герпетичний кератит (ГК) є основною причиною сліпоти в світі внаслідок патології рогівки. Відомі методи лікування рецидивуючих форм герпетичних інфекцій (ГІ) дають тимчасові ремісії, профілактика і прогнози розвитку захворювання суперечливі. Це визначає не лише медичну, а й соціальну значимість проблеми. Механізм рецидивувания стромального ГК повністю не розкритий, так як характеризується складністю патофізіологічних механізмів, взаємин імунних факторів, в тому числі і регуляції експресії цитокінів.

Мета. Дослідити рівень прозапальних (TNF-α і IL-6) та протизапальних цитокінів (IL-10, IL-4) в сироватці крові хворих на рецидивуючий офтальмогерпес (стромальний герпетичний кератит) в різні періоди перебігу захворювання в залежності від частоти рецидивування

Матеріал і методи. Дослідження проведені у 33 пацієнтів з рецидивуючим стромальним герпетичним кератитом (СГК) у відділенні патології рогівки та лабораторії імунології Інституту очних хвороб і тканинної терапії ім В.П.Філатова. Визначали рівень інтерлейкінів - IL-4, IL-6, IL-10 і фактора некрозу пухлини а (TNF-а) в сироватці крові: у 15 осіб з рідко рецидивуючим перебігом СГК (не частіше 1 разу на рік) та у 18 осіб з часто рецидивуючим перебігом СГК (рецидив частіше 1 разу на рік) проводили методом твердофазного імуноферментного аналізу з використанням наборів реагентів для кількісного визначення концентрації інтерлейкінів. Оцінку результатів здійснювали фотометрически (мікропланшетний імуноферментний аналізатор «Stat Fax-2100», США). Використовували референтні значення норми, наведені в інструкції для даних реагентів.

Результати. Виявлено підвищену експресію прозапальних цитокінів TNF-α не тільки в період рецидиву $C\Gamma K - в$ середньому в 5,6 разів, але і в період ремісії: при частих рецидивах – в 2,6 рази, при рідкісних рецидивах – в 4 рази вище норми, що підтверджує перебіг запального процесу без явної клінічної картини. При рецидиві рівень експресії TNF-а підвищився однаково в середньому на 50% в групі як з рідко-, так і часто рецидивуючим перебігом. Рівень експресії IL-6 при ремісії рецидивуючого СГК не відрізнявся від норми, а в період рецидиву був в 3 рази вищим, відмінностей між групами з рідко і часто рецидивуючим процесами не було. При рідко рецидивуючому СГК рівень IL-4 при рецидиві і ремісії в 8,5 разів вищий за норму (p<0,05). При часто рецидивуючому процесі в період рецидиву рівень Il-4 на 39% вище, ніж при рецидиві рідко рецидивуючого процесу. При часто рецидивуючому стромальному ГК IL-4 в 22,5 рази вище норми (p < 0.05). При перебігу ΓK з рідкими рецидивами експресія інтерлейкіну IL-10в період ремісії і рецидиву не має відмінностей і в середньому вища за норму на 24% (p<0,05). При часто рецидивуючому ГК рівень IL-10 в крові при ремісії і рецидив на 74% вище, ніж в групі з рідкими рецидивами $C\Gamma K$ (p<0,05), що вдвічі вище значень норми (p<0,05). Висновок. Виявлено відмінність в експресії цитокінів при різній частоті рецидивування СГК: часто рецидивуючий СГК характеризується особливостями регуляції експресії цитокінів, що відрізняється зниженням рівня експресії TNF-а, підвищенням рівня експресії прозапальних IL-6 і протізапальних інтерлейкінів IL-10 і IL-4, що може відображати аутоімунний механізм запальної відповіді при такому перебігу ГК.

Ключові слова: стромальний герпетичний кератит, цитокіни TNF-а, IL-6, IL-10, IL-4