УДК 617.735-002-002: 616.379-008.64

Цыбиков Н.Н., Шовдра О.Л., Пруткина Е.В.

УРОВЕНЬ ЭНДОТЕЛИНА-1, НЕЙРОН-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЕНОЛАЗЫ И АУТОАНТИТЕЛ К НИМ ПРИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ

ГОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия Росздрава (ректор - заслуженный врач РФ, д.м.н., профессор А. В. Говорин)

Известно, что в патогенезе развития диабетической ретинопатии (ДР) принимает участие достаточно большое количество факторов. Многие исследователи доминирующее значение придают микроангиопатиям, как начальному звену развития ДР [1, 2, 4]. Среди механизмов формирования микроангиопатий существенная роль также отводится эндотелину-1 (ЭТ-1), мощнейшему из известных вазоконстрикторов. Однако помимо вазоактивных эффектов ЭТ-1 усиливает продукцию цитокинов [5, 6, 7] и тем самым инициирует воспалительный процесс. Более того, ЭТ-1 потенциирует синтез и секрецию различных ростковых факторов, таких как фактор роста фибробластов, эпирегулина, стимулирующих процессы формирования внеклеточного матрикса и фибронектина [5, 8, 9], которые могут провоцировать развитие ретинопатии. Вместе с тем, при развитии ДР не остаются безучастными нервные структуры глаза, маркером повреждения которых может явиться нейрон-специфическая енолаза (NSE). Однако до настоящего времени в доступной нам литературе мы не обнаружили сведения по данной проблеме, что и составило предмет нашего исследования.

Цель: Исследовать содержание ЭТ-1, NSE и аутоантител (аАт) к ним в слезной жидкости (СЖ) и сыворотке крови (СК) у больных сахарным диабетом 2 типа (СД 2) с непролиферативной диабетической ретинопатией (НДР) и у лиц не страдающих СД 2, на основании чего выяснить их участие в патогенезе развития ретинопатии.

Материал и методы. Нами обследовано 36 человек. Возраст испытуемых колебался от 48 до 69 лет. Мужчин было 6 человек (17%), женщин - 30 (83%). Из исследования исключались пациенты с воспалительными заболеваниями глаз.

Всем испытуемым проводилось стандартное офтальмологическое обследование в условиях ГУЗ "Забайкальский краевой консультативно-диагностический центр" г. Читы, включающее визометрию (без коррекции, с коррекцией), периметрию, тонометрию, биомикроскопию переднего отрезка глаза, офтальмоскопию с максимально расширенным зрачком, биомикроскопию сетчатки с помощью контактной линзы Гольдмана.

Исследуемые были разделены на 2 группы. Основную группу составили 19 человек с НДР, характеризующейся изменением сосудов сетчатки: расширением, неравномерностью калибра вен, склерозом артерий, единичными микроаневризмами, кровоизлияниями в сетчатку, ограниченными отложениями твердого экссудата (диагноз выставлялся согласно действующей классификации ВОЗ). При этом длительность заболевания СД 2 этих пациентов, установленная официально, составляла от 3 месяцев до 17 лет.

Вторую группу - контрольную - составили 17 пациентов, не страдающих СД 2. Обе группы сопоставимы по возрасту.

Оценку содержания ЭТ-1, аАт к нему проводили по результатам определения их концентрации в СК и СЖ, уровень NSE и аАт к этому ферменту определяли только в СЖ.

Уровень ЭТ-1 и NSE исследовали методом твердофазного ИФА. Для определения концентрации ЭТ-1 использовались наборы фирмы "BIOMEDICA GROUP" (Германия), а для NSE - реактивы фирмы "FUJIREBIO, Diagnostics, Inc." (Германия).

Уровень аАт к эндотелину и NSE оценивали оригинальной методикой. Лунки полистероловых планшетов сенсибилизировали ЭТ-1 (BIOMEDICA GROUP, Германия) или NSE (FUJIREBIO, Diagnostics, Inc., Германия) в количестве 100 мкг в 200 мкл забуференного физиологического раствора. После 30 минутной инкубации при комнатной температуре планшет трижды отмывали дистиллированной водой, затем вводили 200 мкл исследуемой биожидкости (сыворотки либо слезной жидкости), разведенной в соотношении 1:100 забуференным физиологическим раствором и после инкубации вновь трижды отмывали. Аутоантитела в СК выявляли анти-IgG-человеческими антителами («Вектор-Бест», г. Новосибирск), а в СЖ - анти-IgAs-человеческими антителами («Вектор-Бест», г. Новосибирск) по стандартной методике. Полученные результаты выражали в единицах оптической плотности (ед. опт. плот.).

Статистическую обработку проводили с применением пакета прикладной программы "BIOSTAT". При сравнении групп использовался критерий Манна-Уитни (Z). Данные представлены в виде: Me - медиана, ИИ - интерквартильный (процентильный) интервал (указан в скобках).

Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты и обсуждение. Оказалось, что у исследуемых лиц в контрольной группе (табл.1) содержание ЭТ-1 в СК составляло 0,478 (0,355-0,923) фмоль/мл, а у пациентов с НДР оно значимо возрастало. Такая же закономерность изменений уровня ЭТ-1 отмечалась и в СЖ (табл. 2).

Следовательно, при формировании ретинопатии возрастает содержание ЭТ-1 в биожидкостях организма. Вероятной причиной этого сдвига являются метаболические нарушения, приводящие к развитию гипоксии различных структур глаза. Локальная ишемия и гипоксия являются одними из факторов, способствующих переходу проэндотелина в ЭТ-1 [10]. Непосредственной же причиной, приводящей к транскрипции иРНК и синтезу ЭТ-1, может явиться тромбин [3, 10]. Генерация последнего, по крайней мере, в сосудах сетчатки глаза ожидаема, так как локальное тромбирование капилляров и микрокровоизлияния при ДР являются частой находкой офтальмолога. Следует учесть, что помимо вазоконстрикторного действия, ЭТ-1 запускает реакции гиперплазии, что, возможно, и реализует переход из непролиферативной ретинопатии в пролиферативную стадию.

Нами было обнаружено резкое (в 18 раз) увеличение концентрации NSE в СЖ больных с НДР (табл. 2). Причина этого явления, на наш взгляд, заключается в следующем. У больных СД 2 вследствие метаболических изменений идет деструкция нейронов и астроцитов головного мозга. При этом NSE в избыточном количестве накапливается в ликворе, а затем, вероятно, через периневральное пространство зрительного нерва проникает во внутриглазную жидкость, и далее, по увеосклеральному пути оттока транссудирует в слезу. Этот факт, с одной стороны, может свидетельствовать о степени тяжести ДР, а с другой, вероятно, отражать процессы повреждения различных структур центральной нервной системы.

Нами установлено, что в СК пациентов с НДР увеличивается количество аАт класса IgG к ЭТ-1 ($p<0,003$), что свидетельствует о возможной иммунной регуляции уровня ЭТ-1 в крови. Вместе с тем, в СЖ, несмотря на существенные колебания концентраций ЭТ-1 и NSE, уровень аАт к ним практически не меняется. Это обстоятельство, скорее всего, указывает на неэффективный местный иммунный ответ на эти антигены.

Таким образом, в патогенезе НДР у больных СД 2 принимают активное участие ЭТ-1 и NSE. При этом, обнаруженные аАт к этим антигенам могут служить как регуляторами их уровня, так и косвенными маркерами развития НДР.

Таблица 1

Содержание эндотелина и аутоантител к нему в сыворотке крови у больных СД 2 с НДР (Me (25-й;75-й))

Изучаемые показатели	Контрольная группа (n=10)	Больные с НДР (n=6)	Коэффициент Манна-Уитни, уровень различий
Эндотелин (фмоль/мл)	0,478 (0,306-0,527)	0,617 (0,429-1,258)	Z=1,145; p=0,025*
Аутоантитела класса IgG к эндотелину, (ед. опт. плот.)	0,132 (0,124-0,138)	0,255 (0,244-0,327)	Z=3,012; p=0,003*

Прим.: * - значимые отличия.

Таблица 2

Содержание эндотелина, NSE и аутоантител к ним у больных СД 2 с НДР в слезной жидкости (Me (25-й;75-й))

Изучаемые показатели	Контрольная группа (n=17)	Больные с НДР (n=19)	Коэффициент Манна-Уитни; уровень различий
Эндотелин (фмоль/мл)	0,803 (0,355-0,923)	1,285 (0,323-2,288)	Z=2,237; p=0,025*
Аутоантитела класса IgAs к эндотелину (ед. опт. плот.)	0,082 (0,078-0,091)	0,103 (0,088-0,109)	Z=1,803; p=0,071
Нейронспецифическая енолаза (нг/мл)	1,476 (1,245-3,136)	18,540 (9,27-20,035)	Z=2,466; p=0,014*
Аутоантитела класса IgAs к енолазе (ед. опт. плот.)	0,102 (0,099-0,111)	0,111 (0,092-0,128)	Z=0,692; p=0,489

Прим.: * - значимые отличия.

Выводы:

1. У больных сахарным диабетом 2 типа с непролиферативной диабетической ретинопатией увеличивается содержание эндотелина-1 и нейрон-специфической енолазы в сыворотке крови и слезной жидкости.
2. Параллельно возрастает содержание аутоантител класса IgG к эндотелину-1 в сыворотке крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балашова Л. М. Антитела к коллагену II и IV типов, фактор некроза опухоли альфа и циркулирующие

иммунные комплексы в слезе и сыворотке крови у больных с различными стадиями диабетической ангиоретинопатии / Л.М. Балашова, Н.С. Зайцева, Л.Е. Теплинская // Вестн. офтальмол. - 2000. - № 3. - С. 31-34.
2. Воробьева И.В. Основные механизмы патогенеза диабетической ретинопатии (обзор литературы) / И.В. Воробьева, М.Ю. Репкина // Сборник научных трудов "VII Всероссийская школа офтальмологов". - М., 2008. - С. 232-240.
3. Гомзаков О.А. Эндотелин в кардиологии: молекулярные, физиологические и патологические аспекты // Кардиология. - 2001. - Т.41. - № 2. - С. 50-58.
4. Лысенко В.С. Современные представления о патогенезе препролиферативной диабетической ретинопатии // Вестн. Российской Академии Медицинских наук. - 2003. - № 5. - С. 44-47.
5. Минушкина Л.О. Есть ли перспективы у антагонистов рецепторов эндотелина? / Л.О. Минушкина, Д.А. Затейщиков // Фарматека. - 2003. - № 6. - С. 51-58.
6. Патарая С.А. Биохимия и физиология семейства эндотелинов / С.А. Патарая, Д.В. Преображенский, Б.А. Сидоренко // Кардиология - 2000. - № 6. - С. 78-85.
7. Agui T. Stimulation of interleukin-6 production by endothelin in rat bone marrow-derived stromal cells / T. Agui, X. Xin, Y. Cai // Blood. - 1994. - Vol. 84. - P. 2531-2538.
8. Guidry C. Endothelins produced by endothelial cells promote collagen gel contraction by fibroblasts / C. Guidry, M. Hook // J. Cell. Biol. - 1991. - Vol. 115. - P. 873-880.
9. Lucher T.F. Eart: endothelin A receptor antagonist trial in heart failure / T.F. Lucher, F. Ruschitzka, I. Anand // Heart Drug. - 2001. - Vol. 1. - P. 294-298.
10. Taylor D.S. Epiregulin is a potent vascular smooth muscle cell-derived mitogen induced by angiotensin II, endothelin-1, and thrombin / D.S. Taylor, X. Cheng, J.E. Pawlowksi // Proc. Natl. Acad. Sci USA. - 1999. - Vol. 96. - P. 1633-1638.