

## ARTICOL DE CERCETARE

## Evaluarea inflamației sistemice la pacienții cu cataractă legată de vârstă prin strategia multi-marker: studiu prospectiv, comparativ

Ion Jeru<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Catedra de oftalmologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova.*

**Data primirii manuscrisului: 02.06.2017**  
**Data acceptării spre publicare: 07.09.2017**

**Autor corespondent:**

*Ion Jeru, dr. șt. med., conf. univ.*

*Catedra de oftalmologie*

*Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”  
 bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004  
 e-mail: ion.jeru@usmf.md*

## RESEARCH ARTICLE

## Evaluation of the systemic inflammation in patients with age-related cataract by applying of multi-marker strategy: prospective, comparative study

Ion Jeru<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Chair of ophthalmology, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova.*

**Manuscript received on: 02.06.2017**  
**Accepted for publication on: 07.09.2017**

**Corresponding author:**

*Ion Jeru, PhD, assoc. prof.*

*Chair of ophthalmology*

*Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy  
 165, Stefan cel Mare si Sfânt ave., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004  
 e-mail: ion.jeru@usmf.md*

**Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat**

Nu sunt descrise particularitățile angrenării inflamației sistemice în patogenia cataractei legate de vârstă.

**Ipoteza de cercetare**

Evaluarea intensității inflamației sistemice la pacienții cu cataractă legată de vârstă prin abordarea strategiei multi-marker, ce poate evidenția modificările biomarkerilor iminenți în contiguitate interdependentă cu mecanismele apreciate ale cataractei legate de vârstă, *imprimis* activarea stresului oxidativ.

**Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu**

În premieră s-a estimat în manieră complexă (i.e. aplicarea panoului multi-marker din 18 parametri) inflamația sistemică la pacienții cu cataractă legată de vârstă, constatând fenomenul de potențare a acestuia în baza elevării semnificative a biomarkerilor pro-inflamatori și a declinului autentic al biomarkerilor anti-inflamatori principali.

**What is not known yet, about the topic**

Nowadays, there are not emphasized traits of systemic inflammation role in the pathogenesis of age-related cataract.

**Research hypothesis**

Systemic inflammation intensity evaluation in patients with age-related cataract by tackle multi-marker strategy, which can underline imminent biomarker changes in interdependent contiguity with main mechanisms of age-related cataract, firstly, oxidative stress activation.

**Article's added novelty on this scientific topic**

For the first time it has been estimated in a complex manner (i.e. multi-marker panel of 18 indices application) systematic inflammation in patients with age-related cataract, establishing phenomenon of its augmentation based on significant elevation of pro-inflammatory biomarkers and authentic decline of main anti-inflammatory biomarkers.

**Rezumat**

**Introducere.** Patogenia cataractei legate de vârstă rămâne o fațetă cu multe necunoscute a oftalmologiei. În baza aspectelor cunoscute, ce relevă aportul concludent al stresului oxidativ și procesului de glicare a proteinelor, se poate prezuma rolul inflamației sistematice, întrucât mediatorii acesteia sunt recunoscuți drept factori trigger ai formării radicalilor liber de

**Abstract**

**Introduction.** The age-related cataract pathogenesis remains an undeciphered facet of ophthalmology. In concern to known aspects revealing notable contribution of oxidative stress and protein glycation process can be presumed the role of systemic inflammation, because its mediators are recognized as trigger factors of free oxygen radicals formation as

oxigen și expresiei receptorilor celulari, prin care acționează produsele glicării finale.

**Material și metode.** Studiul prospectiv, comparativ, efectuat pe un lot de 112 de pacienți cu cataractă (62 de bărbați și 50 de femei), dintre care 43 de cazuri de cataractă nucleară, 37 de cazuri – de cataractă corticală și 32 de cazuri – de cataractă subcapsulară. Utilizând metoda ELISA, s-au determinat valorile sangvine ale 18 markeri pro- și anti-inflamatori înainte de intervenția microchirurgicală. Statistică: t – Student impar.

**Rezultate.** S-a constatat că la pacienții cu cataractă legată de vârstă, inflamația sistemică este notabil activată, fapt demonstrat prin elevarea semnificativă a nivelurilor circulante ale 9 biomarkeri pro-inflamatorii (hsCRP, TNF-alpha, IL-6, IL-8, IL-18, SDF-1, sCD-40, galectina-3 și rezistina). Totodată, conținutul sanguin al biomarkerilor inerenti sistemului anti-inflamator (IL-4, IL-10, IL-33, heregulina-1 beta și fetuina-A) este veritabil depreciat.

**Concluzii.** Aplicarea panoului multi-marker (18 biomarkeri pro- și anti-inflamatori) la pacienții cu cataractă legată de vârstă, evidențiază inflamația sistemică, care poate fi un mecanism de angrenare a stresului oxidativ și procesului de glicare a proteinelor cristalinelor într-o interfață patogenetică comună. Modificările cantitative sanguine mai importante ale biomarkerilor inflamației care asociază evoluția cataractei legate de vârstă și pot pretinde la valori predictive iminente sunt elevarea semnificativă a IL-6, TNF-alpha, SDF 1 și rezistinei pe o parte, iar pe de altă parte, declinul veritabil al IL-4, IL-15, fetuinei-A și heregulinei-1beta.

**Cuvinte cheie:** cataractă legată de vârstă, inflamație sistemică, strategia multi-marker.

## Introducere

În pofida realizării unui număr mare de cercetări în domeniu, patogenia cataractei legate de vârstă rămâne o problemă nesoluționată și, respectiv, o preocupare constantă a oftalmologiei.

Printre cele mai plauzibile mecanisme fiziopatologice de inducere a opacității cristalinelor (patternul iminent al cataractei legate de vârstă), se anunță activarea exagerată a stresului oxidativ, datorită formării excesive a radicalilor liberi de oxigen, predilect în impactul razelor solare, precum și al mediatorilor endogeni proprii diferitor maladii somatice [1, 2].

În acest sens, este importantă contiguitatea dintre stresul oxidativ și inflamația sistemică care, conform conceptului modern, se impune prin relații interdependente. Oportunitatea acesteia constă în creșterea expresiei citokinelor pro-inflamatoare în stresul oxidativ care, prin manieră endocrină, vor contribui la diseminarea inflamației, aceasta din urmă fiind definită ca inflamație sistemică (IS) non-specifică sau subclinică.

Identificarea IS în contextul diferențierii ei de inflamația indusă de flogogeni (patterne moleculare ale leziunii tisulare sau ale factorilor xenobiotici), are la bază valoarea plasmatică a proteinei C reactive: valoarea acesteia mai mică de 10 mg/l indică la IS.

Pe de altă parte, mediatorii inflamației sistemice sunt considerți drept factori independenți privind stimularea sin-tezei speciilor reactive de oxigen și azot.

well as cell receptor expression mediating and glycation products action.

**Material and methods.** This prospective comparative study has been realized in 112 patients (62 men and 50 women) with age-related cataract (43 cases of nuclear cataracts, 37 cases of cortical cataracts and 32 cases of subcapsular cataract). Using ELISA method were determined 18 pro- and anti-inflammatory markers before microsurgical intervention. Applied statistical test: unpaired t-Student.

**Results.** It has been established a notable activation of systemic inflammation in patients with age-related cataract, demonstrated by significant elevation of circulatory levels of 9 pro-inflammatory biomarkers (hsCRP, TNF-alpha, IL-6, IL-8, IL-18, SDF-1, sCD-40, galectin-3 and resistin). Likewise, the blood content of biomarkers inherent to anti-inflammatory systems (IL-4, IL-10, IL-33, heregulin-1 beta and fetuin-A) was veritably decreased.

**Conclusions.** The application of the multi-marker panel (18 pro-and anti-inflammatory biomarkers) in patients with age-related cataracts highlights the increase in systemic inflammation, which can be a mechanism of engaging oxidative stress and the glycation process of the lens proteins in a common pathogenetic interface. Major blood quantitative changes of inflammation biomarkers that associate age-related cataract evolution and claim to imminent predictive values are significant elevation of IL-6, TNF-alpha, SDF-1 and resistin on the one hand, and on the other – the true decline of IL-4, IL-15, fetuin-A and heregulin-1beta.

**Key words:** age-related cataract, multi-marker strategy.

## Introduction

Despite a large number of investigations in the field, pathogenesis of age-related cataract still remains an unresolved problem and a consistent approach to ophthalmology.

Among the most plausible pathophysiological mechanisms for inducing opacity of the lens (an imminent sign of age-related cataract) represents excessive activation of oxidative stress, due to the excessive formation of free oxygen radicals, as an impact of solar rays, as well as endogenous mediators of various somatic diseases [1, 2].

At this point, is important the contiguity between oxidative stress and systemic inflammation which according to the modern concept is imposed by interdependent relationships. Its opportunity is to increase the expression of pro-inflammatory cytokines in oxidative stress, which by endocrine mode will contribute to dissemination or inflammation, which is defined as systemic inflammation (SI) non-specific or subclinical inflammation.

The identification of SI in the context of its differentiation from induced inflammation (molecular pathology of tissue lesion or xenobiotic factors) is based on the plasma C protein reactive level: its value less than 10 mg/l indicates the SI.

On the other hand, systemic inflammation mediators are estimated to be independent factors in stimulating the synthesis of reactive oxygen and nitrogen species. Increased SI occurs in various diseases such as cardiovascular and endo-

Accentuarea IS are loc în diferite maladii, *imprimis* afecțiunile cardiovasculare și endocrine. Evoluția aterosclerozei, remodelarea vasculară și a miocardului, este în asociere strânsă cu creșterea nivelurilor circulante ale citokinelor pro-inflamatoare.

Rolul inflamației sistemice în declanșarea și exacerbarea cataractei legate de vârstă este tratat sobru și are un suport insuficient de dovezi. Totuși, în literatura de specialitate sunt decelate anumite repere care pot aduce la apel implicarea IS în patogenia cataractei menționate. Astfel, Dudec E. și colab. (2001), coroborează ipoteza, că peroxidul de hidrogen, unul din radicalii liberi de oxigen, crește expresia factorului nuclear *kappa B* în celulele epiteliale ale cristalinului [3].

Factorul nuclear *kappa B* reprezintă o citokină citozolică care, prin activarea receptorilor specifici nucleari, conduce la expresia a circa 150 de citokine, dintre care fac parte citokinele pro-inflamatoare, moleculele de adeziune intercelulare, factorii mitogeni și de creștere etc.

Peroxidul de hidrogen derivă din anionul superoxid sub acțiunea superoxid-dismutazei, fiind, ulterior, metabolizat de către catalază. În mod evident, incompetența sistemului antioxidant (i.e. reducerea expresiei și/sau activității catalazei) conduce la acumularea de peroxid de hidrogen. Prin urmare, activarea stresului oxidativ este o precondiționare de majorare a expresiei citokinelor pro-inflamatoare.

De fapt, rezultatele lui Dudec E. și colab. (2001), confirmă evidențele cercetătorilor japonezi, relatate anterior, conform cărora celulele epiteliale ale cristalinului se impun în cataractă prin formarea notabilă a interleukinelor (IL), în special IL-1 și IL-6, precum și a factorului de creștere al fibroblastelor [3, 4].

De remarcat că expresia factorului de creștere al fibroblastelor este stimulată atât de speciile reactive de oxigen (inclusiv, peroxidul de hidrogen), cât și de citokinele pro-inflamatoare. Activarea fibroblastelor și sinteza de collagen sub acțiunea IS poate fi o fațetă importantă a fiziopatologiei cataractei legate de vârstă, iar monitorizarea mediatorilor pro-inflamatori ar avea o valoare predictivă concludentă asupra riscului de afectare a cristalinului.

Date mai recente, obținute în studiul lui Klein B. și colab. (2006), indică asupra asociației nivelului circulant al IL-6, moleculei de adeziune intercelulară 1 și predictorii disfuncției endoteliale (e.g. grosimea complexului intimă-medie a arterei carotide și indicii elasticității arterelor periferice) și cataracta legată de vârstă în cele 3 forme ale ei: subcapsulară, corticală și, în deosebi, nucleară [5].

Disfuncția endotelială și IS angrenează o interfață comună, impusă, de asemenea, prin relații reciproce. Beneficiile terapeutice, proiectate asupra endoteliului vascular, sunt acompaniate și de reviriment al răspunsului inflamator.

Privind fiziopatologia cataractei legate de vârstă, sunt la această conotație conceptual însemnate datele lui Borkar D. și colab. (2015), care trec în evidență beneficiul statinelor administrate la pacienții cu uveită asupra evoluției cataractei [6].

Totodată, este de menționat că, cataracta reprezintă una dintre cele mai frecvente complicații ale uveitei. Rata acesteia poate atinge cote de până la 78% [7].

Efectele pleiotrope ale statinelor consemnează, în primul

crine disorders. Evolution of atherosclerosis, vascular and myocardium remodeling are closely associated with increased circulating levels of pro-inflammatory cytokines. The role of systemic inflammation in triggering and exacerbating age-related cataracts is soberly treated and has insufficient evidence of support.

However, in the literature there are some benchmarks that may appeal to SI involvement in the cataract pathogenesis.

Thus, Dudec E. *et al.* (2001) corroborates the hypothesis that hydrogen peroxide, one of the oxygen free radicals, increases the expression of the nuclear factor kappa B in the epithelial cells of the lens [3].

The nuclear factor-kappa B is a cytosolic cytokine which, by activating specific nuclear receptors, leads to the expression of about 150 cytokines, including pro-inflammatory cytokines, intercellular adhesion molecules, mitogenic and growth factors etc.

Hydrogen peroxide is derived from superoxide anion by the action of superoxide-dismutase, and is subsequently metabolized by catalase. Obviously, the incompetence of the antioxidant system (i.e., the reduction of catalase expression and/or activity) leads to the accumulation of hydrogen peroxide.

Therefore, activating oxidative stress is a precondition for increasing the expression of pro-inflammatory cytokines.

In fact, the results of Dudec E. confirms previously reported Japanese researchers that epithelial cells of the lens become cataract by notable formation of interleukins (IL), especially IL-1 and IL-6, as well as fibroblast growth factor [4].

Remarkably, expression of fibroblast growth factor is stimulated by both reactive oxygen species (including hydrogen peroxide) and pro-inflammatory cytokines. Activation of fibroblasts and collagen synthesis under SI may be an important facet of age-related cataract pathophysiology, and monitoring of pro-inflammatory mediators would have a predictive value on the risk of damage to the lens.

More recent data obtained in the study of Klein B. *et al.* (2006) indicates IL-6 circulating circulatory association, intercellular adhesion molecule 1 and endothelial dysfunction predictors (e.g. carotid artery intima-media thickness and peripheral arterial elasticity index) and age-related cataracts in the three forms: subcapsular, cortical and especially nuclear [5].

Endothelial dysfunction and SI have a common interface that is also imposed by mutual relationships. The therapeutic benefits projected on vascular endothelium are accompanied by a reversal of the inflammatory response.

Regarding age-related pathophysiology of cataract, there is a significant conceptual connotation of Borkar D. (2015) showing the benefit of statins administered to uveitis patients on cataract progression [6].

It is also worth mentioning that cataract is one of the most common complications of uveitis. Its rate can reach up to 78% [7].

The pleiotropic effects of statins primarily indicate the anti-inflammatory effect of improving vascular endothelial function.

Moreover, the Australian Blue Mountains Eye Study (BMES) has demonstrated that statin administration can reduce the

rând, efectul anti-inflamator și ameliorarea funcționalității endotelului vascular.

Mai mult decât atât, trialul Australian *BMES (Blue Mountains Eye Study)* a demonstrat, că administrarea statinelor poate reduce cu până la 50% riscul dezvoltării cataractei legate de vârstă, preponderent, a formelor nucleare și corticale, pe o perioadă de 10 ani [8].

Fong D. și Poon K. au suplinit apanajul conceptual al trialului *BMES* și au relatat o opțiune însemnată privind durata de administrare a statinelor și riscul cataractei la persoanele cu vârsta de 50-64 de ani, consemnată din analiza bazei de date *Kaiser Permanente* din SUA: reducerea semnificativă a riscului cataractei se atestă atunci, când durata de utilizare a statinelor este mai mare de 5 ani [9].

Așadar, cele menționate *ut supra* consolidează opinia privind implicarea IS în patogenia cataractei legate de vârstă, fapt ce subliniază necesitatea estimării complexe a acesteia la pacienții cu cataractă sau riscul dezvoltării ei.

Estimarea complexă a IS consemnează aplicarea strategiei multi-marker sau panoului multi-marker, care include determinarea sanguină a principalilor biomarkeri ai sistemelor pro- și anti-inflamator. În această ordine de idei, scopul studiului a fost evaluarea inflamației sistemice la pacienții cu cataractă legată de vârstă prin aplicarea panoului multi-marker.

### Material și metode

Cercetarea a fost efectuată pe un lot de 112 (62 de bărbați și 50 de femei) pacienți cu cataractă (43 de cazuri de cataractă nucleară, 37 de cazuri de cataractă corticală și 32 de cazuri de cataractă subcapsulară). Vârsta medie a pacienților cu cataractă legate de vârstă a fost  $58,4 \pm 4,2$  ani.

În sângele preluat înainte de intervenția microchirurgicală a cataractei legate de vârstă, s-a determinat concentrația biomarkerilor inflamației sistemice (pro- și anti-inflamatori) prin aplicarea metodei ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Biomarkerii pro-inflamatori: proteina C reactivă înalt sensibilă (hsCRP), factorul de necroză a tumorii (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-18, peptidul de chemoatracție a monocitelor (MCP-1), factorul derivat de stromă (SDF-1), galectina-3, moleculele solubile de adeziune sCD-40 și rezistina.

Biomarkerii anti-inflamatori: inhibitorul IL-1 (IL-1ra), IL-4, IL-10, IL-33, heregulina-1 $\beta$ , fetuina-A și factorul de transformare a creșterii (TGF-1 $\beta$ ).

Rezultatele obținute au fost comparate cu biomarkerii determinați la 28 de persoane aparent sănătoase (lotul de referință), cu vârsta medie de  $57,6 \pm 7,4$  ani.

Analiza statistică a inclus evaluarea mediei (M) și a erorii standard (m) a parametrilor din fiecare lot. Test statistic aplicat: t-Student impar. Diferența a fost considerată statistic semnificativă atunci când  $p < 0,05$ .

### Rezultate

Nivelurile circulante ale biomarkerilor pro-inflamatori în lotul pacienților cu cataractă legată de vârstă și lotul de referință sunt prezentate în Tabelul 1.

Rezultatele obținute indică un răspuns inflamator accentuat la pacienții cu cataractă legată de vârstă, dată fiind elevarea

risk of age-related cataracts, predominantly nuclear and cortical, by up to 50% over a 10-year period [8].

Fong D. and Poon K. provided the conceptual feature of the *BMES* trial and reported a significant opt-in on statin administration time and cataract risk in individuals aged 50-64 years from the analysis of the *Kaiser Permanente* database in the USA: the significant reduction in cataract risk is attained when the statin use period is over 5 years [9].

Therefore, these considerations over-consolidate the view of IS involvement in age-related cataracts pathogenesis, which underlines the need for its complex estimation in patients with cataract or the risk of developing it.

The complex IS estimation means the application of the multi-marker strategy or the multi-marker panel, which includes blood determination of the main biomarkers of pro- and anti-inflammatory systems. The purpose of the study was the evaluation of systemic inflammation in patients with age-related cataracts by applying the multi-marker panel.

### Material and methods

The research was performed on a group of 112 (62 men and 50 women) of cataract patients (43 cases of nuclear cataracts, 37 cases of cortical cataracts and 32 cases of subcapsular cataract). The mean age of patients with age-related cataracts was  $58.4 \pm 4.2$  years.

In the blood taken up prior to microsurgical age-related cataract surgery, the concentration of biomarkers of systemic inflammation (pro- and anti-inflammatory) was determined by applying the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method.

Serum levels of pro-inflammatory biomarkers (high sensitivity reactive C protein (hsCRP), tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-18, monocyte chemoattractant peptide), Stromal derived factor (SDF-1), galectin-3, soluble adhesion molecules sCD-40 and resistin) and anti-inflammatory biomarkers (IL-1, IL-1ra, IL-4, IL-10, IL-33, heregulin-1 $\beta$ , fetuin-A and growth-factor transformation factor, TGF-1 $\beta$  inhibitors) have been determined.

The results obtained were compared to biomarkers determined in 28 apparently healthy (baseline) subjects with an average age of  $57.6 \pm 7.4$  years.

The statistical analysis included the assessment of the mean and the standard error of the parameters in each batch. Applied statistical test: unpaired t-Student. The difference was considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

### Results

The circulating levels of pro-inflammatory biomarkers in the group of age-related cataract patients and baseline are shown in Table 1.

The results indicate an increased inflammatory response in patients with age-related cataracts, given the significant increase in blood levels of most pro-inflammatory biomarkers compared to baseline.

Regarding the significance of hsCRP at the marker values in relation to cardiovascular risk it is worth mentioning that

**Tabelul 1.** Conținutul sanguin al biomarkerilor pro-inflamatori în loturi.**Table 1.** Blood level of proinflammatory markers in study groups.

Biomarker	Lotul de referință Reference group	Lotul cu cataractă legată de vârstă Age-related cataract group	p
hsCRP, mg/l	0,85±1,12	2,44±1,75	<0,01
TNF-alpha, pg/ml	6,13±0,54	8,31±0,66	<0,05
IL-1beta, pg/ml	4,08±0,38	4,19±0,32	ns
IL-6, pg/ml	5,24±0,43	7,46±0,26	<0,05
IL-8, pg/ml	4,65±0,38	6,15±0,25	<0,05
IL-18, pg/ml	2,68±0,2	3,56±0,15	<0,05
MCP-1, pg/ml	357,3±31	404,8±22	ns
SDF-1, pg/ml	155,6±13,9	224,6±17,3	<0,01
sCD-40, pg/ml	328,7±30,4	396,6±21,2	<0,05
Galectin-3, ng/ml	5,88±0,53	8,72±0,36	<0,01
Resistin, ng/ml	1,98±0,16	2,68±0,14	<0,05

*Notă:* Datele sunt prezentate drept medie și eroare standard. Test statistic aplicat: t-Student impar.

*Note:* Data are presented as mean and standard error. Applied statistical test: unpaired t-Student.

semnificativă a valorilor sanguine a majorității biomarkerilor pro-inflamatori, comparativ cu indicii de referință.

Privind semnificația hsCRP la noima valorilor markerului, în corespundere cu riscul cardiovascular, este de menționat că la pacienții cu cataractă legată de vârstă, aceasta se include în marja 1-3 mg/l, în timp ce în lotul de referință <1,0 mg/l.

Citokinele principale, care stimulează sinteza proteinei C reactive, TNF-alpha, IL-1 și IL-6, au fost decelate majorate în sânge, incrementul fiind semnificativ pentru TNF-alpha (35,6%) și IL-6 (42,4%).

Interleukinele 8 și 18 au avut un spor, practic, identic: 32,3% și, respectiv, 32,8%.

Elevarea MCP-1 a constituit doar 13,3%, dar decalajul depășește marja erorii admisibile.

Este remarcabilă majorarea cu 44,3% a peptidului de chemoatractie a monocitelor.

Nivelul receptorului solubil al CD-40 la pacienții cu cataractă legată de vârstă a fost cu 20,7% peste markerul de referință.

Cel mai concludent spor a fost caracteristic pentru factorul derivat de stromă. Nivelul circulant al SDF-1 se estimează cu 48,3% mai mare, comparativ cu markerul de referință.

in patients with age-related cataracts this is included in the margin of 1-3 mg/l, while in the reference group <1.0 mg/l.

The primary cytokines that stimulate the synthesis of reactive C-protein, TNF-alpha, IL-1 and IL-6 were found to be elevated in the blood, the increment being significant for TNF-alpha (35.6%) and IL-6 .

Interleukins 8 and 18 had a virtually identical increase: 32.3% and 32.8%, respectively.

MCP-1 elevation was only 13.3%, but the gap exceeded the tolerable error margin.

It is remarkable to increase the monocyte chemoattraction peptide by 44.3%.

The soluble CD-40 receptor level in patients with age-related cataracts is 20.7% above baseline.

The most conclusive increase is characteristic of tree-derived factor. The circulating level of SDF-1 is estimated to be 48.3% higher compared to the reference marker.

Pro-inflammatory adipokine, resistin, is also significantly elevated in patients with age-related cataracts, which exceeds the reference index by 35.4%.

In order to estimate the feasibility of the anti-inflammato-

**Tabelul 2.** Conținutul sanguin al biomarkerilor anti-inflamatori în loturi.**Table 2.** Blood level of proinflammatory markers in study groups.

Biomarker	Lotul de referință Reference group	Lotul cu cataractă legată de vârstă Age-related cataract group	p
IL-1ra, pg/ml	5,49±0,41	5,37±0,27	ns
IL-4, pg/ml	6,41±0,48	5,17±0,28	<0,05
IL-10, pg/ml	6,74±0,52	5,25±0,26	<0,05
IL-33, pg/ml	4,71±0,34	3,87±0,23	<0,05
Hereguline-1beta, pg/ml	5,66±0,35	4,81±0,24	<0,01
Fetuin-A, μg/ml	559,6±44,2	475,3±26,8	<0,01
TGF-1beta, pg/ml	161,5±15,7	176,3±11,9	ns

*Notă:* Datele sunt prezentate drept medie și eroare standard. Test statistic aplicat: t-Student impar.

*Note:* Data are presented as mean and standard error. Applied statistical test: unpaired t-Student.

Adipokina pro-inflamatoare, rezistina, de asemenea, a fost semnificativ crescută la pacienții cu cataractă legată de vârstă, aceasta depășind indicele de referință cu 35,4%.

Pentru a estima fezabilitatea sistemului anti-inflamator, au fost determinate valorile sanguine ale biomarkerilor iminenți principali (Tabelul 2).

Evaluarea fezabilității sistemului anti-inflamator prin intermediul panoului multi-marker demonstrează incompetența acestuia, un fenomen, de altfel, concordant cu caracterul modificării biomarkerilor pro-inflamatori.

Astfel, inhibitorul interleukinei 1, IL-1ra, practic, nu diferă de nivelul de referință, un pattern similar raportului dintre IL-1beta și markerul de referință.

Markerii anti-inflamatori principali, IL-4 și IL-10, care guvernează expresia TNF-alpha și a proteinei C reactive sunt în declin semnificativ față de nivelul de referință cu 19,3% și, respectiv, 22,1%.

Concentrația sanguină a IL-33 se estimează redusă semnificativ cu 17,8%, iar factorul de transformare a creșterii, dimpotrivă, este majorat cu 9,2%, deși statistic nesemnificativ.

Nivelul circulant al heregulinei-1beta și fetuinei-A se anunță subiacent valorii de referință, decrementul pentru ambii biomarkeri constituind, în medie 15%.

## Discuții

Rezultatele obținute în cadrul aplicării strategiei multi-marker configurează un fenomen pertinent, ce relevă că evoluția cataractei legate de vârstă este asociată cu inflamația sistemică.

În primul rând, este autentic riscul cardiovascular al pacienților cu cataractă legată de vârstă, dată fiind valoarea sanguină a hsCRP peste 2,4 mg/l, în corespundere cu consensul Asociației Americane a Inimii, recunoscut, ulterior, și de Societatea Europeană de Cardiologie [10]. Prin urmare, la pacienții cu cataractă legată de vârstă, se poate evidenția patternul aterogen de remodelare al arterelor, susținut, pe o parte, de IS, iar pe de altă parte, fiind *per se* o sursă de eliberare a citokinelor pro-inflamatoare.

În acest context, este remarcabilă elevarea IL-6 și TNF-alpha, care sunt factori iminenți de stimulare a sintezei proteinei C reactive. Mai mult decât atât, aceste trei citokine sunt oportune în vederea diseminării pe cale endocrină a inflamației, indiferent care segment arterial a declanșat răspunsul inflamator. Totodată, IL-6 și, în deosebi, TNF-alpha, asistă un set de modificări tisulare: stimulează expresia moleculelor de adeziune intercelulară și a metaloproteinazelor matricei extracelulare, activează fibroblastele și potențează formarea speciilor reactive de oxigen. Sub acest aspect, este inteligibilă majorarea MCP-1 și sCD-40, care rezultă în activarea procesului de recrutare a monocitelor și, respectiv, a neutrofilelor.

În plus, IL-6 și TNF-alpha activează procesul de glicare neenzimatică a proteinelor și stimulează expresia receptorilor RAGE, prin intermediul cărora produsele intermediare și finale ale glicării interferează cu proteinele și alte structuri intra- și extracelulare. În acest context, sunt importante datele lui Gul A. (2009), care demonstrează implicarea produselor glicării finale în evoluția cataractei legate de vârstă nu numai la pacienții cu diabet, dar și la indivizii nediabatici, întrucât ni-

ry system, the blood values of the major imminent biomarkers were determined (Table 2).

Evaluation of the feasibility of the anti-inflammatory system through the multi-marker panel demonstrates its incompetence, a phenomenon, in fact, consistent with the character of the pro-inflammatory biomarker change.

Thus, the interleukin 1, IL-1ra inhibitor practically does not differ from the reference level, a pattern similar to that of IL-1beta and the reference marker.

The primary anti-inflammatory markers, IL-4 and IL-10, which govern the expression of TNF-alpha and reactive C-protein, are significantly lower than the baseline by 19.3% and 22.1%, respectively.

Serum Plasma level Blood concentration of IL-33 is estimated to be significantly reduced by 17.8% and the growth transformation factor, on the contrary, is increased by 9.2%, although statistically insignificant.

The circulating level of heregulin-1beta and fetuin-A is reported below the baseline, with both biomarkers decreasing on average by about 15%.

## Discussion

The entity of the results obtained in the application of the multi-marker strategy configures a pertinent phenomenon that reveals that the age-related cataract evolution is associated with an increase of systemic inflammation.

First of all, the cardiovascular risk of cataract patients is true, given the blood value of hsCRP above 2.4 mg/l, consistent with the consensus of the American Heart Association, which is also recognized by the European Society of Cardiology [10].

Therefore, in patients with cataract, the atherogenic remodeling of the arteries, sustained on one side of the IS, can be highlighted and, on the other hand, being *per se* a source of pro-inflammatory cytokines.

In this context, it is remarkable increased serum level of IL-6 and TNF-alpha, which are imminent factors to stimulate the synthesis of reactive C protein. Moreover, these 3 cytokines are appropriate for endocrine dissemination of inflammation, no matter which arterial segment has triggered the inflammatory response. At the same time, IL-6 and, in particular, TNF-alpha assists a set of tissue changes: stimulates the expression of intercellular adhesion molecules and extracellular matrix metalloproteinases, activates fibroblasts and potentiates the formation of reactive oxygen species. In this respect, it is understandable to increase MCP-1 and sCD-40, resulting in the activation of the monocyte and neutrophil recruitment process.

In addition, IL-6 and TNF-alpha activates the non-enzymatic glycation process of proteins and stimulates the expression of RAGE receptors through which intermediate and final glycation products interfere with proteins and other intra- and extracellular structures. In this context, the data of Gul A. (2009) demonstrating the implication of final glycation products in age-related cataract evolution not only in patients with diabetes but also in non-diabetic individuals as their circulating levels (e.g., fructosamine and hemoglobin) are significantly increased [11].

It is corroborated the view that the gluing of the lens's pro-

velul lor (e.g. fructozaminei și hemoglobinei glicate) circulant este semnificativ majorat [11].

Este coroborată opinia, potrivit căreia glicarea proteinelor cristalinului poate rezulta în dezorganizarea matricei proteice rafinate iminente și opacifierea lui.

Datele recent relatate de Momen L. și colab. (2014), aduc la apel sinergismul dintre stresul oxidativ și glicarea proteinelor cristalinului în fiziopatologia cataractei diabetice și celei legate de vârstă, care are la bază reducerea potențialului anti-oxidant [12].

Așadar, citokinele pro-inflamatoare pot fi acceptate drept o interfață comună de activare a stresului oxidativ și formării legăturii covalente neenzimatice a glucozei cu proteinele cristalinului în detrimentul menținerii transparenței acestuia. Argumentarea inflamației sistemice este dovedită la pacienții cu diabet zaharat și corelează cu intensitatea procesului de glicare a proteinelor extra- și intra-celulare, ultimul fiind inerent și statusului non-diabetic, în prezența radicalilor liberi de oxigen și mediatorilor inflamației.

Citokinele pro-inflamatoare reduc expresia carnozinei, dipeptidul natural care inhibă prooxidarea și glicarea proteinelor. Inhibiția factorului nuclear kappa B reduce, prin acest mecanism, intensitatea procesului de glicare.

Procesul de glicare al proteinelor, în special la pacienții cu status diabetic, este asociat cu eliberarea excesivă a adipokinelor.

În studiul nostru, la pacienții cu cataractă legată de vârstă, fără diabet, s-a decelat majorarea rezistinei, adipokină cu efect de stimulare a răspunsului inflamator și de inducere a insulinerizistenței. Se consideră că eliberarea rezistinei este potențată de citokinele proinflamatoare, iar rezistina, la rândul ei, stimulează expresia acestora, în primul rând, a TNF-alpha.

Corelarea rezistinei cu cataracta legată de vârstă este identificată atât la pacienții cu diabet, cât și la cei fără diabet [13].

Panoul multi-marker evidențiază elevarea concentrației sanguine a factorului derivat de stromă. Este cunoscut efectul SDF-1 de stimulare a angiogenezei și proceselor proliferative, precum și de migrare a macrofagelor. Se poate admite că macrofagele și fibroblastele stratului epitelial devin ținta SDF-1 sechestrat de circuitul irido-ciliar, efectul comun fiind proiectat asupra proteinelor cristalinului.

Activarea fibroblastelor și sinteza de collagen în cataracta legată de vârstă este confirmată prin majorarea galectinei-3, biomarker al fibrozei, eliberat de către macrofage. Galectina-3 a fost găsită implicată în mai multe procese biologice, cum ar fi adeziunea, diferențierea, proliferarea și apoptoza celulară. Cristalinul uman expresează galactina 3 pe parcursul dezvoltării fibrelor iminente, iar după 7 săptămâni, epiteliul anterior al cristalinului pierde această capacitate.

Creșterea galectinei-3 în sânge poate semnifica, la nivelul ochiului, deranjamente privind sinteza proteinelor de către celulele cristalinului de un singur tip, stocate în 1000 de straturi, pierderea defectuoasă a organelor și apoptoza celulară, fapt ce periclitează transparența.

O cauză oportună a activării IS la pacienții cu cataractă legată de vârstă constă în micșorarea citokinelor anti-inflamatoare, în deosebi, a IL-4 și IL-10. Aceste interleukine reduc

teins can result in the disorganization of the imminent refined protein matrix and its opacification.

Recent data reported by Momen L. *et al.* (2014) call for synergism between oxidative stress and glycation of the lens proteins in age-related diabetic cataract pathophysiology, which is based on the reduction of antioxidant potential [12].

Thus, pro-inflammatory cytokines can be accepted as a common interface for activating oxidative stress and forming non-enzymatic covalent linkage of glucose with the proteins of the lens to the detriment of maintaining its transparency. The argumentation of systemic inflammation is proven in patients with diabetes and correlates with the intensity of the extracellular and intracellular protein glycation process, the latter being inherent to non-diabetic status in the presence of free oxygen radicals and mediators of inflammation.

Pro-inflammatory cytokines reduce the expression of carnosine, the natural dipeptide that inhibits prooxidation and protein glycation. Inhibition of the kappa B nuclear factor reduces the intensity of the glycation process by this mechanism.

The protein glycation process, especially in patients with diabetes, is associated with excessive release of adipokines.

In our study in patients with age-related cataract without diabetes, the increase in resistin, adipokine with inflammatory response stimulating effect and insulin resistance induction, was observed. Resistin release is believed to be potentiated by pro-inflammatory cytokines, and resistin in turn stimulates their expression, primarily TNF-alpha.

The correlation of resistin with age-related cataracts is identified in both diabetic and non-diabetic patients [13].

The multi-marker panel highlights elevation of stromal factor derived blood levels. The effect of SDF-1 on stimulating angiogenesis and proliferative processes as well as macrophage migration is known. It can be admitted that macrophages and fibroblasts of the epithelial layer become SDF-1 target sequestered by the irido-ciliary circuit, the common effect being projected on the lens's proteins.

Activation of fibroblasts and collagen synthesis in age-related cataracts is confirmed by the increase in galectin-3, biomarker of fibrosis released by macrophages. Galectin-3 has been found implicated in several biological processes, such as adhesion, differentiation, proliferation and cellular apoptosis. The human crystal expresses galectin 3 during the development of imminent fibers, and after 7 weeks the anterior epithelium of the lens loses this capacity.

The increase in galectin-3 in blood can signify at the eye the disruption of protein synthesis by single-lens cells stored in 1000 layers, defective organ failure and cellular apoptosis, which jeopardizes transparency.

A good cause of IS activation in patients with age-related cataracts is the reduction of anti-inflammatory cytokines, particularly IL-4 and IL-10. These interleukins reduce the expression of the main pro-inflammatory cytokines such as the nuclear factor kappa B, IL-6 and TNF-alpha.

Growth transformation factor is not altered in patients with cataract. This phenomenon can be treated dichotomically, since TGF-1beta possesses both pro-inflammatory and anti-inflammatory properties.

expresia citokinelor pro-inflamatoare principale, factorul nuclear kappa B, IL-6 și TNF-alpha.

Factorul de transformare al creșterii nu este modificat la pacienții cu cataracta menționată. Acest fenomen poate fi tratat dihotomic, dat fiind că TGF-1beta posedă atât proprietăți pro-, cât și anti-inflamatoare.

Reducerea heregulinei-1beta corelează cu majorarea rezistenței. Este vehiculată opinia privind capacitatea heregulinei-1beta de a limita dezvoltarea insulin-rezistenței și procesul de glicare a proteinelor.

O atenție deosebită merită fetuina-A, un biomarker nou anti-inflamator de natură glicoproteică, sintetizat de hepatocite sub acțiunea stimuloare a citokinelor pro-inflamatoare. Fetuina-A este apreciată drept un factor ce echilibrează procesele de proliferare și degradare a matricei extracelulare [14]. La pacienții cu cataractă legată de vârstă, se atestă valori sanguine semnificativ reduse ale fetuinei-A, pe măsură ce proteina C reactivă și stimulatorul ei natural, TNF-alpha, elevează veritabil. Astfel, fetuina-A poate fi în asociere cu IL-4, IL-10 și heregulina, predictorii ai cataractei legate de vârstă.

### Concluzii

1) Aplicarea panoului multi-marker (18 biomarkeri pro și anti-inflamatori) la pacienții cu cataractă legată de vârstă evidențiază argumentarea inflamației sistemice, care poate fi un mecanism de angrenare a stresului oxidativ și procesului de glicare a proteinelor cristalinelor într-o interfață patogenică comună.

2) Modificările cantitative sanguine mai importante ale biomarkerilor inflamației care asociază evoluția cataractei legate de vârstă și pot pretinde la valori predictive iminente, sunt elevarea semnificativă a IL-6, TNF-alpha, SDF-1 și rezistenței, pe o parte, iar pe de altă parte, declinul veritabil al IL-4, IL-15, fetuinei-A și heregulinei-1beta.

### Declarația de conflict de interes

Nimic de declarat.

### Referințe/references

- Vinson J. Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiology*, 2006; 13 (3): 151-62.
- Zoric L., Elek-Vlajic S., Jovanovic M., Kisi B., Djokic O., Canadanovic V., Cosic V., Jaksic V. Oxidative stress intensity in lens and aqueous depending on age-related cataract type and brunescence. *Eur. J. Ophthalmol.*, 2008; 18 (5): 669-74.
- Dudek E., Shang F., Taylor A. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidative stress activates NF-kappa B in lens epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001; 31: 651-8.
- Nishi O., Nishi K., Ohmoto Y. Synthesis of interleukin-1, interleukin-6, and basic fibroblast growth factor by human cataract lens epithelial cells. *J. Cataract Refract. Surg.*, 1996; 22: 852-8.
- Klein B., Klein R., Lee K., Knudtson M., Tsai M. Markers of inflammation, vascular endothelial dysfunction, and age-related cataract. *Am. J. Ophthalmol.*, 2006; 114 (1): 116-22.
- Borkar D., Tham V., Shen E., Parker J., Uchida A., Vinoya A., Acharya N. Association between statin use and uveitis: results from the Pacific Ocular Inflammation study. *Am. J. Ophthalmol.*, 2015; 159 (4): 707-13.

Reduction of heregulin-1beta correlates with increase in resistin. There is an opinion on the ability of heregulin-1beta to limit the development of insulin resistance and the protein glycation process.

Particular attention is paid to fetuin-A, a novel anti-inflammatory drug of glycoprotein synthesis synthesized by palatable hepatocytes under the stimulating action of pro-inflammatory cytokines. Fetuin-A is regarded as a factor that balances the proliferation and degradation processes of the extracellular matrix [14]. In patients with age-related cataracts, there is evidence of significantly reduced fetal-A blood levels as reactive C-proton and its natural TNF-alpha stimulator are truly elevated. Thus, fetuin-A may be in association with age-related predictors of IL-4, IL-10 and heregulin.

### Conclusions

1) The application of the multi-marker panel (18 pro-and anti-inflammatory biomarkers) in patients with age-related cataracts highlights the increase in systemic inflammation, which can be a mechanism of engaging oxidative stress and the glycation process of the lens proteins in a common pathogenetic interface.

2) Major blood quantitative changes of inflammation biomarkers that associate age-related cataract evolution and claim to imminent predictive values are significant elevation of IL-6, TNF-alpha, SDF-1 and resistin on the one hand, and on the other hand The true decline of IL-4, IL-15, fetuin-A and heregulin-1beta.

### Declaration of conflicting interests

Nothing to declare.

- Velilla S., Dios E., Herreras J., Calonge M. Fuchs' heterochromic iridocyclitis: a review of 26 cases. *Ocul. Immunol. Inflamm.*, 2001; 9 (3): 169-75.
- Tan J., Mitchell P., Rochtchina E., Wang J. Statin use and the long-term risk of incident cataract: The Blue Mountains Eye Study. *Am. J. Ophthalmol.*, 2007; 143 (4): 687-9.
- Fong D., Poon K. Recent statin use and cataract surgery. *Am. J. Ophthalmol.*, 2012; 153 (2): 222-8.
- Roberts W. CDC/AHA Workshop on markers of inflammation and cardiovascular disease. Application to clinical and public health practice: laboratory tests available to assess inflammation-performance and standardization: a background paper. *Circulation*, 2004; 110 (25): e572-6.
- Gul A., Rahman M., Salim A., Simjee S. Advanced glycation end products in senile diabetic and nondiabetic patients with cataract. *J. Diabetes Complications*, 2009; 23(5): 343-8.
- Momen L., Mahmoud A., Mostafa A., Ghaleb F., Aziz M., Abdelhamid M., Farrag M., Fahmy I. The relation between advanced glycation end products and cataractogenesis in diabetics. *WJMS*, 2014; 10 (4): 368-74.
- Preedy V. Handbook of nutrition, diet and the eye. King's College London, 2014, Copyright Elsevier, ISBN 9780124017177, 704 p.
- Feistritz H., Klug G., Reinstadler S., Gröber M., Mair J., Kirchmair R., Henninger B., Franz W., Metzler B. Fetuin-A is related to infarct size, left ventricular function and remodeling after acute STEMI. *Open Heart*, 2015; 2 (1): 45-56.