

## СКРИНИНГ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ВЛАЖНОЙ И АТРОФИЧЕСКОЙ ФОРМАХ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ

Нероев В.В., Балацкая Н.В., Нероева Н.В., Кармокова А.Г.,  
Рябина М.В., Куликова И.Г.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца»  
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Резюме.** Цитокины играют важную роль в патогенезе возрастной макулярной дегенерации (ВМД). Особый интерес представляют поздние стадии данного заболевания, которые являются основной причиной прогрессирующего снижения зрения. Терапевтический эффект изменений концентраций цитокинов после лечения также требует изучения как в краткосрочной, так и в долгосрочной перспективе, в особенности при возникновении атрофии на фоне антиангиогенной терапии. Цель: провести исследование комплекса 45 цитокинов различного биологического действия в сыворотке крови (СК) и слезной жидкости (СЖ) пациентов с влажной и атрофической ВМД.

В исследование были включены 70 человек (85 глаз) с 3-4 стадией ВМД по AREDS. В зависимости от формы ВМД, были сформированы 3 группы: I-я группа (n = 24) – пациенты с «географической атрофией», II-я группа (n = 22) – пациенты с макулярной атрофией на фоне антиангиогенной терапии влажной ВМД, III-я группа (n = 24) – пациенты с влажной формой, ранее не получавших лечение. Контрольную группу составили здоровые добровольцы (n = 25). Все группы были сопоставимы по возрасту и полу. Пациентам было проведено комплексное офтальмологическое обследование для постановки диагноза. Мультиплексное исследование локального (в СЖ) и системного (в СК) цитокинового статуса проводилось на приборе MAGPIX (платформа xMAP, Luminex Corporation, США) в программе Luminexx PONENT 3.1, наборами Procarta Plex (eBioscience, Австрия). Определялись 45 цитокинов различного биологического действия IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-31, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL10, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5, Eotaxin/CCL11, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , GM-CSF, VEGF-A, VEGF-D, FGF-2, EGF, PDGF-BB, HGF, SCF, GRO- $\alpha$ , NGF- $\beta$ , BDNF, LIF, PIGF-1.

Проведен скрининг широкой линейки цитокинов различного биологического действия в СК и СЖ пациентов с атрофической и влажной формами ВМД. Показано, что поздние стадии заболевания ассоциируются с локальными и системными нарушениями в звеньях про-/противовоспалительных медиаторов (IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-18, LIF), хемоаттрактантных цитокинов (IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL10,

### Адрес для переписки:

Кармокова Асият Гисовна  
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский  
центр глазных болезней имени Гельмгольца»  
Министерства здравоохранения РФ  
105062, Россия, Москва,  
ул. Садовая-Черногрозская, 14/19.  
Тел.: 8 (963) 669-54-91.  
E-mail: asyakarma17@gmail.com

### Address for correspondence:

Karmokova Asiyat G.  
Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases  
105062, Russian Federation, Moscow, Sadovaya-  
Chernogryazskaya str., 14/19.  
Phone: 7 (963) 669-54-91.  
E-mail: asyakarma17@gmail.com

### Образец цитирования:

В.В. Нероев, Н.В. Балацкая, Н.В. Нероева,  
А.Г. Кармокова, М.В. Рябина, И.Г. Куликова «Скрининг  
цитокинов в сыворотке крови и слезной жидкости  
при влажной и атрофической формах возрастной  
макулярной дегенерации» // Медицинская иммунология,  
2022. Т. 24, № 1. С. 157-170.  
doi: 10.15789/1563-0625-SOC-2351

© Нероев В.В. и соавт., 2022

### For citation:

V.V. Neroev, N.V. Balatskaya, N.V. Neroeva,  
A.G. Karmokova, M.V. Ryabina, I.G. Kulikova "Screening  
of cytokines in blood serum and lacrimal liquid in wet and  
atrophic forms of age-related macular degeneration", *Medical  
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022,  
Vol. 24, no. 1, pp. 157-170.  
doi: 10.15789/1563-0625-SOC-2351

DOI: 10.15789/1563-0625-SOC-2351

MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5, Eotaxin/CCL11), регуляторов гемопоеза (IL-7) и факторов роста с ангиогенной активностью (EGF, HGF, PDGF-BB, VEGF-A). Изменения концентраций ряда хемокинов IP-10/CXCL10, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5 и Eotaxin/CCL11 ( $p < 0,05$ ) в СК пациентов с атрофической и влажной формами ВМД могут представлять интерес для поиска биомаркеров, связанных с различными клиническими фенотипами заболевания, а также могут оказать помощь в разработке новых терапевтических стратегий лечения.

*Ключевые слова: возрастная макулярная дегенерация, «географическая атрофия», хориоидальная неоваскуляризация, «макулярная атрофия», сыворотка крови, слезная жидкость, цитокины, мультиплексный анализ*

## SCREENING OF CYTOKINES IN BLOOD SERUM AND LACRIMAL LIQUID IN WET AND ATROPHIC FORMS OF AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION

Neroev V.V., Balatskaya N.V., Neroeva N.V., Karmokova A.G., Ryabina M.V., Kulikova I.G.

*Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation*

**Abstract.** Cytokines play an integral role in pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). Of particular interest are the late stages of this disease, which causes progressive visual impairment. Therapy-induced effects of post-treatment cytokine concentrations also need to be studied, both at long and short observation terms. These studies are of vital importance if the atrophy occurs during antiangiogenic therapy. Our purpose was to study an array of 45 cytokines, in blood serum (BS) and lacrimal liquid (LL) of the patients with wet and atrophic AMD.

The study included 70 people (85 eyes) with stage 3-4 AMD according to AREDS. Depending on the form of AMD, 3 groups were discerned: I group ( $n = 24$ ) included the patients with “geographic atrophy”; II group ( $n = 22$ ), consisted of the patients with macular atrophy treated with antiangiogenic therapy of wet AMD; III group ( $n = 24$ ), comprised the patients with a wet AMD who did not previously receive the treatment. Control group consisted of healthy volunteers ( $n = 25$ ). All the groups were comparable for age and gender. The patients underwent a comprehensive ophthalmological examination to make a diagnosis. A multiplex study of the local (in the BS) and systemic (in the LL) cytokine status was carried out on a MAGPIX device (platform xMAP, Luminex Corporation, USA) in the Luminexx PONENT 3.1 software, using Procarta Plex kits (eBioscience, Austria). We determined 45 cytokines causing various biological effects, i.e., IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-31, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL10, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5, Eotaxin/CCL11, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , GM-CSF, VEGF-A, VEGF-D, FGF-2, EGF, PDGF-BB, HGF, SCF, GRO- $\alpha$ , NGF- $\beta$ , BDNF, LIF, PIGF-1.

Screening of a wide range of cytokines showing various biological effects was carried out in BS and LL of patients with atrophic and wet forms of AMD. It has been shown that the late stages of the disease are associated with local and systemic changes of pro / anti-inflammatory mediators (IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-18, LIF), chemoattractant cytokines (IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL10, MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5, Eotaxin/CCL11), hematopoietic regulators (IL-7), and growth factors with known angiogenic activity (EGF, HGF, PDGF-BB, VEGF-A). Altered concentrations of numerous chemokines, e.g., IP-10/CXCL10, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5 and Eotaxin/CCL11 ( $p < 0.05$ ) in BS of the patients with atrophic and wet AMD may be of interest for the search of biomarkers associated with various clinical phenotypes of the disease and may be also helpful for development of new therapeutic strategies.

*Keywords: macular degeneration, age-related, geographic atrophy, neovascularization, choroidal, macular atrophy; blood serum, lacrimal liquid, cytokines, multiplex analysis*

## Введение

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) составляет 8-7% всех случаев слепоты в мире и является одной из главных причин слепоты в пожилом возрасте [27].

ВМД характеризуется прогрессирующим дегенеративно-дистрофическим поражением центральной фотоактивной зоны сетчатки и ведет к необратимой потере зрительных функций [5]. Существенные нарушения зрения возникают на продвинутых стадиях заболевания, при развитии влажной и атрофической форм ВМД [13].

Лечение поздней ВМД сопряжено с большими трудностями: требует интравитреального введения антиангиогенных препаратов, направленных на борьбу с патологическим ангиогенезом у пациентов с хориоидальной неоваскуляризацией (ХНВ) (далеко не всегда приводящего к положительным функциональным результатам), а лечение для «географической атрофии» (ГА) в настоящее время, к сожалению, отсутствует [6].

Трудности лечения в том числе связаны с недостаточным изученным патогенезом ВМД. Исследования последнего десятилетия (в большинстве экспериментальные) представили убедительные доказательства участия иммунологических факторов в развитии и прогрессировании этой патологии. Было показано, что начальные этапы ВМД характеризуются преимущественно сдвигами в неспецифическом звене иммунитета, а дальнейшее прогрессирование патологического процесса к поздней стадии – формированию ХНВ, сопровождается глубокими нарушениями в системе регуляции ангиогенеза [17].

Иммунопатогенез влажной формы ВМД изучен полнее, чем атрофической: накопленные данные свидетельствуют, что рост и развитие неполноценных сосудов с повышенной проницаемостью ассоциируется не только с дисбалансом основных про- и антиангиогенных факторов, но и активно модулирующими этот процесс провоспалительными цитокинами и хемоаттрактными медиаторами [19].

Однако патологические механизмы, направляющие вектор развития заболевания во влажную или атрофическую формы, остаются нерасшифрованными.

Продолжительная антиангиогенная терапия в состоянии стабилизировать зрительную функцию в долгосрочной перспективе, недавние исследования вызвали опасения, что лечение ингибиторами ангиогенеза может ускорить развитие и/или прогрессирование вторичных атрофических изменений – макулярной атрофии (МА) [4, 9, 10, 16]. Ряд публикаций также обращают внимание на возможные неблагоприятные эффекты ингибиторов ангиогенеза и, в частности, способ-

ность бевацизумаба существенно снижать выживаемость ганглиозных клеток сетчатки в условиях окислительного стресса [12]. Вышеуказанное обстоятельство определяет актуальность прогнозирования риска возникновения и прогрессирования МА и разработке подходов к ее лечению.

Несмотря на то, что значительное число работ посвящено изучению цитокинов при неоваскулярной ВМД в клинике, их данные получены в ограниченном числе наблюдений и являются достаточно противоречивыми [20, 28].

Особенности локальной (на уровне глаза) и системной (на уровне организма) продукции цитокинов различного биологического действия при ГА и, особенно, МА на фоне антиангиогенной терапии остаются малоизученными, их роль в механизмах формирования основных фенотипов поздней ВМД до настоящего времени остается неясной: в доступной литературе встречены единичные публикации с акцентом на исследовании расширенной панели цитокинов (с воспалительной, профибротической активностью) при атрофической форме ВМД [24]. Таким образом, отмечается целесообразность проведения углубленных исследований иммунопатогенеза атрофической и влажной форм ВМД.

**Цель исследования** – исследование комплекса 45 цитокинов различного биологического действия: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-31, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL10, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5, Eotaxin/CCL11, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , GM-CSF, VEGF-A, VEGF-D, FGF-2, EGF, PDGF-BB, HGF, SCF, GRO- $\alpha$ , NGF- $\beta$ , BDNF, LIF, PlGF-1 в сыворотке крови (СК) и слезной жидкости (СЖ) пациентов с влажной и атрофической формами ВМД.

## Материалы и методы

В исследование вошло 70 человек (85 глаз) с 3 и 4 стадией ВМД по классификации AREDS [3], проходивших обследование в ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца». Первую группу составили 24 пациента (35 глаз) с ГА на фоне прогрессирования сухой формы ВМД – из них 4 мужчины и 20 женщин, в возрасте от 48 до 83 (в среднем 71,7 $\pm$ 2,51) лет, со средней максимально корригированной остротой зрения (МКОЗ) 0,4 $\pm$ 0,05; во вторую группу вошли 22 пациента (23 глаза) с макулярной атрофией (МА) на фоне лечения ингибиторами ангиогенеза влажной ВМД – из них 4 мужчины и 18 женщин, в возрасте от 50 до 84 (в среднем 70,8 $\pm$ 2,2) лет, со средней МКОЗ 0,3 $\pm$ 0,05, которые получили инъекции ингибиторов ангиогенеза в диапазоне от 1 до 15 (в среднем

$6 \pm 0,83$ ); третья группа сформирована из 24 пациентов (27 глаз) с ХНВ, ранее не получавших лечение, — из них 7 мужчин и 17 женщин в возрасте от 50 до 82 (в среднем  $69,7 \pm 1,6$ ) лет, со средней МКОЗ  $0,4 \pm 0,05$ .

Группа контроля составили 25 здоровых добровольцев (35 глаз) в возрасте от 50 до 65 лет сопоставимых по полу и возрасту с основными группами.

Критериями исключения пациентов из исследования были: сопутствующие заболевания сетчатки, воспалительные заболевания органа зрения, глаукома, помутнения оптических сред, препятствующие достаточной визуализации глазного дна, аномалия рефракции более 3 диоптрий.

Всем пациентам было проведено комплексное офтальмологическое обследование для постановки диагноза.

Забор СК и СЖ проводили до каких-либо манипуляций. СЖ (без стимуляции) отбирали стерильной градуированной пипеткой из нижнего конъюнктивального свода в объеме 25-50 мкл в микропробирки Eppendorf. Кровь забирали из локтевой вены в стерильные вакуумные пробирки без активатора свертывания. СК получали, используя стандартные методики. До проведения исследования собранный биоматериал хранили при температуре  $-70^\circ\text{C}$ . Методом мультиплексного анализа на платформе xMAP (прибор MAGPIX, Luminex Corporation, США) в программе Luminexx PONENT 3.1, наборов Procarta Plex (eBioscience, Австрия) в пробах определяли концентрации 45 цитокинов различного биологического действия: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-31, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL10, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5, Eotaxin/CCL11, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , GM-CSF, VEGF-A, VEGF-D, FGF-2, EGF, PDGF-BB, HGF, SCF, GRO- $\alpha$ , NGF- $\beta$ , BDNF, LIF, PIGF-1. Исследования проводились согласно инструкциям производителя (Millipore, Берлингтон, Массачусетс, США) с учетом минимальной и максимальной границ чувствительности метода. Забор биологических жидкостей проводился с согласия пациента после разъяснения метода и целей исследования.

Математическая и статистическая обработка полученных данных проведена при использовании стандартных пакетов прикладных программ MS Excel и Biostat v. 5. Определялись среднее арифметическое (M), стандартная ошибка среднего арифметического (m), стандартное отклонение ( $\sigma$ ), медиана (Me). Оценка на нормальность распределения количественных показателей выполнялась с помощью критерия Шапиро—

Уилка. Показатели содержания цитокинов в биологических жидкостях представлены в виде Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ ), где Me — медиана, 25% — первый, 75% — третий процентиля. Для определения статистически значимых различий (p) показателей двух независимых выборок использовали U-критерий Манна—Уитни. Качественные переменные представлены в абсолютных (n) и относительных (%) значениях. Анализ качественных признаков в таблицах сопряженности проводился с применением критерия  $\chi^2$ , для малых выборок применялся точный критерий Фишера. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принят равным  $p < 0,05$ .

## Результаты

**Результаты мультиплексного анализа СК** пациентов исследуемых групп представлены в таблице 1.

В СК практически здоровых людей из 45 исследуемых цитокинов выявлены 32, среди которых в 68-100% проб обнаруживались хемокины и вазорегуляторные факторы IP-10/CXCL10, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, MCP-1/CCL2, MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5, Eotaxin/CCL11, VEGF-A, EGF, PDGF-BB, HGF, SCF, BDNF, LIF, PIGF-1, в норме, как известно, выполняющие гомеостатические функции, несколько реже, в 16-32% случаев определялись IL-8, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, Gro- $\alpha$  (табл. 1). Остальные медиаторы выявлялись в небольшом количестве образцов либо их концентрации находились ниже предела минимальной чувствительности тест-системы, что делало невозможным проведение статистического анализа.

В I группе пациентов (с ГА) в 21-100% тест-проб обнаружены 26 цитокинов (IL-1 $\alpha$ , IL-1ra, IL-2, IL-7, IL-15, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL10, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5, Eotaxin/CCL11, VEGF-A, EGF, PDGF-BB, HGF, SCF, GRO- $\alpha$ , BDNF, LIF, PIGF-1). Достаточно редко, в 4-8% случаев определялись IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-13, IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$  и TNF $\beta$  (табл. 1).

При исследовании уровней системной продукции иммуномедиаторов в этой группе выявлены достоверные изменения концентраций 7 цитокинов по сравнению с контролем: так в СК пациентов этой группы было достоверно снижено содержание IL-18, в то время как показатели IP-10/CXCL10, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, Eotaxin/CCL11, VEGF-A значительно превышали таковые в норме. Необходимо отметить, что IL-2 и MIP-1 $\alpha$ /CCL3 статистически значимо чаще встречались в тест-пробах пациентов с ГА чем в контроле ( $p < 0,05$ ) (табл. 1).

В СК пациентов с МА на фоне антиангиогенной терапии влажной ВМД (II группа) из 45 цитокинов были обнаружены 32: в подавляющем большинстве проб (90-100%) определены IL-1ra, IL-2, IL-7, IP-10/CXCL10, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, MCP-1/CCL2, MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5, Eotaxin/CCL11, VEGF-A, EGF, PDGF-BB, HGF, SCF, BDNF, LIF, PIGF-1), реже, в 12,5-62,5% случаях выявлены IL-1 $\alpha$ , IL-15, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-27, IL-8/CXCL8, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, TNF $\alpha$ , Gro- $\alpha$  и VEGF-D. В 4-8% проб отмечены IL-1 $\beta$ , IL-13 и IFN $\gamma$  (табл. 1).

Во II группе отмечалось достоверное снижение содержания сывороточных IL-2, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, RANTES/CCL5 и PDGF-BB по сравнению с нормой при значительном статистически значимом повышении уровня IL-1ra ( $p < 0,05$ ). Стоит отметить, что в СК 18,1% больных данной группы выявлен отсутствующий в норме лимфангиогенный фактор роста VEGF-D (табл. 1).

У пациентов с влажной формой ВМД, ранее не получавших антиангиогенную терапию (III группа) из 45 цитокинов были обнаружены 39 цитокинов. В 50-100% случаев выявлены (IL-1ra, IL-2, IL-7, IL-18, IP-10/CXCL10, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5, Eotaxin/CCL11, VEGF-A, EGF, PDGF-BB, HGF, SCF, BDNF, LIF, PIGF-1). Несколько реже, в 12,5-29% тест-проб определены IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-27, IFN $\alpha$ , IL-8/CXCL8, TNF $\alpha$ , GRO- $\alpha$ . У 8% пациентов в СК выявлен IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-31, NGF- $\beta$ , VEGF-D (табл. 1).

Стоит отметить, что частота встречаемости IL-6 ( $p < 0,05$ ) была достоверно выше в третьей группе относительно контроля (табл. 1).

В этой группе статистически значимые сдвиги от нормы отмечены для 5 цитокинов (IL-1ra, RANTES/CCL5, EGF, PDGF-BB и HGF): наблюдался достоверный подъем сывороточных уровней IL-1ra, EGF и HGF при незначительном снижении концентраций RANTES/CCL5 и PDGF-BB по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

Изменения в системной продукции хемоаттрактантных цитокинов стали важными признаками, отличающими между собой фенотипы поздней ВМД, в частности ГА.

В СК больных I группы выявлено достоверное значительное повышение концентраций хемокинов SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, MIP-1 $\alpha$ /CCL3 и RANTES/CCL5 ( $p < 0,05$ ) по сравнению с таковыми у пациентов с МА и нативной влажной формой ВМД. Статистически значимые сдвиги сывороточных уровней 6 хемоаттрактантных цитокинов различали I и II группы: так при ГА обнаружено существенное усиление системной продукции IP-10/CXCL10, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, MIP-1 $\alpha$ /CCL3,

MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5 и Eotaxin/CCL11, по сравнению с группой МА ( $p < 0,05$ ).

**Результаты мультиплексного анализа СЖ** пациентов исследуемых групп представлены в таблице 2.

В СЖ группы контроля из линейки исследуемых цитокинов определены 22 цитокина, среди которых в подавляющем числе тест-проб (88,5-100%) обнаруживались IL-7, IP-10/CXCL10, MCP-1/CCL2, MIP-1 $\beta$ /CCL4, Eotaxin/CCL11, VEGF-A, EGF, PDGF-BB, HGF, Gro- $\alpha$ . Более чем у половины здоровых доноров выявлялись IL-1 $\beta$  (54,2%), IL-1ra (68,5%), IL-8/CXCL8 (57,1%), LIF (65,7%), PIGF-1 (60%), значительно реже, в 5,7-48,5% случаев регистрировались IL-2, IL-13, IL-15, IL-17A, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, RANTES/CCL5 и GM-CSF (табл. 2). В отличие от проб СК в СЖ этой группы не обнаружены IL-1 $\alpha$ , IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-27, IFN $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ /CCL3, TNF $\alpha$ , BDNF и SCF.

В СЖ пациентов с ГА из 45 изучаемых медиаторов, выявлены 39: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-18, IL-27, IFN $\gamma$ , IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL10, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, MCP-1/CCL2, MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5, Eotaxin/CCL11, TNF $\alpha$ , GM-CSF, VEGF-A, FGF-2, EGF, PDGF-BB, HGF, SCF, Gro- $\alpha$ , LIF, PIGF-1 определены в 17,1 – 100% случаях; очень редко, в 2,8 – 11,5% тест-проб обнаружены IL-5, IL-10, IL-21, IL-22, IL-23, IFN $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ /CCL3, NGF- $\beta$ . Следует отметить, что в СЖ пациентов с ГА достоверно чаще чем в группе здоровых встречались IL-1 $\alpha$ , IL-1ra, IL-2, IL-17A, IL-18, IL-27, IL-8/CXCL8, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, RANTES/CCL5, SCF и LIF ( $p < 0,05$ ) (табл. 2).

Анализ локальной продукции цитокинов в этой группе обнаружил статистически значимые изменения концентраций 13 из них по сравнению с таковыми в контроле: повышение содержания IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-7, IL-8/CXCL8, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, MCP-1/CCL2, MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5, VEGF-A, EGF, HGF, а также снижения уровня PDGF-BB ( $p < 0,05$ ).

В СЖ пациентов с МА на фоне антиангиогенной терапии влажной ВМД (II группы) выявлены 35 цитокинов, из них в 21,7 – 100% проб определялись IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-7, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-18, IL-27, IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL10, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, MCP-1/CCL2, MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5, Eotaxin/CCL11, TNF $\alpha$ , GM-CSF, VEGF-A, FGF-2, EGF, PDGF-BB, HGF, Gro- $\alpha$ , LIF, PIGF-1 достаточно редко, в 4,3 -17,3% случаев, встречались IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ /CCL3 и SCF. Обратим внимание, что в СЖ пациентов с МА статистически значимо чаще, чем в группе здо-

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ В СК ПРИ АТРОФИЧЕСКОЙ И ВЛАЖНОЙ ФОРМАХ ВМД

TABLE 1. CONCENTRATION OF CYTOKINES IN BS IN ATROPHIC AND WET FORMS OF AMD

Цитокин, пг/мл Cytokine, pg/ml	Первая группа First group (n = 24)		Вторая группа Second group (n = 22)		Третья группа Third group (n = 24)		Контрольная группа Control group (n = 25)	
	Частота выявления, абс (%) Detection rate, abs (%)	Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )	Частота выявления, абс (%) Detection rate, abs (%)	Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )	Частота выявления, абс (%) Detection rate, abs (%)	Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )	Частота выявления, абс (%) Detection rate, abs (%)	Me ( $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$ )
IL-1 $\beta$	-	-	2 (9)	5,3 (3,9-6,7)	3 (12,5)	27,9 (22,3-31,8)	2 (8)	5,2 (5,2-5,2)
IL-1 $\delta$	5 (21)	23,7 (19,5-25,3) ↓*	13 (59)	22,2 (19,5-35,9)	17 (71)	26 (21,3-36,5)	11 (44)	33,5 (30,9-38,6)
IL-1 $\gamma$	21 (87,5)	459,1 (208,3-922,8)	22 (100)	579,9 (426,2-744,6) ↑*	23 (96)	592,7 (371,5-1027,6) ↑*	23 (92)	371,5 (209,8-484,8)
IL-6	1 (4)	-	-	-	4** (16,7)	29 (17,9-37,7)	-	-
IL-7	24 (100)	4,1 (2,8-4,8)	21 (95,4)	3,7 (2,1-4,6)	24 (100)	3,3 (2,1-5,8)	25 (100)	3,5 (2,5-4,9)
Eotaxin/ CCL11	24 (100)	148 (84,9-180,4) ↑**	22 (100)	79,3 (63,3-117,1)	24 (100)	83,5 (84,9-180,4) ###	25 (100)	63,7 (45,3-108,4)
GRO- $\alpha$	10 (42)	8,64 (5,0-19,4)	2 (9)	5 (4,8-5,2)	6 (25)	7,6 (4,6-10,0)	8 (32)	5,4 (4,6-5,7)
IL-8/ CXCL8	8 (33,3)	20 (8,0-24,6)	3 (13,6)	4,5 (3,9-5,5)	4 (16,7)	14,9 (5,5-27,2)	4 (16)	29,5 (6-53)
IP-10/ CXCL10	24 (100)	52,7 (24,9-63,0) ↑**	22 (100)	19,6 (13,4-45,5)	24 (100)	27,1 (15,9-40,8) ###	25 (100)	20,4 (18,0-35,7)
MCP-1/ CCL2	24 (100)	40,4 (22,8-53,3)	22 (100)	60,3 (40,5-76,9)	24 (100)	60,3 (40,5-76,9)	25 (100)	46,7 (24,0-77,6)
MIP-1 $\alpha$ / CCL3	15** (62,5)	14,9 (10,00-3,22) ↑**	10 (45,4)	5,8 (3,7-8,4)	12 (50)	7,8 (6-14) ###	6 (24)	2,1 (2,0-19,7)
MIP-1 $\beta$ / CCL4	24 (100)	116,7 (81,2-158,7) ↑**	22 (100)	83,8 (75,6-117,4)	24 (100)	87,1 (67,8-120,9)	25 (100)	81,1 (66,9-88,0)

Таблица 1 (окончание)  
Table 1 (continued)

Цитокин, пг/мл Cytokine, pg/ml	Первая группа First group (n = 24)		Вторая группа Second group (n = 22)		Третья группа Third group (n = 24)		Контрольная группа Control group (n = 25)	
	Частота выявления, абс (%) Detection rate, abs (%)	Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )	Частота выявления, абс (%) Detection rate, abs (%)	Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )	Частота выявления, абс (%) Detection rate, abs (%)	Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )	Частота выявления, абс (%) Detection rate, abs (%)	Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )
<b>SDF-1α/ CXCL12</b>	24 (100)	855,4 (657,8-1056,9) ↑**	22 (100)	478,7 (392,0-598,4) ↓*	24 (100)	536,9 (454,8-625,7) ###	25 (100)	599,5 (486,2-835,8)
<b>RANTES/ CCL5</b>	24 (100)	32,4 (18,9-88,9) #	22 (100)	17,8 (16,0-22,1) ↓*	24 (100)	20,4 (13,6-26,7) ↓****	25 (100)	25 (17,0-51,4)
<b>BDNF</b>	24 (100)	229 (132,4-356,4)	22 (100)	263,6 (97,0-423,3)	23 (96)	323,9 (127,2-427,1)	25 (100)	276,3 (175,6-307,1)
<b>EGF</b>	20 (83,3)	17,6 (10,2-51,4)	21 (95,4)	34,3 (17,3-47,7)	23 (96)	45,9 (33,8-50,9) ↑*	25 (100)	25 (11,0-62,8)
<b>HGF</b>	24 (100)	247,3 (184,3-315,5)	22 (100)	240,5 (191,9-287,0) ##	24 (100)	284,3 (232,4-344,0) ↑*	25 (100)	220,9 (164,6-258,5)
<b>LIF</b>	10 (42)	6,9 (4,8-8,4)	21 (95,4)	5,61 (5,00-6,67) ##	18 (75)	7,6 (6,4-9,7)	17 (68)	7,6 (5,2-8,8)
<b>PDGF-BB</b>	24 (100)	114,4 (64,7-167,6) #	22 (100)	56 (37,8-83,8) ↓*	24 (100)	70,5 (42,8-102,8) ↓*	25 (100)	96,3 (76,1-172,8)
<b>PIGF-1</b>	19 (79)	24,8 (11,1-33,7)	20 (90,9)	24,6 (19,3-35,3)	22 (92)	26,3 (18,7-37,1)	23 (92)	16,7 (14,3-37,0)
<b>SCF</b>	18 (75)	7,3 (4,9-9,9)	22 (100)	7,2 (4,8-15,4)	24 (100)	8,5 (7,2-15,2)	23 (92)	6,2 (3,7-10,4)
<b>VEGF-A</b>	24 (100)	383,6 (245,6-707,8) ↑*	22 (100)	243,6 (177,3-521,2)	24 (100)	374,1 (270,3-464,7)	25 (100)	253,9 (176,2-370,9)
<b>VEGF-D</b>	-	-	4** (18,1)	7,3 (6,3-8,3)	2 (8)	22,5 (12,7-32,3)	-	-

Примечание. n – количество проб; «-» – не определяется; \* – достоверность отличия показателей относительно контрольной группы (p < 0,05); \*\* – достоверность частоты встречаемости показателей относительно контрольной группы (p < 0,05); # – достоверность отличия показателей между первой и второй группами (p < 0,05); ## – достоверность отличия показателей между второй и третьей группами (p < 0,05); ### – достоверность отличия показателей между первой и третьей группами (p < 0,05); \*\*\*\* – достоверность отличия показателей между первой и третьей группами (p < 0,05).

Note. n, number of samples; “-”, not defined; \* – reliability of the differences in indicators relative to control group (p < 0.05); \*\* – reliability of the frequency of occurrence in indicators relative to control group (p < 0.05); #, reliability of the difference in indicators between the first and second groups (p < 0.05); ##, reliability of the difference in indicators between the second and third groups (p < 0.05); ###, reliability of the difference in indicators between the first and third groups (p < 0.05).

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СЖ ПРИ АТРОФИЧЕСКОЙ И ВЛАЖНОЙ ФОРМАХ ВМД

TABLE 2. CONCENTRATION OF CYTOKINES IN LL IN ATROPHIC AND WET FORMS OF AMD

Цитокин, пг/мл Cytokine, pg/ml	Первая группа First group (n = 35)		Вторая группа Second group (n = 23)		Третья группа Third group (n = 27)		Контрольная группа Control group (n = 35)	
	Частота выявления, абс (%) Detection rate, abs (%)	Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )	Частота выявления, абс (%) Detection rate, abs (%)	Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )	Частота выявления, абс (%) Detection rate, abs (%)	Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )	Частота выявления, абс (%) Detection rate, abs (%)	Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )
<b>IL-1β</b>	18 (51,4)	6,7 (4,9-8,4) ↑*	8 (34,7)	4,5 (4,1-7,0)	11 (40,7)	6,2 (5,2-8,7) ↑*	19 (54,2)	4 (4,0-5,6)
<b>IL-2</b>	24** (68,5)	38,9 (27,9-51,9) ↑**	11** (47,8)	21,1 (15,9-39,0) ↑*	12** (44,4)	28,2 (25,0-37,7) ↑*	6 (17,1)	12,5 (11,4-13,6)
<b>IL-18</b>	17** (48,5)	49,5 (27,0-79,2)	8** (34,7)	42 (24,6-52,2)	9** (33,3)	69,9 (40-80)	—	—
<b>IL-1ra</b>	31** (88,5)	2369,4 (900,3-8506,2) ↑**	19 (82,6)	726,6 (404,6-1327,1)	21 (77,7)	854,3 (655,2-1806,0) ###	24 (68,5)	542,2 (418,8-1540,9)
<b>IL-7</b>	32 (91,4)	47,5 (8,3-120,5) ↑**	22 (95,6)	10,8 (4,5-36,7)	26 (96,2)	13,6 (3,6-27,6) ###	31 (88,5)	3,9 (3,6-24,3)
<b>Eotaxin/ CCL11</b>	34 (97,1)	5,8 (4,8-8,1) *	20 (86,9)	2,9 (2,0-5,2) ↓*	27 (100)	3 (2,4-5,7) ↓*###	31 (88,5)	6,2 (5,1-7,6)
<b>GRO-α</b>	31 (88,5)	31,3 (18,0-50,5)	20 (86,9)	23,3 (15,4-34,1) ##	24 (88,8)	38,7 (21,9-105,6)	31 (88,5)	42,9 (17,5-45,9)
<b>IL-8/ CXCL8</b>	32** (91,4)	142,4 (58,4-208,5) ↑*	21** (91,3)	69,3 (37,3-117,6) ↑*	25** (92,5)	68,5 (21,9-123,8) ↑*###	20 (57,1)	17,1 (13,0-45,6)
<b>IP-10/ CXCL10</b>	35 (100)	54,8 (22,6-147,2)	22 (95,6)	74,2 (44,0-132,2)	27 (100)	60 (36,4-118,2)	35 (100)	22,2 (19,0-161,2)
<b>MCP-1/ CCL2</b>	33 (94,2)	43,4 (26,3-119,1) ↑*	18 (78,2)	22 (12,4-80,6)	27 (100)	32,6 (21-85)	31 (88,5)	23 (6,7-51,9)
<b>MIP-1α/ CCL3</b>	4** (11,4)	12,6 (9,1-16,4)	2 (8,6)	8,5 (6,9-9,5)	4** (14,8)	34,6 (27,1-35,5)	—	—

Таблица 2 (окончание)  
Table 2 (continued)

Цитокин, пг/мл Cytokine, pg/ml	Первая группа First group (n = 35)		Вторая группа Second group (n = 23)		Третья группа Third group (n = 27)		Контрольная группа Control group (n = 35)	
	Частота выявления, абс (%) Detection rate, abs (%)	Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )	Частота выявления, абс (%) Detection rate, abs (%)	Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )	Частота выявления, абс (%) Detection rate, abs (%)	Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )	Частота выявления, абс (%) Detection rate, abs (%)	Me (Q <sub>0,25</sub> -Q <sub>0,75</sub> )
<b>MIP-1β/ CCL4</b>	30 (85,7)	61,8 (46,8-80,5) ↑*	18 (78,2)	57,6 (50,8-73,9) ↑*	26 (96,2)	65,5 (45,6-83,0) ↑*	31 (88,5)	28,6 (23,9-50,5)
<b>SDF-1α/ CXCL12</b>	26** (74,2)	573,8 (269,0-1198,9) ↑*	10 (43,4)	379,7 (270,8-911,5) ↑*	16 (59,2)	225,3 (126,1-625,7)	14 (40)	137,5 (93,5-278,4)
<b>RANTES/ CCL5</b>	31** (88,5)	13,9 (7,1-37,1) ↑**	20** (86,9)	5,7 (2,7-8,7)	26** (96,2)	11,4 (3,9-18,1)	9 (25,7)	4,3 (2,8-4,3)
<b>EGF</b>	32 (91,4)	139,4 (92,9-265,3) ↑**	22 (95,6)	88,1 (68,7-112,0) ↑*	27 (100)	80,1 (58,9-120,2) ↑***	35 (100)	33,7 (23,7-45,8)
<b>HGF</b>	35 (100)	113,4 (72,8-195,5) ↑*	22 (95,6)	69,1 (47,0-200,1)	27 (100)	128,9 (83,2-292,8) ↑*	35 (100)	37,5 (36,4-81,2)
<b>LIF</b>	31** (88,5)	8,9 (7,3-14,0)	21** (91,3)	10,7 (6,2-13,7)	27** (100)	7,6 (6,1-12,2) ↓*	23 (65,7)	9,7 (8,1-20,2)
<b>PDGF-BB</b>	34 (97,1)	19,2 (11,9-28,7) ↓*	20 (86,9)	24,2 (12,8-37,4) ↓*	27 (100)	15 (10,6-34,6) ↓*	35 (100)	51,4 (31,7-84,2)
<b>PIGF-1</b>	22 (62,8)	11,5 (5,8-14,6)	17 (73,9)	10,6 (7,8-16,0)	20 (74)	10,2 (5,8-14,6)	21 (60)	8,3 (6,5-11,6)
<b>SCF</b>	9** (25,7)	2 (1,8-2,5)	3** (13,0)	1,4 (1,3-1,8)	4** (14,8)	1,7 (1,6-2,4)	-	-
<b>VEGF-A</b>	32 (91,4)	301,1 (135,2-606,2) ↑*	20 (86,9)	276,7 (148,3-531,3) ↑*	26 (96,2)	381,7 (136,4-705,5) ↑*	35 (100)	96,8 (40,6-341,0)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ровых встречались IL-2, IL-18, IL-8/CXCL8, LIF, RANTES/CCL5 и SCF ( $p < 0,05$ ) (табл. 2).

В этой же группе отмечались достоверные разнонаправленные изменения локальной продукции 8 из исследуемых цитокинов по сравнению с контролем: повышение содержания в СЖ IL-2, IL-8/CXCL8, MIP-1 $\beta$ /CCL4, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, VEGF-A, EGF и снижение уровней Eotaxin/CCL11 и PDGF-BB ( $p < 0,05$ ).

При тестировании СЖ пациентов с нативной ХНВ (III группа) 25 цитокинов: IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-7, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-18, IL-27, IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL10, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, MCP-1/CCL2, MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5, Eotaxin/CCL11, GM-CSF, VEGF-A, FGF-2, EGF, PDGF-BB, HGF, Gro- $\alpha$ , LIF и PlGF-I обнаруживались в 33,3-100% тест-проб. Достаточно редко, в 3,7-14,8% случаев определялись IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-21, IL-31, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ /CCL3, TNF $\alpha$ , VEGF-D и SCF. В этой группе частота встречаемости IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-17A, IL-18, IL-27, IL-8/CXCL8, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, RANTES/CCL5, SCF, LIF была достоверно выше чем в контроле ( $p < 0,05$ ) (табл. 2).

В СЖ пациентов III группы выявлены статистически значимые изменения в продукции 10 цитокинов относительно нормы: увеличение локальных уровней IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8/CXCL8, MIP-1 $\beta$ /CCL4, VEGF-A, HGF и EGF, при снижении концентраций Eotaxin/CCL11, PDGF-BB, LIF ( $p < 0,05$ ).

При сравнительном анализе локального содержания медиаторов в исследуемых группах в СЖ больных I группы (ГА) было выявлено достоверное повышение уровней IL-1ra, IL-7 и Eotaxin/CCL11 ( $p < 0,05$ ) по сравнению с таковыми во II-й (МА) и III-й (ХНВ) группах. Статистически значимые сдвиги в продукции 2 цитокинов отличали группы МА и ГА: так при МА обнаружено существенное ослабление локальной продукции IL-2 и EGF по сравнению с ГА ( $p < 0,05$ ); при этом значительное снижение концентрации IL-8/CXCL8 относительного такового в I группе было определено СЖ пациентов с нативной влажной формой ВМД ( $p < 0,05$ ) (табл. 2).

## Обсуждение

ВМД, особенно поздние стадии заболевания, характеризующиеся развитием ХНВ и/или ГА, является наиболее распространенной причиной необратимой потери зрения у пожилых людей [13]. Несмотря на то, что этиология этого сложного заболевания до сих пор неизвестна, участие системных и локальных иммунологических механизмов связывают с патогенезом ВМД [14].

Исследования цитокинов, как важнейшего звена иммунорегуляции, проводились на разных стадиях ВМД, при этом работы, посвященные изучению отдельных клинических фенотипов поздней стадии заболевания, единичны, их данные достаточно противоречивы [17, 19, 20, 24, 28].

Отдельный интерес представляет МА, так как механизм формирования атрофических изменений на фоне влажной ВМД или присоединения ХНВ к атрофии не ясен и требует дальнейшего изучения [23].

IL-1, IL-2 и IL-6 – индуцибельные провоспалительные цитокины, из которых IL-2 вырабатывается Т-лимфоцитами и является медиатором специфического иммунного ответа [22]. В работе Roh M.I. и соавт. отмечен вклад IL-2, IL-6 и IL-8/CXCL8 в патогенез различных форм влажной ВМД. При нативной форме ХНВ авторами не отмечено достоверных сдвигов в концентрации данных цитокинов на локальном уровне по сравнению контролем, но при этом были обнаружены значимые корреляции уровней IL-6 и IL-8/CXCL8 с размером ХНВ пациентов групп с нативной и рецидивирующей ХНВ [21]. В нашем исследовании, напротив, уровень IL-2 был достоверно ниже в СК в группах с ГА и МА относительно контрольной группы. Значимой разницы между контролем и группой пациентов с влажной ВМД, ранее не получавших антиангиогенную терапию, при сравнении сывороточных концентраций IL-2 не наблюдалось. Однако в СЖ зафиксировано достоверное увеличение содержания IL-2 во всех группах относительно контроля ( $p < 0,05$ ). Нами не отмечено изменений локальной и системной продукции IL-6 относительно нормы, что согласуется с данными научных публикаций по этой теме [21]. Значимых сдвигов IL-8/CXCL8 в СК пациентов основных групп не было обнаружено, однако в СЖ наблюдалось повышение уровня данного цитокина относительно контроля во всех исследуемых группах ( $p > 0,05$ ) (табл. 2).

Несмотря на то, что роль VEGF-A и PDGF-BB в развитии патологического ангиогенеза не подлежит сомнению, участие данных факторов в механизмах формирования атрофической форм ВМД до конца не изучено.

Наши данные согласуются с исследованием Funk M. и соавт., в котором отмечено достоверное увеличение концентрации VEGF-A и уменьшение PDGF-BB на локальном уровне при влажной форме ВМД [8]. Аналогичные изменения в концентрации этих цитокинов мы наблюдали также в группах с МА и ГА ( $p < 0,05$ ). В ходе проведенной работы нами также было обнаружено, что концентрация VEGF-A в СК пациентов с

влажной ВМД существенно не превышала таковую у здоровых. Анализ содержания вазоактивных факторов в СК показал достоверное увеличение концентрации VEGF-A в группе с ГА и снижение PDGF-BB во второй и третьей группах относительно контроля ( $p < 0,05$ ).

Говоря о VEGF-A, следует отметить, что в нашем исследовании в 3,6-13,1% проб СЖ при поздней ВМД этот цитокин не был выявлен. Отсутствие локальной продукции VEGF-A в 13,1% случаев при МА можно объяснить применением антиангиогенных препаратов в данной группе, однако подобное наблюдение в 8,6% случаях при ГА позволяет думать о вероятной генетически детерминированной блокировке продукции медиатора и нуждается в дальнейшем исследовании, тем более, что в литературе встречается все больше доказательств его важнейшей нейропротекторной и трофической роли. Отсутствие VEGF-A в СЖ у 3,2% пациентов с влажной ВМД не исключает включения механизмов патологической неоваскуляризации, зависящих от активации других вазоактивных медиаторов с митогенным действием в отношении эндотелия сосудов.

Так, на сегодняшний день известно, что HGF принимает участие в ангиогенезе, росте, пролиферации и дифференцировке многих типов клеток [1]. В работе Jonas J.V. и соавт. были отмечены более высокие концентрации EGF и HGF в биологических жидкостях при влажной ВМД [11]. Эти результаты согласуются с данными нашего исследования, в котором были выявлены однонаправленные изменения локальной и системной продукции указанных факторов роста. В СЖ отмечалось значимое увеличение концентраций EGF в группах с МА и ГА, а также повышение уровня HGF в группе с ГА ( $p < 0,05$ ).

В доступной литературе не было обнаружено данных об участии IL-1ra в патогенезе ВМД. Интересен тот факт, что результаты нашего исследования показывают достоверно высокий уровень цитокина IL-1ra в СК в группах с влажной ВМД, как нативных, так и на фоне антиангиогенной терапии по сравнению с контролем, а также значимое повышение уровня данного цитокина в первой группе на локальном уровне относительно контроля ( $p < 0,05$ ).

Такая активная продукция в СК и СЖ HGF, EGF и IL-1ra, обнаруженная в 96%-100% проб, указывает на их непосредственное участие в патогенезе заболевания.

Как известно, хемокины, и в частности MCP-1/CCL2, играют центральную роль в развитии воспаления и играет решающую роль в регулировании миграции и инфильтрации моноцитов и макрофагов. Повышение внутриглазной концентрации MCP-1 в значительной степени

связывают с влажной ВМД [7]. В нашей работе зафиксировано повышение уровня этого цитокина в СЖ пациентов с ГА. Следует отметить, что нами было обнаружено значимое увеличение содержания хемокинов в СК MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 в группе с ГА и снижение уровня SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 в группе с МА. На локальном уровне отмечалось повышение уровня MIP-1 $\beta$ /CCL4 во всех группах и повышение концентрации SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 в СЖ в первой и второй группах ( $p < 0,05$ ).

Данные литературы также свидетельствуют о повышении системной продукции Eotaxin/CCL11 и IP-10/CXCL10 на всех стадиях ВМД, в том числе при ГА и влажной форме ВМД [15]. IP-10/CXCL10 хорошо известен своей ангиостатической и антифибротической активностью. Он подавляет пролиферацию эндотелиальных клеток, конкурируя с клетками за связывающие участки гепарана сульфата протеогликанов, что приводит к регрессу формирования новых сосудов [2, 25]. Takeda A. и соавт. показали, что блокада Eotaxin/CCL11 эффективна при снижении ХНВ в мышечной модели, тем самым указывая на его ангиогенный характер [26].

В нашем исследовании Eotaxin/CCL11 и IP-10/CXCL10 были достоверно повышены только в СК пациентов ГА относительно контроля ( $p < 0,05$ ). При этом на локальном уровне отмечалось снижение уровня Eotaxin/CCL11 во второй и третьей группах ( $p < 0,05$ ). Значимого сдвига IP-10/CXCL10 в СЖ ни в одной из групп не наблюдалось.

IL-7 играет роль в повышении гомеостатической пролиферации и длительном выживании наивных Т-клеток [18]. Роль данного цитокина в патогенезе ВМД мало изучена. В ходе проведенной нами работы наблюдались значимые сдвиги в концентрации IL-7 в СЖ в группе с ГА относительно контроля фактически в 92% проб ( $p < 0,05$ ). Достоверных сдвигов в системной продукции данного цитокина не обнаружено.

## Заключение

Таким образом проведен скрининг широкой линейки цитокинов различного биологического действия в СК и СЖ пациентов с атрофической и влажной формами ВМД.

Показано, что поздние стадии заболевания ассоциируются с локальными и системными нарушениями в звеньях про-/противовоспалительных медиаторов (IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-18, LIF), хемотактантных цитокинов (IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL10, MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5, Eotaxin/CCL11), регуляторов гемопоэза (IL-7) и факторов роста с анги-

огенной активностью (EGF, HGF, PDGF-BB, VEGF-A).

Изменения концентраций ряда хемокинов: IP-10/CXCL10, SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5 и Eotaxin/CCL11 ( $p < 0,05$ ) в СК пациентов с атрофической и

влажной формами ВМД, значимо отличающихся между собой могут представлять интерес для поиска биомаркеров, связанных с различными клиническими фенотипами заболевания, а также могут оказать помощь в разработке новых терапевтических стратегий лечения.

## Список литературы / References

1. Нероев В.В., Балацкая Н.В., Новикова А.Ю., Рябина М.В., Илюхин П.А. Известные и малоизученные гемопоэтические и вазоактивные факторы роста при капиллярной гемангиоме сетчатки // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 5. С. 943-956. [Neroev V.V., Balatskaya N.V., Novikova A.Yu., Ryabina M.V., Ilyukhin P.A. Proven and less studied hematopoietic and vasoactive growth factors in retinal capillary hemangioma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 5, pp. 943-956. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-PAL-2002.
2. Нероев В.В., Зайцева О.В., Балацкая Н.В., Лазутова А.А. Локальная и системная продукция 45 цитокинов при осложненной пролиферативной диабетической ретинопатии // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 2. С. 301-310. [Neroev V.V., Zaytseva O.V., Balatskaya N.V., Lazutova A.A. Local and systemic production of 45 cytokines in complicated proliferative diabetic retinopathy. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 2, pp. 301-310. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-LAS-1802.
3. Age-related eye disease study research group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch. Ophthalmol.*, 2001, Vol. 119, no. 10, pp. 1417-1436.
4. Bhisitkul R.B., Mendes T.S., Rofagha S., Enanoria W., Boyer D.S., Sadda S.R., Zhang K. Macular atrophy progression and 7-year vision outcomes in subjects from the ANCHOR, MARINA, and HORIZON studies: the SEVEN-UP study. *Am. J. Ophthalmol.*, 2015, Vol. 159, no. 5, pp. 915-924.e2.
5. Bhutto I., Luty G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Mol. Aspects Med.*, 2012, Vol. 33, no. 4, pp. 295-317.
6. Chew E.Y., Clemons T.E., Agrón E., Sperduto R.D., Sangiovanni J.P., Kurinij N., Davis M.D., Age-related eye disease study research group. Long-term effects of vitamins C and E, beta-carotene, and zinc on age-related macular degeneration: AREDS report no. 35. *Ophthalmology*, 2013, Vol. 120, no. 8, pp. 1604-1611.e4.
7. Du Z., Wu X., Song M., Li P., Wang L. Oxidative damage induces MCP-1 secretion and macrophage aggregation in age-related macular degeneration (AMD). *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2016, Vol. 254, no. 12, pp. 2469-2476.
8. Funk M., Karl D., Georgopoulos M., Benesch T., Sacu S., Polak K., Zlabinger G.J., Schmidt-Erfurth U. Neovascular age-related macular degeneration: intraocular cytokines and growth factors and the influence of therapy with ranibizumab. *Ophthalmology*, 2009, Vol. 116, no. 12, pp. 2393-2399.
9. Horani M., Mahmood S., Aslam T.M. A Review of macular atrophy of the retinal pigment epithelium in patients with neovascular age-related macular degeneration: What is the link? Part II. *Ophthalmol. Ther.*, 2020, Vol. 9, no. 1, pp. 35-75.
10. Horani M., Mahmood S., Aslam T.M. Macular atrophy of the retinal pigment epithelium in patients with neovascular age-related macular degeneration: What is the link? Part I: A review of disease characterization and morphological associations. *Ophthalmol. Ther.*, 2019, Vol. 8, no. 2, pp. 235-249.
11. Jonas J.B., Tao Y., Neumaier M., Findeisen P. Cytokine concentration in aqueous humour of eyes with exudative age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol.*, 2012, Vol. 90, no. 5, pp. e381-e388.
12. Lee J.M., Bae H.W., Lee S.Y., Seong G.J., Kim C.Y. Effect of anti-vascular endothelial growth factor antibody on the survival of cultured retinal ganglion cells. *Korean J. Ophthalmol.*, 2017, Vol. 31, no. 4, pp. 360-365.
13. Lim L.S., Mitchell P., Seddon J.M., Holz F.G., Wong T.Y. Age-related macular degeneration. *Lancet*, 2012, Vol. 379, no. 9827, pp. 1728-1738.
14. Liu F., Ding X., Yang Y., Li J., Tang M., Yuan M., Hu A., Zhan Z., Li Z., Lu L. Aqueous humor cytokine profiling in patients with wet AMD. *Mol. Vis.*, 2016, Vol. 22, pp. 352-361.
15. Mo F.M., Proia A.D., Johnson W.H., Cyr D., Lashkari K. Interferon gamma-inducible protein-10 (IP-10) and eotaxin as biomarkers in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2010, Vol. 51, no. 8, pp. 4226-4236.
16. Munk M.R., Ceklic L., Ebnetter A., Huf W., Wolf S., Zinkernagel M.S. Macular atrophy in patients with long-term anti-VEGF treatment for neovascular age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol.*, 2016, Vol. 94, no. 8, pp. e757-e764. 7
17. Patel M., Chan C.C. Immunopathological aspects of age-related macular degeneration. *Semin. Immunopathol.*, 2008, Vol. 30, no. 2, pp. 97-110.

18. Pongsachareonnont P, Mak M.Y.K., Hurst C.P., Lam W.C. Neovascular age-related macular degeneration: intraocular inflammatory cytokines in the poor responder to ranibizumab treatment. *Clin. Ophthalmol.*, 2018, Vol. 12, pp. 1877-1885.
19. Pugazhendhi A., Hubbell M., Jairam P., Ambati B. Neovascular macular degeneration: a review of etiology, risk factors, and recent advances in research and therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 3, 1170. doi: 10.3390/ijms22031170.
20. Rezar-Dreindl S., Sacu S., Eibenberger K., Pollreis A., Bühl W., Georgopoulos M., Krall C., Weigert G., Schmidt-Erfurth U. The intraocular cytokine profile and therapeutic response in persistent neovascular age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2016, Vol. 57, no. 10, pp. 4144-4150.
21. Roh M.I., Kim H.S., Song J.H., Lim J.B., Koh H.J., Kwon O.W. Concentration of cytokines in the aqueous humor of patients with naive, recurrent and regressed CNV associated with amd after bevacizumab treatment. *Retina*, 2009 Vol. 29, no. 4, pp. 523-529.
22. Sakamoto S., Takahashi H., Tan X., Inoue Y., Nomura Y., Arai Y., Fujino Y., Kawashima H., Yanagi Y. Changes in multiple cytokine concentrations in the aqueous humour of neovascular age-related macular degeneration after 2 months of ranibizumab therapy. *Br. J. Ophthalmol.*, 2018, Vol. 102, no. 4, pp. 448-454.
23. Siedlecki J., Fischer C., Schworm B., Kreutzer T.C., Luft N., Kortuem K.U., Schumann R.G., Wolf A., Priglinger S.G. Impact of sub-retinal fluid on the long-term incidence of macular atrophy in neovascular age-related macular degeneration under treat & extend anti-vascular endothelial growth factor inhibitors. *Sci. Rep.*, 2020, Vol. 10, no. 1, 8036. doi: 10.1038/s41598-020-64901-9.
24. Spindler J., Zandi S., Pfister I.B., Gerhardt C., Garweg J.G. Cytokine profiles in the aqueous humor and serum of patients with dry and treated wet age-related macular degeneration. *PLoS One*, 2018, Vol. 13, no. 8, e0203337. doi: 10.1371/journal.pone.0203337.
25. Tager A.M., Kradin R.L., LaCamera P., Bercury S.D., Campanella G.S., Leary C.P., Polosukhin V., Zhao L.H., Sakamoto H., Blackwell T.S., Luster A.D. Inhibition of pulmonary fibrosis by the chemokine IP-10/CXCL10. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2004, Vol. 31, no 4, pp. 395-404.
26. Takeda A., Baffi J.Z., Kleinman M.E., Cho W.G., Nozaki M., Yamada K., Kaneko H., Albuquerque R.J., Dridi S., Saito K., Raisler B.J., Budd S.J., Geisen P., Munitz A., Ambati B.K., Green M.G., Ishibashi T., Wright J.D., Humbles A.A., Gerard C.J., Ogura Y., Pan Y., Smith J.R., Grisanti S., Hartnett M.E., Rothenberg M.E., Ambati J. CCR3 is a target for age-related macular degeneration diagnosis and therapy. *Nature*, 2009, Vol. 460, no. 7252, pp. 225-230.
27. Wang P., Wang J., Ma J., Jin G., Guan X. The association between age-related macular degeneration and the risk of mortality. *Biomed Res. Int.*, 2017, Vol. 2017, 3489603. doi: 10.1155/2017/3489603.
28. Zhou H., Zhao X., Yuan M., Chen Y. Comparison of cytokine levels in the aqueous humor of polypoidal choroidal vasculopathy and neovascular age-related macular degeneration patients. *BMC Ophthalmol.*, 2020, Vol. 20, no. 1, 15. doi: 10.1186/s12886-019-1278-8.

---

**Авторы:**

**Нероев В.В.** — д.м.н., профессор, академик РАН, начальник отдела патологии сетчатки и зрительного нерва, директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Балацкая Н.В.** — к.б.н., ведущий научный сотрудник, начальник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Нероева Н.В.** — к.м.н., врач-офтальмолог отдела патологии сетчатки и зрительного нерва ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Authors:**

**Neroev V.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Retinal and Optic Nerve Pathology, Director, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

**Balatskaya N.V.**, PhD (Biology), Leading Research Associate, Head, Department of Immunology and Virology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

**Neroeva N.V.**, PhD (Medicine), Clinical Ophthalmologist, Department of Retinal and Optic Nerve Pathology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

**Кармокова А.Г.** — аспирант отдела патологии сетчатки и зрительного нерва ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Рябина М.В.** — к.м.н., врач-офтальмолог, старший научный сотрудник отдела патологии сетчатки и зрительного нерва ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Куликова И.Г.** — старший научный сотрудник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Karmokova A.G.**, Postgraduate Student, Department of Retinal and Optic Nerve Pathology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

**Ryabina M.V.**, PhD (Medicine), Clinical Ophthalmologist, Senior Research Associate, Department of Retinal and Optic Nerve Pathology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

**Kulikova I.G.**, Senior Research Associate, Department of Immunology and Virology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 29.04.2021  
Принята к печати 07.11.2021

Received 29.04.2021  
Accepted 07.11.2021