

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© ЦЫБИКОВ Н.Н., ШОВДРА О.Л., ПРУТКИНА Е.В. — 2010

## РОЛЬ ЭНДОТЕЛИНА, НЕЙРОНСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЕНОЛАЗЫ И АУТОАНТИТЕЛ К НИМ В ПАТОГЕНЕЗЕ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

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

(Читинская государственная медицинская академия, ректор — д.м.н., проф. А.В. Говорин, кафедра патологической физиологии зав. — д.м.н., проф. Н.Н. Цыбиков)

**Резюме.** У 19 больных с непролиферативной диабетической ретинопатией (НДР) и 17 человек без нее методом ИФА исследовались концентрация эндотелина-1, нейроспецифической енолазы (NSE) и аутоантител к ним в сыворотке крови и слезной жидкости. Показано, что у больных НДР нарастает уровень эндотелина-1 в сыворотке крови и слезе. При этом содержание аутоантител к эндотелину-1 в крови увеличивается, а слезе остается в пределах нормы. Концентрация NSE в слезной жидкости увеличивается в 18 раз, при этом содержание аутоантител к ней не меняется.

**Ключевые слова.** непролиферативная диабетическая ретинопатия, эндотелин-1, нейрон-специфическая енолаза, аутоантитела.

## THE ROLE OF ENDOTHELIN, NEURONE-SPECIFIC ENOLASE AND THEIR AUTOANTIBODIES IN BLOOD SERUM AND LACRIMAL FLUID IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE 2

N.N. Tsybikov, O.L. Shovdra, E.V. Prutkina  
(Chita State Medical Academy, Chita)

**Summary.** Concentration of endothelin-1, neuron-specific enolase (NSE) and their auto antibodies in blood serum and lacrimal fluid have been investigated by the method of ELISA in 19 patients with non-proliferative diabetic retinopathy (NDR) and in 17 subjects without it. The level of endothelin-1 was registered to increase in the blood serum and lacrimal fluid in the patients with NDR. At the same time the amount of autoantibodies to endothelin-1 in the blood increases but its amount in the lacrimal fluid is normal. The concentration of NSE in the lacrimal fluid 18 times increases, the amount of autoantibodies to it doesn't change.

**Key words:** non-proliferative diabetic retinopathy, endothelin-1; neuron-specific enolase, autoantibodies.

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 потенцирует 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.

## Материалы 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 пациентам 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 асферических линз высокой диоптрийности или контактной линзы Гольдмана.

Исследуемые были разделены на 2 группы. Основную группу составили 19 человек с непролиферативной диа-

бетической ретинопатией (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 сахарным диабетом (СД) 2 типа этих пациентов, установленная официально, составляла от 3 месяцев до 17 лет.

Вторую группу — контрольную — составили 17 пациентов, не страдающих СД. Обе группы были сопоставимы по полу и возрасту.

Оценку содержания ЭТ-1, аутоантител (аАт) к нему проводили по результатам определения их концентрации в сыворотке крови (СК) и слезной жидкости (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 использовали наборы фирмы «BIOMEDICA GROUP» (Германия), а для NSE — реактивы фирмы «FUJIREBIO, Diagnostics, Inc.» (Германия).

Уровень аутоантител (аАт) к эндотелину и NSE оценивали оригинальной методикой. Лунки полистероловых планшетов сенсibilizировали эндотелином-1

Таблица 1  
Содержание эндотелина-1 и аутоантител к нему в сыворотке крови у больных СД 2 типа с НДР (Ме (25-й;75-й))

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

Примечание: \* — значимые отличия.

Таблица 2

Содержание эндотелина-1, NSE и аутоантител к ним у больных СД 2 типа с НДР в слезной жидкости (Ме (25-й;75-й))

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

Примечание: \* — значимые различия.

(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 сыворотке крови выявляли анти-IgG-человеческими антителами (Вектор-Бест, г. Новосибирск), а в слезной жидкости — 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: Ме — медиана, ДИ — 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 сыворотке крови составляло 0,478 (0,355-0,923) фмоль/мл, а у пациентов с НДР оно значимо возрастало. Такая же закономерность изменений уровня Э-1 отмечалась и в слезной жидкости (табл. 2).

Таким образом, 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 Э-1, может явиться тромбин [3, 10]. Генерация последнего, по крайней мере, в сосудах сетчатки глаза ожидаема, так как локальное тромбирование капилляров и микрокровотечения 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 слезной жидкости больных с НДР (табл. 2). Причина этого явления, на наш взгляд, заключается в следующем. У больных СД 2 типа 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 трансудировать в слезную жидкость. 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 сыворотке крови 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 слезной жидкости, 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.

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

### ЛИТЕРАТУРА

- 1.Балашова Л. М., Зайцева Н. С., Теплинская Л. Е. и др. 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 // Вестн. офтальмол. — 2000. — № 3. — С. 31-34.
- 2.Воробьева И.В., Репкина М.Ю. Основные механизмы патогенеза диабетической ретинопатии (обзор литературы) // VII Всероссийская школа офтальмологов: Сб. научных трудов. — 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., Затеищников Д.А. Есть ли перспекти-

- вы у антагонистов рецепторов эндотелина? // Фарматека. — 2003. — № 6. — С. 51-58.
- 6.Патарая С.А., Преображенский Д.В., Сидоренко Б.А. и др. Биохимия и физиология семейства эндотелинов // Кардиология — 2000. — № 6. — С. 78-85.
- 7.Agui T., Xin X., Cai Y. et al. Stimulation of interleukin-6 production by endothelin in rat bone marrow-derived stromal cells. // Blood. — 1994. — Vol. 84. — P. 2531-2538.
- 8.Guidry C., Hook M. Endothelins produced by endothelial cells promote collagen gel contraction by fibroblasts // J. Cell. Biol. — 1991. — Vol. 115. — P. 873-880.
- 9.Lucher T.F., Ruschitzka F., Anand I., et al. Eart: endothelin A receptor antagonist trial in heart failure // Heart Drug. — 2001. — Vol. 1. — P. 294-298.
- 10.Taylor D.S., Cheng X., Pawlowksi J.E., et al. Epregrin is a potent vascular smooth muscle cell-derived mitogen induced by angiotensin II, endothelin-1, and thrombin // Proc. Natl. Acad. Sci USA. — 1999. — Vol. 96. — P. 1633-1638.

**Информация об авторах:** Забайкальский край, г. Чита, ул. Горького, 39а; Пруткина Елена Владимировна — кафедра патофизиологии, к.м.н., ассистент кафедры, email: lenap75@mail.ru тел.: (3022) 32-18-59.

Цыбиков Намжил Нанзатович — зав. кафедрой, д.м.н., профессор, лауреат премии Совета министров СССР; Шовдра Ольга Леонидовна — аспирант; Пруткина Елена Владимировна — ассистент, к.м.н.