

УДК 617.735 :616.633.66 :612.1:616.151.5 : 611 - 018.74

© Н.А. Ярошева, 2014.

ИММУННО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РИСКА ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ У БОЛЬНЫХ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Н. А. Ярошева*Кафедра офтальмологии (зав.каф. – проф. Н.В. Иванова), Государственное учреждение «Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского», г. Симферополь.*

IMMUNO-BIOCHEMICAL RISK FACTORS OF DIABETIC RETINOPATHY PROGRESSING IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS

N. A. Yarosheva

SUMMARY

119 patients with DR divided on research groups are examined. As a control group was 24 healthy donors in the conforming age range. It is determined that an important pathogenetic component of DR progressing is increase of systemic level of proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α , deficiency of fibrinolytic ferments, increase of Et-1 and vWf level in blood plasma depending on a disease stage that promotes to aggravation of hypoxic processes in eye's tissues and in its turn is immuno-biochemical risk factors of DR progressing in patients with DM.

ІМУНО-БІОХІМІЧНІ ФАКТОРИ РИЗИКУ ПРОГРЕСУВАННЯ ДІАБЕТИЧНОЇ РЕТИНОПАТІЇ У ХВОРИХ З ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

Н. А. Ярошева

РЕЗЮМЕ

Обстежено 119 хворих з ДР розділених на групи дослідження. Контролем служили 24 здорових донора у відповідному віковому діапазоні. Встановлено, що важливою патогенетичною складовою прогресування ДР є наростання системного рівня прозапальних цитокінів IL-1 β і TNF- α , дефіцит фібринолітичних ферментів, збільшення рівня Et-1 і vWf в плазмі крові залежно від стадії захворювання, що сприяє збільшенню гіпоксичних процесів в тканинах ока і є, в свою чергу, імунно-біохімічними факторами ризику прогресування ДР у хворих з ЦД.

Ключевые слова: диабетическая ретинопатия, цитокины, фибринолитическая активность сыворотки крови, слезная жидкость, фактор Виллибрандта, сосудистый эндотелий, патогенез.

Сахарный диабет (СД) является актуальной медико-социальной проблемой, существенно растет и инвалидность от этой патологии, особенно от его осложнений и первое место по частоте занимают сосудистые ангиопатии, к которым относят и диабетическую ретинопатию (ДР) [2]. В патогенезе микрососудистых осложнений СД особая роль отводится метаболическим сдвигам, а также нарушениям механизма межклеточных взаимодействий, приводящим к изменению клеточных коопераций, необходимых для нормального функционирования органов и тканей [8]. Регуляция межклеточных взаимодействий осуществляется системой цитокинов, влияющих на тип и длительность иммунного ответа, пролиферацию клеток, гемопоэз, ангиогенез, воспаление и другие процессы. В норме, цитокины, при первичном иммунном ответе, поступают в кровоток в очень низких количествах. Повышение уровня цитокинов свидетельствует об активном патологическом процессе, и может использоваться как один

из критериев диагностики ряда заболеваний и оценки эффективности проводимой терапии [7].

В развитии воспаления при офтальмологической патологии, провоспалительный цитокин (IL-1 β) играет важную роль [12]. При изучении полученных при аутопсии умерших от СД лиц образцов стекловидного тела выявлено повышенное содержание в них IL-1 β и TNF- α , что, по мнению авторов, играет важную роль в патогенезе неоваскуляризации при пролиферативной ДР (ПДР) [13].

Цитокин-зависимый патогенез всех стадий ДР включает развитие на регионарном (ткани глаза) уровне гиперкоагуляции, дефицита эндогенного гепарина, снижение активности процессов фибринолиза и системы антитромбина с возможным развитием локальной (in loco morbi) формы хронического ДВС [14].

Также важной патогенетической составляющей прогрессирования ДР является дисбаланс в системе гемокоагуляция/фибринолиз (в сторону преобла-

дания гиперкоагуляционных сдвигов) как системном, так и регионарном уровне (слезная жидкость, фибринолитическая и прокоагулянтная активность мононуклеарных лейкоцитов и клеток сосудистого эндотелия) [6]. Существенным механизмом формирования дисбаланса системы гемостаза/фибринолиз при ДР является гипергликемия- и инсулинзависимый лейкоцито(лимфоцито)-опосредованный механизм с участием клеток сосудистого эндотелия [8].

Исследованиями доказано, что повышенный уровень фактора Виллибрандта (vWf) в периферической крови непосредственно обусловлен повреждением сосудистого эндотелия [9]. vWf главным образом синтезируется эндотелиальными клетками и его увеличенные уровни отражают активацию или повреждение эндотелиальных клеток – эндотелиальную дисфункцию. Также vWf рассматривается в качестве лабораторного прогностического критерия – маркерного гена диабетической вазопатии [15].

К основным патогенетическим механизмам развития ДР относится цитокиновый дисбаланс, включающий возрастание уровня эндотелина (Et) даже у пациентов с коротким сроком течения СД. Et высвобождается при стимуляции разными субстанциями, а именно: цитокинами или физическими факторами (гипоксия и др.) Уровень Et-1 рекомендовано использовать в качестве лабораторного маркера тяжести сосудистых осложнений при СД [5].

При изучении «цитокиновой» патогенетической концепции ДР нужно учитывать, что с общепатологических позиций при воспалительном повреждении тканей цитокины выступают лишь в качестве компонента (медиатора, или антимедиатора воспаления) целого каскада биохимических преобразований с неизменным участием других гуморальных гомеостатических систем, а также эффекторных клеток воспаления. Характерными особенностями воспалительных процессов любой интенсивности являются инициируемые медиаторами воспаления гемостазио-регуляторные, фибринолитические и иммунные сдвиги не только *in loco morbi* (включая сосудистый эндотелий), но и на системном уровне [4]. Именно поэтому в сферу научного поиска нами, помимо оценки цитокинового гомеостаза, включены клетки сосудистого эндотелия, а также система гемостаза/фибринолиз.

Целью исследования было определение иммунно-биохимических факторов риска прогрессирования (цитокины, фибринолитический потенциал крови и слезной жидкости, и дисфункция эндотелия) диабетической ретинопатии у больных с сахарным диабетом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили сыворотка крови и слезная жидкость. Обследовано 119 больных с ДР: 1-я группа - 14 больных с непролиферативной ДР (НДР), 2-я группа 39 больных с проли-

феративной ДР (ППДР), 3-ю группу составили 42 больных с пролиферативной ДР (ПДР). Контролем служили 24 здоровых донора в соответствующем возрастном диапазоне.

Концентрацию цитокинов IL-1 β , IL-4 и TNF- α в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с использованием коммерческих наборов (ООО «Цитокины» IL-1b, протеиновый контур – TNF- α , IL-4). Оценка результатов осуществляется фотометрическим методом.

Общую фибринолитическую активность (ОФА) (активаторную и плазминовую) крови определяли по методике Astrup T., Mullertz S, выраженную в мм² [11]. Фибринолитическую активность (ФА) слезной жидкости определяли по методике Сомова Е. Е. и Бржевского В. В., выраженную в Ед/мл [10].

Определение содержания эндотелина-1 (Et-1) в плазме крови проводили с помощью иммуноферментного набора фирмы «Amersham Pharmacia Biotech» и колонок для аффинной хроматографии той же фирмы в соответствии с приложенной инструкцией. Концентрацию Et-1 выражали в пг на мл плазмы крови.

Активность vWf определяли по ристомидин-индуцированной агрегации формализированных тромбоцитов (Пат. 35204 Украина, А МПК 6 G 01N33/00. опубл. 15.03.01, Бюл. № 2. – 12 с.).

Все полученные результаты подвергнуты статистической обработке для параметрических и непараметрических критериев с использованием программы «MedStat» (серийный №MS0011) ДНПП ООО «Альфа», г. Донецк.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные исследования уровня IL-1 β , IL-4 и TNF- α в сыворотке крови больных ДР представлены на рис. 1.

Как видно из рис.1, у больных НДР уровень IL-1 β в системном кровотоке не выходит за пределы диапазона его физиологических колебаний, а у больных ППДР и ПДР – повышен соответственно на 23,3% (p и $p_1 < 0,001$) и 41,0% (p и $p_1 < 0,001$), причем чем тяжелее стадия ДР, тем выше уровень IL-1 β , то есть являясь провоспалительным цитокином способствует развитию воспаления у больных ППДР и ПДР.

В свою очередь, такая зависимость свидетельствует о важной роли уровня IL-1 β в прогрессировании ДР.

У больных НДР уровень TNF- α в сыворотке крови не выходит за пределы диапазона его физиологических колебаний, а у больных ППДР и ПДР – повышен соответственно на 21,7% ($p < 0,01$, $p_1 < 0,001$) и на 32,2% (p и $p_1 < 0,001$, $p_2 < 0,05$), причем чем тяжелее стадия ДР, тем выше уровень TNF- α . TNF- α является провоспалительным цитокином и увеличение его уровня способствует развитию воспаления у больных ППДР и ПДР и тоже свидетельствует о важной роли в прогрессировании ДР.

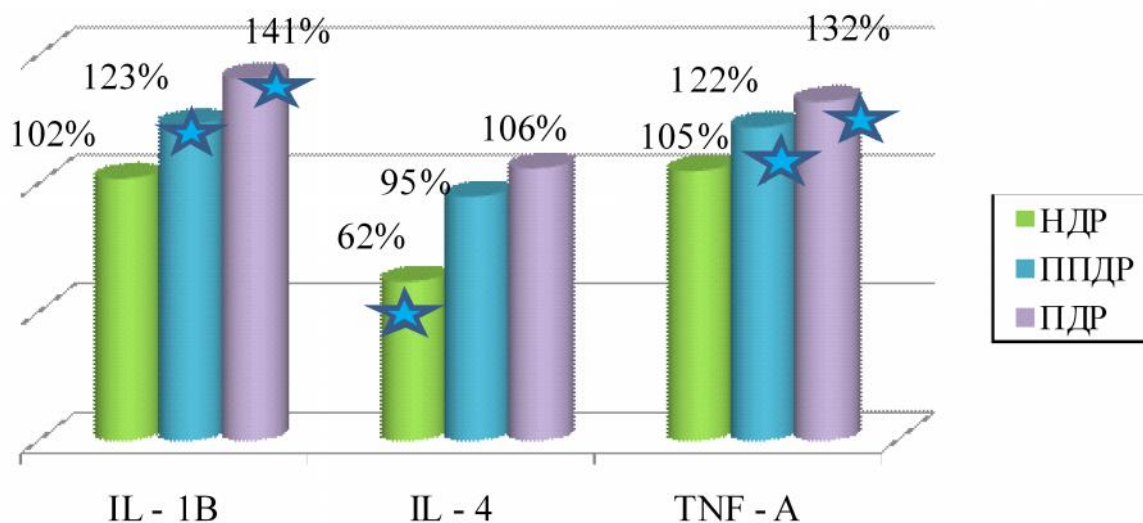


Рис. 1. Уровни цитокинов IL-1β, IL-4 и TNF-α в сыворотке крови больных НДР, ППДР, ПДР, в % к норме, принятой за 100%.

Уровень IL-4 в сыворотке крови больных НДР снижен на 38,0% ($p < 0,001$), а больных ППДР и ПДР возвращается в диапазон физиологических колебаний данного показателя. Можно предположить, что у больных с НДР снижение уровня IL-4 носит саногенетическую направленность, так как, являясь противовоспалительным цитокином, наряду с кортикостероидами, относится к антагонистам экспрессии ICAM-1 [1]. У больных же с ППДР и ПДР наступает истощение адаптационных резервов, характеризующееся, в том числе, достоверным возрастанием (в сравнении с больными 1-й группы с НДР) уровня лимфокина.

Оценивая результаты исследования нужно подчеркнуть, что возрастание в системном кровотоке уровня IL-1β и TNF-α у больных с ППДР и ПДР свидетельствует о наличии у больных воспалительного компонента заболевания. Если предположить, что ДР, как локальный и ограниченный патологический процесс, не может существенно влиять на системный цитокиновый потенциал, то результаты наших исследований позволяют предположить, что одним из факторов прогрессирования ДР является возникновение дисбаланса между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами, в частности, преобладание провоспалительных цитокинов, что приводит к развитию аутоиммунного воспаления, и именно оно лежит в основе развития и прогрессирования ДР.

ОФА сыворотки крови у лиц контрольной группы составляет $73,18 \pm 2,62$ мм², а у больных НДР $68,71 \pm 1,81$ мм², что не выходит за пределы физиологических колебаний показателя, в то время как, у больных ППДР и ПДР снижено соответственно на 24,2% (p и $p_1 < 0,001$) и 43,8% (p , p_1 и $p_2 < 0,001$)

по сравнению с контролем, причем при ПДР показатель снижен почти в 2 раза по сравнению с ППДР, что подтверждает его зависимость от стадии ДР, то есть от тяжести заболевания.

АА крови больных НДР составляет $50,24 \pm 1,82$ мм², что существенно не отличается от соответствующего показателя в группе здоровых лиц, показатель равен $54,39 \pm 2,56$ мм², а у больных с ППДР и ПДР – АА снижена соответственно на 16,5 % ($p < 0,01$, $p_1 < 0,05$) и 28,3 % (p и $p_1 < 0,001$, $p_1 < 0,01$), причем при ПДР показатель снижен почти в 2 раза по сравнению с ППДР, что также свидетельствует о зависимости АА от тяжести или стадии заболевания ДР.

Анализ данных, характеризующих удельную ПА крови, свидетельствует, что у больных НДР ПА равен $18,47 \pm 0,56$ мм², что достоверно не отличается от соответствующего показателя здоровых лиц ($18,79 \pm 0,80$ мм²), а у больных ППДР и с ПДР исследованный показатель достоверно снижен на 46,4 % (p и $p_1 < 0,001$) и на 88,9 % (p , p_1 и $p_2 < 0,001$) соответственно, причем при ПДР показатель снижен почти в 2 раза по сравнению с ППДР, подтверждая так же его зависимость от стадии ДР.

Таким образом, течение ДР на этапе НДР характеризуется стабильными показателями ОФА сыворотки крови, а при прогрессировании заболевания уже на этапе ППДР и тем более ПДР уже сопровождается статистически значимым нарастанием дефицита фибринолитических ферментов – удельной активаторной, плазминовой активности и, как следствие, – ОФА, и зависит от стадии ДР – чем ниже уровень ОФА крови, тем тяжелее ДР.

Результаты исследования регионарного (слезная жидкость) фибринолитического потенциала боль-

ных ДР представлены на рис.2.

Анализ цифрового материала, представленного на рис.3. свидетельствует, что у больных ППДР ФА слезной жидкости снижена на 24,5 % ($p < 0,001$), а у больных ПДР – на 29,8 % ($p < 0,001$), чем у больных

с НДР. Причиной этого, на наш взгляд, могут являться ишемические процессы в тканях глаза и, как следствие этого, недостаточное поступление фибринолитических факторов из периферических зон кровотока.

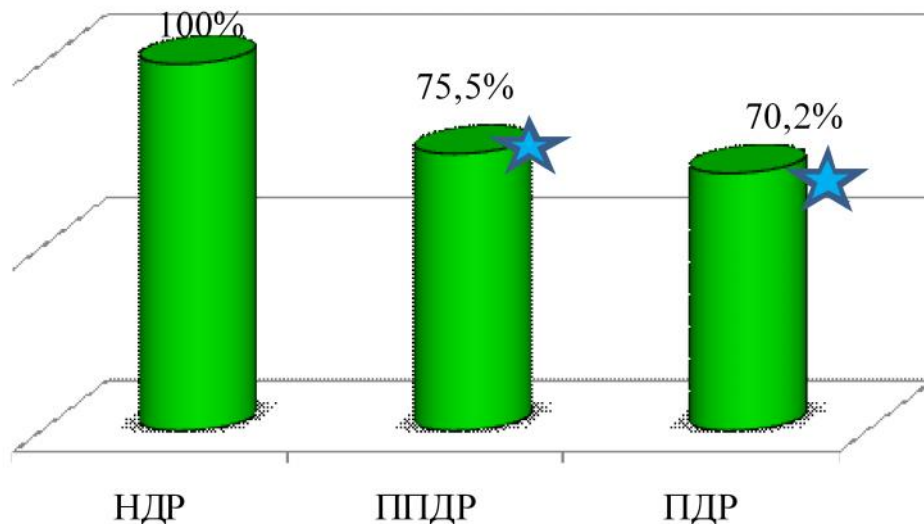


Рис. 2. Фибринолитическая активность (ФА) слезной жидкости больных ПДР, ППДР, ПДР, в % к уровню показателя при НДР, принятой за 100% .

Результаты исследования уровня активности vWf в плазме крови у больных 1-й, 2-й и 3-й групп представлены на рис. 3. Как видно из рис.3, в сравнении с группой здоровых лиц у больных с ДР уровень активности vWf статистически значимо нарастает по мере нарастания степени тя-

жести заболевания: у больных 1-й группы с НДР показатель достоверно повышен на 16,8% (в % к норме принятой за 100%), у больных 2-й (ППДР) и 3-й групп (ПДР) – соответственно на 28,5% ($p < 0,001$, $p_1 < 0,01$) и на 39,0% (p и $p_1 < 0,001$, $p_2 < 0,01$).

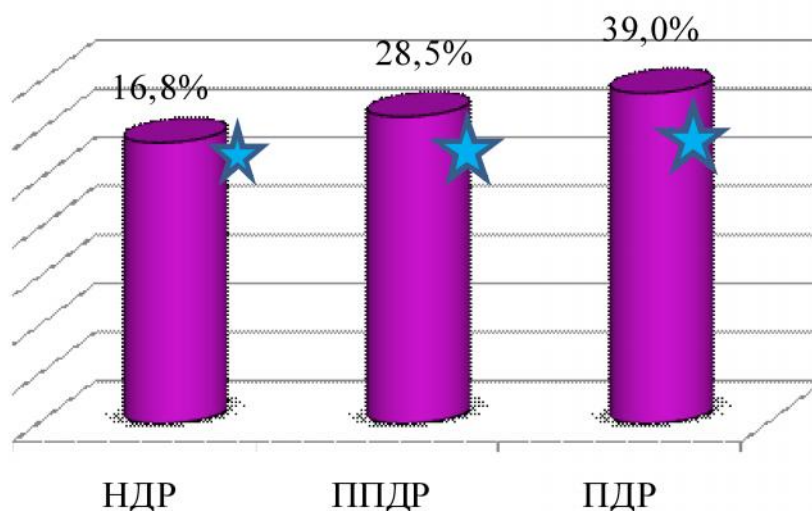


Рис. 3. Уровень активности vWf в плазме крови больных НДР, ППДР, ПДР, в %.

Таким образом, проведенные нами исследования подтверждают, что выполняя основную барьерную функцию, эндотелий сосудов принимает активное участие в регуляции: процессов сосудистой вазоконстрикции и вазодилатации, синтеза и активности факторов пролиферации сосудов, синтеза и ак-

тивности факторов фибринолиза и агрегации тромбоцитов, а также воспалительных реакций (синтез противовоспалительных факторов, включая цитокины) [3]. Можно предположить, что причиной выявленных выше нарушений является непосредственно дисфункция эндотелия сосудов больных с ДР.

Результаты исследования уровня активности Et-1 в плазме крови больных ДР представлены на рис. 4.

Как видно из рис. 4, уровень Et-1 в плазме крови у больных 1-й группы с НДР существенно

не отличается от соответствующего показателя у лиц контрольной группы, а у больных с ППДР (2-й группы) и с ПДР (3-й группы) – повышен соответственно на 18,4 % и 25,6 % по сравнению с контролем, принятым за 100%.

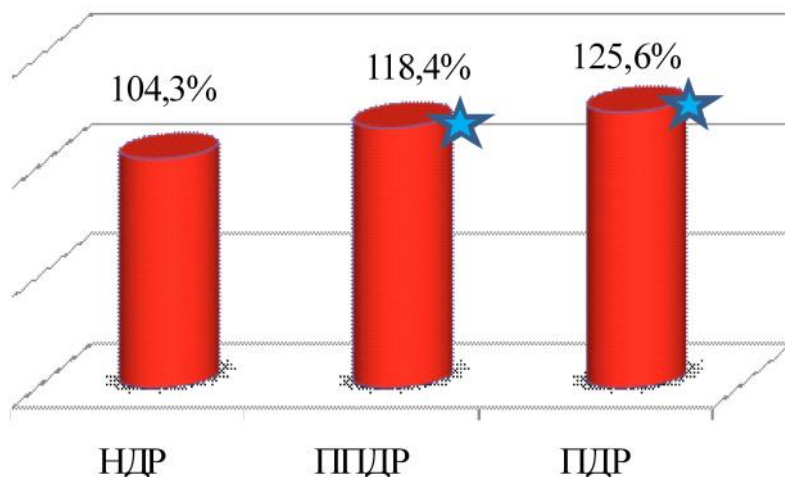


Рис. 4. Уровень Et-1 в плазме крови больных НДР, ППДР, ПДР, в % к норме, принятой за 100%.

Полученные данные свидетельствуют о том, что нарастание дисфункции эндотелия является важным фактором прогрессирования ДР, чем выше содержание Et-1 в плазме крови, тем тяжелее стадия ДР.

ВЫВОДЫ

Установлено, что нарастание системного уровня провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α формирует условия для реализации на уровне сосудов в тканях различной локализации воспалительной «составляющей» ДР, что сопровождается выбросом медиаторов воспаления, экссудацией. В свою очередь, выявленный дефицит фибринолитических ферментов, зависящий от тяжести ДР, не позволяет в полной мере ограничить воспалительную «составляющую», и, как следствие, способствует нарастанию дисфункции сосудистого эндотелия, что выражается в увеличении уровня Et-1 и vWf в зависимости от стадии заболевания, способствует усугублению гипоксических процессов в тканях глаза и является, в свою очередь, иммуно-биохимическими факторами риска прогрессирования ДР у больных СД.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров А. В. Анализ механизма модуляции межклеточных молекул адгезии ICAM / А. В. Александров, А. М. Джексон, А. Г. Румянцев ; Иммунология. – 1997. – № 1. – С. 4–13.
2. Балаболкин М. И. Микроангиопатия – одно из сосудистых осложнений сахарного диабета / М. И. Балаболкин, Е. М. Клебанова, В. М. Креминская Consilium medicum. – 2000. – Т.2, №5. – Р.67-72.

3. Бувальцев В. И. Дисфункция эндотелия как новая концепция профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний / В. И. Бувальцев ; Межд. мед. журнал. – 2001. – №3. – С. 202 – 208.

4. Воспаление. Руководство для врачей / Под ред.: В. В. Серова, В. С. Паукова. – М.: Медицина, 1995. – 640 с.

5. Иванова Н. В. Роль дисбаланса цитокинового гомеостаза в патогенезе диабетической ретинопатии / Н. В. Иванова, Н. А. Ярошева ; Офтальмологический журнал. – 2008. – № 2. – С. 11-14.

6. Иванова Н. В. Фибринолитическая активность сыворотки крови и слезной жидкости у больных с диабетической ретинопатией / Н. В. Иванова, Н. А. Ярошева ; Научно- практический журнал для фармацевтов и врачей «Рецепт». - 7 съезд офтальмологов Республики Беларусь, Минск. – 2007. - С. 290-295.

7. Ковальчук Л. В. Система цитокинов. / Л. В. Ковальчук, Л. В. Ганковская, Э. И. Рубакова ; Москва. 1998.

8. Кочемасова В. Т. Состояние эндотелия и адгезия лейкоцитов при сахарном диабете / В. Т. Кочемасова; Сахар. диабет. – 2000. – № 3. – С.73-78.

9. Поливода С. Н. Фактор Виллибранда как маркер эндотелиальной дисфункции у пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы / С. Н. Поливода, А. А. Черепок ; Укр. ревматол. журнал. – 2000. - №1. – С. 13 – 18.

10. Сомов Е. Е. Коагуляционная и фибринолитическая активность слезной жидкости у здоровых

людей и при острых нарушениях кровообращения в глазу / Е. Е. Сомов, В. В. Бржевский ; Вест. офтальмологии. – 1992. – №3. – С.38-41.

11. Astrup T. The fibrin plate methods for estimation fibrinolytic activity / T. Astrup, S. Mullertz ; Arch. Bioch. Bioph. – 1972. – Vol.40. – P.346–351.

12. Cubitt C. L. Differential induction of GRO α gene expression in human corneal epithelial cells and keratinocytes exposed to proinflammatory cytokines / C.L. Cubitt, R.N. Lausch, J.E. Oakes // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2002. – Vol. 38. – P. 1149-1158.

13. Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1)

and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy / N. Demircan, B.G. Safran, M. Soyulu [et al.] ; Eye. – 2006. – Vol. 20, N. 12. – P. 1366-1369.

14. Disorders in the immune regulation and hemostasis as factors triggering the proliferative retinopathy in diabetes mellitus / N.S. Zaitseva, L.M. Balashova, L.E. Teplinskaia [et al.] ; Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk. – 2003. – Vol. 5. – P. 28-32.

15. Elevated von Willebrand factor antigen predicts deterioration in diabetic peripheral nerve function / M. E. Plater, I. Ford, M. T. Dent [et al.] ; Diabetologia. – 2003. – Vol.39. – P.336-343.