

## **СОДЕРЖАНИЕ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ И НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ В СТЕКЛОВИДНОМ ТЕЛЕ ПАЦИЕНТОВ С ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИЕЙ**

Проведено определение концентраций фактора роста эндотелия сосудов, интерлейкинов 17А и 10 в стекловидном теле пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией. Установлено, что в патогенезе пролиферативной диабетической ретинопатии значимую роль играет активность местного иммуновоспалительного процесса (повышение концентраций ИЛ-17А) и сосудистой пролиферации (повышение концентрации фактора роста эндотелия сосудов). Выявленные корреляционные взаимосвязи свидетельствуют о сопряженности этих процессов.

**Ключевые слова:** диабетическая ретинопатия, цитокины, фактор роста эндотелия сосудов.

### **Актуальность**

В настоящее время в мире насчитывается 200 миллионов человек, страдающих сахарным диабетом, и их число практически удваивается каждые 10–15 лет. Не вызывает сомнения, что офтальмологические осложнения, возникающие при развитии сахарного диабета, являются важнейшей медико-социальной проблемой, что связано с их значимостью в инвалидизации пациентов, высоким удельным весом в структуре нарушений зрения и необратимой слепоты, что является тяжелыми социальными последствиями как для отдельного человека, так и для общества в целом [1, 2, 6].

Несмотря на все успехи современной медицины, совершенствование методов контроля сахара в крови, существующих методов профилактики и лечения диабетических поражений органа зрения, одним из самых тяжелых специфических поражений глаза при сахарном диабете остается диабетическая ретинопатия. Известно, что распространенность диабетической ретинопатии среди больных сахарным диабетом во многом зависит от длительности течения патологического процесса, полноты проведения комплексного лечения и может достигать 80–90%. Прогрессирование диабетической ретинопатии может осложняться рецидивирующими внутриглазными кровоизлияниями, фиброзом сетчатки и стекловидного тела, тракционной отслойкой сетчатки, атрофией зрительного нерва, что приводит к развитию необратимой слепоты [1, 8, 9, 15].

В настоящее время патогенез сахарного диабета рассматривается как многофакторный процесс. Его патогенетической основой являются системные и локальные сосудистые, а также метаболические нарушения, которые приводят и к возникновению поражений органа зрения.

В научных публикациях показано, что у пациентов с диабетической ретинопатией выявлены нарушения, свидетельствующие о значимости в ее патогенезе активности воспалительного процесса, нарушений функционального состояния иммунной системы, включая дисбаланс индукторов межклеточных взаимоотношений – цитокинов, матричных металлопротеиназ, факторов роста и др. [4, 5, 10, 13, 14].

В последние годы придается большое значение факторам роста сосудистого эндотелия в механизмах развития пролиферативной диабетической ретинопатии [3, 7, 12].

Однако, несмотря на активное изучение различных механизмов возникновения и развития диабетической ретинопатии, многие аспекты ее патогенеза требуют дальнейшего изучения, а данные, имеющиеся в настоящее время, о роли дисбаланса про-, противо- и регуляторных цитокинов во взаимосвязи с активацией синтеза факторов, активирующих пролиферацию, остаются дискуссионными и требуют дальнейшего изучения [8].

Все вышеизложенное позволило сформулировать цель настоящего исследования.

### Цель исследования

Изучить содержание фактора роста эндотелия сосудов, интерлейкинов ИЛ-17А и ИЛ-10 в стекловидном теле пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией.

### Материалы и методы

Было обследовано 34 пациента, прошедших хирургическое лечение по поводу тракционной отслойки сетчатки на базе Новосибирского филиала ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздравсоцразвития» в период с 2011 по 2012 год.

Возраст пациентов составлял от 25 до 78 лет. Средний возраст равнялся  $52.6 \pm 4.5$  года. Количество женщин в обследованной группе составило 18, а мужчин – 16.

Основная группа – 18 пациентов с тракционной отслойкой сетчатки на фоне пролиферативной диабетической ретинопатии. Средний возраст пациентов в группе составил  $50.5 \pm 3.2$  года. Количество женщин в группе составило 12, а мужчин – 6.

Группа сравнения составила 16 пациентов с тракционной отслойкой сетчатки, не болевших сахарным диабетом и, соответственно, не имевших признаков диабетической ретинопатии. Средний возраст пациентов в группе составил  $55.5 \pm 2.6$  лет. Количество женщин в группе – 6, а мужчин – 10.

Пациенты обеих подгрупп во время предоперационной подготовки и в послеоперационный период получали стандартную схему терапии, принятую в Новосибирском филиале ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздравсоцразвития»: Наклоф 0,1% раствор (глазные капли), Дексаметазон 0,1% раствор (глазные капли) – инстилляцией в конъюнктивальный мешок по одной капле 3 раза в сутки в течение 10 дней. Тобрекс 0,3% раствор (глазные капли) – субконъюнктивально по одной капле 2 раза в сутки в течение 14 дней. Тропикамид 1% раствор (глазные капли) инстилляцией в конъюнктивальный мешок по одной капле 3 раза в сутки в течение 7 дней.

Оперативное лечение отслойки сетчатки пациентам обеих групп проводилось по стандартной методике задней трехпортовой витрэктомии 25G, 23G.

В качестве исследуемого материала использовалось стекловидное тело, забранное на начальных этапах витрэктомии. Для исключения попадания BSS, забор материала осуществлялся на фоне воздушной тампонады.

Далее проводилась мобилизация сетчатки, фиксация сетчатки перфторорганическим соединением (ПФОС), эндолазеркоагуляция. Во всех случаях витрэктомия была завершена тампонадой силиконовым маслом (СМ).

Полученный биологический материал помещался в пробирки и центрифугировался в течение 10 минут при 3000 оборотах в минуту на центрифуге ОПН-3. Образовавшийся надосадочный слой помещался в пластиковые пробирки, замораживался и в дальнейшем использовался для лабораторной диагностики.

В качестве методов лабораторной диагностики было выбрано определение следующих показателей.

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), биологически активная субстанция, способная, связываясь и активируя мембранные рецепторы (рецептор-1 VEGF и рецептор-2 VEGF), запускать сигнальный каскад, стимулирующий рост и пролиферацию эндотелиальных клеток сосуда. После образования новых сосудов, VEGF выступает фактором выживаемости через подавление апоптоза эндотелиоцитов.

Определение фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в стекловидном теле выполнялось на коммерческих тест-системах производства ООО «ВекторБест» Новосибирск по инструкции производителя. Результаты иммуноферментного анализа регистрировали на вертикальном фотометре «Униплан» при длине волны 450 нм. Для определения концентрации VEGF в анализируемых образцах строился калибровочный график по «средним» оптической плотности каждого стандартного раствора. Результаты выражали в пг/мл.

Известно, что в стимуляции экспрессии VEGF принимают участие многие цитокины, такие как интерлейкин-1в, фактор некроза опухоли-б и др., поэтому для исследования было выбрано определение интерлейкин-17А, являющегося провоспалительным цитокином, секретуемым активированными Т-клетками, и стимулирующим синтез провоспалительных цитокинов TNF-б, ИЛ-1в, молекул межклеточной адгезии и др., и интерлейкина-10 – противо-

воспалительного цитокина, участвующего в процессах хронизации, обладающего иммуносупрессорными свойствами, участвующего в регуляции синтеза VEGF.

Определение ИЛ-17А и ИЛ-10 в стекловидном теле выполнялось на коммерческих тест-системах производства ООО «Цитокин» г. С-Петербург по инструкции производителя. Результаты иммуноферментного анализа регистрировали на вертикальном фотометре «Униплан» при длине волны 450 нм. Для определения концентрации интерлейкинов в анализируемых образцах строился калибровочный график по «средним» оптической плотности каждого стандартного раствора. Результаты выражали в пг/мл.

Статистическая обработка полученных данных. Полученные цифровые данные были подвергнуты статистическому анализу и представлены в виде графиков. Анализ данных проводили с помощью пакета прикладных программ Statgrafics. Значимость различий вариационных рядов в несвязанных выборках оценивали с помощью критерия Манна-Уитни. Корреляция показателей вычислялась по методу Спирмена. Достоверным считали различие между сравниваемыми рядами с уровнем достоверной вероятности 95% ( $p < 0,05$ ).

У всех пациентов было получено информированное согласие на использование данных обследования в научных целях и согласие этического комитета на проведение исследования.

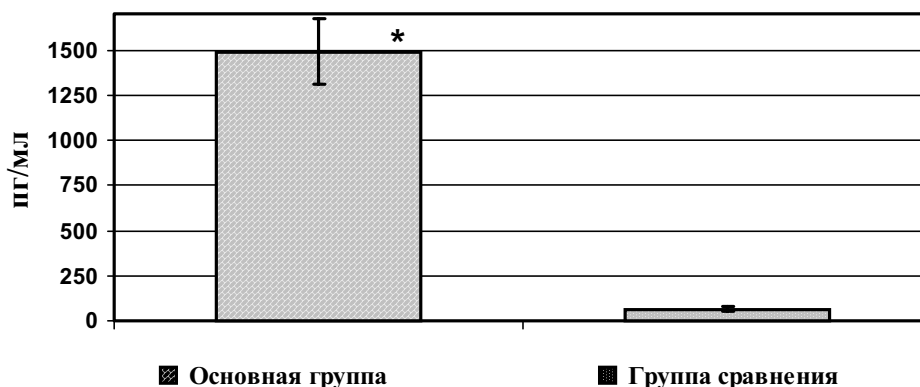
**Результаты собственных исследований**

Концентрация фактора роста эндотелия сосудов в стекловидном теле пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией была достоверно, более чем в 23 раза, выше значений показателя у пациентов с тракционной отслойкой сетчатки без признаков пролиферативной диабетической ретинопатии ( $p < 0,001$ ). Графически результаты представлены на рисунке 1.

Концентрация провоспалительного цитокина ИЛ-17А в стекловидном теле пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией была достоверно в 2,84 раза выше значений показателя у пациентов с тракционной отслойкой сетчатки без признаков пролиферативной диабетической ретинопатии ( $p < 0,001$ ). Графически результаты представлены на рисунке 2.

Концентрация противовоспалительного цитокина ИЛ-10, обладающего иммуносупрессивными свойствами, в стекловидном теле пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией достоверно не отличалась от значений показателя у пациентов с тракционной отслойкой сетчатки без признаков пролиферативной диабетической ретинопатии. Графически результаты представлены на рисунке 3.

При оценке содержания цитокинов важным является не только изменение их концентрации, но и соотношение интерлейкинов, обладающих про- и противовоспалительной активностью, способных стимулировать гуморальное или клеточное звено иммунной системы и т. д.



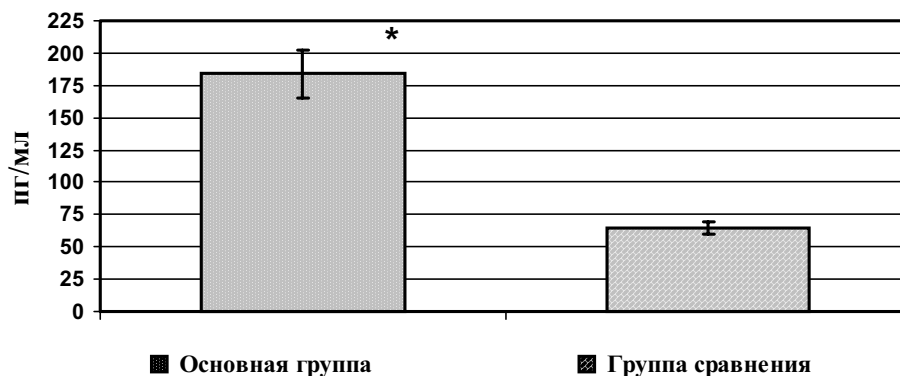
\* – достоверно отличается от значений показателя в группе сравнения ( $p < 0,001$ )

Рисунок 1. Концентрация VEGF в стекловидном теле пациентов основной группы в сравнении с его концентрацией в стекловидном теле пациентов группы сравнения

В результате проведенного анализа было показано, что коэффициент соотношения ИЛ-17А/ИЛ-10 в стекловидном теле пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией был достоверно, в 2,73 раза, выше значений показателя у пациентов с тракционной отслой-

кой сетчатки без признаков пролиферативной диабетической ретинопатии ( $p < 0,001$ ). Графически результаты представлены на рисунке 4.

При сравнительной оценке диагностической и прогностической значимости любого показателя крайне важным является не только наличие



\* – достоверно отличается от значений показателя в группе сравнения ( $p < 0,01$ )

Рисунок 2. Концентрация ИЛ-17А в стекловидном теле пациентов основной группы в сравнении с его концентрацией в стекловидном теле пациентов группы сравнения

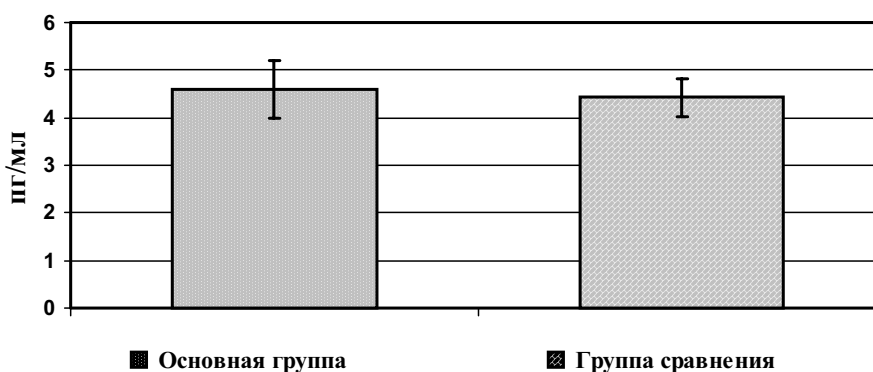
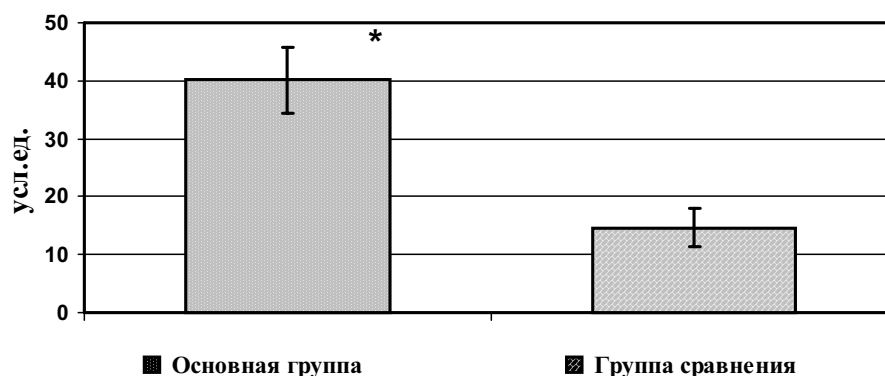


Рисунок 3. Концентрация ИЛ-10 в стекловидном теле пациентов основной группы в сравнении с его концентрацией в стекловидном теле пациентов группы сравнения



\* – достоверно отличается от значений показателя в группе сравнения ( $p < 0,01$ )

Рисунок 4. Коэффициент соотношения ИЛ-17А/ИЛ-10 в стекловидном теле пациентов основной группы в сравнении с его концентрацией в стекловидном теле пациентов группы сравнения

его изменений и достоверности различия между нормативными и полученными значениями, но и наличие изменений выраженности и направленности взаимосвязей между изучаемыми параметрами в патогенезе патологического процесса.

В связи с вышеизложенным, был проведен корреляционный анализ значений изучаемых показателей в обследованных группах пациентов, в результате которого было показано – в группе сравнения не было выявлено коррелятивных взаимосвязей между изучаемыми показателями.

При исследовании стекловидного тела пациентов основной группы были выявлены корреляционные взаимосвязи между следующими показателями:

– прямая достоверная коррелятивная взаимосвязь между концентрациями VEGF и ИЛ-17А ( $r=0.5$ ,  $p<0.05$ );

– обратная достоверная коррелятивная взаимосвязь между концентрациями ИЛ-17А и ИЛ-10 ( $r= -0.56$ ,  $p<0.05$ ).

### **Заключение**

Таким образом, проведенное исследование позволило показать, что в механизмах развития пролиферативной диабетической ретинопатии значимую роль играет высокая активность местного иммуновоспалительного процесса, о чем свидетельствуют достоверно высокие, относительно величин изучаемых показателей в группе сравнения, уровни содержания провоспалительного цитокина ИЛ-17А и коэффициента соотношения ИЛ-17А/ИЛ-10 в стекловидном теле. Указанные процессы приводят к активации сосудистой пролиферации и проявляются более чем 20-кратным повышением содержания фактора роста эндотелия сосудов в стекловидном теле. Выявленные корреляционные взаимосвязи свидетельствуют о сопряженности развития иммуновоспалительного и пролиферативного процессов.

25.09.2012

### **Список литературы:**

1. Глазные проявления диабета / Под ред. Л.И. Балашевича – СПб, 2004. – 382 с.
2. Либман Е.С., Шахова Е.В. Слепота и инвалидность вследствие патологии органа зрения в России // Вестник офтальмологии. – 2006. – №1. – С. 35-37.
3. Слепова О.С., Нероев В.В., Илюхин П.А., Сарыгина О.И. Иммунологический контроль при хирургическом лечении больных с пролиферативной диабетической ретинопатии с предварительным интравитреальным введением Лувентиса // Российский офтальмологический журнал. – 2012.-№1.-С. 69-74.
4. Черных В.В., Лысинов А.Г., Обухова О.О., Горбенко О.М., Шваюк А.П., Трунов А.Н. Особенности местного иммуновоспалительного процесса при непролиферативной диабетической ретинопатии // Вестник НГУ. – 2011. – Т.9, №1. – С. 164-168.
5. Ходжаев Н. С., Черных В. В., Роменская И. В., Кунтышева К. Е., Трунов А. Н. Влияние лазерокоагуляции сетчатки на клинико-лабораторные показатели у пациентов диабетическим макулярным отеком // Вестник НГУ. – 2011. – Т.9, №4. – С. 48-53.
6. Bhavsar A.R. Diabetic retinopathy: the latest in current management // Retina. – 2006. – Vol. 26, №6. – P. 71-79.
7. Citirik M., Kabatas E.U., Batman C., Akin K.O., Kabatas N. Vitreous vascular endothelial growth factor concentrations in proliferative diabetic retinopathy versus proliferative vitreoretinopathy // Ophthalmic Res. – 2012. – Vol.47, №1. – P.7-12.
8. Lim A., Stewart J., Chui T.Y., Lin M., Ray K., Lietman T., Porco T., Jung L., Seiff S., Lin S. Prevalence and risk factors of diabetic retinopathy in a multi-racial underserved population // Ophthalmic Epidemiol. – 2008.-№6.- P.402-409.
9. Kollias A.N., Ulbig M.W. Diabetic retinopathy: Early diagnosis and effective treatment // Dtsch. Arztebl. Int. -2010.- №5. – P. 75-83.
10. Kowluru R.A., Zhong Q., Kanwar M. Metabolic memory and diabetic retinopathy: role of inflammatory mediators in retinal pericytes // Exp. Eye Res.-2010. – №5.-P.617-623.
11. Murugeswari P., Shukla D., Rajendran A., Kim R., Namperumalsamy P., Muthukkaruppan V. Proinflammatory cytokines and angiogenic and anti-angiogenic factors in vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy and eales' disease // Retina. – 2008.-№6.-P.817-824.
12. Pennock S., Kazlauskas A. Vascular endothelial growth factor A competitively inhibits platelet-derived growth factor (PDGF)-dependent activation of PDGF receptor and subsequent signaling events and cellular responses // Mol. Cell Biol.-2012.- Vol.32,№10.-P.1955-1966.
13. Rasier R., Gormus U., Artunay O., Yuzbasioglu E., Oncel M., Bahcecioglu H. Vitreous levels of VEGF, IL-8, and TNF-alpha in retinal detachment // Curr. Eye Res.-2010.- Vol.35, №6.-P.505-509.
14. Symeonidis C, Papakonstantinou E, Androudi S, Rotsos T, Diza E, Brazitikos P, Karakioulakis G, Dimitrakos S.A. Interleukin-6 and the matrix metalloproteinase response in the vitreous during proliferative vitreoretinopathy // Cytokine. – 2011.-Vol.54,№2.- P.212-217.
15. Sadaka A., Giuliari G.P. Proliferative vitreoretinopathy: current and emerging treatments // Clin. Ophthalmol. – 2012.-№6.- P.1325-1333.



Сведения об авторах:

**Варваринский Егор Викторович**, Новосибирский филиал ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздравсоцразвития», врач-офтальмолог

**Братко Галина Викторовна**, Новосибирский филиал ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздравсоцразвития», заведующая научно-образовательным отделом, кандидат медицинских наук

**Трунов Александр Николаевич**, заместитель директора по научной работе Новосибирского филиала ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздравсоцразвития», руководитель лаборатории иммунологии ФГБУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины Сибирского отделения РАМН, доктор медицинских наук, профессор

**Черных Валерий Вячеславович**, директор Новосибирского филиала ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздравсоцразвития», доктор медицинских наук, профессор

630071, г. Новосибирск, ул. Колхидская, 10

**Шваюк Аля Петровна**, старший научный сотрудник лаборатории иммунологии ФГБУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины Сибирского отделения РАМН, кандидат биологических наук

**Горбенко Ольга Михайловна**, старший научный сотрудник лаборатории иммунологии ФГБУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины Сибирского отделения РАМН, кандидат биологических наук

630117, г. Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2

**UDC 617.735-007.281; 616.379-008.64; 612.017.1:57.041, 577.17, 577.12.05**

**Varvarinsky E.V., Gorbenko O.M., Shvayuk A.P., Bratko G.V., Trunov A.N., Chernykh V.V.**

**CONTENTS VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND SEVERAL CYTOKINES IN THE VITREOUS BODY PATIENTS WITH PROLIFERATIVE DIABETIC RETINOPATHY**

Conducted determination of the concentrations of vascular endothelial growth factor, interleukin 17A and 10 in the vitreous body of patients with proliferative diabetic retinopathy. Found that in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy activity of local immuno-inflammatory process (increased concentrations of IL-17A) and vascular proliferation (increased concentrations of vascular endothelial growth factor) plays significant role. Identified correlations indicate the relationship of these processes.

Key words: diabetic retinopathy, cytokines, vascular endothelial growth factor

**Bibliography:**

1. Ocular manifestations of diabetes / Ed. Balashevich L.I. – St. Petersburg, 2004. – 382 p.
2. Libman E.S., Shahova E.V. Blindness and disability due to pathology of the vision in Russia // Journal of Ophthalmology. – 2006. – №1. – P. 35-37.
3. Slepova O.S., Neroev V.V. Ilyukhin P.A., Sarygina O.I. Immunological control of in the surgical treatment of patients with proliferative diabetic retinopathy with preliminary introduction to the vitreous Lucentis // Russian Ophthalmological Journal. – 2012. – №1. – P.69-74.
4. Chernykh V.V., Lysikov A.G., Obukhova O.O., Gorbenko O.M., Shvayuk A.P., Trunov A.N. Features of local immunoinflammatory process at nonproliferative diabetic retinopathy // Bulletin of the Novosibirsk State University.– 2011. – Vol.9, №1. – P.164-168.
5. Khodzhayev N.S., Chernykh V.V., Romenskaya I.V., Kuntysheva K.E., Trunov A.N. Effect of lasercoagulation retina on clinical-laboratory parameters in patients diabetic macular edema // Bulletin of the Novosibirsk State University.– 2011. – Vol.9, №4. – P.48-53.
6. Bhavsar A.R. Diabetic retinopathy: the latest in current management // Retina. – 2006. – Vol. 26, №6. – P. 71-79.
7. Citirik M., Kabatas E.U., Batman C., Akin K.O., Kabatas N. Vitreous vascular endothelial growth factor concentrations in proliferative diabetic retinopathy versus proliferative vitreoretinopathy // Ophthalmic Res.-2012.– Vol.47, №1.– P.7-12.
8. Lim A., Stewart J., Chui T.Y., Lin M., Ray K., Lietman T., Porco T., Jung L., Seiff S., Lin S. Prevalence and risk factors of diabetic retinopathy in a multi-racial underserved population. // Ophthalmic Epidemiol. – 2008. – №6. -P. 402-409.
9. Kollias A.N., Ulbig M.W. Diabetic retinopathy: Early diagnosis and effective treatment // Dtsch. Arztebl. Int. -2010.– №5.– P. 75-83.
10. Kowluru R.A., Zhong Q., Kanwar M. Metabolic memory and diabetic retinopathy: role of inflammatory mediators in retinal pericytes // Exp. Eye Res.-2010. – №5.-P. 617-623.
11. Murugeswari P., Shukla D., Rajendran A., Kim R., Namperumalsamy P., Muthukkaruppan V. Proinflammatory cytokines and angiogenic and anti-angiogenic factors in vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy and eales' disease // Retina.– 2008. -№6. – P. 817-824.
12. Pennock S., Kazlauskas A. Vascular endothelial growth factor A competitively inhibits platelet-derived growth factor (PDGF)-dependent activation of PDGF receptor and subsequent signaling events and cellular responses // Mol. Cell Biol.-2012.-Vol.32,№10.-P.1955-1966.
13. Rasier R., Gormus U., Artunay O., Yuzbasioglu E., Oncel M., Bahcecioglu H. Vitreous levels of VEGF, IL-8, and TNF-alpha in retinal detachment // Curr. Eye Res.-2010. – Vol.35, №6.– P.– 505-509.
14. Symeonidis C, Papakonstantinou E, Androudi S, Rotsos T, Diza E, Brazitikos P, Karakiulakis G, Dimitrakos S.A. Interleukin-6 and the matrix metalloproteinase response in the vitreous during proliferative vitreoretinopathy // Cytokine.– 2011. – Vol.54, №2. – P. 212-217.
15. Sadaka A., Giuliani G.P. Proliferative vitreoretinopathy: current and emerging treatments // Clin. Ophthalmol. – 2012. – №6. -P. 1325-1333.