

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»
Кафедра «Биофизика»

Диссертация допущена к защите

Зав. кафедрой, проф.

_____ Скворцов А.Н.

"__" _____ 2015 г.

ДИССЕРТАЦИЯ
НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ МАГИСТРА
по теме:
БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ РАННЕЙ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ
ДИАГНОСТИКИ ГЛАУКОМЫ

Направление: 011200.68 – Физика

Магистерская программа: 011200.68.02 – Биофизика

Выполнил студент гр. 63417

(подпись)

Н.М. Шурыгина

Руководитель, к.б.н., доц.

(подпись)

О.В. Галкина

Рецензент, к.б.н., доц.

(подпись)

В.Р. Сергеев

Санкт-Петербург 2015

Реферат

с. 38, рис. 10, табл. 4, 34 источника

ГЛАУКОМА, МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ, ТРАНСФОРМИРУЮЩИЙ ФАКТОР РОСТА, ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ, ИФА

Целью работы являлось измерение концентрации ММП-9, ММП-2, TGF- β 1 и TGF- β 2 в плазме крови пациентов с ПОУГ, ПЭГ, ПЭС для последующей оценки возможности применения данных показателей в дифференциальной диагностике патологии. Концентрации маркеров измеряли методом твердофазного ИФА.

В результате проведенного исследования было показано, что у пациентов с ПЭС увеличена плазменная концентрация ММП-9 (по сравнению с другими типами заболевания и здоровыми людьми). Высокий уровень TGF- β 2 ассоциируется с ПЭГ и ПЭС, но не с ПОУГ. Для ММП-2 и TGF- β 1 не было выявлено изменений концентраций по всем группам исследования. На основании полученных результатов можно предположить, что определение плазменного уровня ММП-9 и TGF- β 2 может использоваться для ранней дифференциальной диагностики глаукомы.

Summary

p. 38, fig. 10, tab. 4.

GLAUCOMA, MATRIX METALLOPROTEINASES, TRANSFORMING GROWTH FACTOR, DIAGNOSTIC TESTS, ELISA

The purpose of the study was to measure the concentration of MMP-2, MMP-9, TGF- β 1 and TGF- β 2 in plasma of patients with POAG, PEX Gl, PEX Sy for further evaluation of the possibility to use those indicators in differential diagnostics of glaucoma. The marker concentrations were measured by ELISA.

The study showed that patients with PEX Sy have higher concentration of MMP-9 in comparison with patients having other types of the disease and control group of normal people. High level of TGF- β 2 is connected with PEX Gl and PEX Sy, but not with POAG. There were no differences in all study groups for MMP-2's and TGF- β 1's concentration. Based on the study results, it can be possible to use measuring level of MMP-9 and TGF- β 2 in plasma for early differential diagnostics of glaucoma.

Список использованных сокращений

TGF- β	Transforming growth factor β	Трансформирующий фактор роста β
IL	Interleukin	Интерлейкины
ВГД		Внутриглазное давление
BP	Binding protein	Связывающий белок
ГКС		Ганглиозные клетки сетчатки
ДЗН		Диск зрительного нерва
ИФА		Иммуноферментный анализ
КДЛ		Клинико-диагностические лаборатории
кДНК		Комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛАП		Латентно-ассоциированный пептид
ММП, MMP	Matrix metalloproteinases	Матриксные металлопротеиназы
ПЗУГ		Первичная закрытоугольная глаукома
ПОУГ		Первичная открытоугольная глаукома
ПЭГ		Псевдоэкзофалиативная глаукома
ПЭС		Псевдоэкзофалиативный синдром
ТИМП, TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase	Тканевый ингибитор металлопротеиназ
ЭЦМ		Экстрацеллюлярный матрикс

Оглавление

1. Обзор литературы.....	9
1.1 Глаукома	9
1.1.1 Типы и причины заболевания.....	9
1.1.2 Экстрацеллюлярный матрикс	9
1.2 Матриксные металлопротеиназы	10
1.2.1 Строение, функции, классификация матриксинов	10
1.2.2 Регуляция активности ММП: специфичные тканевые ингибиторы ТИМП	12
1.2.3 Роль ММП при глаукоме.....	13
1.2.4 Апоптоз ганглионарных клеток сетчатки.....	15
1.3 Трансформирующий фактор роста.....	16
1.4 Варианты биологических жидкостей для исследования.....	16
1.5 Концентрации биомаркеров при глаукоме	17
1.5.1 Уровень ММП	17
1.5.2 Уровень TGF- β	18
1.6 Иммуноферментный анализ.....	18
2. Материалы и методы	19
2.1 Материал	19
2.2 Группы обследованных пациентов.....	19
2.3 Иммуноферментный анализ.....	19
2.4 Статистическая обработка данных	21
3. Результаты и обсуждения.....	22
3.1 Группы обследованных пациентов.....	22
3.2 Проверка нормальности распределений результатов.....	22
3.3 Определение уровня ММП-2	24
3.4 Определение уровня ММП-9	26
3.5 Определение уровня TGF- β 1	28
3.6 Определение уровня TGF- β 2.....	30

3.7	Исследование корреляции между параметрами.....	32
Выводы.....		34
Список использованных источников		35

Введение

Глаукома – это хроническое заболевание органа зрения, которое характеризуется, в первую очередь, повышением внутриглазного давления, и последующим развитием дефекта поля зрения, атрофией зрительного нерва и слепотой.

В мире насчитывается около 100 млн. человек, страдающих данным заболеванием. В России их число превышает 1 млн. человек, при этом еще столько же людей больны, но не знают об этом. Высокая распространенность данного заболевания, а так же тяжелые последствия, приводящие к инвалидности, придают глаукоме большое медико-социальное значение [1]. В связи с этим имеется необходимость поиска универсальных методов, которые позволят диагностировать глаукому на ранних стадиях, т.к. современные существующие методы являются субъективными и позволяют диагностировать заболевание только тогда, когда уже развивается необратимое разрушение зрительного нерва.

Доказано, что одним из ведущих механизмов прогрессирования глаукомной оптической нейропатии является апоптоз [2], а внутриглазное давление является основным фактором риска. Прогрессирование апоптоза ганглиозных клеток при глаукоме происходит при участии матриксных металлопротеиназ (ММП) и трансформирующего фактора роста β (TGF- β).

ММП - семейство внеклеточных Zn и Ca-зависимых эндопептидаз, способных разрушать почти все компоненты внеклеточного матрикса соединительных тканей. ММП-2 и ММП-9 относятся к семейству желатиназ и гидролизуют ламинин, что, видимо, приводит к апоптозу и дегенерации сетчатки.

В процессах апоптоза, регуляции синтеза и деградации внеклеточного матрикса активное участие принимает также TGF- β – цитокин, осуществляющий свою биологическую активность через связывание с TGF рецептором, что приводит к запуску различных путей внутриклеточного сигналинга, в том числе, приводящих к апоптозу. Считается, что он вносит дисбаланс в нормальное соотношение матриксинов и их тканевых ингибиторов ТИМП, что приводит к чрезмерному накоплению или деградации внеклеточного матрикса.

Таким образом, ММП-2, ММП-9, TGF- β 1 и TGF- β 2 можно рассматривать как перспективные ранние биомаркеры для диагностики глаукомы.

Целью данной работы явилось исследование изменения концентраций ММП-9, ММП-2, TGF- β 1 и TGF- β 2 в плазме крови пациентов с ПОУГ, ПЭГ, ПЭС, и возможности их применения для дифференциальной диагностики патологии.

Для реализации данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Создать базу данных биоматериала.

2. Измерить концентрации матриксных металлопротеиназ (ММП-9, ММП-2) и трансформирующих ростовых факторов (TGF- β 1 и TGF- β 2) в плазме крови пациентов.
3. Проанализировать изменения концентраций ММП-9, ММП-2, TGF- β 1 и TGF- β 2 и их ассоциацию с различными типами глауком.
4. Выявить информативные лабораторные показатели для дифференциальной диагностики глаукомы.

Материалом для исследования являлась плазма крови пациентов с диагностированной глаукомой, находящихся на амбулаторном лечении в клинике офтальмологии ПСПбГМУ им. ак. И. П. Павлова.

Определение концентрации маркеров глаукомы проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

Работа проводилась в лаборатории биохимического гомеостаза НИИ Нефрологии ПСПбГМУ им. ак. И. П. Павлова (зав. лаб. Галкина О.В.).

1. Обзор литературы

1.1 Глаукома

1.1.1 Типы и причины заболевания

Глаукома – офтальмологическая патология, при которой происходит повышение внутриглазного давления (ВГД), связанное с нарушением оттока жидкости из глаза. Согласно принятой классификации, глаукома бывает:

- открытоугольная (ПОУГ), возникающая в том случае, когда имеется доступ к естественной дренажной системе, но нарушены ее функции;
- псевдоэксфолиативная (ПЭГ), связанная с отложением эксфолиативного вещества на всех структурах переднего отдела глазного яблока;
- закрытоугольная (ПЗУГ), при которой происходит накопление внутриглазной жидкости из-за отсутствия доступа к естественной дренажной системе.

Развитие глаукомы – многофакторный процесс. Несмотря на многочисленные исследования, посвященные данной теме, молекулярные механизмы патогенеза глаукомы до конца не выяснены. Известно, что к повышению внутриглазного давления приводит нарушение оттока водянистой влаги, которое обусловлено недостаточностью трабекулярной сети (уменьшение межтрабекулярного пространства, увеличение толщины структур трабекулы). Повышенное внутриглазное давление приводит к механической компрессии, запуская сложный механизм глаукоматозного поражения структур глаза, исходом которого является атрофия зрительного нерва. Известно, что к факторам риска глаукомы и усугубления ее течения относятся определенные физиологические условия (возраст, наследственность, раса) и системные нарушения (сосудистые заболевания и др.). Гипертензия и гипотензия приводят к нарушению перфузии клеток сетчатки и диска зрительного нерва (ДЗН), результатом чего является ишемия и оксидативный стресс, формирующие глаукоматозное поражение [3].

1.1.2 Экстрацеллюлярный матрикс

Соединительную ткань образуют клетки и межклеточное вещество (т.н. экстрацеллюлярный матрикс (ЭЦМ)). Клетки соединительной ткани (фибробласты, фиброциты, миофибробласты, макрофаги, плазматические клетки и пр.) обеспечивают возможность регуляции строения и состояния межклеточного вещества, контролируя его продукцию, перестройку и необходимое разрушение. Это возможно благодаря различным гуморальным

факторам (цитокинам, факторам роста, различным ферментам и т.д.), регулирующим рост, дифференцировку и активность клеток. С их же помощью осуществляются иммунные реакции, распознавание и удаление поврежденных, раковых, погибших клеток и межклеточного вещества [4,5].

Важную роль в регуляции функционирования соединительной ткани играет экстрацеллюлярный матрикс. Он состоит из волокон и аморфного вещества, и обеспечивает структурную организацию, механические, физико-химические свойства ткани, объединяет все клетки в одну систему и выполняет важную роль в передаче информации между ними. Помимо этого, ЭЦМ влияет на деление, дифференцировку клеток, экспрессию рецепторов, активность и чувствительность к действию различных факторов [4,5]. Решающую роль в поддержании гомеостаза ткани играет сбалансированность синтеза и деградации компонентов ЭЦМ [5].

Для выполнения зрительной функции необходима правильная работа сетчатки и зрительного нерва. Нейроглия, представленная в глазу макроглией, микроглией и олигодендроглией, обеспечивает правильное функционирование нейронов, выполняя опорную, питательную, барьерную, защитную и секреторную функции [4].

В последнее время явным становится значение синтеза и разрушения ЭЦМ в процессах ремоделирования структур глаза, которые связаны с развитием глаукомы.

В протеолизе ЭЦМ принимают участие все типы протеиназ, но основную роль выполняют металлопротеиназы. Их концентрация преобладает в межклеточном пространстве. Они способны разрушать почти все компоненты внеклеточного матрикса, в том числе протеогликаны и нативный коллаген.

1.2 Матриксные металлопротеиназы

1.2.1 Строение, функции, классификация матриксинов

Матриксные металлопротеиназы (ММП), или матриксины, относятся к семейству цинковых металлопротеиназ, функция которых связана с обменом белков межклеточного матрикса. Они получили свое название за способность специфически гидролизовать все основные белки матрикса. Эти ферменты играют решающую роль при развитии таких физиологических процессов, как морфогенез, резорбция и ремоделирование тканей, миграция, адгезия, дифференцировка и пролиферация клеток, а также при патологических состояниях (ревматоидный артрит, гломерулонефрит, пародонтиты, изъязвление роговой оболочки глаз и др.). ММП синтезируются и секретируются целым рядом клеток: фибробластами, эпителиальными клетками, фагоцитами, лимфоцитами и онкогенно-

трансформированными клетками. Семейство ММР обладает некоторыми общими характерными чертами:

1. содержат цинк в активном центре и относятся к кальций-зависимым протеиназам, ингибируются хилатными агентами;
2. каталитический домен содержит мотив HEXXHXXGXXH , три остатка гистидина которого связывают атом цинка в активном центре;
3. обладают сходной доменной структурой;
4. гидролизуют один или несколько компонентов матрикса и базальных мембран;
5. секретируются в виде проферментов, пропептидный домен содержит консервативную последовательность, которая отвечает за активацию про-ММР;
6. проферменты активизируются рядом протеиназ, тиолмодифицирующими агентами и хаотропными реагентами;
7. ингибируются специфическими тканевыми ингибиторами;
8. последовательности кДНК всех ММР имеют высокую степень гомологии с кДНК коллагеназы;
9. промоторные участки генов содержат несколько сходных регуляторных последовательностей.

В то же время на основании данных по структурной организации и субстратной специфичности в семействе ММР выделены четыре подсемейства: коллагеназы, желатиназы, стромелизины и остальные ММР, не относящиеся к перечисленным подсемействам. ММР представленных подсемейств могут различаться способом активации проферментов и особенностями взаимодействия с эндогенными ингибиторами.

Коллагеназы (ММП-1, -8, -13 и -18) расщепляют интерстициальные коллагены I, II и III типа, а также способны «переваривать» другие молекулы ЭЦМ и растворимые протеины [6].

ММП-2 (желатиназа А) и ММП-9 (желатиназа В) относятся к классу желатиназ за способность легко гидролизовать желатины. Помимо этого они также участвуют в расщеплении многих молекул ЭЦМ, включая коллагены IV, V, XI типов, ламинин, коровий протеин агрекан и др. ММП-2 расщепляет коллагены I, II и III типов аналогично коллагеназам. ММП-9 способна расщеплять нативные коллагены VI, V и XI типов, амилоидный пептид $-\beta$, IL-8 [6,7].

К стромелизинам относят ММП-3, -10 и -11 типа. Они не расщепляют интерстициальные коллагены, но кроме расщепления компонентов ЭЦМ, способны активизировать про-ММП.

В настоящее время клонированы все кДНК всех основных представителей ММР, установлена аминокислотная последовательность ММР, в которой выделены

функциональные домены. В качестве первого домена ММП рассматривается сигнальный пептид, т.н. «пре»-домен, который обеспечивает направленную секрецию молекулы. Он состоит, как правило, из 18-20 а.о. и удаляется в процессе секреции. Латентная форма содержит «пропептидный» домен, состоящий из 77-87 а.о. В состав этого домена входит консервативная последовательность PRCG(V/N)PD, содержащая неспаренный остаток цистеина, который связан с ионом цинка активного центра, - так называемый цистеиновый выключатель. Активация профермента сопровождается диссоциацией Zn^{2+} -Cys-связи и отщеплением полипептида с молекулярной массой 4000-15000 Да. Основная часть активной молекулы ММП состоит из двух участков – N- и С-концевых доменов. N-концевой - каталитический домен (160-260 а.о.), содержит цинк-связывающий участок HEXHXXGXXH, в который входят три остатка His, связывающие цинк, и остаток Glu, принимающий участие в катализе, а С-концевой – связывающий домен (200-230 а.о.). Между N- и С-доменами находится небольшой связывающий домен (hinge), который важен для проявления субстратной специфичности [6].

В 1949 году ММП были впервые описаны как деполимеризующие ферменты, способствующие росту опухоли. Однако только в 1985 году все известные на тот момент ферменты были объединены в общую группу. Третичная структура данных ферментов определялась с помощью рентгеноструктурного анализа на протяжении десятилетия, начиная с 1994 года, в котором была получена структура ММП-1 и ММП-8 [6,8].

1.2.2 Регуляция активности ММП: специфичные тканевые ингибиторы ТИМП

Активность ферментов в тканях зависит от уровня экспрессии их генов и от наличия активаторов и ингибиторов ферментов в окружающей среде. ММП в обычных условиях содержатся в тканях в незначительных количествах. Эти протеиназы относятся к «индуцируемому» ферментам, синтез которых на уровне транскрипции контролируется рядом факторов: цитокинами, факторами роста, химическими соединениями, факторами, действующими на поверхность клетки, факторами, тормозящими уровень синтеза. Действие этих факторов зависит от типа клеток и вида животного. Анализ промоторов ММП показал, что они содержат общие элементы, отвечающие за механизмы регуляции экспрессии генов глюкокортикоидами, эстрогеном, прогестероном и др. Активность ММП в физиологических условиях регулируются специфическими тканевыми ингибиторами – ТИМП. Они связываются с про-ММП и активными ММП стехиометрически, ингибируя таким образом как автокаталитическую активацию латентных форм ММП, так и активные ферменты. ТИМП различаются по их специфическому действию на ММП. Так, ТИМП-1 значительно лучше

ингибирует ММП-9, в то время как TIMP-2 подавляет активность ММП-2. Показано, что молекулы ингибиторов включают два домена, содержащие по три дисульфидные связи. N-концевой домен отвечает за ингибирование ММП, а С-концевой способствует взаимодействию с ферментами [6].

TIMP специфически угнетают активный фермент, обратимо связываясь с его адсорбционным центром, блокируя при этом атом Zn^{2+} в каталитическом центре. Выявлено 4 белка семейства TIMP. Все они содержат по 12 остатков цистеина, которые, образуя S-S мостики, формируют 6 петель полипептидной цепи [9].

Решающим фактором в действии ММП является соотношение ферментов и их эндогенных ингибиторов TIMP. Получены многочисленные данные об эффективном ингибировании процессов инвазии и метастазирования в системах *in vitro* и на экспериментальных животных. В настоящее время проводятся многочисленные исследования по разработке ингибиторов ММП как перспективных лекарственных препаратов [6].

1.2.3 Роль ММП при глаукоме

За отток влаги передней камеры глазного яблока отвечает трабекулярная сеть – соединительная ткань, связывающая ресничный край радужки и заднюю поверхность роговицы. Так же существует увеосклеральный путь, через который происходит около 10% оттока влаги. Нарушение ремоделирования ЭЦМ в этих тканях, а также диске зрительного нерва и слое ганглиозных клеток сетчатки (ГКС) являются признаками глаукомного процесса. Из-за особенностей состава этих структур, таких как преобладание в трабекулярной сети коллагенов I и III типов, и IV типа в склере и базальных мембранах, а также наличие коллагена III типа в волокнах, окружающих капилляры и нервные волокна, считается, что ММП принимает участие в этих процессах [1,4].

Одним из основных механизмов гибели клеток трабекулярной зоны и ГКС при глаукоме является апоптоз. В его реализации уже доказана роль ММП, что дает идею для их изучения при данной патологии [10].

В нормальном состоянии соотношение ММП:TIMP должно составлять 1:1. Любые изменения данного соотношения, как было сказано выше, приводят к чрезмерному накоплению или деградации ЭЦМ. Известно, что нарушение данного баланса может быть вызвано белками TGF- β 1, что порождает увеличение ЭЦМ в трабекулярной сети с последующим увеличением внутриглазного давления.

Псевдоэксфолиативный синдром (ПЭС) – это системное заболевание, похожее на эластоз, которое связано с продуцированием и накоплением ЭЦМ в тканях переднего сегмента глаза и различных внутренних органах. Недавние исследования показали, что TGF- β 1, оксидативный стресс и дисбаланс между ММП и ТИМП играют роль в возникновении ПЭС. Точный механизм возникновения данного заболевания, тем не менее, не известен, хотя считается, что TGF- β 1 приводит к дисбалансу между ММП и ТИМП, что и приводит к накоплению ЭЦМ в трабекулярной ткани, а это, в свою очередь, к увеличению ВГД [11].

Участие ММП-2 и ее ингибиторов в патогенезе ПЭГ и ПЭС объясняется наличием в псевдоэксфолиативном материале элементов ЭЦМ, которые являются субстратами для ММП-2. К этим компонентам относятся фибронектин, витронектин, фибриллина-1, амилоида-Р и ламинин [12].

При исследовании закрытоугольной глаукомы было обнаружено, что в соотношении ММП:ТИМП преобладает уровень ММП, что может свидетельствовать о других механизмах развития этого типа глаукомы [13].

J. Flammer и O. Golubnitschaja обнаружили увеличение числа ММП-9 и ММП-14 в лейкоцитах крови больных нормотензивной и ПОУГ, при этом экспрессия ММП-2 не была обнаружена ни у здоровых, ни у страдающих глаукомой. В результате авторы сделали вывод об участии процессов ремоделирования в формировании глаукомной оптической нейропатии [14]. Увеличение уровня ММП-9 в слезной жидкости и сыворотке крови больных ПОУГ было выявлено Д.А. Рукиной при сравнении активности ММП-9 и ММП-14, а так же нарушение баланса с ТИМП при снижении уровня TGF- β в крови пациентов [15].

Существующие в настоящий момент данные об активности разных типов ММП и ТИМП в крови больных ПОУГ, ПЭГ и ПЭС неоднозначны. U. Schlötzer-Schrebarth с коллегами показали в своей работе, что концентрации ММП-1,-2,-3,-7,-9, ТИМП-1 и -2 несильно отличались у пациентов данных групп [16]. Другие исследователи измеряли уровень ММП-2, ТИМП-2, TGF- β 1 у больных ПЭГ в сыворотке и во влаге передней камеры. Согласно их результатам, в сыворотке крови концентрации показателей не отличались у больных и здоровых людей, зато значения, измеренные во влаге передней камеры, имели достоверных различия [17].

Участие ММП в ремоделировании ЭЦМ и возможность использования протеолитических ферментов и их ингибиторов в диагностике глаукомы является предметом для дальнейших исследований.

1.2.4 Апоптоз ганглионарных клеток сетчатки

Известно, что в патогенезе различных видов патологии органа зрения играет роль гибель клеток путем апоптоза. Он происходит при ишемических состояниях глаз [10,18,19]. Показано, что в развитии ряда других заболеваний имеет место функционирование ММП, приводящее в апоптозу [7].

Имеются исследования, доказывающие влияние ММП на апоптоз ГКС при глаукоме. Например, Li Guo с соавторами оценивали взаимосвязь между повышением ВГД, развитием апоптоза ГКС и изменением состояния ЭЦМ на экспериментальной модели глаукомы. В результате, ими была показана связь между апоптозом и повышением ВГД, а так же между апоптозом и повышением ВГД, вследствие изменения компонентов ЭЦМ в ГКС. Помимо этого они выявили ассоциацию между увеличением концентрации ММП-9, деградацией ламинина, апоптозом и повышением ВГД при глаукоме.

Полученные данные позволили сделать вывод, что апоптоз ГКС связан с изменениями ЭЦМ, в частности, с увеличением секреции ММП-9 и увеличением ВГД. Предполагается, что изменения в ЭЦМ или цитокинов в сетчатке, вызванные увеличением ВГД, приводят к повышению активности ММП-9. В ответ на увеличение ВГД ганглиозные клетки увеличивают экспрессию ММП-9, что приводит к потере ламинина и, как следствие, апоптозу ГКС [2].

В работе S.K. Chintala и его коллег была подтверждена гипотеза о том, что инициация экспрессии ММП-9 играет роль в апоптозе ГКС и разрушении ламинина [20]. К утрате этих клеток, как известно, могут приводить ишемия, нарушение реперфузии, а также вызванное разными причинами нарушение взаимосвязи между ГКС и мозгом. Похожий механизм потери ГКС наблюдается при перевязке зрительного нерва. Эту экспериментальную модель часто используют для исследования механизмов, которые приводят к повреждению зрительного нерва при глаукоме.

Итак, согласно литературным данным, ММП играют важную роль в развитии глаукомы, и могут быть использованы как специфические биомаркеры этого заболевания и объекты терапевтического воздействия. Однако необходимо дальнейшее исследование в этой области, так как отсутствует единое мнение о значимости данных ферментов при разных типах глаукомы. Сейчас имеется лишь единичное число работ, посвященных изучению ММП как потенциальных биомаркеров ПЭГ. Необходимо отметить важность изучения молекулярных процессов развития заболевания и поиска новых методов диагностики для выявления заболевания на ранних стадиях, что будет способствовать предупреждению слепоты как финального симптома.

1.3 Трансформирующий фактор роста

Трансформирующий фактор роста β (TGF- β) – цитокин, осуществляющий свою биологическую активность через связывание с TGF рецептором, что приводит к фосфорилированию, изменению конформации молекул и запуску различных путей внутриклеточного сигналинга. Семейство TGF- β включает группу гомологичных гетеродимерных белков TGF- β -1, -2, -3, -4, но у млекопитающих идентифицированы только первые две молекулярные формы. Все представители этого семейства имеют до 70% гомологий. Наиболее широко у различных видов представлен TGF- β 1. Подобно большинству членов данного семейства, этот фактор синтезируется в виде большой молекулы предшественника, содержащей гидрофобную сигнальную последовательность. Активная молекула имеет массу 25 кДа и представляет собой связанный дисульфидными связями гомодимер С-конца молекулы-предшественника. Гетеродимер секретируется в виде латентного нековалентно связанного комплекса. Этот комплекс включает в себя сам TGF- β , латентно-ассоциированный пептид (ЛАП) и TGF- β -связывающий белок (ВР). Подобный комплекс не способен связываться с поверхностными рецепторами клеток, т.е. он находится в биологически неактивном состоянии. Активный TGF- β имеет очень короткий период жизни (2-3 минуты), в то время как латентная форма циркулирует в плазме крови гораздо более продолжительное время (100 минут). Активная форма TGF- β 1 быстро утилизируется печенью, почками, легкими и селезенкой.

TGF- β является ключевым регулятором клеточного роста и дифференцировки. Высокий уровень TGF- β найден в тромбоцитах и костной ткани. *In vivo* продемонстрированы его ангиогенное действие и способность к индукции образования гранулярной ткани при заживлении ран. Пролиферация клеток многих типов, включая эндотелиальные, эпителиальные, миелоидные и лимфоидные, ингибируется TGF- β .

Многие наблюдения показывают, что механизм действия TGF- β зависит от природы межклеточных контактов и формы клеток, наличия или отсутствия специфических молекул ЭЦМ, а также клеток, которые могут усиливать или изменять его действие [21].

1.4 Варианты биологических жидкостей для исследования

В настоящее время для анализа маркеров в жидкостях организма используют различные современные методы исследования, например, протеомные, генетические методы, иммуноферментный анализ и т.д. [22]. Чаще всего исследуют жидкости, которые близко расположены к месту поражения. Слеза является одним из самых удобных материалов для исследования глазных патологий.

Образец слезы для анализа может быть получен либо с использованием стеклянных микрокапиллярных трубочек [23], либо с помощью полосок для теста Ширмера с последующей обработкой их специальными буферными системами [24]. Минимальная инвазивность является еще одним плюсом для использования слезы как материала для диагностики [23].

Другой биологической жидкостью, которая может быть использована для анализа процессов, протекающих в тканях глаза при глаукоме, является влага передней камеры. Однако для получения материала при этом, как правило, необходимо хирургическое вмешательство или парацентез.

Помимо этого, уровень маркеров может измеряться в сыворотке крови [3,16], причем этот метод предпочтителен по причине легкости способа получения биоматериала. Однако на данный момент лишь небольшое число публикаций посвящено определению уровню ММП и их ингибиторов в периферической крови людей, страдающих глаукомой.

1.5 Концентрации биомаркеров при глаукоме

1.5.1 Уровень ММП

В последнее время появляется все больше данных, что ММП и их ингибиторы играют важную роль в развитии разных заболеваний, действуя при этом локально. Имеются статьи об определении концентрации ММП в плазме крови при сердечнососудистых заболеваниях, сахарном диабете, ревматологической патологии [25, 26, 27].

Имеется ряд статей об измерении уровня ММП разных типов при глаукоме. Чаще всего активность ММП измерялась локально, с использованием различных современных методик. В опыте, описанном в статье И.В. Воронкиной и К.М. Кирпичникова, измерение ММП-2 и ММП-9 проводили методом зимографии на монослое мышинных фибробластов [28]. Этим же методом определяли присутствие ММП К. Shravan и др. [20]. Зимографию, Вестерн-блоттинг и ИФА использовали для измерения ММП-1,2,3,7,9,12 и ТИМП-1,2 Ursula Schlötzer-Schrebarth, Lommatzsch и соавторы. Они наблюдали минимальный уровень ММП-9 и значимое преобладание выделения ТИМП-1 над ТИМП-2 у пациентов с ПЭГ/ПЭС [16].

Как показали исследования, одной из главных ММП, играющих большую роль в процессах, происходящих при глаукоме, является ММП-2. Концентрация данного матриксина во влаге передней камеры значительно повышается при всех видах глаукомы (ПОУГ, ПЭГ, ПЗУГ) по сравнению с контролем. Однако оценка активности ММП-2 продемонстрировала, что наибольшее значение этот фермент имеет в развитии ПЭГ и ПЭС, хотя при ПОУГ его показатели тоже достаточно высоки [11,13,16,29,30].

1.5.2 Уровень TGF- β

В некоторых статьях так же измерялся и уровень TGF- β . В работе Li Guo, Stephen E. Moss и др. описывается увеличение уровня TGF- β в диске зрительного нерва, вызванное стрессовым ответом клетки на увеличение ВГД. В сетчатке же, напротив, отмечалось снижение уровня цитокина при увеличении давления. TGF- β является одним из сильнейших модуляторов заживления ран в организме. Учитывая то, что TGF- β 2 является основным стимулятором ЭЦМ и ингибитором матриксных металлопротеиназ, не удивительно, что низкий уровень TGF- β 2 в сетчатке связан с увеличением активности ММП-9 и уменьшением отложения ламинина. Одно исследование показало, что уменьшение уровня TGF- β и увеличение уровня ММП связано с апоптозом клеток сосудов [2].

В другой работе отмечалось увеличение уровня TGF- β 2 и TGF- β 1 при ПОУГ. Увеличенная концентрация TGF- β 1 была обнаружена в эпителии цилиарного тела глаз людей, страдающих ПОУГ и ПЭГ, вследствие чего предполагается, что эта часть оболочки глаза является местом хранения TGF- β 1 при глаукоме. TGF- β 1 приводит к образованию ЭЦМ и увеличению ВГД у крыс [31].

Таким образом, данные о роли этого цитокина в литературе противоречивы. Повышенные концентрации TGF- β связывают с прогрессированием фиброза и ремоделированием внутриклеточного матрикса у больных ПОУГ. Другие исследования пациентов с глаукомой, напротив, обнаружили дефицит цитокина, что, по мнению авторов, снижает пролиферацию фибробластов и усиливает прогиб решетчатой пластинки [32].

1.6 Иммуноферментный анализ

Среди различных методов анализа концентраций биомаркеров в крови классическим является метод иммуноферментного анализа (ИФА). Этот метод требует небольшое число биоматериала, он стандартизирован, удобен в использовании, в частности благодаря существующим готовым наборам, а также пригоден для массовых исследований. К тому же этот метод обладает высокой чувствительностью, позволяя определять концентрации аналита, меньше 10 пг/мл. В настоящее время метод ИФА налажен во многих клиничко-диагностических лабораториях, и новые диагностические тесты могут быть внедрены как в КДЛ высокоспециализированных стационаров, так и первичного звена здравоохранения.

2. Материалы и методы

2.1 Материал

Материалом для исследования служила плазма крови пациентов с глаукомой. Кровь собирали в утренние часы натощак в условиях процедурного кабинета в соответствии с системой взятия венозной крови (Becton Dickenson, США). После чего её доставляли в лабораторию, центрифугировали при 1500 g в течение 10 минут, затем аликвотили, банкировали. После этого проводили непосредственно сами исследования. Часть материала, не использующегося в эксперименте, хранили при температуре -20°C до момента исследования, не допуская повторного замораживания.

2.2 Группы обследованных пациентов

Биоматериал получали путем венепункции у 154 мужчин и женщин в возрасте от 54 до 75 лет. Из них у 42 человек была диагностирована ПЭГ, у 37 – ПОУГ, у 37 – ПЭС. Под критерии исключения попадали люди с наличием миопии высокой степени, воспалительных заболеваний сосудистой оболочки и сетчатки, острых сосудистых нарушений сетчатки, влажной формы возрастной макулярной дегенерации, травм и операций органа зрения в молодом возрасте, сахарного диабета, аутоиммунных и системных заболеваний, требующих терапии глюкокортикоидами в течение последних 5 лет, онкологических заболеваний, хронических воспалительных процессов и тяжелых заболеваний печени, почек, сердечнососудистой системы. В контрольную группу вошли 38 человек, у которых отсутствовала патология органов зрения, не было патологии, попадающей под критерии исключения. По возрасту основная и контрольная группы совпадали, все пациенты, вошедшие в исследование, подписали информированное согласие.

2.3 Иммуноферментный анализ

Измерение уровня MMP-2 в плазме крови проводилось с помощью набора «Quantikine Total MMP-2» (R&D Systems, Inc., США&Канада). Для измерения концентрации маркеров MMP-9, TGF- β 1 и TGF- β 2 использовались наборы «Human MMP-9 Platinum ELISA», «Human TGF- β 1 Platinum ELISA» и «Human TGF- β 2 Platinum ELISA» (eBioscience, США) соответственно. Чувствительность набора для определения концентрации TGF- β 2 составляет 6,6 пг/мл, для TGF- β 1 – 8,6 пг/мл, для MMP-2 – 0,014-0,082 нг/мл, а для MMP-9 – 0,05 нг/мл. В основе наборов лежит «сэндвич» - метод твердофазного иммуноферментного анализа. Моноклональные антитела, специфичные к соответствующему параметру, иммобилизованы в лунки планшета. После того как биомаркер из образцов специфически

связывается с этими антителами, не связавшиеся компоненты отмываются, и добавляются поликлональные антитела. После повторной отмывки и добавления субстрата, происходит окрашивание раствора, и результат детектируется на анализаторе. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству соответствующего показателя.

Схема метода аналогична для всех маркеров и выполняется по схожему протоколу. Протокол исследования:

В лунки планшета поочередно вносятся образцы и стандарты. Инкубация проходит при комнатной температуре (18-25°C). Затем лунки отмываются, и в каждую лунку вносятся антитела, конъюгированные с биотином. После аналогичной инкубации и промывки лунок, в них добавляется стрептавидин-пероксидаза хрена. Затем планшет снова инкубируется, промывается, и в него вносится субстрат. Завершающая инкубация протекает без попадания прямого света. Реакция останавливается внесением стоп-реагента, после чего можно измерять оптические плотности в лунках планшета на спектрофотометре на длине волны 450 нм. Калибровочная кривая строилась по значениям оптических плотностей стандартов из наборов с известными концентрациями. Пример калибровочного графика представлен на рис.1:

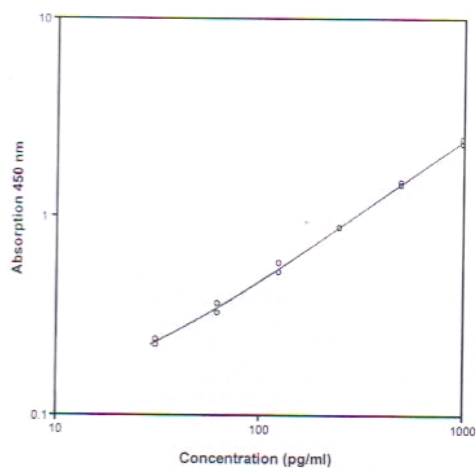


Рисунок 1. Калибровочная кривая для определения концентраций биомаркеров.

Для промывки лунок на всех этапах использовали автоматическую мойку микропланшетов ImmunoChem 2600 (High Technology, США). Оптическую плотность измеряли на полуавтоматическом иммуноферментном микропланшетном анализаторе ImmunoChem 2100 (High Technology, США). Концентрации маркеров рассчитывали в программе SoftMax® Pro (Molecular Devices, Inc., США) в соответствии с калибровочным графиком.

2.4 Статистическая обработка данных

Статистическая обработка проводилась в программе STATISTICA 10 (компания StatSoft). Выборки проверялись на нормальность с помощью W-теста Шапиро-Уилка. Для сравнения групп использовался критерий Краскела-Уоллиса с последующим применением критерия рангов. Для исследования связей между переменными применяли корреляционный анализ Спирмена. Критический уровень значимости для всех статистических тестов принимали равным 0,05.

3. Результаты и обсуждения

3.1 Группы обследованных пациентов

Концентрацию биомаркеров ММП-2, ММП-9, TGF- β 1 и TGF- β 2 определяли в крови 154 человек, из них 82 женщины, 72 мужчины. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Возраст обследованных пациентов от 54 до 75 лет, средний возраст – $66,1 \pm 5,8$ лет (данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение). Из них у 42 человек диагностирована ПЭГ (18 мужчин, 24 женщины), у 37 – ПОУГ (17 мужчин, 20 женщин), еще у 37 человек выявлен ПЭС (17 мужчин, 20 женщин). Группу контроля составили 38 человек (20 мужчин, 18 женщин). По возрастным характеристикам различия между группами отсутствовали.

3.2 Проверка нормальности распределений результатов

Статистическая обработка проводилась в программе STATISTICA 10 (компания StatSoft). Выборки проверялись на нормальность с помощью W-теста Шапиро-Уилка (Рис.2-5). В результате теста оказалось, что данные по всем четырем маркерам не обладают нормальностью ($p < 0,05$).

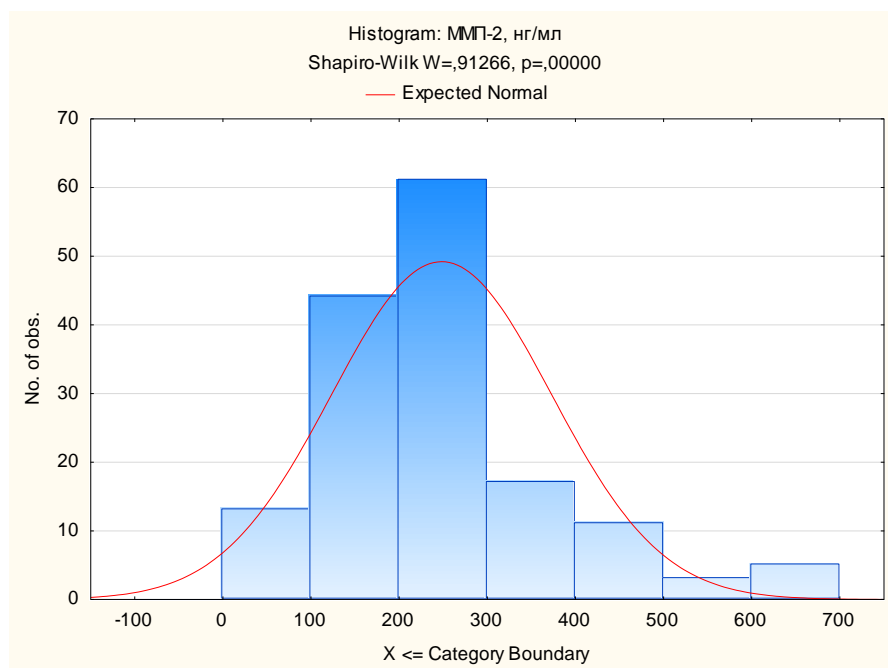


Рис.2. Проверка нормальности распределения концентрации ММП-2 с помощью W-теста Шапиро-Уилка.

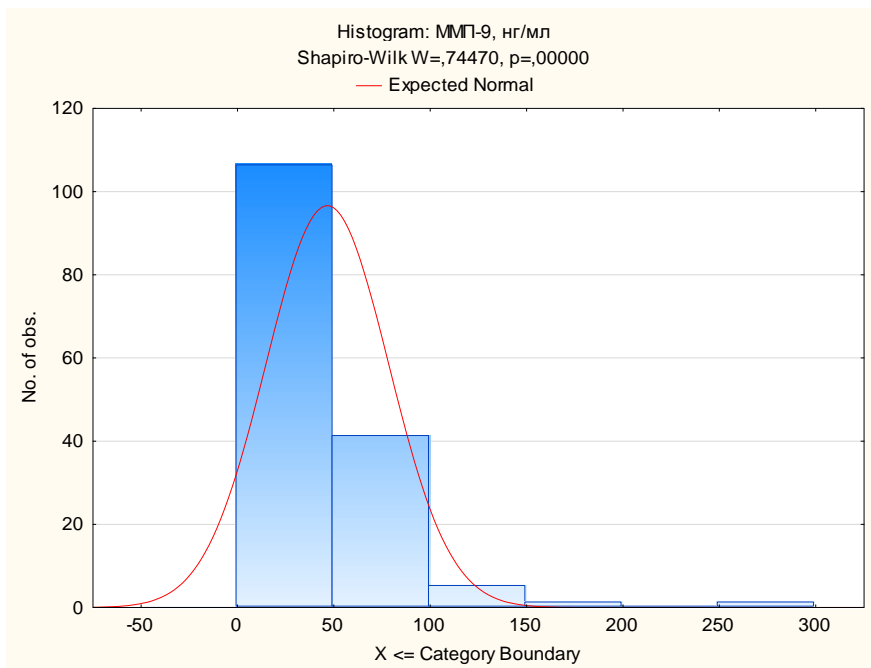


Рис.3. Проверка нормальности распределения концентрации ММП-9 с помощью W-теста Шапиро-Уилка.

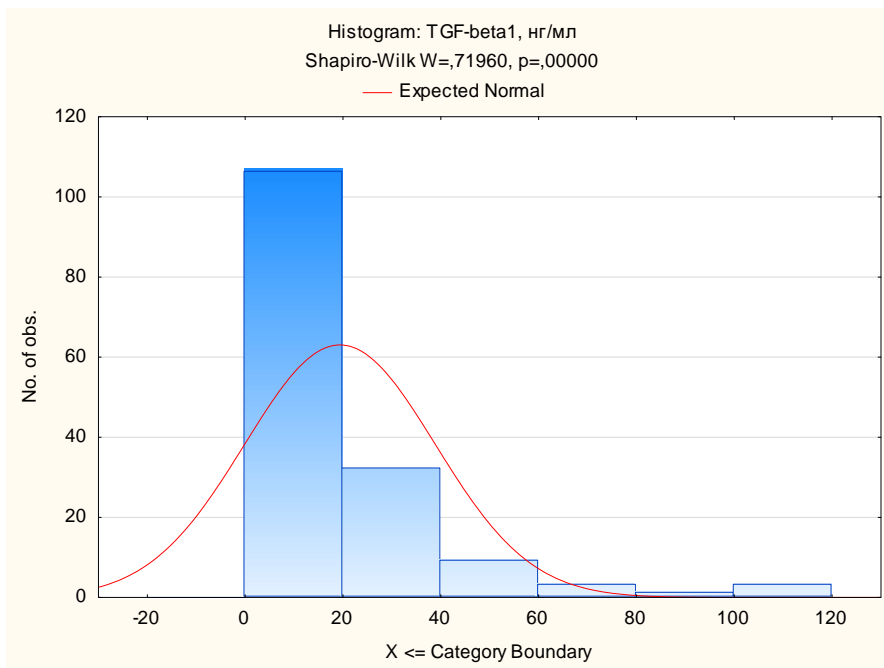


Рис.4. Проверка нормальности распределения концентрации TGF-β1 с помощью W-теста Шапиро-Уилка.

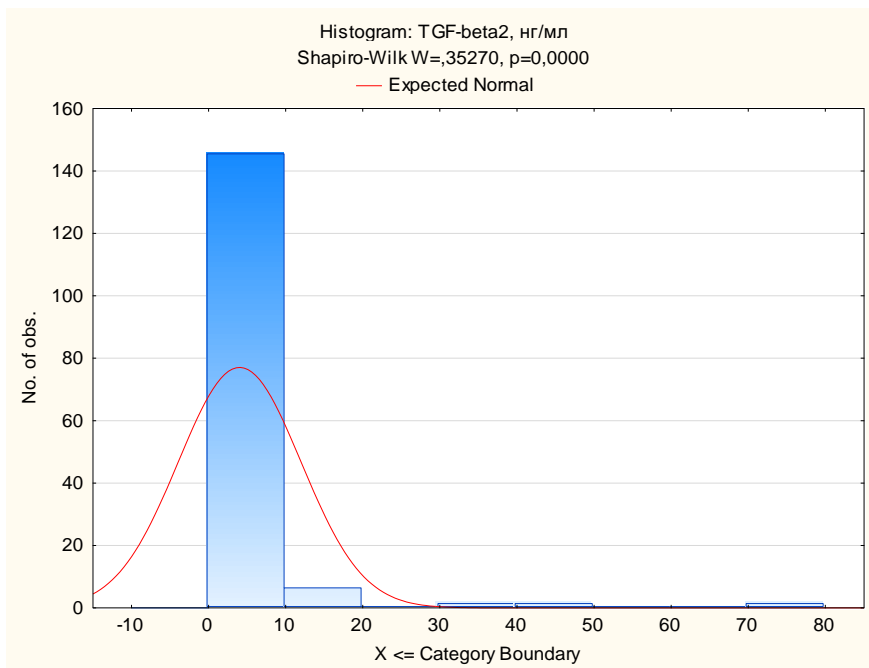


Рис.5. Проверка нормальности распределения концентрации TGF-β2 с помощью W-теста Шапиро-Уилка.

В связи с отсутствием нормальности в распределениях, для дальнейших расчетов использовались непараметрические критерии. Так как у нас 4 независимые выборки, то использовался критерий Краскела-Уоллиса с последующим применением критерия рангов.

Для каждого параметра во всех группах были определены медианы и интерквартильные размахи.

3.3 Определение уровня ММП-2

Концентрация ММП-2 в группе контроля составляла 217,9 (189,3; 280,7) нг/мл, в группе больных ПЭГ - 211,9 (125,6; 298,6), ПОУГ - 214,4 (194,4; 281,8), ПЭС - 252,4 (136,6; 388,1). Применение критерия Краскела-Уоллиса для сравнения выборок не показало достоверного различия данного маркера по группам (табл.1.)

Табл. 1. – Уровень значимости при сравнении показателя ММП-2 по контролю, группам больных ПЭГ, ПОУГ и ПЭС (Kruskal-Wallis test: $H(3, N=154)=1,683880$ $p=0,64$):

	Контроль	ПЭГ	ПОУГ	ПЭС
Контроль		1,00	1,00	1,00
ПЭГ	1,00		1,00	1,00
ПОУГ	1,00	1,00		1,00
ПЭС	1,00	1,00	1,00	

Полученные концентрации ММП-2, измеренные в группах пациентов, представлены графически на рис.6.

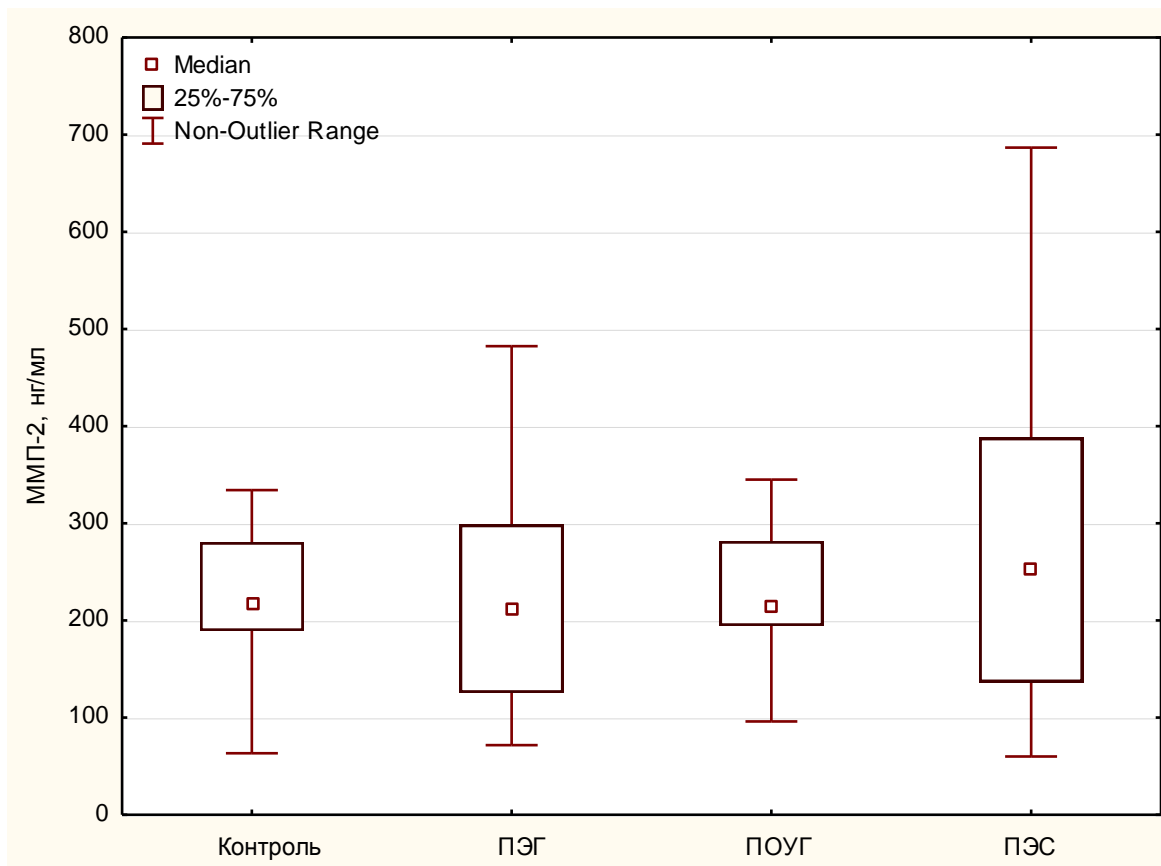


Рисунок 6. Концентрация ММП-2 (нг/мл) в плазме крови условно здоровых людей и людей с офтальмологической патологией.

Согласно полученным данным, не обнаружено специфического изменения концентрации ММП-2 у больных ПЭГ, ПОУГ или ПЭС по сравнению с контрольной группой. Различия концентрации маркера в группах пациентов с глаукомой не были достоверными. Несмотря на отсутствие достоверных отличий по группам, максимальные концентрации ММП-2 наблюдались в крови пациентов с ПЭГ и ПЭС.

В современной научной литературе приводятся данные о концентрации ММП-2 у пациентов с различными типами глауком и катарактой. В исследовании Schlötzer-Schrebar dt U. и соавторов (2003) измерялись концентрации разных матриксинов, а также их активных форм у страдающих ПОУГ, ПЭГ, ПЭС и катарактой во влаге передней камеры с использованием Вестерн-блоттинга, электрофореза и ИФА. За контрольную группу была выбрана группа больных катарактой, поэтому полученные ими данные не позволяют сделать вывод о возможности диагностировать глаукому. Общий уровень ММП-2 был выше у пациентов с ПЭГ и ПЭС, чем у пациентов с ПОУГ и катарактой, соответственно. Свободная

форма белка составляла 22-24% от общего числа и была выше у пациентов с ПЭС. Исходя из полученных данных авторы предполагают, что изменения в балансе ММП:ТИМП и активности ММП приводит к тенденции накопления ЭЦМ при ПЭС, и это же может играть роль в патогенезе ПОУГ и ПЭГ [16]. Однако на основании полученных ими данных нельзя сделать вывод о роли ММП-2 как маркера для ранней диагностики глаукомы, так как в их исследовании не проводится сравнения концентрации матриксина в биологических жидкостях здоровых и больных людей.

В работе других авторов (Jasmina Djordjević-Jocić, 2012) показано достоверное различие концентрации значения ММП-2, у больных ПЭГ, ПОУГ, ПЭС и катарактой измеренной в водянистой влаге методом ИФА. Авторами выявлено значительное увеличение уровня данного параметра в группе больных ПЭГ по сравнению со всеми группами исследования, а так же достоверные различия между концентрацией маркера у людей, страдающих ПЭС от тех, у кого была диагностирована ПОУГ [11].

Таким образом, в обеих работах отмечается увеличение уровня ММП-2 в группах ПЭГ и ПЭС. В данной работе достоверных различий между группами не выявлено, однако показана аналогичная тенденция концентрации маркера: максимальные значения ММП-2 (>400 нг/мл) были получены в этих двух группах. Кроме того, в приведенных статьях биомаркер определяли в водянистой влаге, в то время как в данной работе измерение проводили в плазме крови. Это может быть одной из причин различной динамики ММП-2 при исследуемой патологии.

3.4 Определение уровня ММП-9

Для ММП-9 медиана в группе контроля составляла 34,8 (26,1; 53,5) нг/мл. При ПЭГ значения маркера были 28,4 (23,5; 44,0) нг/мл, при ПОУГ – 40,6 (29,8; 54,3) нг/мл и при ПЭС – 54,2 (42,2; 75,5) нг/мл. При сравнении выборок было выявлено различие по данному маркеру между группами ПЭГ и ПОУГ, ПЭГ и ПЭС, а также увеличение концентрации матриксина в группе ПЭС в сравнении с контрольной группой (табл.2.)

Табл. 2. – Уровень значимости при сравнении показателя ММП-9 по контролю и группам больных ПЭГ, ПОУГ и ПЭС (Kruskal-Wallis test: $H(3, N=154)=23,15649$ $p=0,00$):

	Контроль	ПЭГ	ПОУГ	ПЭС
Контроль		0,83	1,00	0,01
ПЭГ	0,82		0,05	0,00
ПОУГ	1,00	0,05		0,30
ПЭС	0,01	0,00	0,30	

Полученные концентрации ММП-9, измеренные в группах пациентов, представлены графически на рис.7.

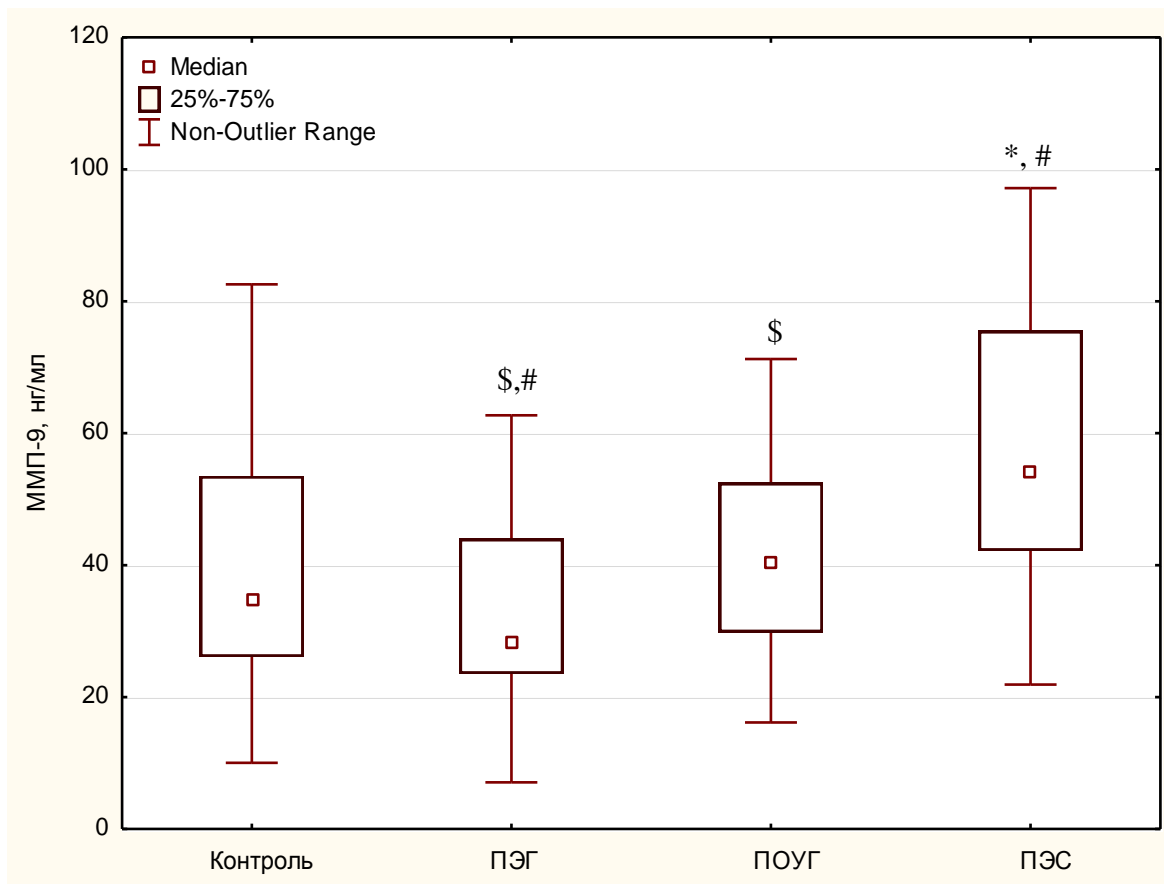


Рисунок 7. Концентрация ММП-9 (нг/мл) в плазме крови условно здоровых людей и людей с офтальмологической патологией.

Примечание:

* - $p=0,011$ при сравнении ПЭС с контролем

\$ - $p=0,049$ при сравнении ПЭГ и ПОУГ

- $p<0,001$ при сравнении ПЭГ и ПЭС

Из полученных данных видно достоверное различие по концентрации матриксина в группе ПЭС с контролем, следовательно, можно рассматривать ММП-9 как маркер для диагностики ПЭС. Помимо этого, значения параметра в группе ПЭС и ПОУГ значительно выше, чем в группе ПЭГ, что может служить диагностическим критерием при определении типа глаукомы при наличии у человека офтальмологической патологии.

В своей работе Д.А. Рукина с коллегой (2011) измеряли концентрацию ММП-9 в сыворотке и слезной жидкости у пациентов с разными стадиями ПОУГ и группой людей, входящих в зону риска по медицинским показаниям. За группу сравнения были взяты люди без офтальмологической патологии. Она также использовала метод ИФА. В результате

проведенного исследования, авторы сделали вывод о том, что чем более запущенная глаукома, тем выше уровень ММП-9, особенно это заметно при измерении маркера в слезной жидкости – в материале, взятом непосредственно в очаге поражения. Помимо этого, измерялся уровень ТИМП-1, и было обнаружено нарушение баланса между концентрацией ММП и ТИМП в группах с глаукомой. Достоверная разница в концентрации ММП-2 у здоровых людей и пациентов с ПОУГ была получена только при измерении уровня маркера в слезной жидкости [3]. Тем не менее, предполагается, что данный маркер и его ингибитор играют важную роль в патогенезе ПОУГ. В нашей работе также не было получено различия концентраций в группах ПОУГ и контроля, хотя есть значимое повышение уровня ММП-2 в сравнении с группой ПЭГ.

Интересно отметить, что в работе по измерению потенциальных биомаркеров пациентов с ПОУГ, ПЭГ, ПЭС и катарактой, были получены очень низкие значения концентрации ММП-9 во влаге передней камеры. Измерения в сыворотке крови показали более низкие значения в группах с ПЭГ и ПОУГ чем в контрольной группе людей с катарактой [16]. В проведенном исследовании не было выявлено достоверного понижения уровня при ПЭГ и ПОУГ, о котором говорится в статье Schlötzer-Schrebarth U. и др., хотя значение медианы при ПЭГ несколько ниже, чем в контрольной группе, т.е. в группе обследованных пациентов с диагностированной ПЭГ отмечалась тенденция к снижению концентрации маркера.

3.5 Определение уровня TGF-β1

Для TGF-β1 были получены следующие результаты: медиана концентрации в крови здоровых людей составила 12,2 (6,2; 20,8) нг/мл. При наличии ПЭГ уровень цитокина стал 14,5 (9,6; 22,4) нг/мл, а при ПОУГ значение медианы изменилось до 15,2 (8,5; 27,3) нг/мл. В крови пациентов, страдающих ПЭС, концентрация данного ростового фактора составила 12,2 (7,3; 25,3) нг/мл. Однако при сравнении выборок не было обнаружено различий в концентрации цитокина (табл.3.).

Табл. 3. – Уровень значимости при сравнении показателя TGF-β1 по контролю и группам больных ПЭГ, ПОУГ и ПЭС (Kruskal-Wallis test: $H(3, N=154)=1,433520$ $p=0,70$):

	Контроль	ПЭГ	ПОУГ	ПЭС
Контроль		1,00	1,00	1,00
ПЭГ	1,00		1,00	1,00
ПОУГ	1,00	1,00		1,00
ПЭС	1,00	1,00	1,00	

Полученные концентрации TGF- β 1, измеренные в группах пациентов, представлены графически на рис.8.

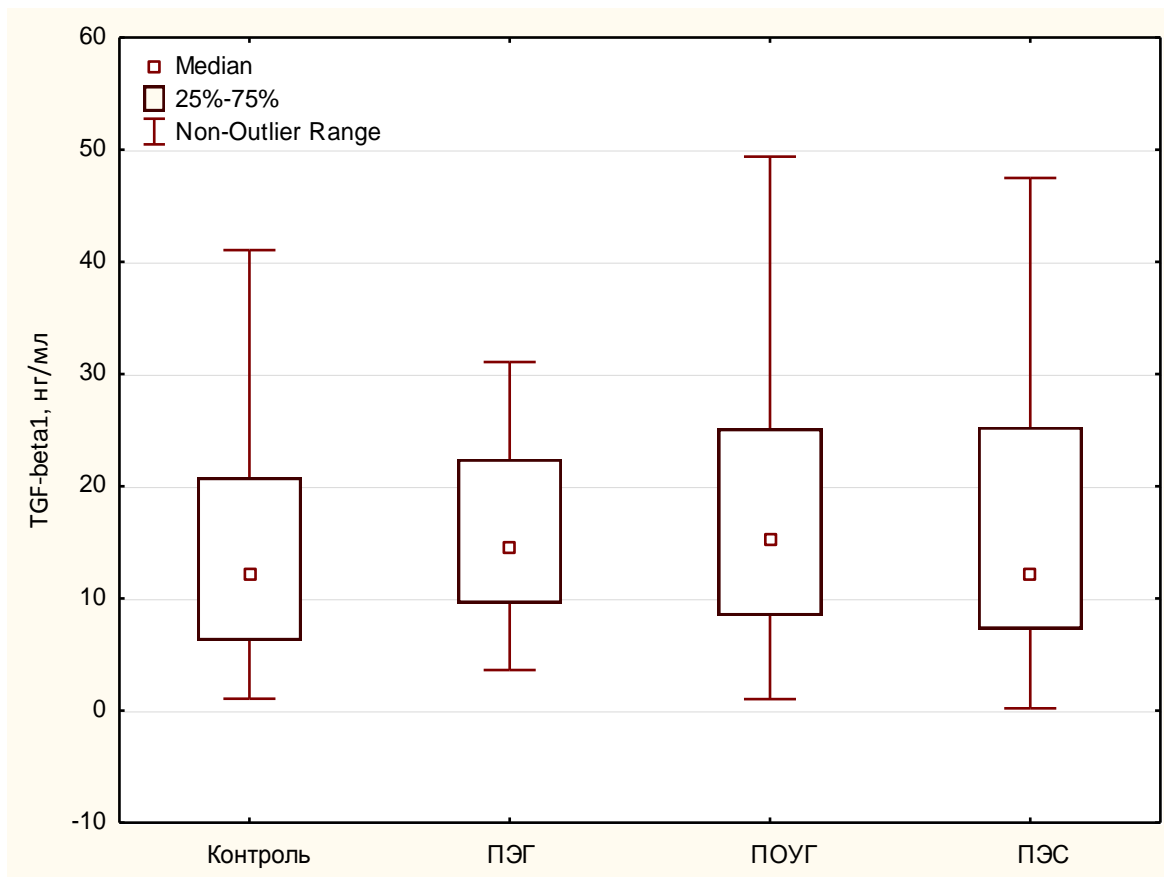


Рисунок 8. Концентрация TGF- β 1 (нг/мл) в плазме крови условно здоровых людей и людей с офтальмологической патологией.

В результате проделанной работы не было выявлено значимого изменения рогового фактора в крови людей, входящих в группы исследования. Возможно, что уровень TGF- β 1 при глаукоме повышается локально, оказывая действие непосредственно в патологическом очаге, оставаясь неизменным на системном уровне. В связи с этим в данной работе не выявлены различия по его концентрации при различных типах глаукомы.

Yasuyuki Takai с коллегами в своей работе (2012) измеряли концентрации 8 различных цитокинов в водянистой влаге пациентов с катарактой, ПОУГ и ПЭГ методом мультиплексного анализа. Полученные результаты выявили значительное увеличение уровня TGF- β 1 у пациентов с ПОУГ и ПЭГ в сравнении с группой страдающих от катаракты, а также увеличение уровня рогового фактора у группы ПЭГ в сравнении с ПОУГ [31].

Djordjević-Jocić J.с соавторами, помимо уровня ММП-2 в водянистой влаге, измеряли также и концентрацию TGF- β 1. При сравнении групп ПЭГ и ПОУГ, ПОУГ и катаракты, ПЭГ и катаракты, ПЭС и катаракты, ПЭС и ПОУГ были обнаружены различия в концентрации

TGF-β1. В группах пациентов с ПЭГ и ПЭС концентрации цитокина были значительно выше, чем в двух других группах [11].

В данной работе не было получено подтверждения результатов, приводимых в вышеперечисленных статьях. Скорее всего, это связано с тем, что в нашей работе измерение цитокина проводили в крови, в то время как в приведенных статьях материалом для исследования служила водянистая влага. Известно, что количественный и качественный состав крови и водянистой влаги отличается. Влага, как и слезы, берется из очага воспаления и свидетельствуют о локальной активности цитокинов и матриксинов, в то время как кровь является системным показателем и демонстрирует изменение концентрации во всем организме. Это подтверждается данными исследования Kara S. с коллегами (2014), которые измеряли уровень TGF-β1 методом ИФА во влаге и сыворотке у пациентов с ПЭГ, ПЭС и катарактой в качестве контрольной группы. Достоверных различий с контрольной группой в этой работе выявлено не было [17].

3.6 Определение уровня TGF-β2

Значения медиан для второго цитокина были следующие: в контрольной группе – 2,1 (1,4; 2,5) нг/мл, при ПЭГ – 3,2 (1,2; 7,0) нг/мл, при ПОУГ – 2,0 (1,3; 2,4) нг/мл, а при ПЭС – 2,4 (1,4; 5,2) нг/мл. При сравнении групп были выявлены различия по данному маркеру между группами ПЭГ и ПОУГ, а также отличие группы ПЭГ и ПЭС от контрольной (табл.4.)

Табл. 4. – Уровень значимости при сравнении показателя TGF-β2 по контролю и группам больных ПЭГ, ПОУГ и ПЭС (Kruskal-Wallis test: $H(3, N=154)=7,861348$ $p=0,04$):

	Контроль	ПЭГ	ПОУГ	ПЭС
Контроль		0,02	0,98	0,05
ПЭГ	0,02		0,02	0,72
ПОУГ	0,98	0,02		0,06
ПЭС	0,05	0,72	0,06	

Полученные концентрации TGF-β2, измеренные в группах пациентов, представлены графически на рис.9.

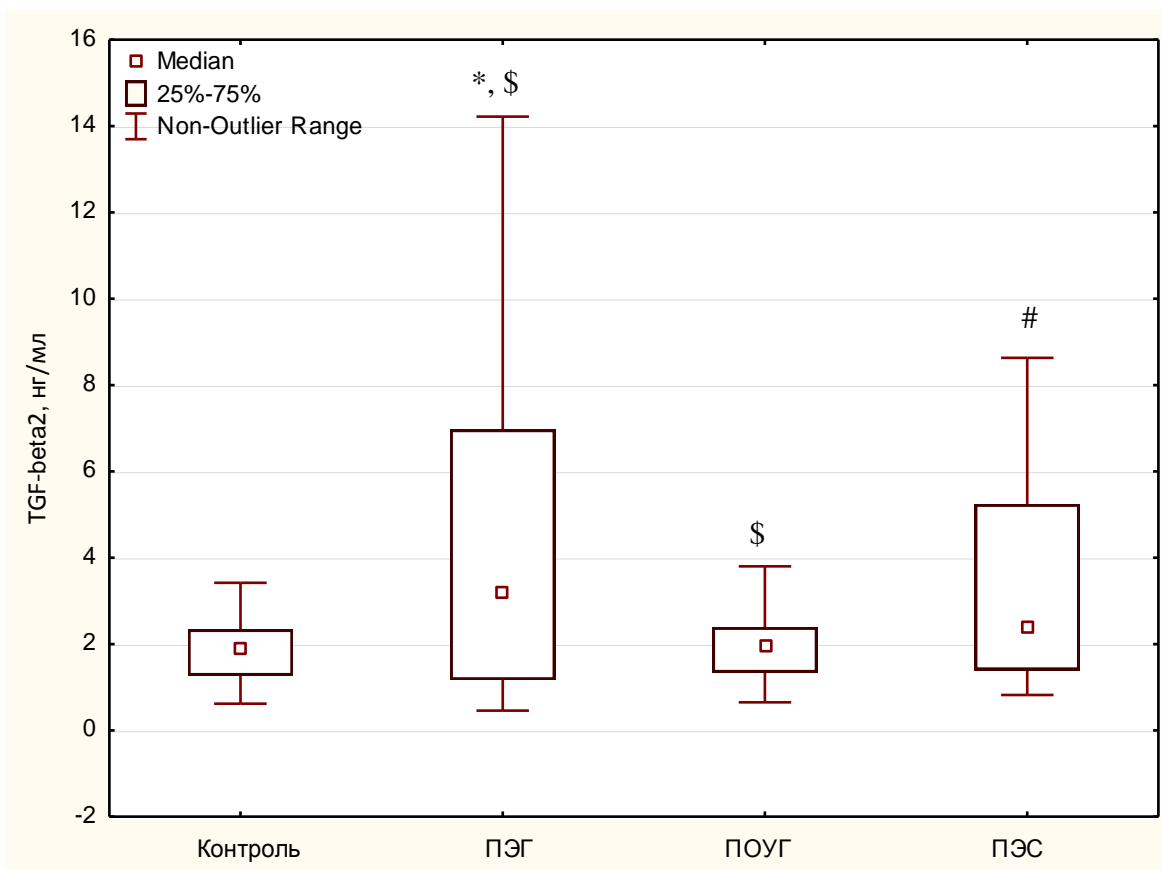


Рисунок 9. Концентрация TGF-β2 (нг/мл) в плазме крови условно здоровых людей и людей с офтальмологической патологией.

Примечание:

* - $p=0,02$ при сравнении ПЭГ с контролем

- $p=0,05$ при сравнении ПЭС с контролем

\$ - $p=0,02$ при сравнении ПЭГ и ПОУГ

Выявлено достоверное отличие от контроля у групп с ПЭГ и ПЭС, а также значимо различаются значения концентрации цитокина у групп с ПЭГ и ПОУГ. Следовательно, TGF-β2 может применяться для ранней диагностики ПЭГ и ПЭС, а также для дифференциации ПЭГ от ПОУГ.

Статей по измерению уровня TGF-β2 в крови не было найдено. В работе (1994) по измерению данного параметра в водянистой влаге методом ИФА у пациентов с ПОУГ и у людей, перенесших операцию по лечению катаракты, было показано увеличение уровня цитокина и его активной формы в группе ПОУГ [33].

В другой работе (2001) измеряли концентрацию ростового фактора у пациентов с четырьмя типами глаукомы, в том числе с ПОУГ и ПЭС. Увеличение концентрации активной формы было показано в группе пациентов с ПОУГ в сравнении с ПЭС и другими типами патологии. Однако исследование концентрации цитокина в целом (а не только его

активной формы) не выявило никаких различий по группам. Тем не менее, авторы статьи считают, что увеличение уровня TGF- β 2 может играть важную роль в патогенезе глаукомы [34].

В данной работе не было выявлено увеличения уровня цитокина при ПОУГ, как в вышеуказанных статьях, однако сильно отличались условия проведения исследований (разный биоматериал и группы исследования, измерение общего содержания, а не активной формы). Тем не менее, исходя из проведенной работы, можно рекомендовать TGF- β 2 для диагностики глаукомы, так как его концентрация изменяется в различных группах исследования.

3.7 Исследование корреляции между параметрами

Все группы по каждому параметру были проверены на наличие связи концентрации биомаркеров и возраста. В результате, корреляции между уровнем биомаркеров и возрастом людей, принимавших участие в исследовании, обнаружено не было. Таким образом, возраст пациентов не влияет на динамику исследованных показателей.

При проведении корреляционного анализа с использованием критерия Спирмена была обнаружена прямая зависимость между уровнем ММП-9 и TGF- β 1 ($p=0,00$; $r=0,30$). Причем в контрольной группе данная зависимость отсутствует ($p=0,41$; $r=0,14$).

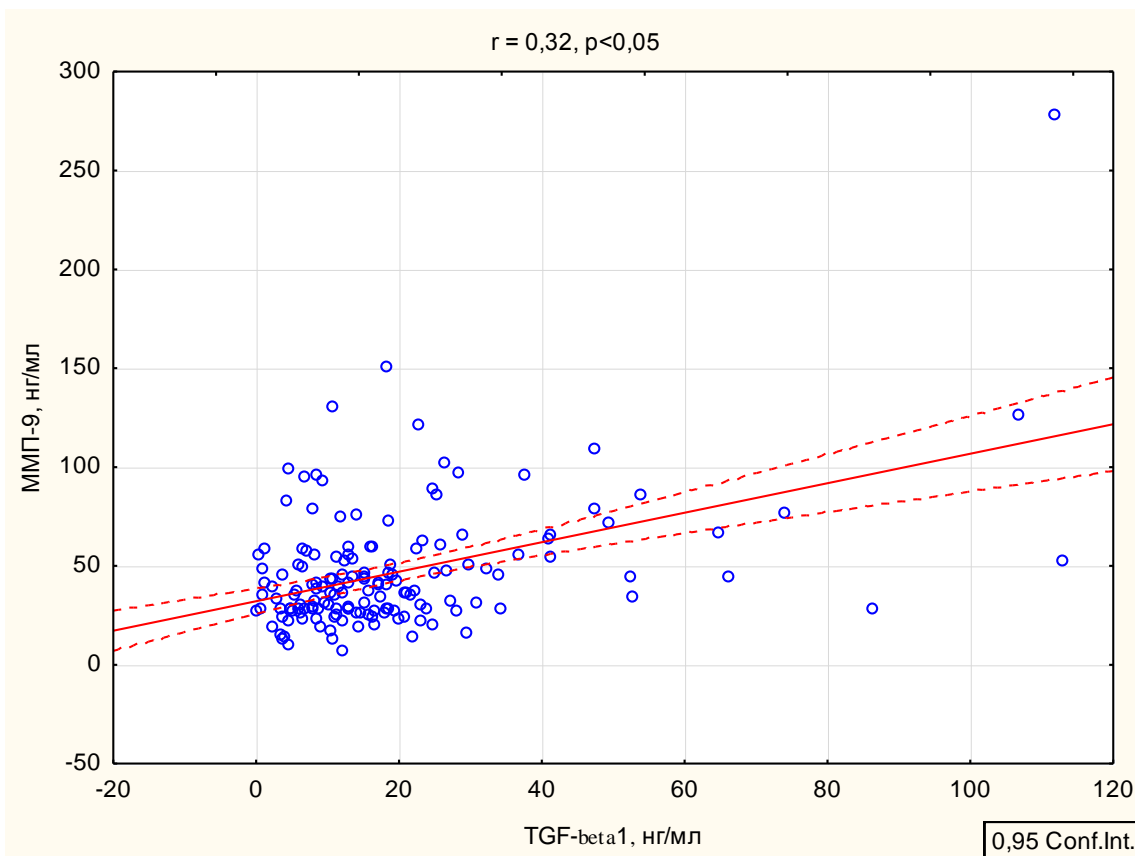


Рис. 10. Корреляция между уровнями ММП-9 и TGF- β 1 (нг/мл) в плазме крови условно здоровых людей и людей с офтальмологической патологией.

Не было найдено статей подтверждающих и объясняющих эту корреляцию, но, видимо, увеличение уровня TGF- β 1 приводит к увеличению экспрессии протеазы.

В работе Djordjević-Josić J. и коллег была обнаружена прямая зависимость между уровнем TGF- β 1 и ММП-2 при ПЭГ, а также между концентрацией TGF- β 1 и уровнем ЭЦМ. Скорее всего, цитокин вносит дисбаланс между уровнем протеаз и их ингибиторами, вызывая изменения в ЭЦМ, приводя к увеличению ВГД. У здоровых людей корреляционные связи между исследованными маркерами отсутствуют. Исходя из приведенных данных можно предположить, что при начальных стадиях глаукомы происходят изменения в ЭЦМ, запускающие процесс апоптоза ГК и развитие различных вариантов глаукомы [11].

По результатам проведенной работы и статистической обработки данных были выбраны два показателя - ММП-9 и TGF- β 1 для включения в комплекс методов диагностики глаукомы, позволяющие уточнить тип заболевания. Методика по определению их концентрации проста и доступна для выполнения в стандартной биохимической лаборатории. Использование данного метода позволит диагностировать глаукому до появления клинических симптомов и определить конкретный тип заболевания, определить прогноз течения глаукомы, что имеет значение для оказания своевременного и адекватного лечения и предотвращения развития заболевания.

Выводы

В результате проделанной работы и обработки полученных данных можно сделать следующие выводы:

1. Концентрация ММП-9 у пациентов с ПЭС достоверно выше, чем при других типах глауком и в контрольной группе, концентрация TGF- β 2 достоверно выше у пациентов с ПЭГ и ПЭС, чем у пациентов с ПОУГ.
2. У пациентов с офтальмологической патологией при выявлении высоких концентраций ММП-9 и TGF- β 2 вероятно развитие ПЭС.
3. У пациентов с повышенной концентрацией TGF- β 2 и нормальной концентрацией ММП-9 наиболее вероятно наличие ПЭГ.
4. При нормальных концентрациях ММП-9 и TGF- β 2 и установленном диагнозе глаукома наиболее вероятно ПОУГ.

Использование этих двух биомаркеров может позволить выявить риск заболевания на ранних стадиях, а также диагностировать конкретный тип глаукомы. Это обеспечит своевременное начало терапии, позволит снизить затраты на лечение, отсрочить прогрессирование заболевания и остановить необратимые процессы и развитие слепоты.

Аналогичные исследования в России на данный момент не проводятся. Зарубежные статьи посвящены исследованию локальной активности предлагаемых маркеров при глаукоме, а измерение их концентрации в крови пациентов описано в единичных работах, результаты которых не позволяют сделать выводов о возможности их применения для дифференциальной диагностики глаукомы [4, 16, 22].

Список использованных источников

1. Егоров Е.А., ред. Глаукома. Национальное руководство // М.: Гэотар-Медиа. – 2013. – С. 824.
2. Guo L., Moss S.E., Alexander R.A., Ali R.R., Fitzke F.W., Cordeiro M.F. Retinal ganglion cell apoptosis in glaucoma is related to intraocular pressure and IOP-induced effects on extracellular matrix // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2005. – V. 46. – № 1. – P. 175-182.
3. Рукина Д.А., Кириенко А.В. Значение матриксной мателлопротеиназы в патогенезе первичной открытоугольной глаукомы // *Тихоокеанский медицинский журнал*. – 2011. – № 3.
4. Быков В.Л. Цитология и общая гистология. Функциональная морфология клеток и тканей человека // СПб.: СОТИС. – 1998. – С. 520.
5. Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань // М.: Медицина. – 1981. – С. 312.
6. Соловьева Н.И. Матриксные металлопротеиназы и их биологические функции // *Биоорганическая химия*. – 1998. – Т. 24. – № 4. – С.245–255.
7. Verma R.P., Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2007. – V. 15. – № 6. – P. 2223-2268.
8. Lovejoy B., Cleasby A., Hassell A.M., Longley M.A., Luther M.A., Weigl D., McGeehan G., McElroy A.B., Drewry D., Lambert M.H. et al. Structure of the catalytic domain of fibroblast collagenase complexed with an inhibitor // *Science*. – 1994. – V. 263. – № 5145. – P. 375-377.
9. Щербак И.Г. Биологическая химия: учебник // СПб.: Издательство СПбГМУ. – 2005. – С. 480.
10. Огородникова В.Ю., Егоров Е.А., Куроедов А.В., Маркитантова Ю.В., Петров А.Н. Результаты исследования апоптоза клеток дренажной зоны методом иммунохимического анализа у пациентов с продвинутыми стадиями глаукомы // *Клиническая офтальмология*. – 2012. – Т. 13. – № 3. – С. 82-85.
11. Djordjević-Jocic J., Zlatanović G., Veselinović D., Jovanović P., Djordjević V., Zvezdanović L., Stanković-Babić G., Vujanović M., Cekić S., Zenkel M., Schlötzer-Schrehardt U.

Transforming growth factor β 1, matrix metalloproteinase-2 and its tissue inhibitor in patients with pseudoexfoliation glaucoma/syndrome // *Vojnosanit Pregl.* – 2012. – V. 69. – № 3. P. 231-236.

12. Ovodenko B., Rostagno A., Neubert T.A., Shetty V., Thomas S., Yang A., Liebmann J., Ghiso J., Ritch R. Proteomic analysis of exfoliation deposits // *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* – 2007. – V. 48. – № 4. – P. 1447-1457.
13. Nga A.D.C., Yap S., Samsudin A., Abdul-Rahman P.S., Hashim O.H., Mumiwati Z. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the aqueous humor of patients with primary angle closure glaucoma – a quantitative study // *BMC Ophthalmology.* – 2014. – V. 14. – № 33.
14. Golubnitschaja O., Flammer J. What are the biomarkers for glaucoma? // *Survey of Ophthalmology.* – 2007. – V. 52. – № 2. – P. 155-161.
15. Рукина Д.А. Особенности иммунного и цитокинового статуса у больных первичной открытоугольной глаукомой // Автореф. дисс. на соиск. ст. канд. мед. наук. Владивосток.: ВГМУ. – 2012.
16. Schlötzer-Schrebardt U., Lommatzsch J., Küchle M., Konstas A.G.P., Naumann G.O. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in aqueous humor of patients with pseudoexfoliation syndrome/glaucoma and primary open-angle glaucoma // *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* – 2003. – V. 44. – № 3. – P. 1117-1125.
17. Kara S., Yildirim N., Ozer A., Colak O., Sahin A. Matrix metalloproteinase-2, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2, and transforming growth factor beta 1 in the aqueous humor and serum of patients with pseudoexfoliation syndrome // *Clinical Ophthalmology.* – 2014. – V. 8. – P.305-309.
18. Agarwal R., Talati M., Lambert W., Clark A.F., Wilson S.E., Agarwal N., Wordinger R.J. Fas-activated apoptosis and apoptosis mediators in human trabecular meshwork cells // *Experimental Eye Research.* – 1999. – V. 68. – № 5. – P. 583-590.
19. Levin L.A., Louhab A. Apoptosis of retinal ganglion cells in anterior ischemic optic neuropathy // *Archives of ophthalmology.* – 1996. – V. 114. – № 4. – P. 488-491.
20. Chintala S.K., Zhang X., Austin J.S., Fini M.E. Deficiency in matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) protects against retinal ganglion cell death after optic nerve ligation // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2002. – V. 277. – № 49. – P. 47461-47468.

21. Пальцев М.А., Иванов А.А. Межклеточные взаимодействия // М.: Медицина. – 1995. – С. 224.
22. Hu S., Loo J.A., Wong D.T. Human body fluid proteome analysis // *Proteomics*. – 2006. – V. 6. – № 23. – P. 6326-6353.
23. An H.J., Ninonuevo M., Agilan J., Liu H., Lebrilla C.B., Alvarenga L.S., Mannis M.J. Glycomics analyses of tear fluid for the diagnostic detection of ocular rosacea // *Journal of Proteome Research*. – 2005. – V. 4. – № 6. – P. 1981-1987.
24. Grus F.H., Kramann C., Bozkurt N., Wiegel N., Bruns K., Lackner N., Pfeiffer N. Effects of multipurpose contact lens solutions on the protein composition of the tear film // *Contact Lens & Anterior Eye*. – 2005. – V. 28. – № 3. – P. 103-112.
25. Stegemann C., Didangelos A., Barallobre-Barreiro J., Langley S. R., Mandal K., Jahangiri M., Mayr M. Proteomic identification of matrix metalloproteinase substrates in the human vasculature // *Circulation: Cardiovascular Genetics*. – 2013. – V. 6. – № 1. – P. 106-117.
26. Tsioufis C., Bafakis I., Kasiakogias A., Stefanadis C. The role of matrix metalloproteinases in diabetes mellitus // *Current topics in medicinal chemistry*. – 2012. – V. 12. – №10. – P. 1159–1165.
27. Ribbens C., Martin y Porras M., Franchimont N, Kaiser M.J., Jaspas J.M., Damas P., Houssiau F.A., Malaise M.G. Increased matrix metalloproteinase-3 serum levels in rheumatic diseases: relationship with synovitis and steroid treatment // *Annals of the rheumatic diseases*. – 2002. – V. 61. – № 2. – P. 161-166.
28. Воронкина И.В., Кирпичникова К.М., Смагина Л.В., Гамалей И.А. Изменение активности матричных металлопротеиназ нормальных и трансформированных фибробластов мышцы при действии антиоксидантов // *Цитология*. – 2008. – Т. 50. – № 10.
29. Gartaganis S.P., Georgokopoulos C.D., Mela E.K., Exarchou A., Ziouti N., Assouti M., Vynios D.H. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in exfoliation syndrome // *Ophthalmic Research*. – 2002. – V. 34. – № 3. – P. 165-171.
30. Määttä M., Tervahartiala T., Harju M., Airaksinen J., Autio-Harmainen H., Sorsa T. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in aqueous humor of patients with primary open-angle glaucoma, exfoliation syndrome, and exfoliation glaucoma // *Journal of Glaucoma*. – 2005. – V. 14. – № 1. – P. 64-69.

31. Takai Y., Tanito M., Ohira A. Multiplex cytokine analysis of aqueous humor in eyes with primary open-angle glaucoma, exfoliation glaucoma, and cataract // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2012. – V. 53. – №1.
32. Рукина Д.А., Догадова Л.П., Маркелова Е.В., Абдуллин Е.А., Осыховский А.Л., Хохлова А.С. Иммунологические аспекты патогенеза первичной открытоугольной глаукомы. // *РМЖ. Клиническая офтальмология*. – 2011. – № 4. – С. 162–165.
33. Tripathi R.C., Li J., Chan W.F., Tripathi B.J. Aqueous humor in glaucomatous eyes contains an increased level of TGF-beta 2 // *Experimental Eye Research*. – 1994. – V. 59. – № 6. – P.723-727.
34. Inatani M., Tanihara H., Katsuta H., Honjo M., Kido N., Honda Y. Transforming growth factor-beta 2 levels in aqueous humor of glaucomatous eyes // *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. – 2001. – V. 239. – № 2. – P. 109-113.