



ПРОТЕОМНЫЙ ПРОФИЛЬ СЛЕЗЫ В ДИАГНОСТИКЕ УВЕИТА, АССОЦИИРОВАННОГО С ЮВЕНИЛЬНЫМ ИДИОПАТИЧЕСКИМ АРТРИТОМ: ОТ ПОСТАНОВКИ ЗАДАЧИ ДО ПЕРВЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

© В.Г. Часнык¹, Е.В. Гайдар¹, А.В. Кононов², Т. Аммосова^{3,4}, А. Хайнес⁵, М.Ф. Дубко¹, М.М. Костик¹, Т.Н. Никитина¹, Е.Д. Серогодская¹, О.В. Калашникова¹, В.В. Масалова¹, Л.С. Снегирева¹, В.А. Кельцев⁶, Л.И. Гребенкина⁶, Ю. Обухов³, К. Лин³, С. Нехай^{3,4}

¹Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, РФ;

²Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, РФ;

³Центр серповидноклеточной анемии, Университет Говарда, США;

⁴Департамент медицины, Университет Говарда, США;

⁵Центр хирургической и терапевтической офтальмологической помощи, США;

⁶Городская клиническая больница № 5, Тольятти

Для цитирования: Педиатр. – 2017. – Т. 8. – № 1. – С. 5–26. doi: 10.17816/PED815-26

Поступила в редакцию: 12.12.2016

Принята к печати: 03.02.2017

В статье представлены эпидемиологические и патофизиологические аспекты формулировки задачи распознавания увеитов (Ув), ассоциированных с ювенильным идиопатическим артритом (ЮИА), в терминах анализа протеомного профиля слезы, а также результаты попытки решения этой задачи с использованием тандемной масс-спектрометрии (ТМС). Актуальность раннего распознавания ЮИА-Ув определяется тем, что в лечении этой патологии в последние годы произошли революционные изменения в связи с успешным использованием генно-инженерных препаратов. Анализ данных литературы позволяет считать, что: 1) в Северо-Западном федеральном округе частота вновь выявленных случаев ЮИА-Ув составляет 0,5–0,7 случая на 100 000 детского населения при в 10 раз большей его пораженности; 2) без использования метотрексата в течение 4–7 лет после выявления ЮИА-Ув у 35–40 % детей формируется катаракта, у 5 % – глаукома; 3) даже при использовании метотрексата у 28–40 % детей неизбежно возникают осложнения, а у 10–36 % детей ухудшается зрение; 4) своевременная диагностика ЮИА-Ув и назначение адекватного лечения снижают риск осложнений до 4 % в год; 5) при существующей системе диагностики у трети детей ЮИА-Ув выявляют уже при наличии его осложнений. Выявление в слезе белковых информационных молекул-триггеров, запускающих мобилизацию/торможение клеток, определяющих течение Ув, противоречит традиционным представлениям о наличии естественных анатомических и физиологических барьеров, ограничивающих внутриглазную среду, но представляется возможным, поскольку ЮИА относится к системным заболеваниям, а Ув сопровождается нарушением гематоретинальных барьеров. С целью поиска белковых маркеров ЮИА-Ув исследована слеза 31 ребенка в возрасте 2–17 лет (17 – хронический ЮИА-Ув, 4 – ЮИА без Ув, 4 – идиопатический Ув, 3 – системный васкулит, 3 – здоровые дети). Обследуемых группировали с учетом стандартных клинических протоколов, использована ТМС с иерархической кластеризацией: наноклонка C18, хроматограф Shimadzu nano + масс-спектрометр LTQ Orbitrap XL, четырехступенчатое сканирование с применением Фурье-преобразования (FT-MS) в качестве первой ступени с последующей тандемной FT-MS/MS для трех наиболее значимых пептидов. Белки идентифицировали с использованием пакета Proteome Discoverer 1.2, международного протеинового индекса (International Protein Index (IPI)) и базы данных Human Protein Database. Количественный анализ проводили с использованием программы SIEVE 2.0 после нормализации по альбумину, полагая доказанной пропорциональность его концентрации разведению слезы при стимулированном слезоотделении. Характеристики протеинов экспортировали из SIEVE в пакет IPA (Ingenuity Pathway Analysis). По генетико-белковым идентификационным номерам искали связи выявленных белковых кластеров с известными биологическими феноменами. В результате ТМС в слезе было обнаружено более 3000 белков, из которых в результате последующего анализа были выбраны около 300 кандидатов на роль маркеров ЮИА-Ув. Концентрация

двух наиболее вероятных биомаркеров Ув – лактотрансферрина и липокалина – у детей с ЮИА-Ув была выше более чем в 10 раз. Анализ связей выявил ассоциацию этих белков с интерлейкином-1, фактором некроза опухолей – альфа и белками, участвующими в формировании эндотелиальной дисфункции, воспаления и ретинопатии. Было подтверждено участие в формировании Ув интерлейкина-23. В целом наше пилотное исследование, представляющее собой новый, не использованный ранее подход к идентификации ранних биомаркеров ЮИА-Ув, доказало его перспективность и выявило несколько белков-кандидатов.

Ключевые слова: ювенильный идиопатический артрит; увеит; диагностика; tandemная масс-спектрометрия; протеом; биомаркеры.

PROTEOMIC PROFILE OF TEARS FOR THE DIAGNOSIS OF UVEITIS ASSOCIATED WITH JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS: SETTING TARGETS TO ACHIEVE RESULTS

© V.G. Chasnyk¹, E.V. Gaidar¹, A.V. Kononov², T. Ammosova^{3,4}, A. Hynes⁵, M.F. Dubko¹, M.M. Kostik¹, T.N. Nikitina¹, E.D. Serogodskaya¹, O.V. Kalashnikova¹, V.V. Masalova¹, L.S. Snegireva¹, V.A. Keltsev⁶, L.I. Grebenkina⁶, Yu. Obukhov³, K. Lin³, S. Nekhai^{3,4}

¹St Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Russia;

²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St Petersburg, Russia

³Centre for Sickle Cell Disease, Howard University, USA;

⁴Department of Medicine, Howard University, USA;

⁵Eye Care Physicians and Surgeons, USA;

⁶Municipal Clinical Hospital No 5, Togliatti, Russia

For citation: *Pediatrician (St Petersburg)*. 2017;8(1):5-26

Received: 12.12.2016

Accepted: 03.02.2017

The paper presents epidemiologic and pathophysiological aspects of the problem statement for early recognition of Uveitis (Uv) associated with Juvenile Idiopathic Arthritis (JIA) in terms of the proteomic profile of tears as well as the results of an attempt to solve this problem by means of the Tandem Mass-Spectrometry (TMS). The solution of this problem is of the highest relevance due to revolutionary changes in treatment strategies after introducing highly effective biologics. Content analysis of literature reviews reveals the following: 1. the incidence of JIA-Uv in the Northwest Federal District of Russian Federation averages 0.5-0.7 per 100 000 of children with the prevalence being ten-fold higher than incidence, 2. without Methotrexate treatment 4-7 years after the diagnosis of JIA-Uv cataract is revealed in 35-40% of children and in 5% – glaucoma as well, 3. even with Methotrexate in 28-40% of children the complications of JIA-Uv inevitably will be revealed with blurred vision in 10-36% of children, 4. timely diagnosis of JIA-Uv and adequate treatment reduce the risk of complications by 4% per year, 5. current medical care system reveals in one third of children already the complications of JIA-Uv. Revelation in tears of the motif mode for protein interaction network, triggering mobilization/inhibition of cells which moderate Uv would contradict the traditional point of view on existing natural anatomic and physiologic barriers, isolating the intraocular space, but however seems to be possible since JIA is a systemic disease and Uv leads to damage of the blood-retinal barriers. To reveal protein biomarkers of JIA-Uv tears of 31 children aged 2-17 years were studied: 17 – chronic JIA-Uv, 4 – JIA without Uv, 4 – idiopathic Uv, 3 – systemic vasculitis, 3 – healthy children. We used the current clinical guidelines and standards to diagnose the pathology and TMS with hierarchical clustering methodology for protein identification: nano C18 column attached to Shimadzu nano LC coupled in-line to LTQ Orbitrap XL tandem mass spectrometer, data-dependent 4-event scan method, a survey FT-MS parent scan followed by sequential data dependent FT-MS/MS scans on the three most abundant peptide ions. Proteins were identified from the mass spectra results with Proteome Discoverer 1.2 software for protein database search using the International Protein Index (IPI) and Human Protein Database. Quantification was conducted using SIEVE 2.0 after normalization to albumin keeping in mind the validity of proportional change of its concentration after stimulation of lacrimation. Data from SIEVE were exported to IPA (Ingenuity Pathway Analysis) for filtering. The extracellular proteins selected in Ingenuity were further analyzed for disease relation and networks formation. TMS revealed more than 3000 proteins in tears and 300 of them have been considered to be the first row candidates to be biomarkers of JIA-Uv. The top two proteins, lactoferrin and lipocalin were upregulated over ten-fold in children with Uv. Pathway analysis placed these proteins into the inflammation-related IL-1 and TNF- α related networks which also included proteins involved in the development of endothelial dysfunction, inflammation and retinopathy. In addition, IL-23, which was previously linked to Uveitis, was found to be upregulated. Taken together, our proof-of-principle study presents a novel and yet untested approach for detection of early biomarkers of Uveitis and identified several candidate proteins.

Keywords: Juvenile idiopathic arthritis; uveitis; diagnosis; tandem mass-spectrometry; proteome; biomarkers.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как известно, увеит, т. е. воспаление увеальных (сосудистых) компонентов глаза — радужки, сосудистой оболочки и сетчатки, распространен в детской популяции не очень широко. В год в среднем выявляется 4,3–6,9 новых случаев увеита на 100 000 населения при общей распространенности около 30 случаев на 100 000 [23, 54, 70]. До 6 % всех увеитов у взрослых начинаются в детстве [67]. Диагностика и лечение увеита у детей, составляющих всего 5 % от всей численности страдающих увеитом в популяции [70], представляют большую проблему, поскольку течение заболевания часто маломанифестно [9], дети, как правило, не жалуются на ухудшение зрения и настроены негативно по отношению к активному офтальмологическому осмотру. В результате до 30–40 % детей, страдающих увеитом, в значительной степени теряют зрение [4, 107]. Слепота, по крайней мере односторонняя, наступает у 17–35 % детей, а ухудшение зрения ниже 20/40 — у 17–41 % детей [23, 79].

Причины увеита у детей, как и у взрослых, чрезвычайно разнообразны, причем неинфекционные увеиты являются наиболее частой формой, а в 60 % случаев причина заболевания вообще остается нераспознанной [9, 23, 54, 70, 79, 94].

Увеит классифицируют в соответствии со стандартами, определенными номенклатурой SUN (Standardization of Uveitis Nomenclature) [22, 42], предполагающей учет времени протекания патологического процесса и вовлеченных в него структур глаза (рис. 1) [40].

В табл. 1 представлены критерии увеита согласно протоколу SUN [42].

Увеит может быть острым, подострым, хроническим и рецидивирующим. В патологический процесс вовлекаются все отделы глаза (см. рис. 1), но с разной частотой: передний увеит — в 30–90 % случаев [54, 94], средний — в 25–42 % случаев [42, 54, 94], задний встречается

Таблица 1

Классификация степеней увеита и критерии обострения согласно протоколу SUN

Протокол SUN: степени увеита по количеству клеток в передней камере (для поля зрения щелевой лампы 1 мм ²)	
Степень	Количество клеток в поле зрения
0	<1
0,5+	1–5
1+	6–15
2+	16–25
3+	26–50
4+	50+

Протокол SUN: критерии обострения увеита по визуально наблюдаемому накоплению плазменных белков	
Степень	Описание
0	Нет обострения
1+	Легкое
2+	Умеренное (радужка/хрусталик чисты)
3+	Выраженное (радужка/хрусталик замутнены)
4+	Сильное (коагуляция фибрино/серозно-пластическая)

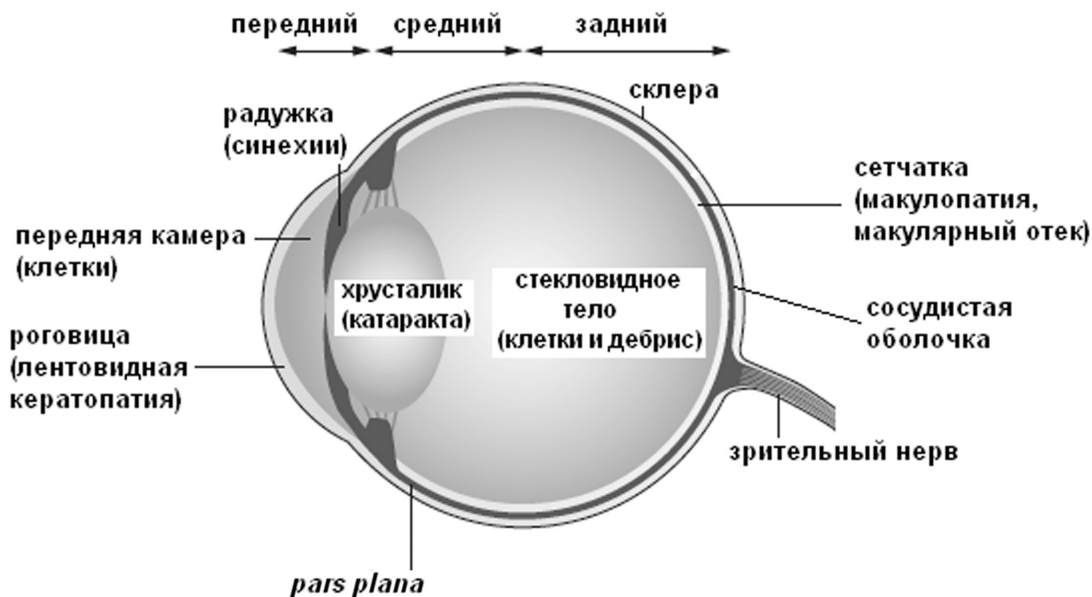


Рис. 1. Схематическое изображение глаза с указанием структур, поражаемых при переднем, среднем и заднем увеите. В скобках приведены симптомы поражения

редко и, как и у взрослых, в большинстве случаев обусловлен инфицированием токсоплазмой [23, 70]. Еще реже заболевание поражает все оболочки глаза (панувеит).

Из-за задержек с диагностикой ребенок часто поступает на первый осмотр окулиста уже со снижением зрения вследствие наличия осложнений увеита, в числе которых наиболее частыми являются катаракта (35–52 %), отек зрительного нерва (17–29 %), рубцы макулы (27 %), вторичная глаукома (15–33 %), неврит зрительного нерва (8 %), отслойка сетчатки (8 %) [4, 9, 39, 54, 79, 107], причем общеизвестно, что увеит, ассоциированный с ювенильным идиопатическим артритом, является наиболее частой причиной этих осложнений [54], вероятность возникновения которых при этой форме заболевания составляет до 34 % в течение последующих за постановкой диагноза 5–6 лет наблюдения [11].

Увеит — одно из наиболее частых экстраартикулярных проявлений ювенильного идиопатического (ревматоидного) артрита (ЮИА), представляющего собой достаточно гетерогенную группу хронических артритов детского возраста [34], из которых в части, имеющей отношение к увеиту, особое значение приобретает олигоартикулярная форма (поражение четырех или менее суставов в течение первых 6 месяцев заболевания).

Частота выявления новых случаев ЮИА в США и Канаде составляет 0,041–0,061 на 1000 детей при доле олигоартикулярной формы в группе детей с ЮИА в США, как и в Европе, 30–60 % [59]. В некоторых этнических группах (индейцы, коренные жители Азии и Австралии) эти значения могут быть на порядок больше [61, 63].

Данные о распространенности увеита, ассоциированного с ЮИА, весьма вариабельны: от 11,6 [5] до 30 % [66] всех детей с ЮИА, или у 30 % всех детей с ЮИА, имеющих антинуклеарные антитела [75].

Исследование большой группы детей с ЮИА, проведенное в Германии, выявило наличие увеита у 12 % больных в целом и у 16–25 % детей с олигоартикулярной формой артрита [34].

Широта диапазона вариации распространенности отчасти обусловлена наличием четырех известных управляющих групп факторов, часть из которых ассоциирована с генетическими особенностями популяций [64].

Большинство специалистов считают, что, кроме олигоартикулярной формы артрита, еще как минимум три фактора определяют большую вероятность возникновения увеита: женский пол, возраст дебюта артрита младше 6 лет, а также наличие антинуклеарных антител в крови [14, 35, 74].

В частности, в возрастной группе 1–2 года увеит был выявлен у 37 % девочек и только у 7 % мальчиков [82]. Такое же соотношение частоты увеита было обнаружено для той же возрастной группы у больных ЮИА с наличием антинуклеарных антител (47 против 10 % соответственно). Вместе с тем при манифестации артрита в возрасте позже 7 лет вероятность выявления увеита у девочек была меньше 10 %, а мужской пол более тесно ассоциировался с катарактой, макулярным отеком и папиллитом, возникающими в течение последующих 5 лет наблюдения [48], мужской пол определял более чем шестикратное увеличение вероятности слепоты [49].

Таким образом, пол, возраст дебюта артрита, наличие антинуклеарных антител не могут считаться общепринятыми неблагоприятными маркерами, особенно в том, что касается оценки независимости влияния каждого из этих факторов [13, 76, 82, 86].

Наиболее частой формой увеита, ассоциированного с ЮИА, является *хронический* передний увеит, который может быть уни- или билатеральным (доля последнего — 70 %). Доля переднего увеита достигает 83 %, средний, задний увеиты и панувеит встречаются значительно реже (9, 1, 7 % соответственно) [34].

В 68 % всех случаев течение увеита — хроническое, в 16 % случаев — острое и в 12 % случаев — рецидивирующее [81].

Острый передний увеит у больных ЮИА встречается обычно при энтезит- или HLA B27-ассоциированном артрите.

Среднее время от появления суставного синдрома до регистрации первых признаков возникновения увеита составляет 1,8 года, причем чем короче этот интервал, тем более тяжелым по течению является увеит и тем больше вероятность осложнений [104]. Иногда увеит возникает еще до клинических признаков поражения суставов, и длительность этого лага может достигать нескольких лет [38, 94]. Количество таких случаев доходит до 3–7 % детей с ЮИА, а сам факт появления увеита до артрита является признаком неблагоприятного течения увеита [34, 35].

Результаты ретроспективных исследований течения увеита, ассоциированного с ЮИА (см. обзор Sen E.S. et al., 2015), показывают, что в целом у 28–67 % детей возникают осложнения [6, 84, 102], а у 9,2–36 % детей высока вероятность существенного ухудшения зрения (<20/40 оба глаза) [6, 14, 102] из-за формирования катаракты (20,5 %), глаукомы (18,9 %) и лентовидной кератопатии (15,7 %).

Длительное мониторирование в семидесятые — восьмидесятые годы прошлого века (эпоха до введе-

ния метотрексата в лечение ЮИА) состояния детей с увеитом, ассоциированным с ЮИА [52, 87], позволило установить: через 7 лет у 42 % детей сформировалась катаракта, у 5 % — глаукома. К взрослому возрасту у половины пациентов формируется катаракта, у 22 % — глаукома и около 50 % имеют признаки активного увеита или получают местно кортикостероиды для купирования его обострения.

Надо признать, что в последние годы в связи с широким внедрением новых программ диагностики и иммуносупрессивной терапии частота осложнений постепенно уменьшается [53, 91]. Так, сравнение течения заболевания у 239 детей с ЮИА-ассоциированным увеитом, леченных в 1990–1993 гг., с таковым у 240 детей, леченных в 2000–2003 гг., приводит к выводу о существенном снижении частоты осложнений — с 35 до 21 % соответственно. До 91 % глаз удается сохранить, хотя и с падением остроты зрения. Около 6 % глаз полностью теряют способность видеть [11]. Вместе с тем частота обнаружения тяжелого увеита в момент постановки диагноза с 1993 г., когда были впервые предложены стандарты офтальмологического скрининга для детей, страдающих ЮИА, не уменьшилась [16].

Увеит, начавшийся у детей в раннем возрасте, может иметь двухфазное течение: снижение активности в возрасте около 9 лет с последующей активацией патологического процесса в пубертатном возрасте [37].

Среди факторов риска тяжелого течения увеита и развития осложнений, кроме раннего дебюта и короткого лага между появлением артрита и увеита, можно отметить мужской пол и наличие синехий при первом офтальмологическом осмотре [5, 16, 23, 46].

Ретроспективный анализ течения увеита, ассоциированного с ЮИА, у 327 пациентов позволил выявить общую частоту потери зрения до 20/50 или меньше, равную 0,18 случая/глаза × год, общую частоту развития новых осложнений — 0,15 случая/глаза × год. Для случаев, когда диагноз увеита был поставлен еще до появления осложнений, частота развития новых осложнений была существенно меньше — 0,04 случая/глаза × год. При этом наличие двустороннего поражения, длительное течение увеита, наличие задних синехий, низкое (<5 мм рт. ст.) или высокое (>21 мм рт. ст.) внутриглазное давление, активный увеит (степень ≥ 1 по количеству клеток в передней камере или $\geq 0,5$ по мутности стекловидного тела), офтальмологические операции в анамнезе являются факторами неблагоприятного прогноза [31].

Риск формирования катаракты у детей с хроническим передним увеитом в течение четырех лет, рассчитанный Thorne [103], соответствует формуле $0,04/\text{глаз} \times \text{год}$. При этом существенными неблагоприятными факторами являлись задние синехии, активный увеит и использование локально кортикостероидов. Вероятность катаракты была равна 0 при использовании двух или менее капель кортикостероидов, но возрастала до $0,16/\text{глаз} \times \text{год}$ при использовании трех и более капель в сутки.

ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общепринятым является мнение о том, что ЮИА является заболеванием, сопряженным с нарушением Т-клеточного звена иммунитета. Дисрегуляция цитокинов, в первую очередь фактора некроза опухоли — альфа (TNF- α), лежит в основе как олиго-, так и полиартикулярного артрита и увеита при генетическом детерминировании [45, 101] и предположительном (но недоказанном) участии внешних факторов [59].

Традиционно предполагается, что неинфекционные увеиты по своей природе являются аутоиммунными заболеваниями, возникающими вследствие потери иммунной толерантности к аутоантигенам и последующей активации аутореактивных Т-лимфоцитов [15, 55, 57, 68, 96]. Эта точка зрения сформировалась в результате анализа исследований, проведенных на экспериментальных моделях аутоиммунного увеита, ассоциированного с энцефалитом, а также вызванного введением эндотоксина, меланина [64].

Механизмы формирования увеита, ассоциированного с ювенильным идиопатическим артритом, не вполне ясны. Современные представления о его патогенезе схематически представлены на рис. 2 [15]. Неинфекционный увеит считается обусловленным вовлечением в патологический процесс Т-клеточного звена иммунитета с участием CD4⁺ Т-хелперных клеток типов 1 и 17, продуцирующих соответственно интерферон-гамма и интерлейкин-17 [15, 57, 68].

Активность этих провоспалительных Т-клеток управляется CD4⁺, CD25⁺, FoxP3⁺, Т-регуляторными клетками, в том числе и индуцируемыми. Патогенетическая роль как Т-хелперных клеток 1-го и 17-го типов, так и регуляторных Т-клеток при неинфекционном увеите установлена в ходе экспериментальных и клинических исследований, однако детальные механизмы участия каждого из этих звеньев в формировании заболевания неизвестны [2, 47, 71, 80].

Неполная элиминация в тимусе эффекторных прекурсоров Т-клеток, ответственных за распоз-

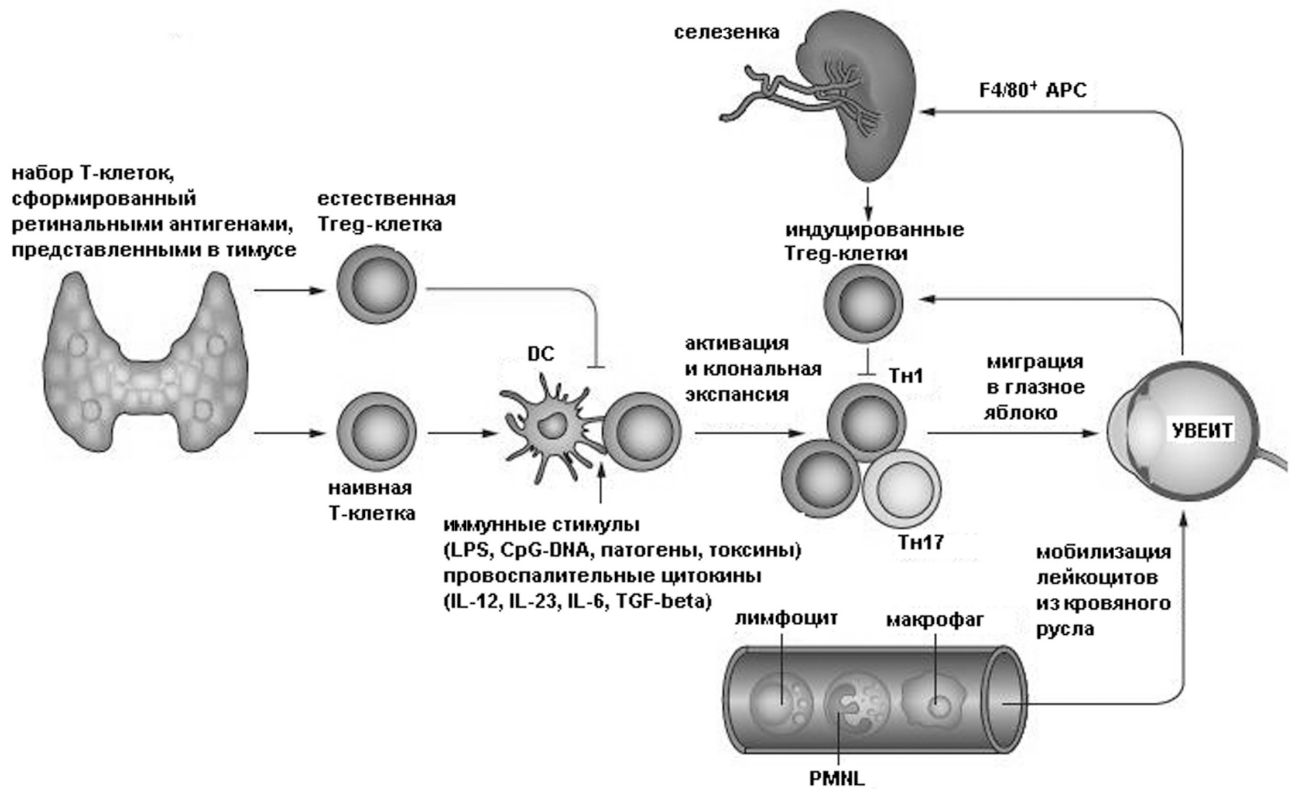


Рис. 2. Клеточные механизмы увеита: APC — антигенпрезентирующая клетка, DC — дендритная клетка, LPS — липополисахарид, PMNL — полиморфноядерный лимфоцит, Th — Т-хелпер, Treg-клетка — Т-регуляторная клетка, CpG-DNA — цитозин-фосфат-гуанин динуклеотид

навание ретинальных антигенов, приводит к существованию циркулирующих нетолеризованных Т-клеток. Эти клетки активируются антигенами или кроссреактивными антигенами сетчатки при наличии эндо- или экзогенных воспалительных стимулов и дифференцируются в аутоагрессивные Th1- или Th17-клетки.

Хотя естественные T_{reg}-клетки, происходящие из тимуса, тормозят активацию и клональную экспансию прекурсоров, некоторые активированные эффекторные Т-клетки все же достигают внутренней среды глаза. Идентификация антигенов глаза приводит к возникновению воспалительного каскада, результатом которого являются прорыв гематоретинального барьера, миграция лейкоцитов и формирование увеита. Одновременно антигены сетчатки, высвобожденные из поврежденных тканей, запускают генерацию антигенспецифических T_{reg}-клеток в селезенке, стремящихся остановить воспаление и ограничить патологический процесс в глазу.

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

Анализ данных литературы позволяет с известными допущениями сформулировать следующие выводы в части актуальности исследования.

1. Для популяции европеоидов Северо-Западного федерального округа России предположительная частота вновь выявленных случаев увеита, ассоциированного с ЮИА, составляет 0,5–0,7 случая на 100 000 детского населения при его в 10 раз большей пораженности, а для детских популяций коренных жителей Крайнего Севера эти частоты могут быть в разы больше.
2. Без использования метотрексата в терапии ЮИА-ассоциированного увеита в течение 4–7 лет после его выявления приблизительно у 35–40 % детей сформируется катаракта, у 5 % — глаукома, а к взрослому возрасту катаракта будет зарегистрирована у половины пациентов, глаукома — у каждого пятого, а половина пациентов будет продолжать получать местно кортикостероиды для купирования обострений увеита, причем если для купирования обострения будет требоваться 3 и более капель в сутки, то расчетная вероятность осложнений составит 16 % в год на 1 глаз.
3. При более широком использовании метотрексата у 28–40 % детей неизбежно возникнут осложнения, а у 10–36 % детей ухудшится зрение (20/40 и меньше) и 6 % глаз полностью потеряют

способность видеть из-за формирования катаракты (каждый пятый), глаукомы (каждый пятый) и лентовидной кератопатии (каждый шестой).

4. Постановка диагноза ЮИА-ассоциированного увеита до появления осложнений и назначение адекватного лечения снижает расчетный риск осложнений его течения до 4 % в год на 1 глаз.
5. Существующая в настоящее время система диагностики увеита не обеспечивает его раннего распознавания, в связи с чем у трети детей с ЮИА-ассоциированным увеитом диагноз ставят уже при наличии его осложнений.

Одним из ключевых элементов дифференциальной диагностики неинфекционных увеитов является необходимость наиболее раннего распознавания увеита, ассоциированного с ЮИА, поскольку в лечении этой формы патологии в последние годы произошли революционные изменения в связи с успешным использованием генно-инженерных (биологических) препаратов. В связи с высокой стоимостью этих препаратов их назначению предшествует декретированная процедура установки диагноза. Эта процедура неукоснительно соблюдается при наличии суставного синдрома, когда диагноз ЮИА-ассоциированного увеита не вызывает сомнений, но в случаях, когда поражение суставов запаздывает, а увеит уже регистрируют, биологическую терапию не назначают, поскольку идентифицировать форму увеита не представляется возможным, и его квалифицируют как идиопатический, что не является показанием для назначения этого вида терапии.

Решением проблемы было бы выявление маркеров ЮИА-ассоциированного увеита при общеизвестном отсутствии надежных маркеров самого ЮИА в случае отсутствия суставного синдрома. Естественным предложением является исследование внутриглазной жидкости с целью обнаружения элементов, являющихся маркерными. Но, во-первых, тонкие патофизиологические механизмы увеита, ассоциированного с ЮИА, неизвестны, во-вторых, забор внутриглазной жидкости у ребенка практикуется редко и только по очень ограниченным показаниям. Получение положительных результатов оценки внутриглазной жидкости по составу, например, слезы или крови с использованием достаточно трудоемких и дорогостоящих методов исследования маловероятно, поскольку:

- 1) противоречит традиционным представлениям о наличии естественных анатомических и физиологических барьеров;
- 2) состав слезы и крови определяется слишком широким спектром факторов, среди которых найти ключевые представляется очень сложной задачей.

Вместе с тем в пользу наличия ассоциации состава внутриглазной жидкости и слезы/крови свидетельствует:

- 1) известная системность патологического процесса при ЮИА, предположительно изменяющая и состав слезы/крови;
- 2) наличие дефектов гематоретинального барьера, возникающих вследствие воспаления и являющихся, по современным представлениям, одним из важных звеньев патогенеза увеита.

В связи с вышеизложенным наиболее вероятными маркерами увеита, ассоциированного с ЮИА, должны быть высокомолекулярные соединения, являющиеся, по сути, информационными молекулами — триггерами появления циркулирующих нетолеризованных к элементам внутренней структуры глаза Т-клеток, и/или запускающими активацию и клональную экспансию Т-клеток и/или мобилизацию лимфоцитов, макрофагов и полиморфноядерных клеток из кровяного русла, и/или тормозящими генерацию антигенспецифических T_{reg} -клеток в селезенке, стремящихся остановить воспаление и ограничить патологический процесс (см. рис. 2).

Инструментом такого поиска может быть прецизионная масс-спектрометрия, а средой, в которой надо искать информационные молекулы, по крайней мере на первом этапе, — слеза, поскольку очень большое количество разных по молекулярной массе соединений, содержащихся в крови, чрезвычайно затруднит как предварительную подготовку к проведению анализа, так и сам анализ.

АНАТОМО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОБРАЗОВАНИЯ СЛЕЗЫ И ЕЕ СОСТАВ

Как известно, слой слезы, покрывающей роговицу и конъюнктиву, имеет сложную структуру (рис. 3) [29], а в ее формировании участвует несколько типов желез (рис. 4) [44].

Железы Krause (около 40 на верхнем веке, 6–8 — на нижнем веке) и Wolfring/Ciaccio (около 2–5 на верхнем веке) по структуре и функции подобны основной слезной железе. Крипты Henle, железы Manz и бокаловидные клетки секретируют муцин. Мейбомиевы железы (около 50 на верхних веках и около 25 — на нижних) секретируют сложный субстрат с высоким содержанием липидов. Железы Zeis и Moll секретируют липиды. Жидкость, продуцируемая основной и дополнительными слезными железами, содержит также электролиты.

Количество и качество слезы регулируется по парасимпатическим (медиаторы: ацетилхолин и вазоактивный интестинальный пептид) и симпатическим (медиатор: норадреналин) каналам. Сенсорные сигналы передаются при участии суб-

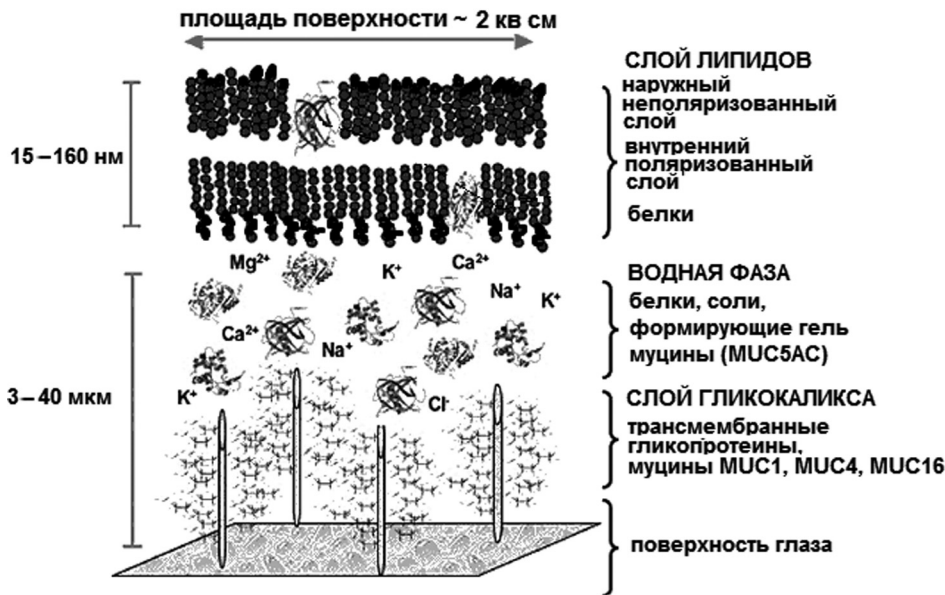


Рис. 3. Структура слезной пленки

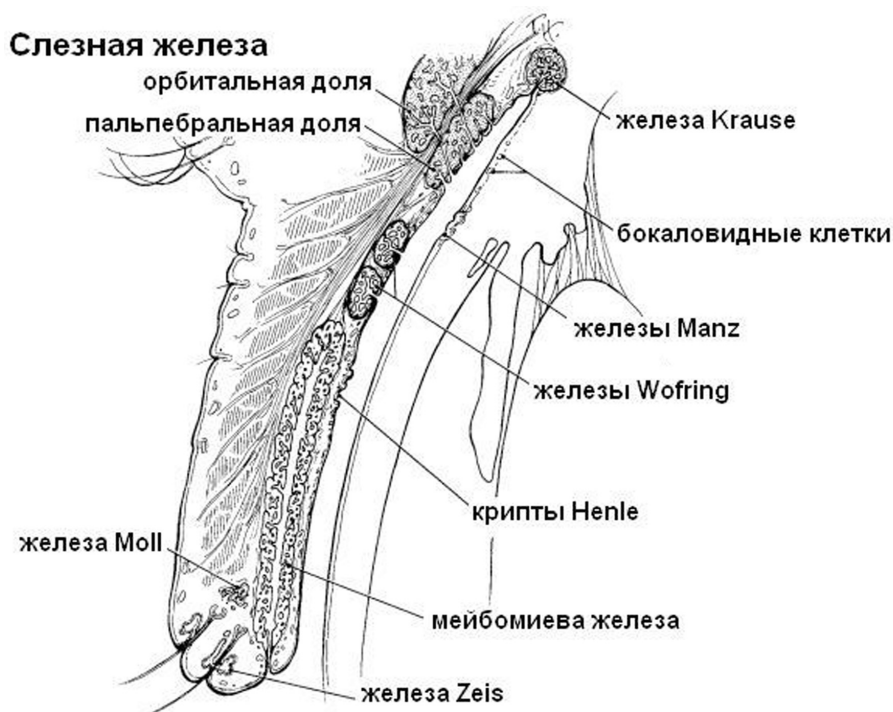


Рис. 4. Железы, принимающие участие в формировании слезы

станции P и кальцитонин-генерируемого пептида. Основная слезная железа, иннервируемая в основном парасимпатическими волокнами, функционирует рефлекторно в ответ на стимуляцию, а дополнительные железы обеспечивают нерелекторную базальную секрецию слезы [1].

Слеза изотонична, электролиты представлены в основном ионами Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- и в значи-

тельно меньшей степени — Mg^{2+} и Ca^{2+} . Слеза содержит в незначительных количествах мелкие молекулы (глюкоза, лактат, мочевины и др.).

Муцин MUC5AC формирует конъюнктивальный гель, еще как минимум два типа молекул этого гликопротеина — MUC1 и MUC4 — связываются с поверхностью роговицы и образуют гликокаликс.

Таблица 2

Относительное содержание белковых фракций в слезе

Фракции	В нестимулированной слезе, %	В стимулированной слезе, %
Альбумин	58,2	20,2
Глобулин	23,9	56,9
Лизоцим	17,9	22,9

Особый интерес представляют белки, содержащиеся в слезе. Классические представления о протеоме слезы определяют четыре белка, находящихся в ней в большом количестве: лизоцим, лактоферрин, липокалин и sIgA [25]. Эти белки секретируются слезными железами и клетками эпителия их протоков, а также плазматическими клетками, причем концентрация белковых компонентов в слезе очень зависит от того, каков ее объем: стимулированная слеза содержит меньшие концентрации белков (3–7 и 20 мг/л соответственно) при изменении их соотношения (табл. 2) [1].

С возрастом количество белка в слезе уменьшается пропорционально уменьшению объема слезы, что приводит к сохранению или даже увеличению концентрации в слезе, например, альбумина и церулоплазмينا [33, 62, 83], а во время сна секреция жидкости и основных белков, кроме sIgA, прекращается [90].

Эта вариабельность концентрации компонентов слезы является одним из факторов, требующих стандартизации отбора слезы для ее исследования [92].

В последние годы исследование протеома слезы вызывает все больший интерес [58, 69, 97, 98]. Все больше научных данных указывают на то, что анализ белкового состава слезы является перспективным направлением исследований его применимости для раннего распознавания офтальмологической патологии.

Количество белков, выявляемых в слезе, определяется методом, который при этом используется. Первые исследования белкового состава слезы проводили с использованием электрофореза в полиакриламидном геле [3, 18, 65], в дальнейшем все более широкое распространение стали полу-

чать различные подходы с использованием метода масс-спектрометрии [29, 58, 89]. В настоящее время наиболее широко построение протеомного профиля слезы используют для поиска биомаркеров синдрома сухого глаза [32, 43, 93, 97, 106]. С использованием все более совершенных методов исследования количество идентифицируемых в слезе белков увеличилось от 17 до 491 [89].

В настоящее время все белковые компоненты могут быть разделены на две группы [1].

Группа А. Белки, сходные с белками плазмы, их количество составляет <15 % всех белков слезы, некоторые из этих белков всегда присутствуют в слезе (альбумин, IgG, α-L-антитрипсин, трансферрин, α-L-антихимотрипсин, В-2-микροглобулин), другие — обнаруживаются транзиторно (церулоплазмин, гаптоглобин, цинк-α-2-гликопротеин).

Группа В. Специфические белки, синтезируемые только слезной железой, например белок RMP (rapid migration protein), и поступающие из прочих мест (лизоцим, лактоферрин, IgA).

Цель исследования: поиск белковых маркеров ЮИА-ассоциированного увеита в слезе с использованием прецизионной масс-спектрометрии и иерархической методики кластеризации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведение исследования одобрено этическим комитетом Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета.

В исследование включен 31 ребенок. Распределение детей по диагнозам представлено в табл. 3.

Диагностику и терапию проводили с использованием стандартных клинических протоколов [10, 78].

Таблица 3

Распределение обследованных по диагнозам

Диагноз	Количество обследованных	Количество девочек	Средний возраст, лет (диапазон)	Длительность заболевания, месяцев
ЮИА, хронический передний увеит 2+–3+	17	8	13 (2–16)	6–120
ЮИА без увеита	4	0	14–17	18–33
Системный васкулит	3	1	10–17	3–36
Идиопатический увеит	4	2	5–9	0–1
Здоровые дети	3	0	9–11	

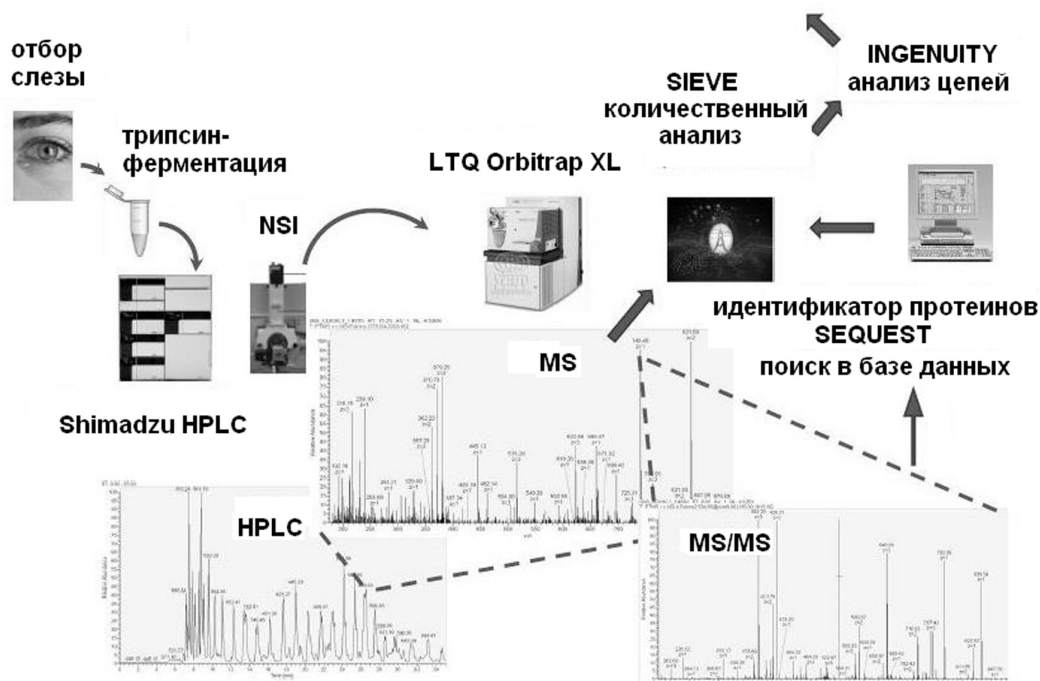


Рис. 5. Последовательность анализа проб слезы. NSI – наноспрей-ионизация, HPLC – высокопроизводительный жидкостный хроматограф, MS – масс-спектрометрия

Перед забором слезы пациенты наклоняли голову набок на 2–3 минуты для стекания слезы во внутренний угол глаза, после чего угол глаза промокали фильтровальной бумагой, не касаясь конъюнктивы для исключения активации рефлекторного слезоотделения. Высушенная при комнатной температуре слеза хранилась до 2–3 месяцев в стерильном герметично закрытом пакете в холодильнике при температуре 4,0–6,0 градуса Цельсия.

Последовательность анализа проб слезы представлена на рис. 5.

Непосредственно перед исследованием пробы были *in situ* алкилированы и обработаны трипсином. Полученные пептиды концентрировались и загружались в нанокололку C18, соединенную с жидкостным хроматографом Shimadzu nano, работающим *in line* с масс-спектрометром LTQ Orbitrap XL (Thermo Fischer Scientific, GA, USA). Масс-спектры белков определяли методом четырехступенчатого последовательного сканирования с использованием масс-спектрометрии с Фурье-преобразованием (FT-MS) в качестве первой ступени с последующей по результатам предшествующей ступени tandemной FT-MS/MS для трех наиболее значимых пептидов.

Белки идентифицировали с использованием пакета Proteome Discoverer 1.2, международного протеинового индекса (International Protein Index (IPI)) и базы данных Human Protein Database. С целью минимизации вариабельности состава слезы из-за активации лакримального рефлекса при ее отборе

все количественные оценки проводили после нормализации по альбумину. Альбумин был выбран для этой роли на основании того, что его концентрация в слезе пропорциональна ее разведению при стимулированном слезоотделении (см. табл. 2). С целью количественного анализа использовали программу SIEVE2.0 (Thermo Scientific, San Jose, CA).

Характеристики протеинов экспортировали из SIEVE в пакет IPA (Ingenuity Pathway Analysis). IPA фильтровал и сортировал эти данные с учетом внеклеточного и внутриклеточного происхождения выделенных протеинов. Внеклеточные белки отбирались и сортировались по уровню значения доверительной вероятности (p). Затем по генетико-белковым идентификационным номерам производили поиск связей выявленных белковых кластеров с уже известными биологическими феноменами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате масс-спектрометрии в слезе было обнаружено около 3000 протеинов, из которых в результате последующего анализа были выбраны около 300 наиболее вероятных кандидатов на роль маркеров ЮИА-ассоциированного увеита.

При сравнении протеома слезы здоровых и больных ЮИА-ассоциированным увеитом детей были выделены белки, концентрация которых существенно различалась (порог 2,5 раза, $p < 0,05$): концентрация 45 белков в опытной группе была выше, а концентрация 1 белка — ниже (табл. 4).

Таблица 4

Список белков – кандидатов на маркер ЮИА-ассоциированного увеита

Entrez Gene Name	Fold Change	p-Value	Symbol	Location	Type(s)
laminin, alpha 2	54,516	4,57E-02	LAMA2	Extracellular Space	other
coagulation factor IX	32,964	8,33E-04	F9	Extracellular Space	peptidase
primase and polymerase (DNA-directed)	30,827	1,63E-02	PRIMPOL	Extracellular Space	enzyme
laminin, alpha 4	30,236	5,48E-05	LAMA4	Extracellular Space	enzyme
mediator complex subunit 12-like	27,043	2,71E-02	MED12L	Extracellular Space	other
cystatin SA	26,125	3,57E-02	CST2	Extracellular Space	other
prolactin-induced protein	24,952	1,19E-06	PIP	Extracellular Space	peptidase
cystatin SN	23,691	3,39E-03	CST1	Extracellular Space	other
versican	19,297	2,26E-03	VCAN	Extracellular Space	other
fucosidase, alpha-L-2, plasma	19,185	3,15E-02	FUCA2	Extracellular Space	enzyme
hemcentin 2	18,659	1,08E-02	HMCN2	Extracellular Space	other
EF-hand calcium binding domain 7	17,314	4,63E-02	EFCAB7	Extracellular Space	other
carboxyl ester lipase	16,106	2,89E-02	CEL	Extracellular Space	enzyme
ubiquitin protein ligase E3B	15,049	4,83E-02	UBE3B	Extracellular Space	enzyme
lipocalin 1	14,899	2,80E-11	LCN1	Extracellular Space	transporter
CIq and tumor necrosis factor related protein 1	14,484	3,91E-02	CIQTNF1	Extracellular Space	other
SPARC related modular calcium binding 2	13,987	1,96E-02	SMOC2	Extracellular Space	other
lactotransferrin	13,493	6,71E-07	LTF	Extracellular Space	peptidase
WAP four-disulfide core domain 1	13,262	5,19E-03	WFDC1	Extracellular Space	other
cystatin S	11,353	4,05E-04	CST4	Extracellular Space	other
neurotrophin 3	11,047	1,02E-02	NTF3	Extracellular Space	growth factor
laminin, alpha 3	10,152	1,85E-02	LAMA3	Extracellular Space	other
laminin, alpha 5	10,152	1,85E-02	LAMA5	Extracellular Space	other
arylsulfatase family, member K	9,697	6,76E-03	ARSK	Extracellular Space	enzyme
contactin associated protein-like 3	9,407	2,38E-02	CNTNAP3	Extracellular Space	other
collagen, type XXI, alpha 1	9,35	2,34E-02	COL21A1	Extracellular Space	other
dynein, axonemal, heavy chain 3	8,95	9,82E-05	DNAH3	Extracellular Space	enzyme
fibroblast growth factor 3	8,567	1,65E-03	FGF3	Extracellular Space	growth factor
slit homolog 3 (Drosophila)	8,567	1,65E-03	SLIT3	Extracellular Space	other
BMP binding endothelial regulator	7,951	2,74E-03	BMPER	Extracellular Space	other
cilia and flagella associated protein 58	7,628	2,05E-02	CFAP58	Extracellular Space	other
zinc finger, C3H1-type containing	6,58	3,82E-02	ZFC3H1	Extracellular Space	other
lysozyme	5,845	3,40E-03	LYZ	Extracellular Space	enzyme
thyroglobulin	5,467	4,73E-02	TG	Extracellular Space	other
ADAM-like, decysin 1	5,072	1,74E-02	ADAMDEC1	Extracellular Space	peptidase
chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	5,008	2,74E-02	CX3CL1	Extracellular Space	cytokine
secretoglobin, family 1D, member 1	3,933	4,24E-02	SCGB1D1	Extracellular Space	other
relaxin 2	3,839	3,50E-02	RLN2	Extracellular Space	other
secretoglobin, family 2A, member 1	3,814	5,39E-03	SCGB2A1	Extracellular Space	other
transferrin	3,775	2,57E-02	TF	Extracellular Space	transporter
von Willebrand factor	3,479	4,52E-02	VWF	Extracellular Space	other
proline rich 4 (lacrimal)	3,272	2,20E-02	PRR4	Extracellular Space	other
single-pass membrane protein with aspartate-rich tail 1	3,182	1,84E-02	SMDT1	Extracellular Space	other

Таблица 4 (Окончание)

Entrez Gene Name	Fold Change	p-Value	Symbol	Location	Type(s)
growth differentiation factor 9	2,899	2,41E-02	GDF9	Extracellular Space	growth factor
immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)	2,616	1,71E-03	IGHG1	Extracellular Space	other
albumin	1	1,17E-02	ALB	Extracellular Space	transporter
fibroblast growth factor 8 (androgen-induced)	-4,679	2,87E-02	FGF8	Extracellular Space	growth factor

Таблица 5

Белки – маркеры увеита, ассоциированного с ювенильным идиопатическим (ревматоидным) артритом

Entrez Gene Name	Fold Change	p-Value	Symbol	Location	Type(s)
lipocalin 1	14.899	2.80E-11	LCN1	Extracellular Space	transporter
lactotransferin	13.493	6.71E-07	LTF	Extracellular Space	peptidase
prolactin-induced protein	24.952	1.19E-06	PIP	Extracellular Space	peptidase
laminin, alpha 4	30.236	5.48E-05	LAMA4	Extracellular Space	enzyme
dynein, axonemal, heavy chain 3	8.950	9.82E-05	DNAH3	Extracellular Space	enzyme
cystatyn S	11.353	4.05E-04	CST4	Extracellular Space	other
coagulation factor IX	32.964	8.33E-04	F9	Extracellular Space	peptidase
fibroblast growth factor 3	8.567	1.65E-03	FGF3	Extracellular Space	growth factor
slit homolog 3 (Drosophila)	8.567	1.65E-03	SLIT3	Extracellular Space	other
immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)	2.616	1.71E-03	IGHG1	Extracellular Space	other
versican	19.297	2.26E-03	VCAN	Extracellular Space	other
BMP binding endothelial regulator	7.951	2.74E-03	BMPER	Extracellular Space	other
cystatin SN	23.691	3.39E-03	CST1	Extracellular Space	other
lysozyme	5.845	3.40E-03	LYZ	Extracellular Space	enzyme
WAP four-disulfide core domain 1	13.262	5.19E-03	WFDC1	Extracellular Space	other
secretoglobin, family 2A, member 1	3.814	5.39E-03	SCGB2A1	Extracellular Space	other
arylsulfatase family, member K	9.697	6.76E-03	ARSK	Extracellular Space	enzyme
neurotrophin 3	11.047	1.02E-02	NTF3	Extracellular Space	growth factor
hemicentin 2	18.659	1.08E-02	HMCN2	Extracellular Space	other
albumin	1.000	1.17E-02	ALB	Extracellular Space	transporter

С учетом кратности различия и уровня достоверной вероятности в группу маркеров вошли липокалин 1 (LCN₁), лактотрансферин (LTF), пролактин-индуцированный протеин (PIP) и ламинин- α -4 (LAMA₄) (табл. 5).

IPA-анализ позволил сформировать группу воспалительных кластеров, состоящих из протеинов

с наилучшим Z-критерием, и описать этот кластер в терминах известных биологических феноменов (рис. 7). Один из таких кластеров представлен на рис. 6, выявленные связи с биологическими феноменами — на рис. 7.

Как видно, в кластеры включены ранее не ассоциированные с увеитом белки, в частности IL-23A.

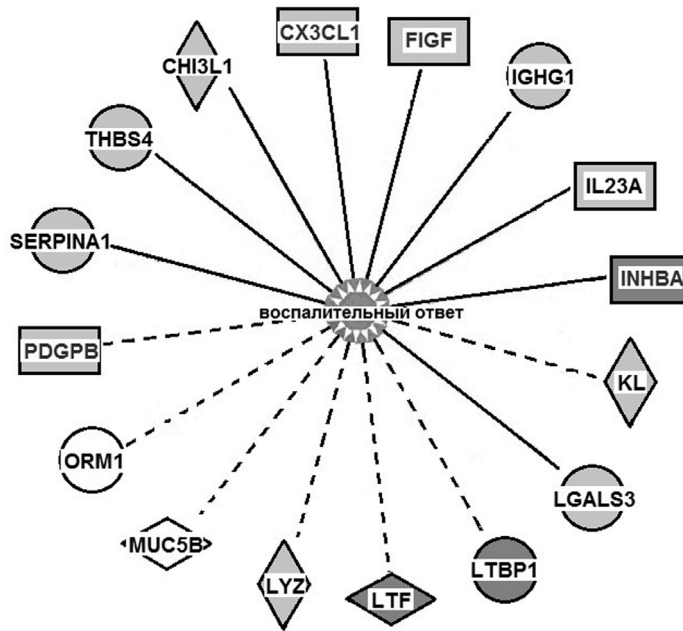


Рис. 6. Кластер белков, сформированный программой Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Серый цвет кодирует большее содержание белка в слезе больных ЮИА-ассоциированным увеитом, чем у здоровых. Оттенок серого кодирует уровень экспрессии. Белый цвет кодирует белки, содержание которых в слезе больных ЮИА-ассоциированным увеитом меньше, чем у здоровых

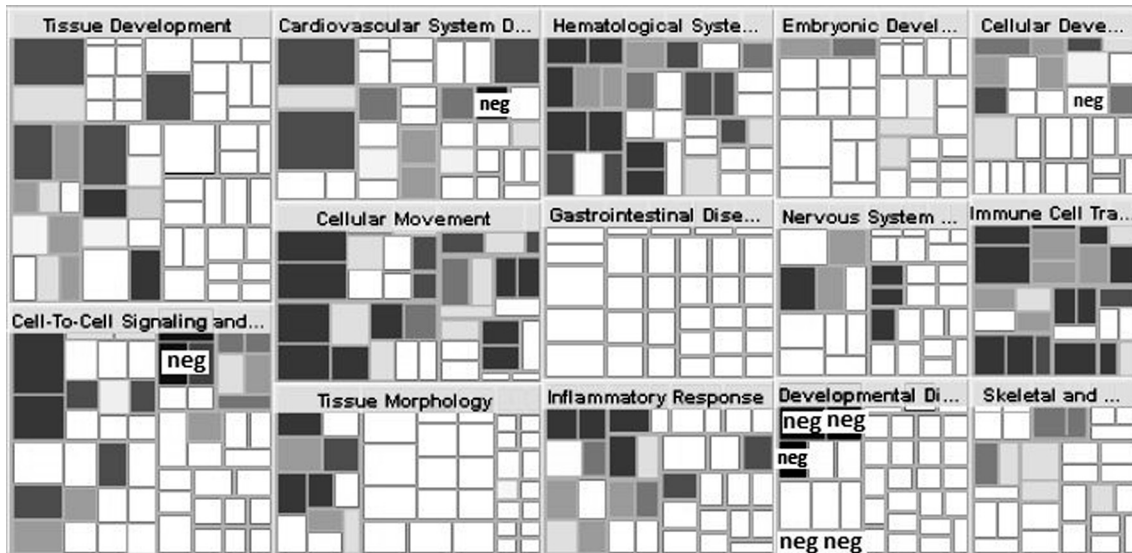


Рис. 7. Программа IPA: фрагмент результатов поиска известных биологических феноменов, описываемых совокупностью белковых кластеров, выявленных в слезе больных ЮИА-ассоциированным увеитом. Площадь элемента пропорциональна доверительной вероятности p , серый цвет отражает вариабельность Z-критерия: белый цвет – не определено, neg – область отрицательных значений Z-критерия в диапазоне от 0 до -2,437, интенсивность оттенка серого отражает динамику положительного значения Z-критерия от 0 до +2,618

Выявленные из слезы больных ЮИА-ассоциированным увеитом белковые кластеры в наибольшей степени могут быть описаны в терминах «развитие ткани», «межклеточная передача сигнала», «сердечно-сосудистая система», «миграция клеток», «гематология», «воспалительный ответ», «трансформа-

ция иммунных клеток», что в целом соответствует современным представлениям о патогенезе ЮИА-ассоциированного увеита.

Один из сформированных программой IPA кластеров белков, включающих в себя, в частности, лактоферрин группировался вокруг цитокина

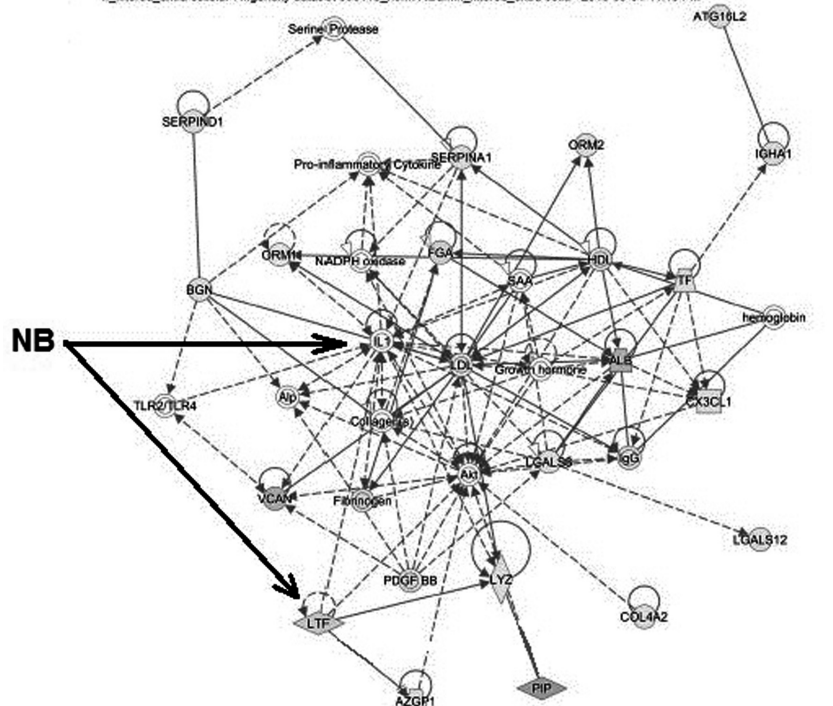


Рис. 8. Белковый кластер, сформированный вокруг интерлейкина-1 (IL-1), альбумина (ALB), человеческого гомолога вирусного онкогена (Akt), липопротеинов низкой плотности (LDL) и гормона роста (Growth hormone) при участии лакто-трансферрина (LTF)

IL-1 (рис. 8), что дало основания для более детального исследования связи ЮИА-ассоциированного увеита с системным васкулитом.

Как видно на рис. 6, воспалительный ответ обеспечивается активацией продукции LTF и еще 13 белков.

В отличие от увеита увеличения экспрессии лакто-трансферрина при системном васкулите не зарегистрировано, а экспрессия липокалина даже снизилась.

Как видно на рис. 9, выявленные в слезе больных системным васкулитом белковые кластеры

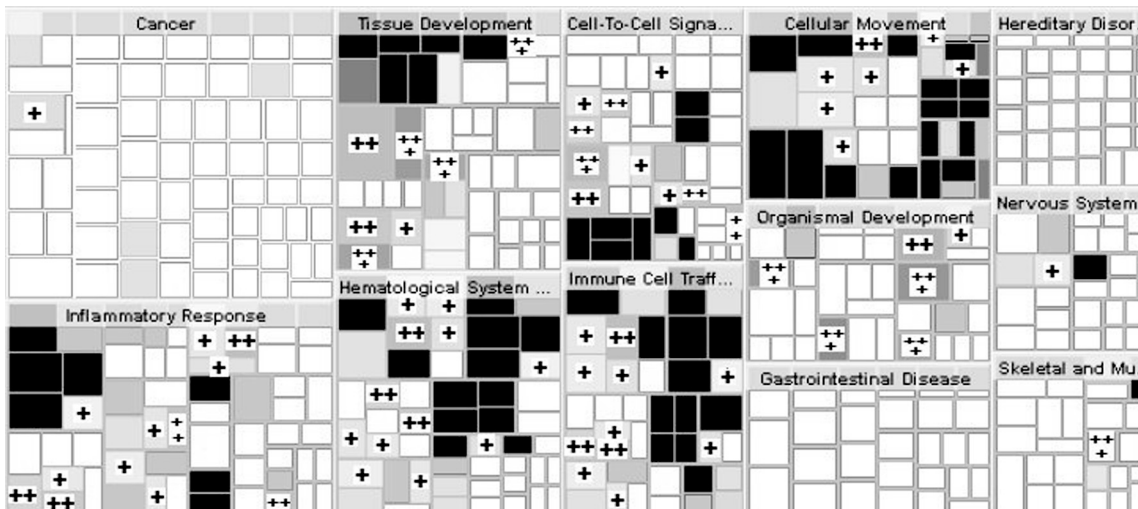


Рис. 9. Программа IPA: фрагмент результатов поиска известных биологических феноменов, описываемых совокупностью белковых кластеров, выявленных в слезе детей, больных системным васкулитом. Площадь элемента пропорциональна доверительной вероятности p , серый цвет отражает вариабельность Z-критерия: белый цвет – не определено, оттенки серого до черного – динамика значений Z-критерия в области отрицательных значений от 0 до -1,660, количество крестиков – динамика положительного значения Z-критерия от 0 до +2,219

Categories	Diseases or Functions Annotat	p-Value	Predicted Activ	Activation z-score	Notes	Molecules	# Molecules
<input type="checkbox"/> Inflammatory Response	inflammatory response	7.81E-04	Increased	3.272	bias	*CHI3L1, *CX3CL1, *FIGF, *IGHG1, *IL23A, *INHBA, *KL, *... all 16	16
<input type="checkbox"/> Cellular Movement	migration of cells	1.43E-08	Increased	2.891	bias	ALB, *BGN, *CHI3L1, *COL4A2, *CSH1/CSH2, *CX3CL1, *ED... all 41	41
<input type="checkbox"/> Tissue Morphology	quantity of cells	6.59E-06	Increased	2.891	bias	*BGN, *CBLN4, *CHI3L1, *CX3CL1, *FGF3, *FGF6, *FGF8, *... all 34	34
<input type="checkbox"/> Cell-To-Cell Signaling and Inter	activation of antigen prese	1.67E-04	Increased	2.779	bias	*CHI3L1, *CX3CL1, *IGHG1, *IL23A, *INHBA, *LGALS3, *LT... all 10	10
<input type="checkbox"/> Cell-To-Cell Signaling and Inter	activation of macrophages	6.76E-05	Increased	2.608	bias	*CHI3L1, *CX3CL1, *IGHG1, *IL23A, *INHBA, *LGALS3, *LT... all 9	9
<input type="checkbox"/> Cellular Movement	homing of cells	5.95E-03	Increased	2.576	bias	*CX3CL1, *FIGF, *IGHG1, *IL23A, *INHBA, *LGALS3, *NTF3, *... all 11	11
<input type="checkbox"/> Hematological System Develop	quantity of blood cells	4.65E-04	Increased	2.500	bias	*CHI3L1, *CX3CL1, *FGF6, *IGK, *IGKC, *IL23A, *INHBA, *... all 20	20
<input type="checkbox"/> Cellular Movement, Immune Cel	leukocyte migration	4.11E-06	Increased	2.482	bias	ALB, *BGN, *CHI3L1, *CX3CL1, *EDIL3, *FGF3, *FIGF, *IGH... all 22	22
<input type="checkbox"/> Cell-To-Cell Signaling and Inter	activation of cells	1.08E-08	Increased	2.467	bias	ALB, *BMPER, *CIQTNF1, *CHI3L1, *CX3CL1, *FGF6, *HSPG2 all 28	28
<input type="checkbox"/> Cellular Movement, Hematolog	chemotaxis of myeloid cell	1.74E-03	Increased	2.440	bias	*CX3CL1, *FIGF, *IL23A, *INHBA, *LGALS3, *PDGFB, *SERPI... all 8	8
<input type="checkbox"/> Cellular Movement, Hematolog	chemotaxis of rheinocytes	1.91E-03	Increased	2.440	bias	*CX3CL1, *FIGF, *IL23A, *INHBA, *LGALS3, *PDGFB, *SERPI... all 8	8

а

Categories	Diseases or Functions Annotat	p-Value	Predicted Activ	Activation z-score	Notes	Molecules	# Molecules
<input type="checkbox"/> Organismal In	Bleeding	3.77E-06	Increased	2.774	bias	ALB, *AMY2A, *BGN, *COL4A2, *CST3, *F9, *GRN, *LAMA4, *LAMC1, *N... all 13	13
<input type="checkbox"/> Development	congenital anomalies of kidn	3.19E-03	Increased	2.000	bias	*FRAS1, *IFNG, *LAMC1, *NPHP3, *PCSK5, *SLIT3 all 6	6
<input type="checkbox"/> Infectious Dise	Bacterial Infections	7.36E-05		1.999	bias	*GRN, *IFNG, *IGHG3, *IGK, *JCHAIN, *LILRA3, *LTF, *LUM, *LYZ, *MUC... all 11	11
<input type="checkbox"/> Development	aplasia	8.19E-04		1.982	bias	*FRAS1, *IGKC, *LAMC1, *PCSK5, *SLIT3 all 5	5
<input type="checkbox"/> Embryonic Deve	formation of muscle	2.35E-04		1.980	bias	*BGN, *ELN, *FMOD, *IFNG, *IGFBP5, *LAMA2, *LAMA5, *NTF3, *PAPPA, *... all 10	10
<input type="checkbox"/> Cardiovascular	vasculogenesis	8.45E-07		1.786	bias	*APOA1, *BMPER, *COL4A2, *CST3, *CX3CL1, *EDIL3, *ELN, *FGF5, *GRN, *... all 19	19
<input type="checkbox"/> Connective Tiss	arthritis	1.16E-07		1.767	bias	ALB, *APOA1, *AZGP1, *BGN, *COL4A2, *COL4A5, *CST3, *FMOD, *GRN, *... all 23	23
<input type="checkbox"/> Cardiovascular	endothelial cell development	1.25E-04		1.650		*APOA1, *BMPER, *COL4A2, *FGF5, *GRN, *IFNG, *IGHG1, *SERPINA3, *... all 10	10
<input type="checkbox"/> Cellular Deve	differentiation of bone cells	3.77E-04		1.456		*BGN, *BMPER, *CST3, *IFNG, *IGFBP5, *IGHG1, *LTF, *TF, *UCN, *VCAN all 10	10
<input type="checkbox"/> Cardiovascular	proliferation of endothelial ce	2.20E-04		1.353		*APOA1, *BMPER, *COL4A2, *FGF5, *GRN, *IFNG, *IGHG1, *SERPINA3, *T... all 9	9
<input type="checkbox"/> Cardiovascular	development of cardiovascul	1.41E-10		1.132	bias	*ANGPTL6, *APOA1, *BMPER, *COL4A2, *CST3, *CX3CL1, *EDIL3, *ELN, *... all 30	30
<input type="checkbox"/> Cell Death and	cell death of central nervous	5.02E-03		1.129		ALB, *IFNG, *IGHG1, *NTF3, *SERPINA3, *TF, *UCN all 7	7

б

Рис. 10. Программа IPA: белковые кластеры слезы детей с ЮИА-ассоциированным увеитом (а) и системным васкулитом (б) в терминах известных биологических феноменов

также могут быть описаны преимущественно в терминах «эволюция ткани», «межклеточная передача сигнала», «миграция клеток», «гематология», «воспалительный ответ», «трансформация иммунных клеток», что в целом соответствует современным представлениям о патогенезе системного васкулита. Однако при системном васкулите в отличие от ЮИА-ассоциированного увеита существенно большее значение имеет низкая экспрессия многих белков, входящих в кластер. Это фактически и является основой различий патогенетических механизмов этих состояний.

На рис. 10 представлены фрагменты более детального описания карт, представленных на рис. 7 и 9. Как видно, по количеству включенных в соответствующий кластер белковых молекул при ЮИА-ассоциированном увеите лидируют феномены «миграция клеток» (41 молекула), «количество клеток» (34), «активация клеток» (28), «миграция лейкоцитов» (22), «количество клеток крови» (20), «воспалительный ответ» (16), в то время как при системном васкулите — «эволюция сердечно-сосудистой системы» (30), «артрит» (23), «васкулогенез» (19).

ОБСУЖДЕНИЕ

На наш взгляд, одним из наиболее важных результатов проведенного исследования является сам факт обнаружения и описания характерного для интраокулярного воспалительного процесса протеомного профиля в слезе, т. е. экстраокулярно. Причем достаточно убедительно показано, что повышенная экспрессия целого ансамбля белков обусловлена именно наличием увеита, поскольку патология, близкая по иммуновоспалительным свойствам и сопровождающаяся значительно более обширным

системным воспалением без вовлечения интраокулярных структур, характеризовалась совершенно другим профилем экспрессии протеинов. По сути, это подтверждает факт нарушения гематоретинального барьера при ЮИА-ассоциированном увеите.

Достаточно неожиданно ключевым протеином в выявленном белковом ансамбле явился лакто-трансферрин.

Как известно, лактоферрин (лактоферрин) входит в семейство трансферринов. Он обладает наибольшей железосвязывающей способностью из всех членов семейства, относится к гликопротеинам с молекулярным весом 78 кДа и состоит из остатков 690 аминокислот [7]. У человека он является одним из основных белков в составе секретов экзокринных желез, включая грудное молоко, слюну, слезу, семенную и вагинальную жидкость, жидкости желудочно-кишечного тракта, слизистую носовых ходов и бронхов [17, 28, 77, 95]. Будучи важным звеном в механизмах врожденного иммунитета [99], он обладает антибактериальными, антигрибковыми, противовирусными, антипаразитарными, противовоспалительными и антиаллергенными свойствами, а также антиоксидантным и даже, как считают многие исследователи, — антиканцерогенным действием [41, 51, 72, 105], в целом являясь противовоспалительным агентом.

Трудно предположить, что повышенная секреция лактоферрина со слезой имеет целью борьбу с нейтрофильным воспалительным процессом, происходящим интраокулярно. Наиболее вероятным представляется еще одно свойство лактоферрина — его участие в межклеточных сетях обмена информацией.

Кроме постоянной секреции экзокринными железами, лактоферрин синтезируется нейтрофилами

в стадии их грануляции, в том числе и при ревматоидном артрите [12].

Известно, что лактоферрин является сигнальной молекулой в нескольких межклеточных информационных сетях, управляющих циклом развития клетки и запускающих торможение развития клетки, истинный митохондриальный апоптоз и разрушение клеточной мембраны. Все эти эффекты реализуются через торможение активности Akt (протеинкиназа B), активацию p21, p27, p38 и JNK (с-Jun N-terminal kinase), вызывающих выброс каспаз-8, -3 и цитохрома C, что, собственно, и обуславливает апоптоз [50, 105].

Показано, что, используя информационные цепи, реализующие эффекты через нуклеарный фактор каппа-B (NF-κB) и MAP-киназу, лактоферрин на клеточном уровне модулирует дифференциацию, созревание, активацию, миграцию, пролиферацию иммунных клеток [26].

В экспериментах *in vitro* лактоферрин активировал иммунный ответ локально, мобилизуя нейтрофилы, обеспечивающие межклеточное взаимодействие, и активируя фагоцитоз полиморфноядерными лейкоцитами (PMNs) и макрофагами. В результате концентрация провоспалительных цитокинов уменьшалась, а активность естественных клеточных киллеров увеличивалась [20, 21].

Концентрация лактоферрина в месте воспаления многократно увеличивается с 0,4–2,0 до 200 мкг/мл, что обеспечивает работу механизмов обратной связи воспалительного ответа [24].

Лактоферрин, регулируя соответствующие звенья воспаления, управляет как клеточными, так и гуморальными реакциями, ответственными за его формирование [8, 56, 73, 85, 108], включая и продукцию интерлейкинов, в частности IL-1, IL-6, TNF-α [19, 60, 88]. Интересно, что в кластеры воспалительного ответа ЮИА-ассоциированного увеита закономерно включались IL-1, IL-6, TNF-α, значение которых в формировании воспалительного процесса общеизвестно. Спектр интерлейкинов, принимающих участие в формировании неинфекционного увеита, достаточно широк [49, 64], но большинство исследователей не включают в этот спектр IL-23, вошедший в кластер воспалительного ответа в нашем исследовании (см. рис. 6). Этому интерлейкину, описанному как один из факторов формирования аутоиммунного увеита [15], отводят роль инициатора синтеза IL-22 дифференцированными клетками Th17 [100] в условиях взаимного антагонизма между клетками Th17 и Th1, возникающего вследствие индукции реципрокных путей развития T-клеток интерлейкинами Th-23 и Th-27 [100].

Вероятнее всего, роль лактоферрина сводится к мобилизации лимфоцитов, макрофагов и полиморфноядерных лимфоцитов из кровяного русла, блокировке иммунных стимулов и/или торможению активации и клональной экспансии T-хелперов 1 и 17 регулированием формирования индуцированных Treg-клеток посредством модуляции функции антигенпрезентирующих клеток (см. рис. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало возможность идентификации увеита, ассоциированного с ЮИА, по протеомному профилю слезы. Одним из ключевых протеинов, обеспечивающих эту идентификацию, является лактоферрин. Результаты исследования протеомных кластеров и поиска их связей с различными биологическими феноменами позволяют предположить, что лактоферрин, являясь сигнальной белковой молекулой, играет роль иммуномодулятора, обеспечивающего формирование иммунного ответа во время воспалительного процесса, что позволяет считать его потенциально наиболее вероятным биомаркером, позволяющим распознать увеит еще до появления клинических симптомов поражения суставов.

В ходе настоящей работы разработан протокол исследования слезы, включающий в себя технологию забора проб слезы, их транспортировку и прецизионный анализ с помощью тандемной масс-спектрометрии. Ключевым элементом протокола является нормализация по альбумину, результаты использования которой мы считаем вполне удовлетворительными.

Дальнейшие исследования должны быть направлены на более детальное изучение роли липокалина-1, ламинина-α-4, пролактининдуцированного протеина и механизмов обмена железа, нарушение которых, наиболее вероятно, лежит в основе патогенеза увеита, ассоциированного с ЮИА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Agarwal S, Agarwal A, Apple DJ, et al. Textbook of Ophthalmology. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.; 2002. 657 p.
2. Amadi-Obi A, et al. TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL 2 and inhibited by IL 27/STAT1. *Nat Med.* 2007;13:711-718. doi: 10.1038/nm1585.
3. Ananthi S, Santhosh RS, Nila MV, et al. Comparative proteomics of human male and female tears by two-dimensional electrophoresis. *Exp Eye Res.* 2011;92:454-63. doi: 10.1016/j.exer.2011.03.002.

4. Anesi SD, Foster CS. Importance of Recognizing and Preventing Blindness From Juvenile Idiopathic Arthritis – Associated Uveitis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012;5:653-657. doi: 10.1002/acr.21599.
5. Angeles-Han ST, Yeh S, Vogler LB. Updates on the risk markers and outcomes of severe juvenile idiopathic arthritis-associated uveitis. *Int J Clin Rheumatol*. 2013;8:109-121. doi: 10.2217/ijr.12.83.
6. Asproudis I, Felekis T, Tsanou E, et al. Juvenile idiopathic arthritis-associated uveitis: Data from a region in western Greece. *Clin Ophthalmol*. 2010;4:343-7.
7. Baker E, Baker H. Lactoferrin. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62:2531-2539. doi: 10.1007/s00018-005-5368-9.
8. Baynes RD, Bezwoda WR. Lactoferrin and the inflammatory response. *Adv Exp Med Biol*. 1994;357:133-141. doi: 10.1007/978-1-4615-2548-6_13.
9. Ben Ezra D, Cohen E, Maftzir G. Uveitis in children and adolescents. *Br J Ophthalmol*. 2005;89:444-8. doi: 10.1136/bjo.2004.050609.
10. Beukelman T, Patkar NM, Saag KG, Tolleson-Rinehart S, et al. American College of Rheumatology recommendations for the treatment of juvenile idiopathic arthritis: Initiation and safety monitoring of therapeutic agents for the treatment of arthritis and systemic features. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011;63(4):465-82. doi: 10.1002/acr.20460.
11. Bolt IB, Cannizzaro E, Sege R, Saurenmann RK. Risk factors and longterm outcome of juvenile idiopathic arthritis-associated uveitis in Switzerland. *J Rheumatol*. 2008;35:703-706.
12. Caccavo D, Garzia P, Sebastiani GD, Ferri GM, et al. Expression of lactoferrin on neutrophil granulocytes from synovial fluid and peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2003;30:220-224.
13. Calandra S, et al. Female sex and oligoarthritis category are not risk factors for uveitis in Italian children with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol*. 2014;41:1416-1425. doi: 10.3899/jrheum.131494.
14. Carvounis PE, Herman DC, Cha S, Burke JP. Incidence and outcomes of uveitis in juvenile rheumatoid arthritis, a synthesis of the literature. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2006;44:281-290. doi: 10.1007/s00417-005-0087-3.
15. Caspi RR. A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J Clin Invest*. 2010;120:3073-3083. doi: 10.1172/JCI42440.
16. Chia A, Lee V, Graham EM, Edelsten C. Factors related to severe uveitis at diagnosis in children with juvenile idiopathic arthritis in a screening programme. *Am J Ophthalmol*. 2003;135:757-762. doi: 10.1016/S0002-9394(03)00225-3.
17. McClellan K. Mucosal defense of the outer eye. *Surv Ophthalmol*. 1997;42:233-246. doi: 10.1016/S0039-6257(97)00090-8.
18. Coyle PK, Sibony PA, Johnson C. Electrophoresis combined with immunologic identification of human tear proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1989;30:1872-8.
19. Cumberbatch M, Bhushan M, Dearman RJ. IL-1beta-induced langerhans' cell migration and tnf-alpha production in human skin: Regulation by lactoferrin. *Clin Exp Immunol*. 2003;132:352-359. doi: 10.1046/j.1365-2249.2003.02146.x.
20. Damiens E, Mazurier J, El Yazidi I, et al. Effects of human lactoferrin on nk cell cytotoxicity against haematopoietic and epithelial tumour cells. *BBA-Mol. Cell Res*. 1998;1402:277-287.
21. Dashper SG, Pan Y, Veith PD, et al. Lactoferrin inhibits porphyromonas gingivalis proteinases and has sustained biofilm inhibitory activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:1548-1556. doi: 10.1128/AAC.05100-11.
22. Deschenes J, Murray PI, Rao NA, Nussenblatt RB. & International Uveitis Study Group. International Uveitis Study Group (IUSG): clinical classification of uveitis. *Ocul Immunol Inflamm*. 2008;16:1-2. doi: 10.1080/09273940801899822.
23. Edelsten C, Reddy MA, Stanford MR, Graham EM. Visual loss associated with pediatric uveitis in English primary and referral centers. *Am J Ophthalmol*. 2003;135:676-80. doi: 10.1016/S0002-9394(02)02148-7.
24. Farnaud S, Evans RW. Lactoferrin-A multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol*. 2003;40:395-405. doi: 10.1016/S0161-5890(03)00152-4.
25. Gachon AM, Verrelle P, Betail G, Dastugue B. Immunological and electrophoretic studies of human tear proteins. *Exp Eye Res*. 1979;29:539-553. doi: 10.1016/0014-4835(79)90154-4.
26. Gahr M, Speer C, Damerau B, Sawatzki G. Influence of lactoferrin on the function of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Leukoc Biol*. 1991;49:427-433.
27. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, et al. TGF-[beta] and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol*. 2007;8(12):1390-7.
28. González-Chávez SA, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q. Lactoferrin: Structure, function and applications. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33:32-8. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.07.020.
29. Green-Church KB, Butovich I, Willcox M. The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Report of the Subcommittee on Tear Film Lipids and Lipid – Protein Interactions in Health and

- Disease. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011;52(4):1979-1993. doi: 10.1167/iovs.10-6997d.
30. Green-Church KB, Nichols KK, Kleinholz NM, et al. Investigation of the human tear film proteome using multiple proteomic approaches. *Mol Vis*. 2008;14:456-70.
 31. Gregory AC, et al. Risk factors for loss of visual acuity among patients with uveitis associated with juvenile idiopathic arthritis: the Systemic Immunosuppressive Therapy for Eye Diseases study. *Ophthalmology*. 2013;120:186-192. doi: 10.1016/j.ophtha.2012.07.052.
 32. Grus FH, Podust VN, Bruns K, et al. SELDI-TOF-MS ProteinChip array profiling of tears from patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:863-76. doi: 10.1167/iovs.04-0448.
 33. van Haeringen NJ. Aging and the lacrimal system. *Br J Ophthalmol*. 1997;81:824-826. doi: 10.1136/bjo.81.10.824.
 34. Heiligenhaus A, et al. Prevalence and complications of uveitis in juvenile idiopathic arthritis in a population-based nation-wide study in Germany: suggested modification of the current screening guidelines. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46:1015-1019. doi: 10.1093/rheumatology/kem053.
 35. Heiligenhaus A, Heinz C, Edelsten C, et al. Review for disease of the year: epidemiology of juvenile idiopathic arthritis and its associated uveitis: the probable risk factors. *Ocul Immunol Inflamm*. 2013;21:180-191. doi: 10.3109/09273948.2013.791701.
 36. Heiligenhaus A, Niewerth M, Ganser G, et al. Prevalence and complications of uveitis in juvenile idiopathic arthritis in a population-based nation-wide study in Germany: suggested modification of the current screening guidelines. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46(6):1015-9. doi: 10.1093/rheumatology/kem053.
 37. Hoeve M, Kalinina Ayuso V, Schalijs-Delfos NE, et al. The clinical course of juvenile idiopathic arthritis-associated uveitis in childhood and puberty. *Br J Ophthalmol*. 2012;96(6):852-856. doi: 10.1136/bjophthalmol-2011-301023.
 38. Holland GN, Denove CS, Yu F. Chronic anterior uveitis in children: clinical characteristics and complications. *Am J Ophthalmol*. 2009;147:667-78. doi: 10.1016/j.ajo.2008.11.009.
 39. Holland GN, Stiehm ER. Special considerations in the evaluation and management of uveitis in children. *Am J Ophthalmol*. 2003;135:867-78. doi: 10.1016/S0002-9394(03)00314-3.
 40. Hughes EH, Dick AD. The pathology and pathogenesis of retinal vasculitis. *Neuropathol. Appl Neurobiol*. 2003;29:325-340. doi.org/10.1046/j.1365-2990.2003.00499.x.
 41. Iigo M, Alexander DB, Long N, et al. Anticarcinogenesis pathways activated by bovine lactoferrin in the murine small intestine. *Biochimie*. 2009;91:86-101. doi: 10.1016/j.biochi.2008.06.012.
 42. Jabs DA, Nussenblatt RB, Rosenbaum JT. Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. Results of the First International Workshop. *Am J Ophthalmol*. 2005;140:509-16. doi: 10.1016/j.ajo.2005.03.057.
 43. Jacob JT, Ham B. Compositional profiling and biomarker identification of the tear film. *Ocul Surf*. 2008;6:175-85. doi: 10.1016/S1542-0124(12)70178-7.
 44. Jones LT, Reeh MJ, Wirtschafter JD. *Manual of Ophthalmic Anatomy*. Rochester, MN: American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology; 1970. 597 p.
 45. Julián K, Terrada C, Quartier P, et al. Uveitis related to juvenile idiopathic arthritis: familial cases and possible genetic implication in the pathogenesis. *Ocul Immunol Inflamm*. 2010;18:172-177.45.
 46. Kalinina Ayuso V, Ten Cate HA, van der Does P, et al. Male Gender as a Risk Factor for Complications in Uveitis Associated with Juvenile Idiopathic Arthritis. *Am J Ophthalmol*. 2010;149(6):994-9. doi: 10.1016/j.ajo.2010.01.016.
 47. Kalinina Ayuso V, et al. Pathogenesis of juvenile idiopathic arthritis associated uveitis: the known and unknown. *Surv Ophthalmol*. 2014;59:517-531. doi: 10.1016/j.survophthal.2014.03.002.
 48. Kalinina Ayuso V, Ten Cate HA, van der Does P, et al. Male gender and poor visual outcome in uveitis associated with juvenile idiopathic arthritis. *Am J Ophthalmol*. 2010;149:987-93. doi: 10.1016/j.ajo.2010.01.014.
 49. Kalinina Ayuso V. Uveitis in childhood. Clinical and fundamental developments. Thesis. Utrecht: University Medical Centre; 2013. P. 259.
 50. Kanwar JR, Mahidhara G, Roy K, et al. Fe-blf nanoformulation targets survivin to kill colon cancer stem cells and maintains absorption of iron, calcium and zinc. *Nanomedicine*. 2014;10:35-55. doi: 10.2217/nnm.14.132.
 51. Kanwar JR, Roy K, Patel Y, Zhou SF, et al. Multifunctional Iron Bound Lactoferrin and Nanomedicinal Approaches to Enhance Its Bioactive Functions. *Molecules*. 2015;20:9703-9731. doi: 10.3390/molecules20069703.
 52. Kotaniemi K, Arkela-Kautiainen M, Haapasaari J, Leirisalo-Repo M. Uveitis in young adults with juvenile idiopathic arthritis: a clinical evaluation of 123 patients. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:871-874. doi: 10.1136/ard.2004.026955.
 53. Kotaniemi K, et al. The frequency and outcome of uveitis in patients with newly diagnosed juvenile idiopathic arthritis in two 4 year cohorts from 1990-1993 and 2000-2003. *Clin Exp Rheumatol*. 2014;32:143-147.

54. Kump LI, Cervantes-Castaneda RA, Androudi SN, Foster CS. Analysis of pediatric uveitis cases at a tertiary referral center. *Ophthalmology*. 2005;112:1287-92. doi: 10.1016/j.ophtha.2005.01.044.
55. Lee RW, Dick AD. Current concepts and future directions in the pathogenesis and treatment of non-infectious intraocular inflammation. *Eye (Lond)*. 2012;26:17-28. doi: 10.1038/eye.2011.255.
56. Legrand D, Elass E, Carpentier M, Mazurier J. Lactoferrin: A modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62:2549-2559. doi: 10.1007/s00018-005-5370-2.
57. Levy RA, de Andrade FA, Foeldvari I. Cutting-edge issues in autoimmune uveitis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011;41:214-223. 75.
58. Li N, Wang N, Zheng J, et al. Characterization of human tear proteome using multiple proteomic analysis techniques. *J Proteome Res*. 2005;4:2052-61. doi: 10.1021/pr0501970.
59. Macaubas C, Nguyen K, Milojevic D, et al. Oligoarticular and polyarticular JIA: epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol*. 2009;5(11):616-26.105.
60. Machnicki M, Zimecki M, Zagulski T. Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 *in vivo*. *Int J Exp Pathol*. 1993;74:433-439.
61. Manners PJ, Diepeveen D. Prevalence of juvenile chronic arthritis in a population of 12 year old children in urban Australia. *Pediatrics*. 1996;98:84-90.
62. Mathers WD, Lane JA, Zimmerman MB. Tear film changes associated with normal aging. *Cornea*. 1996;15:229-34. doi: 10.1097/00003226-199605000-00001.
63. Mauldin J, Dan Cameron H, Jeanotte D, et al. Chronic arthritis in children and adolescents in two Indian health service user populations. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2004;5:30. doi: 10.1186/1471-2474-5-30.
64. Menezo V. The Genetic Predictors of Severe Outcome in Patients with Anterior Uveitis. Thesis. London: Institute of Ophthalmology, University College; 2011. P. 238.
65. Mii S, Nakamura K, Takeo K, Kurimoto S. Analysis of human tear proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*. 1992;13:379-82. doi: 10.1002/elps.1150130177.
66. Moradi A, Amin RM, Thorne JE. The role of gender in juvenile idiopathic arthritis-associated uveitis. *J Ophthalmol*. 2014;4:610-78. doi: 10.1155/2014/461078.
67. Nguyen QD, Foster CS. Saving the vision of children with juvenile rheumatoid arthritis-associated uveitis. *JAMA*. 1998;280(13):1133-4. doi: 10.1001/jama.280.13.1133.
68. Nussenblatt RB, Gery I. Experimental autoimmune uveitis and its relationship to clinical ocular inflammatory disease. *J Autoimmun*. 1996;9:575-585. doi: 10.1006/jaut.1996.0077.
69. Ohashi Y, Dogru M, Tsubota K. Laboratory findings in tear fluid analysis. *Clin Chim Acta*. 2006;369:17-28. doi: 10.1016/j.cca.2005.12.035.
70. Paivonsalo-Hietanen T, Tuominen J, Saari KM. Uveitis in children: population-based study in Finland. *Acta Ophthalmol Scand*. 2000;78:84-8. doi: 10.1034/j.1600-0420.2000.078001084.x.
71. Parikh JG, Tawansy KA, Rao NA. Immunohistochemical study of chronic nongranulomatous anterior uveitis in juvenile idiopathic arthritis. *Ophthalmology*. 2008;115:1833-1836. doi: 10.1016/j.ophtha.2008.03.027.
72. Parhi P, Mohanty C, Sahoo SK. Nanotechnology-based combinational drug delivery: An emerging approach for cancer therapy. *Drug Discov Today*. 2012;17-18, 1044-1052. doi: 10.1016/j.drudis.2012.05.010.
73. Puddu P, Valenti P, Gessani S. Immunomodulatory effects of lactoferrin on antigen presenting cells. *Biochimie*. 2009;91:11-18. doi: 10.1016/j.biochi.2008.05.005.
74. Qian Y, Acharya NR. Juvenile idiopathic arthritis-associated uveitis. *Curr Opin Ophthalmol*. 2010;21:468-472. doi: 10.1097/ICU.0b013e32833eab83.
75. Ravelli A, Felici E, Magni-Manzoni S, et al. Patients with antinuclear antibody-positive juvenile idiopathic arthritis constitute a homogeneous subgroup irrespective of the course of joint disease. *Arthritis Rheum*. 2005;52(3):826-32. doi: 10.1002/art.20945.
76. Reininga JK, Los LI, Wulffraat NM, Armbrust W. The evaluation of uveitis in juvenile idiopathic arthritis (JIA) patients: are current ophthalmologic screening guidelines adequate? *Clin Exp Rheumatol*. 2008;26:367-372.
77. Reitamo S, Konttinen Y, Segerberg-Konttinen M. Distribution of lactoferrin in human salivary glands. *Histochemistry*. 1980;66:285-291. doi: 10.1007/BF00495741.
78. Roque MR, Foster CS, Miseroocchi E, Roque BL, et al. Juvenile Idiopathic Arthritis Uveitis. 06 January, 2016. 30/11/2016: [http://emedicine.medscape.com/article/1209891].
79. Rosenberg KD, Feuer WJ, Davis JL. Ocular complications of pediatric uveitis. *Ophthalmology*. 2004;111:2299-306. doi: 10.1016/j.ophtha.2004.06.014.
80. Ruggieri S, Frasanito MA, Dammacco R, Guerriero S. TREG lymphocytes in autoimmune uveitis. *Ocul Immunol Inflamm*. 2012;20:255-261. doi: 10.3109/09273948.2012.681830.
81. Sabri K, Saurenmann RK, Silverman ED, Levin AV. Course, complications, and outcome of juvenile arthritis-related uveitis. *J AAPOS*. 2008;12:539-545. doi: 10.1016/j.jaapos.2008.03.007.
82. Saurenmann RK et al. Risk factors for development of uveitis differ between girls and boys with juvenile

- idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62:1824-1828. doi: 10.1002/art.27416.
83. Seal DV. The effect of ageing and disease on tear constituents. *Trans Ophthalmol Soc UK.* 1985;104:355-362.
 84. Sen ES, Dick AD, Ramanan AV. Uveitis associated with juvenile idiopathic arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11:338-348. doi: 10.1038/nrrheum.2015.20.
 85. Shau H, Kim A, Golub SH. Modulation of natural killer and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity by lactoferrin. *J Leukoc Biol.* 1992;51:343-349.
 86. Sim KT, Venning HE, Barrett S, et al. Extended oligoarthritis and other risk factors for developing JIA-associated uveitis under ILAR classification and its implication for current screening guideline. *Ocul Immunol Inflamm.* 2006;14:353-357. doi: 10.1080/09273940600977233.
 87. Skarin A, Elborgh R, Edlund E, Bengtsson-Stigmar E. Long-term follow-up of patients with uveitis associated with juvenile idiopathic arthritis: a cohort study. *Ocul Immunol Inflamm.* 2009;17:104-108. doi: 10.1080/09273940802650398.
 88. Sorimachi K, Akimoto K, Hattori Y, et al. Activation of macrophages by lactoferrin: Secretion of TNF-alpha, IL-8. *Biochem Mol Biol Int.* 1997;43:79-87. doi: 10.1080/15216549700203841.
 89. de Souza GA, Godoy LM, Mann M. Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome Biol.* 2006;7:72-5. doi: 10.1186/gb-2006-7-8-r72.
 90. Tan KO, Sack RA, Holden BA, Swarbrick HA. Temporal sequence of changes in tear film composition during sleep. *Curr Eye Res.* 1993;12:1001-1007. doi: 10.3109/02713689309029226.
 91. Thorne JE, Woreta F, Kedhar SR, et al. Juvenile idiopathic arthritis-associated uveitis: incidence of ocular complications and visual acuity loss. *Am J Ophthalmol.* 2007;143(5):840-6. doi: 10.1016/j.ajo.2007.01.033.
 92. Tiffany JM. Tears in Health and Disease. *Eye.* 2003;17:923-926. doi: 10.1038/sj.eye.6700566.
 93. Tomosugi N, Kitagawa K, Takahashi N, et al. Diagnostic potential of tear proteomic patterns in Sjögren's syndrome. *J Proteome Res.* 2005;4:820-5. doi: 10.1021/pr0497576.
 94. Tugal-Tutkun I. Pediatric uveitis. *J Ophthalmic Vis Res.* 2011;6:259-69.
 95. Valore EV, Park CH, Igrati SL, Ganz T. Antimicrobial components of vaginal fluid. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187:561-568. doi: 10.1067/mob.2002.125280.
 96. Vastert SJ, Bhat P, Goldstein DA. Pathophysiology of JIA-associated uveitis. *Ocul Immunol Inflamm.* 2014;22:414-423. doi: 10.3109/09273948.2014.926937.
 97. Versura P, Bavelloni A, Blalock W, et al. A rapid standardized quantitative microfluidic system approach for evaluating human tear proteins. *Molecular Vision.* 2012;18:2526-2537
 98. Versura P, Bavelloni A, Grillini M, et al. Diagnostic performance of a tear protein panel in early dry eye. *Molecular Vision.* 2013;19:1247-1257
 99. Wakabayashi H, Takakura N, Yamauchi K, Tamura Y. Modulation of immunity-related gene expression in small intestines of mice by oral administration of lactoferrin. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13:239-245. doi: 10.1128/CI.13.2.239-245.2006.
 100. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, et al. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T-cell ties. *Immunity.* 2006;24(6):677-88. doi: 10.1016/j.immuni.2006.06.002.
 101. Willermain F, et al. Interplay between innate and adaptive immunity in the development of non-infectious uveitis. *Prog Retin Eye Res.* 2012;31:182-194. doi: 10.1016/j.preteyeres.2011.11.004.
 102. Woreta F, Thorne JE, Jabs DA, et al. Risk factors for ocular complications and poor visual acuity at presentation among patients with uveitis associated with juvenile idiopathic arthritis. *Am J Ophthalmol.* 2007;143(4):647-55. doi: 10.1016/j.ajo.2006.11.025.
 103. Ying Qian, Nisha R. Acharya. Juvenile idiopathic arthritis associated uveitis. *Curr Opin Ophthalmol.* 2010;21(6):468-472. doi: 10.1097/ICU.0b013e32833eab83.
 104. Zannin ME et al. Timing of uveitis onset in oligoarticular juvenile idiopathic arthritis (JIA) is the main predictor of severe course uveitis. *Acta Ophthalmol.* 2012;90:91-95. doi: 10.1111/j.1755-3768.2009.01815.x.
 105. Zhang Y, Lima CF, Rodrigues LR. Anticancer effects of lactoferrin: Underlying mechanisms and future trends in cancer therapy. *Nutr Rev.* 2014;72:763-773. doi: 10.1111/nure.12155.
 106. Zhou L, Beuerman RW, Chan CM, et al. Identification of tear fluid biomarkers in dry eye syndrome using iTRAQ quantitative proteomics. *J Proteome Res.* 2009;8:4889-905. doi: 10.1021/pr900686s.
 107. Zierhut M, Michels H, Stubiger N, et al. Uveitis in children. *Int Ophthalmol Clin.* 2005;45:135-56. doi: 10.1097/01.iio.0000155903.87679.c2.
 108. Zimecki M, Mazurier J, Machnicki M, et al. Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4-CD8-murine thymocytes. *Immunol Lett.* 1991;30:119-123. doi: 10.1016/0165-2478(91)90099-V.

◆ Информация об авторах

Вячеслав Григорьевич Часнык – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой госпитальной педиатрии. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. E-mail: chasnyk@gmail.com.

Екатерина Владимировна Гайдар – аспирант, кафедра госпитальной педиатрии. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. E-mail: gaidare85@gmail.com.

Анатолий Викторович Кононов – аспирант, кафедра офтальмологии. ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России. E-mail: 7435020@gmail.com.

Татьяна Аммосова – канд. биол. наук, ассистент, центр серповидноклеточной анемии. Университет Говарда, отделение медицины, США. E-mail: t.ammosova@gmail.com.

Алла Хайнес – врач-офтальмолог, директор. Центр хирургической и терапевтической офтальмологической помощи, США. E-mail: rozalat@hotmail.com.

Маргарита Федоровна Дубко – канд. мед. наук, доцент, кафедра госпитальной педиатрии. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. E-mail: andrq@rambler.ru.

Михаил Михайлович Костик – канд. мед. наук, доцент, кафедра госпитальной педиатрии. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. E-mail: kost-mikhail@yandex.ru.

Татьяна Николаевна Никитина – канд. мед. наук, ассистент кафедры офтальмологии. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России.

Елена Дмитриевна Серогодская – врач-офтальмолог, отделение офтальмологии. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России.

Ольга Валерьевна Калашникова – канд. мед. наук, доцент, кафедра госпитальной педиатрии. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. E-mail: koira7@yandex.ru.

Вера Васильевна Масалова – ассистент, кафедра госпитальной педиатрии. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. E-mail: masalova.vera@gmail.com.

Людмила Степановна Снегирева – врач-ревматолог, педиатрическое отделение №3. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. E-mail: L.s.negireva@mail.ru.

Владимир Алексеевич Кельцев – д-р мед. наук, профессор-консультант. Городская клиническая больница № 5, Тольятти. E-mail: keltsev@mail.ru.

◆ Information about the authors

Vyacheslav G. Chasnyk – MD, PhD, Dr Med Sci, Professor, Head of the Department of Hospital Pediatrics. St Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation. E-mail: chasnyk@gmail.com.

Ekaterina V. Gaidar – MD, Research Fellow, Chair of Hospital Pediatrics. St Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation. E-mail: gaidare85@gmail.com.

Anatolii V. Kononov – MD, Research Fellow, Chair of ophthalmology. North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov. E-mail: 7435020@gmail.com.

Tatyana Ammosova – PhD, Assistant Professor, Center for Sickle Cell Disease. Howard University, Department of Medicine, USA. E-mail: t.ammosova@gmail.com.

Alla Hynes – MD, Ophthalmologist, Director. Eye Care Physicians and Surgeons, USA. E-mail: rozalat@hotmail.com.

Margarita F. Dubko – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Hospital Pediatrics. St Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation. E-mail: andrq@rambler.ru.

Mikhail M. Kostik – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Hospital Pediatrics. St Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation. E-mail: kost-mikhail@yandex.ru.

Tatiana N. Nikitina – MD, PhD, Assistant Professor, Chair of Ophthalmology. St Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation.

Elena D. Serogodskaja – MD, PhD, Assistant Professor, Chair of Ophthalmology. St Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation.

Olga V. Kalashnikova – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Hospital Pediatrics. St Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation. E-mail: koira7@yandex.ru.

Vera V. Masalova – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Hospital Pediatrics. St Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation. E-mail: masalova.vera@gmail.com.

Ludmila S. Snegireva – MD, Department of Pediatrics No 3. St Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation. E-mail: l.s.negireva@mail.ru.

Vladimir A. Keltsev – MD, PhD, Consulting professor. Togliatti Municipal Clinical Hospital No 5. E-mail: keltsev@mail.ru.

◆ Информация об авторах

Людмила Ивановна Гребенкина – канд. мед. наук, детский кардиолог. Городская клиническая больница № 5, Тольятти. E-mail: keltsev@mail.ru.

Юрий Обухов – канд. физ.-техн. наук, научный сотрудник, центр серповидноклеточной анемии. Университет Говарда, США. E-mail: yuobukhov@hotmail.com.

Ксенгхао Лин – канд. хим. наук, научный сотрудник, центр серповидноклеточной анемии. Университет Говарда, США. E-mail: xionghao.lin@howard.edu.

Сергей Нехай – канд. физ.-мат. наук, профессор, отделение медицины, центр серповидноклеточной анемии, директор. Университет Говарда, США. E-mail: snekhai@howard.edu.

◆ Information about the authors

Liudmila I. Grebenkina – MD, PhD, Pediatric cardiologist. Togliatti Municipal Clinical Hospital No 5. E-mail: keltsev@mail.ru.

Yuri Obukhov – PhD, Research Scientist, Centre for Sickle Cell Disease. Howard University, USA. E-mail: yuobukhov@hotmail.com.

Xionghao Lin – PhD, Research Scientist, Centre for Sickle Cell Disease. Howard University, USA. E-mail: xionghao.lin@howard.edu.

Sergei Nekhai – PhD, Professor, Center for Sickle Cell Disease, Howard University. Department of Medicine, USA. E-mail: snekhai@howard.edu.