



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.13.3.012>
УДК 617.764.1:577.12]:617.713-007.64:004.891.3



Ситник Г.В. ✉, Степанова Ю.И.

Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

Биохимические маркеры в слезной жидкости пациентов при кератоконусе: результаты ROC-анализа

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция, дизайн исследования – Ситник Г.В.; сбор материала, редактирование, обработка, написание текста – Ситник Г.В., Степанова Ю.И.

Подана: 26.06.2023

Принята: 28.08.2023

Контакты: drhalinasitnik@gmail.com

Резюме

Цель. Установить прогностическое значение биохимических показателей слезной жидкости у пациентов с кератоконусом I–IV стадии.

Материалы и методы. В исследование вошли 34 пациента (56 глаз) с кератоконусом и 28 здоровых добровольцев. Сформированы следующие группы: 1-я группа – 28 глаз с кератоконусом I–III стадии и 2-я группа – 28 глаз с кератоконусом IV стадии, при которой заболевание выражено максимально и его лечение предполагает планирование и выполнение пересадки роговицы. Группу 3 (контрольная) составили здоровые добровольцы. Забор слезной жидкости для исследования концентраций биологически активных протеинов выполняли при помощи фильтровальных половок. Проведено определение концентрации в слезной жидкости следующих биохимических показателей: ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-17, коллаген IV типа, ММП-1, ММП-3 и ММП-9, ФНО- α и ФНО- β , альфа-2 макроглобулин, ТФР- β , СРБ, общая антиоксидантная активность.

Результаты. Установлены диагностически значимые уровни ММП-9, ИЛ-1 β и ИЛ-17, α 2-МГ в слезной жидкости, превышение которых может использоваться в комплексе диагностических критериев при скрининге пациентов в группе риска, при подозрении на кератоконус или при монолатеральном кератоконусе. Результаты ROC-анализа ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-17, СРБ в слезной жидкости пациентов с кератоконусом I–III стадии позволяют рассматривать их в качестве предикторов патологических изменений глазной поверхности, ассоциированных с прогрессированием кератоконуса до терминальной стадии. Определены пороговые уровни биологически активных протеинов в слезе, характеризующие терминальную стадию кератоконуса.

Заключение. Разработка новых диагностических инструментов повысит эффективность скрининга, диагностики прогрессирования болезни, выбора метода лечения пациентов, а также приблизит нас к пониманию патогенетических механизмов развития кератоконуса.

Ключевые слова: кератоконус, слезная жидкость, ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-17, коллаген IV типа, ММП-9, α 2-МГ, СРБ, ROC-анализ

Sitnik H. ✉, Stepanova Y.

Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

Biochemical Markers in the Tear Fluid of Patients with Keratoconus: Results of a ROC Analysis

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept, design of the study – Sitnik H.; collection of material, editing, processing, writing the text – Sitnik H., Stepanova Y.

Submitted: 26.06.2023

Accepted: 28.08.2023

Contacts: drhalinasitnik@gmail.com

Abstract

Purpose. To establish the prognostic value of the biochemical markers of the tear fluid in patients with stage I–IV keratoconus.

Materials and methods. The study included 34 patients (56 eyes) with keratoconus and 28 healthy volunteers. Group 1 consisted 28 eyes with stage I–III keratoconus, group 2 – 28 eyes with stage IV keratoconus, in which the symptoms of the disease were most pronounced and treatment required planning and performing a cornea transplant. Group 3 (control) were presented with healthy volunteers. Tear fluid was collected using filter strips to study the concentrations of biologically active proteins. The following biochemical markers were determined in the lacrimal fluid: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-17, type IV collagen, MMP-1, MMP-3 and MMP-9, TNF- α and TNF- β , alpha-2 macroglobulin, TGF- β , CRP, total antioxidant activity.

Results. Diagnostically significant levels of MMP-9, IL-1 β and IL-17, α 2-MG in the tear fluid were established and can be used in the complex of diagnostic criteria for screening patients at risk, with suspected keratoconus or with monolateral keratoconus. The results of ROC analysis of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, CRP in the tear of patients with stage I–III keratoconus allow to consider them as predictors of pathological changes on the ocular surface associated with the progression of keratoconus to the terminal stage. The cut-off levels of biologically active proteins in the tear, which characterize the terminal stage of keratoconus, were determined.

Conclusion. New diagnostic tools will increase the effectiveness of screening, diagnosis of the disease progression, choice of treatment method and will also bring us closer to understanding the pathogenetic mechanisms of keratoconus development.

Keywords: keratoconus, tear fluid, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-17, type IV collagen, MMP-9, α 2-MG, CRP, ROC-analysis

■ ВВЕДЕНИЕ

Кератоконус – это заболевание многофакторной природы, для которого характерно возникновение и прогрессирование конической деформации роговицы, появление астигматизма и рефракционной миопии, снижение остроты зрения, истончение и рубцевание стромы, что в терминальной стадии приводит к необходимости пересадки донорской роговицы.



В настоящее время в офтальмологии не существует единой концепции развития кератоконуса, однако не вызывает сомнений, что ключевая роль в патогенезе принадлежит генетически обусловленному механизму, который проявляется деградацией волокон коллагена стромы роговицы, значительным уменьшением количества клеток-кератоцитов за счет активации апоптоза и нарушением локальных иммуноопосредованных процессов и цитокинового баланса слезной жидкости [1–7].

Цитокины играют важную роль регуляторов многих процессов в организме на клеточном и тканевом уровне. Дисбаланс между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами вызывает каскад межклеточных взаимодействий, который приводит к значительным изменениям в гомеостазе глазной поверхности и может являться отправной точкой развития различных заболеваний [5, 8, 9].

Кератоконус в большинстве случаев протекает ассиметрично на обоих глазах, что дает основание предполагать, что не только системные, но и местные факторы играют роль в прогрессировании заболевания. По данным литературы, в слезной жидкости пациентов с кератоконусом увеличивается содержание провоспалительных цитокинов, в том числе интерлейкинов (ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-17), а также молекул клеточной адгезии ICAM и VCAM-1, наблюдается активация апоптоза кератоцитов под воздействием фактора некроза опухоли-альфа (ФНО-α) и ИЛ-1β, повышение уровня металлопротеиназ (ММП), в том числе ММП-9, а также факторов роста, что в итоге проявляется повреждением и истончением стромы роговицы [3, 10–14]. Однако в настоящее время отсутствует информация о диагностической значимости содержания биохимических параметров в слезе при кератоконусе.

Определение закономерностей экспрессии ряда биохимических аналитов в слезной жидкости при кератоконусе представляет большой интерес для установления возможных патогенетических факторов и предикторов прогрессии заболевания, а также для оценки эффективности проводимого лечения.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установить прогностическое значение биохимических показателей слезной жидкости у пациентов с кератоконусом I–IV стадии.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование вошли 34 пациента (56 глаз) с кератоконусом и 28 здоровых добровольцев. Были сформированы следующие группы: 1-я группа – 28 глаз с кератоконусом I–III стадии, 2-я группа – 28 глаз с кератоконусом IV стадии, при которой заболевание выражено максимально, а его лечение предполагает планирование и выполнение пересадки роговицы. Группу 3 (контрольная) составили здоровые добровольцы.

Забор слезной жидкости для исследования концентраций биохимических показателей выполняли при помощи фильтровальных полосок, после проведения теста Ширмера, по ранее описанному методу [15]. Критерием включения пациентов в исследование было согласие на многократное выполнение забора слезной жидкости.

Проведено определение концентрации в слезной жидкости следующих биохимических показателей: ИЛ-1α, ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-17, коллаген IV типа, ММП-1, ММП-3 и ММП-9, ФНО-α и ФНО-β, альфа-2 макроглобулин (α2-МГ), трансформирующий фактор роста-бета (ТФР-β), С-реактивный белок (СРБ), общая антиоксидантная активность (ОАА).

Лабораторные исследования проводили путем иммуноферментного анализа и спектрофотометрии с использованием реагентов CORMAY (Польша), Bioassay Technology Laboratory (Китай), IMTEC (Германия), Вектор-Бест (РФ). Определение ОАА проводили с помощью тест-набора «ОксиСтат» производства УП «ХОП ИБОХ НАН РБ».

Для установления биохимических маркеров кератоконуса в слезной жидкости и предикторов прогрессирования заболевания до терминальной стадии был выполнен ROC-анализ, который является высокоэффективным инструментом для дихотомического разделения пациентов на группы с помощью оптимального порогового значения теста, а также определения его диагностической надежности и предсказательной способности и широко используется в медицинских исследованиях [16].

Построение ROC-кривой отображает соотношение между диагностической чувствительностью (ДЧ) и диагностической специфичностью (ДС) теста. При этом ДЧ – это процент правильно классифицированных истинно положительных результатов от числа случаев с наличием признака, заданного классификатором, ДС – процент истинно отрицательных результатов теста от числа случаев с отсутствием заданного признака. Совокупность значений ДЧ и ДС определяет диагностическую надежность (значимость) изучаемого теста, которая обуславливает его способность отражать истинное состояние исследуемых параметров в организме пациента, а также соответствие результатов данного теста объективным симптомам заболевания [16].

Значение площади под ROC-кривыми (AUC) позволяет оценить прогностическое качество модели, для чего используется экспертная шкала оценки уровня AUC: 0,9–1,0 – отличное качество, 0,8–0,9 – очень хорошее, 0,7–0,8 – хорошее, 0,6–0,7 – среднее, 0,5–0,6 – неудовлетворительное. Таким образом, чем ближе кривая к диагонали (AUC=0,5), тем ниже диагностическая ценность показателя; чем ближе площадь под кривой к 1, тем эффективнее диагностический тест. Рассчитывается 95% доверительный интервал (ДИ) [17]. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Кроме того, ROC-анализ дает возможность определения порогового уровня (cut-off value) или точки отсечения одной диагностируемой группы от другой, то есть оптимального количественного значения диагностического теста, соответствующего максимальным показателям чувствительности и специфичности. Использование ROC-анализа позволяет выявлять наиболее значимые критерии, характеризующие изучаемый патологический процесс у обследуемых пациентов.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 1–3 и на рис. 1–6 представлены результаты ROC-анализа содержания следующих биохимических показателей слезной жидкости изучаемых групп: коллаген IV типа, ММП-1, ММП-3 и ММП-9, ФНО- α и ФНО- β , ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-17, α 2-МГ и ТФР- β , СРБ, ОАА.

Для выявления предикторов прогрессирования кератоконуса использовали результаты исследования слезной жидкости пациентов 1-й и 2-й групп, которые были сформированы по признаку степени выраженности патологического процесса – кератоконус I–III стадии и IV стадии (терминальной). В результате проведения ROC-анализа было установлено, что у пациентов с кератоконусом высокой диагностической надежностью обладают следующие биохимические показатели слезной жидкости: ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-17, СРБ (табл. 1).

Таблица 1
Характеристики ROC-кривых биохимических показателей слезной жидкости пациентов 1-й и 2-й групп
Table 1
Characteristics of ROC-curves of biochemical parameters of tear fluid in patients of 1st and 2nd groups

Параметр	Площадь под кривой (AUC)	95% доверительный интервал	Cut off (пороговый уровень)	ДЧ	ДС	р
ММП-9, нг/мл	0,57±0,086	0,50–0,73	208,0 нг/мл	100%	22,0%	НЗ
ФНО-α, пг/мл	0,84±0,054	0,74–0,95	152,9 пг/мл	93,0%	75,0%	0,000
ИЛ-1β, пг/мл	0,84±0,054	0,73–0,95	67,5 пг/мл	75,0%	82,0%	0,000
ИЛ-6, пг/мл	1,0	1,0–1,0	62,1 пг/л	100%	100%	0,000
ИЛ-17, пг/мл	0,71±0,072	0,56–0,85	649,4 пг/мл	100%	56,0%	0,028
α2-МГ, мг/дл	0,55±0,077	0,50–0,70	326,2 мг/дл	25,0%	96,4%	НЗ
СРБ, мг/л	1,0	1,0–1,0	21,0 мг/л	100%	100%	0,000

Примечание: НЗ – достоверность различий незначима.

С помощью построения характеристических кривых определены пороговые уровни содержания в слезе биохимических маркеров, превышение которых достоверно свидетельствует о прогрессировании поражения глазной поверхности при кератоконусе, утяжелении симптоматики заболевания и переходе его в терминальную стадию, для лечения которой предполагается выполнение пересадки роговицы (рис. 1А, В).

Пороговый уровень для концентрации ФНО-α в слезе составил 152,9 нг/мл, для ИЛ-1β и ИЛ-6 – 67,5 пг/мл и 62,1 пг/мл соответственно, для СРБ – 21,0 мг/л. При этом AUC ROC-кривой для этих показателей варьировала от 0,84 до 1,0, что отражает их отличную диагностическую эффективность. Для ИЛ-17 пороговый уровень составил 649,4 пг/мл при AUC ROC-кривой 0,71, ДЧ – 100%, ДС – 56,0%, что позволяет оценить его как диагностически достаточно значимый предиктор. Пороговые уровни

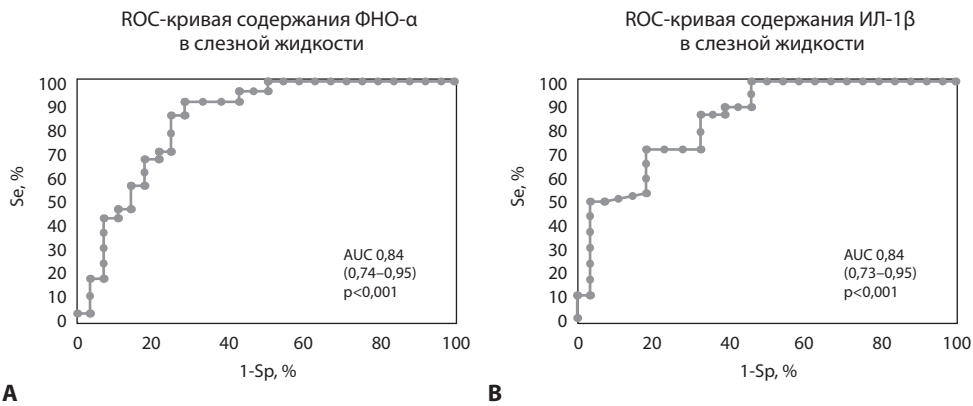


Рис. 1. Характеристические кривые содержания ФНО-α (А) и ИЛ-1β (В) в слезной жидкости у пациентов с кератоконусом 1-й и 2-й групп
Fig. 1. Characteristic curves of TNF-α (A) and IL-1β (B) level in tear fluid of patients with keratoconus of the 1st and the 2nd groups

содержания ММП-9 и $\alpha 2$ -МГ не рассматривались ввиду отсутствия достоверности полученных результатов и неудовлетворительного качества диагностических моделей с AUC ROC-кривой 0,57 и 0,55 соответственно.

Таким образом, результаты ROC-анализа и установленные нами пороговые уровни ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-17, СРБ в слезной жидкости пациентов с кератоконусом I–III стадии позволяют рассматривать данные биологически активные протеины в качестве предикторов патологических изменений глазной поверхности, ассоциированных с прогрессированием кератоконуса до терминальной стадии. При этом диагностически значимым является превышение пороговых уровней содержания в слезе ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-17, СРБ соответственно свыше 152,9 пг/мл, 67,5 пг/мл, 62,1 пг/мл, 649,4 пг/мл и 21,0 мг/л.

С целью выявления возможных патогенетических элементов развития заболевания ROC-анализ проводили попарно в 1-й и 3-й группах (кератоконус I–III стадии и здоровые) и во 2-й и 3-й группах (кератоконус IV и здоровые). В табл. 2 представлены результаты изучения содержания исследуемых аналитов в слезе у пациентов с кератоконусом I–III стадии (1-я группа) и у здоровых лиц (3-я группа).

Выявлено, что диагностической значимостью обладают такие показатели, как ММП-9, ИЛ-1 β и ИЛ-17, $\alpha 2$ -МГ с высокой AUC, ДЧ и ДС. С помощью построения характеристических кривых, которые представлены на рис. 2 и 3, установлены пороговые уровни этих показателей, которые могут быть использованы в качестве маркеров кератоконуса.

Пороговая точка для ММП-9 составила 115,4 нг/мл при AUC ROC-кривой 1,0 (ДИ 1,0–1; $p < 0,000$); ДЧ и ДС метода составили 100% (рис. 2А). Для концентрации в слезной жидкости таких интерлейкинов, как ИЛ-1 β и ИЛ-17, пороговые уровни составили соответственно 63,9 пг/мл и 404,1 пг/мл при AUC ROC-кривой 0,99 (ДИ 0,96–1,0; $p < 0,000$) и 1,0 (ДИ 1,0–1,0; $p < 0,000$) соответственно (рис. 2В, 3А). Пороговый уровень $\alpha 2$ -МГ составил 188,3 мг/дл при AUC ROC-кривой 0,82 (ДИ 0,71–0,94; $p < 0,000$) соответственно; при этом ДЧ теста составила 81,0%, ДС – 86,0% соответственно (рис. 3В).

Таблица 2
Характеристики ROC-кривых биохимических показателей слезной жидкости пациентов 1-й и 3-й групп

Table 2
Characteristics of ROC-curves of biochemical parameters of tear fluid in patients of 1st and 3^d groups

Параметр	Площадь под кривой (AUC)	95% доверительный интервал	Cut off (пороговый уровень)	ДЧ	ДС	p
ММП-9, нг/мл	1,0	1,0–1,0	115,4 нг/мл	100%	100%	0,000
ФНО- α , пг/мл	0,63 $\pm$ 0,074	0,50–0,78	98,1 пг/мл	50,0%	82,0%	НЗ
ИЛ-1 β , пг/мл	0,99 $\pm$ 0,013	0,96–1,0	63,9 пг/мл	95%	100%	0,000
ИЛ-6, пг/мл	0,57 $\pm$ 0,077	0,5–0,72	17,6 пг/л	39%	89%	НЗ
ИЛ-17, пг/мл	1,0	1,0–1,0	404,1 пг/л	100%	100%	0,000
$\alpha 2$ -МГ, мг/дл	0,82 $\pm$ 0,059	0,71–0,94	188,3 мг/дл	81%	86%	0,000
СРБ, мг/л	0,66 $\pm$ 0,081	0,51–0,82	3,1 мг/л	81%	54%	НЗ

Примечание: НЗ – достоверность различий незначима.

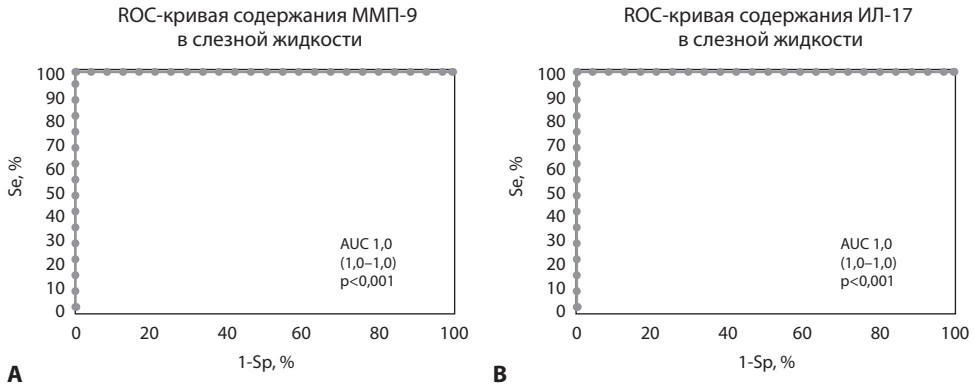


Рис. 2. Характеристическая кривая содержания ММП-9 (А) и ИЛ-17 (В) в слезе у пациентов с кератоконусом I–III стадии (группа 1) и у здоровых лиц (группа 3)
Fig. 2. Characteristic curves of MMP-9 (A) and IL-17 (B) level in the tear fluid of patients with keratoconus of stage I–III (group 1) and healthy individuals (group 3)

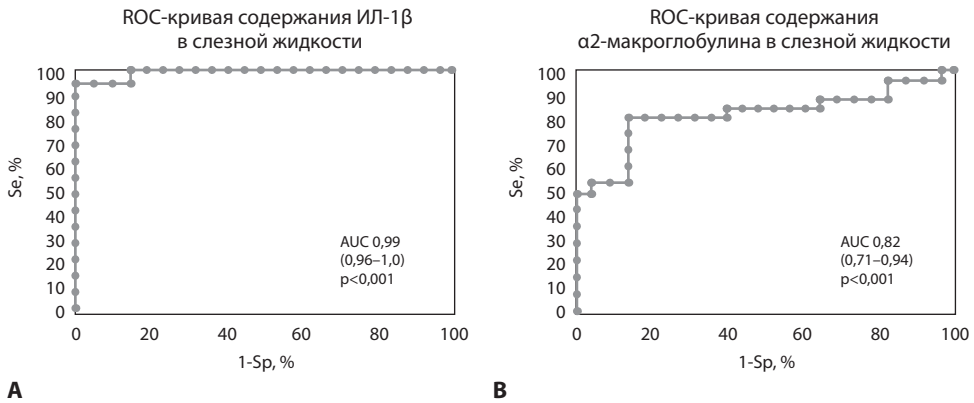


Рис. 3. Характеристическая кривая содержания ИЛ-1β (А) и α2-МГ (В) в слезе у пациентов с кератоконусом I–III стадии (группа 1) и у здоровых лиц (группа 3)
Fig. 3. Characteristic curves of IL-1β (A) and α2-MG (B) level in the tear fluid of patients with keratoconus of stage I–III (group 1) and healthy individuals (group 3)

Пороговые уровни содержания в слезе ФНО-α и ИЛ-6, а также СРБ, дихотомически разделяющие здоровых лиц и пациентов с кератоконусом, не рассматривались ввиду отсутствия достоверности полученных результатов.

Следовательно, нарастание концентрации ММП-9, ИЛ-1β, ИЛ-17, α2-МГ в слезе является одним из патогномоничных признаков формирования кератоконуса у пациентов офтальмологического профиля. Нами установлены диагностически значимые уровни ММП-9, ИЛ-1β и ИЛ-17, α2-МГ в слезной жидкости, превышение которых свыше 115,4 нг/мл, 63,9 пг/мл, 404,1 пг/л и 188,3 мг/дл соответственно, может использоваться в комплексе диагностических критериев при скрининге пациентов в группе риска, при подозрении на кератоконус или при монолатеральном кератоконусе.

В табл. 3 представлены результаты анализа содержания изучаемых анализов слезы у пациентов с кератоконусом IV стадии (группа 2) и здоровых добровольцев (группа 3). Выявлено, что такие биохимические показатели слезы, как коллаген IV типа, ММП-1 и ММП-9, ФНО-α и ФНО-β, ИЛ-1β, ИЛ-6 и ИЛ-17, α2-МГ и ТФР-β, СРБ и ОАА, следует рассматривать как биохимические маркеры терминальной стадии заболевания с высокой диагностической надежностью.

С помощью построения характеристических кривых (ROC-анализ), некоторые из которых представлены на рис. 4–6, установлены пороговые уровни содержания в слезе биохимических показателей, превышение которых сопряжено с утяжелением течения заболевания и развитием терминальной стадии кератоконуса.

Пороговый уровень коллагена IV типа в слезе составил 72,8 нг/мл при AUC ROC-кривой 0,92 (ДИ 0,78–0,99; $p<0,000$) (рис. 4А). Пороговые уровни металлопротеиназ составили: 14,8 нг/мл для ММП-1 и 208,0 нг/мл для ММП-9 при AUC ROC-кривой 0,84 (ДИ 0,74–0,95; $p<0,000$) и 1,0 (ДИ 1,0–1,0; $p<0,000$) соответственно; ДЧ тестов составила 75,0% и 100%, ДС – 82,0% и 100% соответственно (рис. 4В). Пороговый уровень ММП-3, дихотомически разделяющий здоровых лиц и пациентов с выраженной эктазией роговицы, не учитывался нами, так как имел низкие значения AUC ROC-кривой и отсутствие достоверности.

ROC-анализ содержания интерлейкинов в слезной жидкости при кератоконусе IV стадии показал неоднозначные результаты. Для концентрации в слезной жидкости таких интерлейкинов, как ИЛ-1β, ИЛ-6 и ИЛ-17, пороговые уровни составили соответственно 37,6 пг/мл, 62,1 и 603,2 пг/мл при AUC ROC-кривой 0,95 (ДИ 0,89–1,0;

Таблица 3
Характеристики ROC-кривых биохимических показателей слезной жидкости пациентов 2-й и 3-й групп
Table 3
Characteristics of ROC-curves of biochemical parameters of tear fluid in patients of 2nd and 3^d groups

Параметр	Площадь под кривой (AUC)	95% доверительный интервал	Cut off (пороговый уровень)	ДЧ	ДС	p
Коллаген IV типа, нг/мл	0,92±0,038	0,78–0,99	72,8 нг/мл	86,0%	89,0%	0,000
ММП-1, нг/мл	0,84±0,053	0,74–0,95	14,8 нг/мл	75,0%	82,0%	0,000
ММП-3, нг/мл	0,73±0,068	0,60–0,86	2,1 нг/мл	93,0%	46,0%	НЗ
ММП-9, нг/мл	1,0	1,0–1,0	208,0 нг/мл	100%	100%	0,000
ФНО-α, пг/мл	0,81±0,059	0,69–0,92	152,9 пг/мл	93,0%	61,0%	0,000
ФНО-β, пг/мл	0,91±0,042	0,82–0,99	130,8 пг/мл	82,0%	86,0%	0,000
ИЛ-1α, пг/мл	0,62±0,075	0,50–0,77	20,4 пг/мл	32,0%	100%	НЗ
ИЛ-1β, пг/мл	0,95±0,029	0,89–1,0	37,6 пг/мл	89,0%	90,0%	0,000
ИЛ-6, пг/мл	1,0	1,0–1,0	62,1 пг/мл	100%	100%	0,000
ИЛ-17, пг/мл	1,0	1,0–1,0	603,2 пг/мл	100%	100%	0,000
α2-МГ, мг/дл	0,83±0,055	0,72–0,94	191,0 мг/дл	75,0%	86,0%	0,000
ТФР-β, пг/мл	0,91±0,040	0,84–0,99	1475,7 пг/мл	71,0%	100%	0,000
СРБ, мг/л	1,0	1,0–1,0	21,0 мг/л	100%	100%	0,000
ОАА, ммоль/л	0,91±0,042	0,83–0,99	28,7 ммоль/л	77,0%	96,0%	0,000

Примечание: НЗ – достоверность различий незначима.

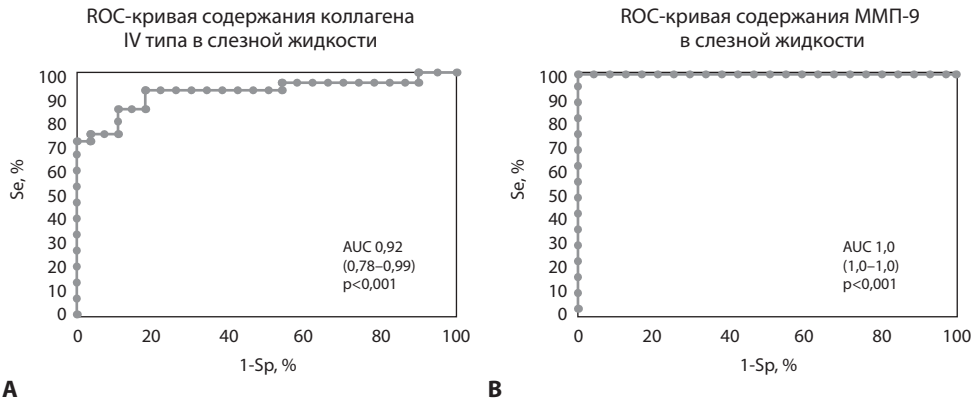


Рис. 4. Характеристические кривые содержания коллагена IV (А) и MMP-9 (В) в слезе у пациентов с кератоконусом IV стадии (группа 2) и у здоровых лиц (группа 3)
Fig. 4. Characteristic curves of collagen IV (A) and MMP-9 (B) level in the tear fluid of patients with keratoconus of stage IV (group 2) and healthy individuals (group 3)

$p < 0,000$) и по 1,0 (ДИ 1,0–1,0; $p < 0,000$) соответственно (рис. 5А). ДЧ тестов составила 89,0% и по 100%, ДС – 90,0% и по 100% соответственно. Пороговый уровень содержания ИЛ-1 α , дихотомически разделяющий здоровых лиц и пациентов с выраженной патологией роговицы, не рассматривался ввиду отсутствия достоверности полученного результата.

Пороговые уровни ФНО составили: 152,9 пг/мл для ФНО- α и 130,8 пг/мл для ФНО- β при AUC ROC-кривой 0,81 (ДИ 0,69–0,92; $p < 0,000$) и 0,91 (ДИ 0,82–0,99; $p < 0,000$) соответственно, при этом ДЧ тестов составила 93,0% и 82,0%, ДС – 61,0% и 86,0% соответственно (рис. 5В).

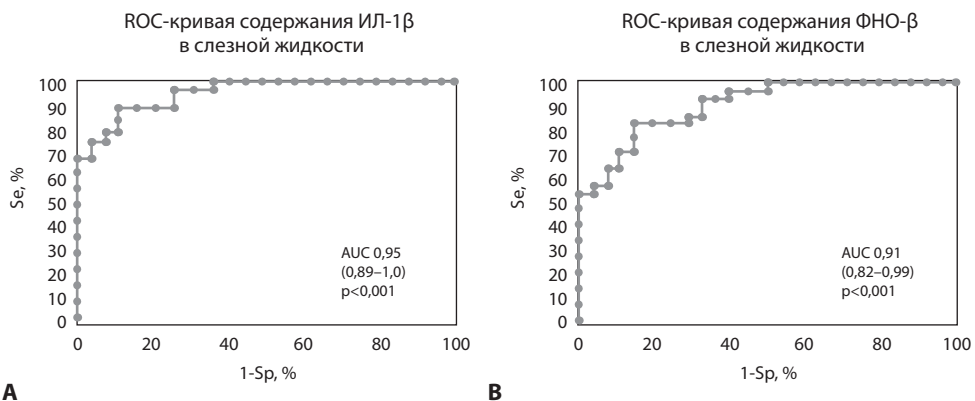


Рис. 5. Характеристические кривые содержания ИЛ-1 β (А) и ФНО- β (В) в слезе у пациентов с кератоконусом IV стадии (группа 2) и здоровых лиц (группа 3)
Fig. 5. Characteristic curves of IL-1 β (A) and TNF- β (B) level in the tear fluid of patients with keratoconus of stage IV (group 2) and healthy individuals (group 3)

Для содержания таких биоактивных маркеров в слезе, как $\alpha 2$ -МГ и ТФР- β , пороговые уровни составили 191,0 мг/дл и 1475,7 нг/л при AUC ROC-кривой 0,83 (ДИ 0,72–0,94; $p < 0,000$) и 0,91 (ДИ 0,84–0,99; $p < 0,000$) соответственно; при этом ДЧ тестов составила 75,0% и 71,0%, ДС – 86,0% и 100,0% соответственно (рис. 6А). Пороговая точка для уровня СРБ в слезе составила 21,0 мг/л при AUC ROC-кривой 1,0 (ДИ 1,0–1; $p < 0,000$); ДЧ и ДС метода составили 100%. Пороговое значение ОАА в слезной жидкости составило 28,7 ммоль/л при AUC ROC-кривой 0,91 (ДИ 0,83–0,99; $p < 0,000$); ДЧ теста составила 77,0%, ДС – 96,0% (рис. 6В).

Таким образом, в группе пациентов с кератоконусом IV стадии среди всех проведенных тестов в слезе такие показатели, как коллаген IV типа, ММП-1 и ММП-9, ФНО- α и ФНО- β , ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-17, $\alpha 2$ -МГ и ТФР- β , СРБ и ОАА, оказались наиболее значимыми маркерами заболевания с высокой AUC, ДЧ и ДС (табл. 3).

Однако, как следует из результатов, представленных в табл. 2, повышение экспрессии в слезе комплекса биомаркеров ММП-9, ИЛ-1 β и ИЛ-17, $\alpha 2$ -МГ характерно для дебюта заболевания и обусловлено запуском и развитием патологических изменений на глазной поверхности при кератоконусе I–III стадий.

Следовательно, при кератоконусе IV следует исключить вышеупомянутые маркеры и выделить другой комплекс диагностических критериев, определяющий именно терминальную стадию заболевания, связанную с выраженной активацией иммунновоспалительных и дегенеративных нарушений в тканях роговицы – это коллаген IV типа, ММП-1, ФНО- β , ТФР- β и ОАА. Превышение экспрессии соответствующих биохимических маркеров свыше 72,8 нг/мл, 14,8 нг/мл, 130,8 пг/мл, 1475,7 пг/мл и 28,7 ммоль/л свидетельствует о максимально выраженных патологических изменениях, характерных для терминальной стадии кератоконуса, при которых показано хирургическое лечение – пересадка донорской роговицы.

Определение в слезной жидкости содержания ММП-3 и ИЛ-1 α не имеет диагностической ценности при кератоконусе.

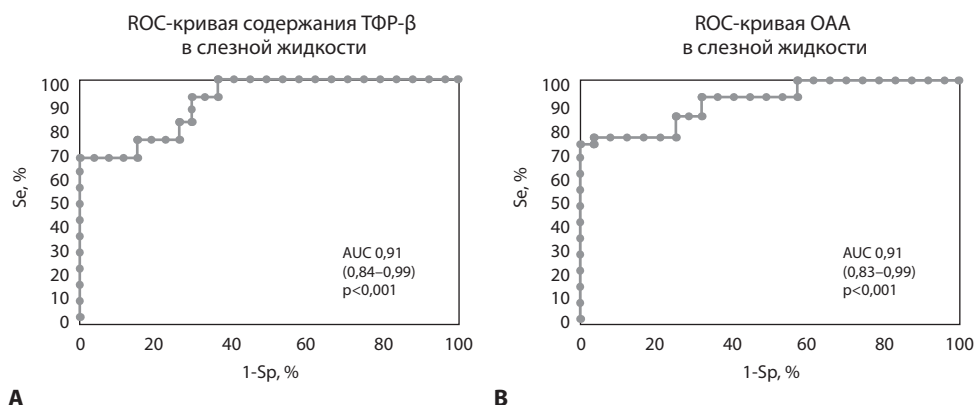


Рис. 6. Характеристические кривые содержания ТФР- β (А) и ОАА (В) в слезной жидкости у пациентов с кератоконусом IV стадии (группа 2) и здоровых лиц (группа 3)
Fig. 6. Characteristic curves of TGF- β (A) and TAA (B) level in the tear fluid of patients with keratoconus of stage IV (group 2) and healthy individuals (group 3)



Полученные результаты демонстрируют возможность использования новых данных о пороговых уровнях изученных биологически активных протеинов слезной жидкости у пациентов с кератоконусом различной стадии в качестве не только маркеров, но и предикторов прогрессии патологического процесса, что, несомненно, имеет большое научное и клиническое значение.

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки диагностической и прогностической ценности определения концентраций медиаторов воспаления и фиброза в слезной жидкости пациентов с кератоконусом, уровень которых значимо изменялся в пороговой точке отсечения при сравнении групп исследования, был проведен ROC-анализ, результаты которого представлены в данной статье.

В клинической практике необходимо использовать тесты, чувствительность и/или специфичность которых превышает 75% [18]. К тестам с высокой диагностической надежностью относятся показатели, площадь под кривой (AUC) которых была не менее 0,70 усл. ед., а также диагностическая чувствительность которых превышала 75%-й порог, так как основной задачей дальнейшего практического использования данных тестов являлось подтверждение, а не исключение патологического процесса у обследуемых пациентов.

Чувствительность теста отражает вероятность положительного результата у пациента с наличием конкретного заболевания, то есть способность выявлять заболевание, при этом чем она выше, тем чаще с помощью данного показателя будет выявляться заболевание, и, следовательно, диагностика с помощью этого теста будет более эффективной. В то же время если такой высокочувствительный тест оказывается отрицательным, то наличие заболевания маловероятно. Специфичность теста демонстрирует вероятность отрицательного результата у пациента без конкретной патологии, поэтому чем выше специфичность метода, тем надежнее с его помощью исключается заболевание. В медицинской диагностике оптимален тест, который имел бы одновременно высокую специфичность и чувствительность, однако на практике это труднодостижимо, так как повышение чувствительности теста неизбежно будет сопровождаться потерей его специфичности, и, наоборот, повышение специфичности сопряжено со снижением его чувствительности. Общая точность или эффективность является объективным отражением процесса ложноотрицательной диагностики (невыявления патологии) и ложноположительной диагностики (гипердиагностики) патологического процесса [16–18].

В доступных литературных источниках отсутствует информация, касающаяся диагностической значимости определения ряда изученных нами биохимических показателей в слезе при различных стадиях кератоконуса, поэтому установление новых диагностических критериев заболевания для использования в клинической практике является актуальной проблемой современного здравоохранения.

Биологически активные протеины слезной жидкости играют важнейшую роль в поддержании гомеостаза глазной поверхности у здоровых лиц и участвуют в манифестации и прогрессировании различной офтальмопатологии. Разработка новых диагностических инструментов повысит эффективность скрининга, диагностики прогрессирования болезни, выбора метода лечения пациентов, а также приблизит нас к пониманию патогенетических механизмов развития кератоконуса.

■ ВЫВОДЫ

1. У пациентов с кератоконусом I–III стадии установлены пороговые уровни ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-17, СРБ в слезной жидкости, превышение которых свыше 152,9 пг/мл, 67,5 пг/мл, 62,1 пг/мл, 649,4 пг/мл и 21,0 мг/л соответственно ассоциировано с прогрессированием кератоконуса до терминальной стадии, что позволяет рассматривать их в качестве предикторов.
2. Определен диагностически значимый комплекс патогенетических факторов кератоконуса, включающий ММП-9, ИЛ-1 β и ИЛ-17, α 2-МГ, установлены их пороговые уровни в слезной жидкости – 115,4 нг/мл, 63,9 пг/мл, 404,1 пг/л и 188,3 мг/дл соответственно, превышение которых свидетельствует в пользу наличия кератоконуса и может быть использовано при скрининге пациентов в группе риска, при подозрении на кератоконус и при монолатеральном кератоконусе.
3. Установлено, что превышение экспрессии в слезной жидкости коллагена IV типа, ММП-1, ФНО- β , ТФР- β , и ОАА свыше 72,8 нг/мл, 14,8 нг/мл, 130,8 пг/мл, 1475,7 пг/мл и 28,7 ммоль/л соответственно свидетельствует о максимально выраженных патологических изменениях, характерных для терминальной стадии кератоконуса, при которых показано хирургическое лечение – пересадка донорской роговицы.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Nichani P.A.H., Solomon B., Trinh T., Mimouni M., Rootman D., Singal N., Chan C.C. Investigating the role of inflammation in keratoconus: A retrospective analysis of 551 eyes. *European Journal of Ophthalmology*, 2023;33(1):35–43.
2. Pahuja N., Kumar N.R., Shroff R. et al. Differential molecular expression of extracellular matrix and inflammatory genes at the corneal cone apex drives focal weakening in keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016;57(13):5372–5382.
3. Gabr M.A., Jing L., Helbling A.R. et al. Interleukin-17 synergizes with IFN γ or TNF α to promote inflammatory mediator release and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in human intervertebral disc cells. *J Orthop Res*, 2011;29(1):1–7.
4. Engler C., Chakravarti S., Doyle J., Eberhart C.G., Meng H., Stark W.J., Kelliher C., Jun A.S. (2011) Transforming growth factor- β signaling pathway activation in Keratoconus. *Am J Ophthalmol*, 2011;151(5):752–759.e2
5. Balasubramanian S.A., Pye D.C., Willcox M.D. Effects of eye rubbing on the levels of protease, protease activity and cytokines in tears: relevance in keratoconus. *Clin. Exp. Optom.* 2013;96(2):214–218.
6. Pannebaker C., Chandler H.L., Nichols J.J. (2010) Tear proteomics in keratoconus. *Mol Vis*, 2010;16:1949–1957.
7. Balasubramanian S.A., Mohan S., Pye D.C., Willcox M.D. Proteases, proteolysis and inflammatory molecules in the tears of people with keratoconus. *Acta Ophthalmol.*, 2012;90(4):e303–e309.
8. Pflugfelder S.C., Bian F., de Paiva C.S. Matrix metalloproteinase-9 in the pathophysiology and diagnosis of dry eye syndrome. *Metalloproteinases In Medicine*. 2017;4:37–46.
9. Brzheskii V.V., Egorova G.B., Egorov E.A. *Dry eye syndrom and ocular surface diseases: clinic, diagnosis, treatment*. Moscow: GEOTAR-Media, 2016. (in Russian)
10. Lema I., Duran J.A. Inflammatory molecules in the tears of patients with keratoconus. *Ophthalmology*, 2005;112(4):654–659.
11. Lema I., Sobrino T., Duran J.A. et al. Subclinical keratoconus and inflammatory molecules from tears. *Br J Ophthalmol*, 2009;93(6):820–824.
12. Solomatin I., Gertner J., Meshcheryakova Y., Skitsko D. Comparative analysis of the levels of inflammation markers in the lacrimal fluid in patients with keratoconus. *Modern technologies in ophthalmology*. 2018;5:303–306. (in Russian)
13. Peyman A., Namgar M., Feizi A., Hakemi M.G., Nasab F.H., Pourazizi M. Interleukin-6 and tumor necrosis factor – a levels in tear film of keratoconus patients. *J Res Med Sci*. 2021;26:75.
14. Wojcik K.A., Blasiak J., Szaflik J., Szaflik J.P. Role of biochemical factors in the pathogenesis of keratoconus. *Acta biochimica Polonica*, 2014;61(1), 55–62.
15. Sitnik H.V., Kamyshnikov V.S., Lebedeva P.A., Stepanova Yu.I., Alekhovich L.I., Yuraga T.M. Laboratory study of tear fluid based on the use of standardized technology for its collection and sample preparation: results of validation of the method for taking biological fluid. *Laboratory diagnostics. Eastern Europe*. 2021;11(4):483–492.
16. Greenhalch T. *Fundamentals of evidence-based medicine: textbook*. 3rd ed. M.:GEOTAR-Media, 2008, 288 p. (in Russian)
17. Grigoriev S.G., Lobzin Yu.V., Skripchenko N.V. The role and place of logistic regression and ROC-analysis in solving medical diagnostic problems. *Journal of Infectology*. 2016;8(4):36–45. (in Russian)
18. Fletcher R., Fletcher S., Wagner E. *Clinical epidemiology. Fundamentals of evidence-based medicine*. M.: Media Sphere, 1998, 352 p. (in Russian)