Белки слезной жидкости в диагностике и прогнозе диабетического поражения органа зрения у детей и подростков

С.С. Раков, Л.К. Мошетова, Э.А. Очирова

Кафедра офтальмологии с курсом детской офтальмологии, кафедра клинической и лабораторной диагностики РМАПО МЗ РФ, Москва

Сахарный диабет 1 типа характеризуется поражением всех функциональных систем. Наиболее частыми осложнениями СД у взрослых и детей являются диабетическая ретинопатия (ДР), диабетическая нефропатия (ДН), диабетическая нейропатия (ДНр) [1,6].

ДР - наиболее тяжелое и раннее осложнение СД, приводящее к слепоте [4]. Представляется актуальным поиск оптимального перечня исследований, позволяющих осуществлять раннюю диагностику диабетического поражения органа зрения (ДПОЗ).

Целью настоящего исследования являлось изучение, наряду с традиционными в офтальмологии подходами клинического обследования пациентов, характера экскреции со слезой общего и 12 индивидуальных белков как показателей выраженности мембранопатии для оценки степени тяжести и возможного прогноза.

Методы исследования

В исследование включены 57 детей и подростков в возрасте от 10 до 18 лет, заболевших СД до 15 лет. Контрольную группу составили 20 детей и подростков, не страдающих СД и заболеваниями органа зрения. Из исследования были исключены пациенты с воспалительными заболеваниями глаз.

При офтальмологическом обследовании, включающем такие методы как визометрия, прямая и непрямая офтальмоскопия в бескрасном свете, биомикроскопия, флюоресцентная ангиография (ФАГ), было диагностировано: ДР - у 17 больных, у 1 больного - зрелая диабетическая катаракта, у 13 - начальная диабетическая катаракта), ангиопатия - у 18 больных, неизменённое глазное дно - у 22 больных. У 20 пациентов наблюдалась сочетанная патология - наряду с ДПОЗ была выявлена ДН на стадии микроальбуминурии. Распознавание последней осуществлялось общепринятыми методами: проба Реберга, - тест полоски на микроальбуминурию (Micral - Test 2), повышенная активность в моче НАГ.

Таблица 1

Распределение больных по группам

Показатель	Группы больных (n=57)	
	без ДР (n=40)	ДР (n=17)
Возраст, лет	13,92	15,23
Длительность заболевания, лет	5,37	7,53
Hb A1c, %	11,77	11,43
Наличие Ig M в СЖ	8 (20%)	17 (100%)

В зависимости от степени тяжести ДР все больные разделены на 2 группы: 1-я - больные без ДР и с ангиопатией, 2-я - больные с ДР 1-3 стадии (табл. 1).

Слёзная жидкость (СЖ) собиралась рефлекторным методом (раздражение слизистой носа) в количестве 0,5 мл. Пробу брали в положении сидя, после утреннего завтрака при помощи микропипетки. До момента исследования СЖ хранилась при температуре - 20°С не более 3 мес. У всех больных в слезе определяли концентрацию общего и индивидуальных белков. Концентрацию общего белка определяли с помощью метода Брэдфорд [2,5]. Выбор белковых маркеров ДПОЗ определялся величиной их молекулярной массы.

Нами были определены в СЖ концентрации следующих низкомолекулярных белков: β2 - микроглобулин (β2-MG, молекулярная масса, М-12 кД), α1 - кислый гликопротеид (α1- AG, М-41 кД), α1 антитрипсин (α1- AT, М-54 кД), преальбумин (PAB, М-55 кД) и альбумин (ALB, М-66 кД). Из среднемолекулярных белков мы исследовали содержание трансферрина (TRF, М-80 кД), гаптоглобина (HPT, М-86 кД), иммуноглобулинов класса G (Ig G, М-150 кД) и класса А (Ig A, М-160 кД). Среди высокомолекулярных -С3 компонент системы комплемента (С3, М-185 кД), С4 компонент системы комплемента (С4, М-200 кД) и иммуноглобулины класса М (Ig M, М-971 кД).

Концентрацию индивидуальных белков определяли методом лазерной нефелометрии на иммунохимическом анализаторе «Array» фирмы Beckman (США), за исключением β2- MG, содержание которого в слезе было исследовано с помощью РИА. Содержание в СЖ указанных белков возможно исследовать иммунотурбидиметрическим методом, используя более дешевые реактивы и оборудование; при этом чувствительность данного метода несколько меньше, чем иммунонефелометрического.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью непараметрических методов (критерий Вилкоксона сумм рангов). Корреляционный анализ проводился методами непараметрической статистики по Кендалу.

Результаты и обсуждение

Результаты наших исследований позволили выявить следующие закономерности. В СЖ контрольной группы и у больных 1-й группы мы обнаружили белки с молекулярной массой от 11,8 до 200 кД,

что согласуется с данными Т.Н. Сафоновой и соавт. [3]. Сумма концентраций индивидуальных белков в норме и группах больных составила от 80 до 88% от содержания в СЖ общего белка (ОБ).

У всех больных 2-й группы, в составе СЖ содержится Ig M; среди больных 1-й группы этот белок выявлен лишь у 8 больных, у остальных 32 пациентов Ig M в СЖ обнаружен не был. В контрольной группе Ig M в СЖ также не обнаружено.

Таким образом, прослеживается достоверная зависимость между наличием в СЖ Ig M и тяжестью диабетического поражения органа зрения ($p<0,002$).

Исходя из выявленной закономерности нарастания степени тяжести ДР в зависимости от наличия Ig M, 1-я группа больных была разделена на 2 подгруппы (а,б) для определения характера распределения больных в этой группе по офтальмологическому статусу и по характеру экскреции белков. Средние значения концентраций низко-, средне- и высокомолекулярных и общего белков в представленных группах имеют некоторые особенности (табл.2).

С нарастанием степени тяжести ДПОЗ увеличивалась концентрация трёх групп белков. Средние концентрации белков во 2-й группе с ДР, где в СЖ обнаружен Ig M, близки к соответствующим значениям группы без ДР, где в СЖ обнаружен Ig M, что свидетельствует об идентичных изменениях проницаемости клеточных мембран в этих группах. Отсутствие этого белка в контрольной группе и в группе больных без ДР свидетельствует о незначительных нарушениях проницаемости сосудистой стенки у больных 1-й группы.

Таким образом, увеличение концентрации всех исследованных белков по мере нарастания степени тяжести сосудистых нарушений говорит о прогрессирующей мембранопатии, обусловливающей повышенную проницаемость сосудистой стенки слезных желез и сосудов глазного дна. Появление Ig M в СЖ по мере нарастания степени тяжести ДПОЗ говорит о необходимости дифференцировки больных в зависимости от наличия высокомолекулярного белка - Ig M. На основании этого признака больные разде-

Таблица 2

Содержание низко-, средне-, высокомолекулярных белков и общего белка (мг/дл) в СЖ контрольной группы и группах больных СД (M±m)

Группы		M≤66	M≤160	M>160	ОБ
контроль (n=20) (1)		149,37±2,4 2,3 p<0,001	164,91±2,5 2,3 p<0,001	9,0±1,23 2,3 p<0,001	374,4±5,9 2,3 p<0,001
без ДР (2) (n=40)	без Ig M (2а) у 31% ангиопатия (n=32)	292,86±4,1 1,26,3 p<0,001	225,09±11,1 1,26,3 p<0,001	12,8±1,14 1,26,3 p<0,001	638,06±24,3 1,26,3 p<0,001
	с наличием Ig M (2б) ангиопатия у 100% (n=8)	349,1±10,0 1,2а p<0,001	396,4±24 1,2а p<0,001	107,43±8,55 1,2а p<0,001	964,8±44 1,2а p<0,001
ДР у 100% с наличием Ig M (3) (n=17)		351,68±6,2 1,2а p<0,001	409,76±11,5 1,2а p<0,001	115,88±1,63 1,2а p<0,001	1014±18,2 1,2а p<0,001

Примечание: указаны номера групп, между которыми выявлены достоверные различия.

Таблица 3

Распространенность патологии органа зрения в зависимости от наличия Ig M

Параметры	без Ig M n=32	с наличием Ig M n=24	p
Офтальмологические			
норма глазного дна	22 (68,75)	0	p<0,001
ангиопатия	10 (31,25)	6 (25)	
ДР	0	18 (75)	p<0,01
Клинические			
катаракта (ДК)	6 (18,75)	8 (33,3)	
Возраст, лет	13,85±0,1	14,76±0,1	
Длительность заболевания, лет	4,96±0,12	7,88±0,1	p<0,001
HbA1c,%	11,88±0,1	11,73±0,1	

Примечание: в скобках - %.

Таблица 4

Содержание низко-, средне-, высокомолекулярных белков и общего белка (мг/дл) в СЖ контрольной группы и группах больных СД (M±m)

	Группы	M≤66	M≤160	M>160	ОБ
Ig M нет	Контроль (n=20)	149,37±2,4	164,91±2,5	9,0±1,23	374,4±5,9
Ig M	Ангиопатия (n=10) (1а)	290,8±4,1 (2а,б<0,01)	222,4±11,1 (2а,б p<0,001)	12,05±1,14 (2а,б p<0,001)	635,6±24,3 (2а,б p<0,001)
Ig M (n=32) (1)	Глазное дно без изменений (n=22) (1б)	289,4±6,2	209,8±11,5 (2а,б p<0,001)	9,92±0,72 (2а,б p<0,001)	635,25±18,2 (2а,б p<0,001)
Ig M (n=24)	Ангиопатия (n=6) (2а)	349,1±10,0 (1а,б p<0,01)	396,4±24 (1а,б p<0,001)	107,43±8,55 (1а,б p<0,001)	964,8±44 (1а,б p<0,001)
(2)	ДР (1-3ст) (n=18) (2б)	352,5±4,15 (1а,б p<0,001)	413,0±13,4 (1а,б p<0,001)	124,97±7,2 (1а,б p<0,001)	1026,2±20,1 (1а,б p<0,001)

лены на 2 группы. В 1-й группе, где не было обнаружено Ig M в СЖ, больные были без грубой глазной патологии (нет ДР), и средние значения концентраций индивидуальных и общего белков были не так значительно повышены по сравнению с нормой. Во 2-й группе, где Ig M был обнаружен в СЖ, были диагностированы более грубые изменения, связанные с диабетом (ДР1-3 стадии, ДК), и средние значения концентраций индивидуальных и общего белков были значительно выше таковых в 1-й и контрольной группах (табл. 3,4).

В 1-й группе у 18,75 % больных была зарегистрирована начальная стадия диабетической катаракты, у 31,25 % больных были признаки ангиопатии (диабетической ретинопатии ни в одном случае зарегистрировано не было) и у 68,75% больных глазное дно было без изменений. Во 2-й группе у 33,3 % больных была диагностирована диабетическая катаракта, у 25% больных отмечались признаки ангиопатии, у 75% больных была диагностирована диабетическая ретинопатия (ДР 1-3 стадии), у 3,8 % больных глазное дно не офтальмоскопировалось из-за зрелой диабетической катаракты; неизменённого глазного дна не было зарегистрировано ни в одном случае.

Таким образом, прослеживается достоверная зависимость между наличием в СЖ Ig M и тяжестью диабетического поражения органа зрения на фоне увеличения общей длительности заболевания.

Для того чтобы определить характер экскреции белков СЖ внутри этих двух групп в зависимости от наличия патологии на глазном дне было проведено деление каждой группы на подгруппы по офтальмологическому статусу: 1а подгруппа без наличия в СЖ Ig M (больные СД с ангиопатией сосудов глазного дна), 1б подгруппа без наличия в СЖ Ig M (больные без изменений на глазном дне). 2а подгруппа больных, в СЖ которых обнаружен Ig M (больные с ангиопатией сосудов глазного дна), 2б подгруппа в СЖ имеется Ig M (больные с ДР).

С нарастанием тяжести сосудистых нарушений увеличивалась концентрация всех исследованных белков. Достоверные различия имеют место лишь между подгруппами основных групп: группой больных с Ig M в СЖ и группой больных, в СЖ которых Ig M не обнаружено (табл. 4).

Учитывая закономерность выявления большего количества глазной патологии (ДР, ДК) по мере увеличения концентрации каждого из индивидуальных и общего белков СЖ, назрела необходимость детального изучения значения концентраций и характера экскреции со слезой низко-, средне-, высокомолекулярных и общего белков в диагностике глазной патологии.

Нам удалось выделить из 1-й группы (нет Ig M) 6 больных, уровень экскреции α1- AG, α1- AT, PAB, ALB, TRF, HPT, C_3, Ig G и Ig A которых оказался выше (p<0,001), чем у остальных больных 1-й группы (табл. 5, 6, 7). Наиболее информативными из перечисленных белков оказались TRF и HPT, экскреция которых возрастает примерно в 2 раза. Это позволило разделить 1-ю группу на 2 подгруппы. В 1а подгруппе у 23 % больных имела место начальная стадия ДК и у 30 % больных были признаки ангиопатии, ни у кого нет ДН. В 1б подгруппе ни у одного не было диагностировано диабетической катаракты, у 33% больных отмечались признаки ангиопатии, у 100% больных выявлена ДН, что свидетельствует о выраженных системных нарушениях проницаемости клеточных мембран.

Из больных 2-й группы (Ig M обнаружен) нам

Таблица 5

Содержание низкомолекулярных белков (мг/дл) группах больных (M±m)

Группа	β_2-MG M 11,8	α_1-AG M 41	α_1-AT M 54	PAB M 55	ALB M 66	Суммарное содержание белков
Норма	0,21±0,027	5,01±0,30	4,1±0,25	4,31±0,36	135,8±2,33	149,37±2,38
1а	0,81±0,03	6,15±0,37	8,45±0,29	8,14±0,47	263,86±5,79	287,41±5,65
1б	0,82±0,02	6,98±0,1	9,63±0,15	9,77±0,26	287,5±1,24	314,74±1,48
2а	1,04±0,06	7,15±0,32	10±0,49	10,55±1,36	303,36±3,75	332,1±5,17
2б	1,1±0,07	8,01±0,71	11,19±0,59	10,71±1,37	336,05±6,5	367,06±5,31

Таблица 6

Содержание среднемолекулярных белков (мг/дл) в группах больных (M±m)

Группа	TRF M 80	HPT M 86	IgG M 150	IgA M 160	Суммарное содержание белков
Норма	49,4±1,57	20,05±1,67	83,84±1,86	11,64±1,99	164,93±2,52
1а	57,91±1,37	29,91±1,56	94,87±1,51	25,43±3,59	208,12±6,23
1б	106,92±4,57	44,87±2,01	103,18±1,71	38,18±4,61	293,15±9,89
2а	114,25±2,85	52,36±1,92	132,6±6,02	54,76±3,43	353,99±9,9
2б	120,11±3,85	56±2,63	170,9±2,51	115,1±6,1	455±13,32

Таблица 7

Содержание высокомолекулярных белков (мг/дл) в группах больных (M±m)

Группа	C3M 185 M 80	C4M 200 M 86	Ig MM 385 M 150	Суммарное содержание белков
Норма	9,04±0,75	2,82±1,05	0	11,86±1,14
1а	12,48±0,73	3,83±0,6	0	16,23±1,1
1б	106,92±4,57	44,87±2,01	0	103,18±1,71
2а	37,77±4,46	14,34±2,37	20,32±2,96	72,43±8,55
2б	60,06±2,96	21,62±1,41	68,34±6,41	150,03±7,25

удалось выделить 15 больных, уровень экскреции ALB, Ig G, Ig A, Ig M, C_3 и C_4 у которых оказался выше ($p<0,001$), чем у остальных больных 2-й группы (табл. 5, 6,7). Наиболее показательными являются тесты на Ig M и A, экскреция которых возрастает в 2-3,5 раза. Это позволило разделить 2-ю группу на 2а и 2б подгруппы, где имели место более выраженные изменения органа зрения по мере нарастания концентраций белков.

Таким образом, по мере увеличения концентраций выявленных белков нарастают изменения со стороны органа зрения (см. рисунок, табл. 4).

Проведенные исследования выявили некоторые особенности характера экскреции белков в СЖ. У больных без клинических форм ДР (1а, 1б подгруппы) больший удельный вес в экскреции со слезой имели низкомолекулярные белки, в то время как у больных с клиническими формами ДР (2а, 2б подгруппы) - среднемолекулярные и высокомолекулярные. Увеличение экскреции со слезой низкомолекулярных белков по мере прогрессирования патологического процесса оказалось различным. Наиболее информативным в этом отношении было увеличение концентрации β2-MG (в 3,9 раза), α1- AT и ALB (в 2 раза) у больных 1а подгруппы по сравнению с нормой. Эти 3 низкомолекулярных белка в слезе могут явиться маркёрами ангиопатии сетчатки (табл. 5).

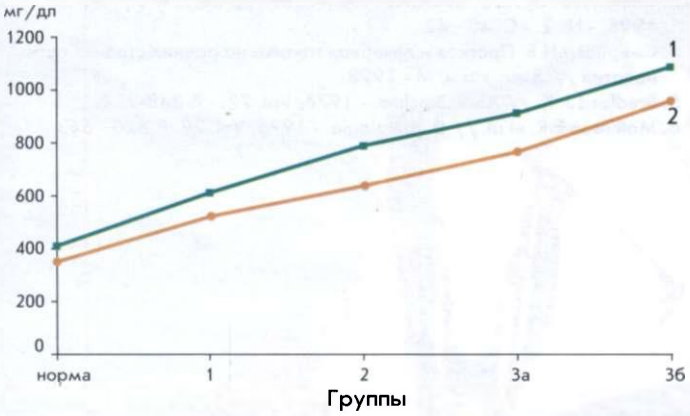
На более поздних стадиях патологического процесса большую информативность несут средне- и особенно высокомолекулярные белковые маркёры.

В слезе больных 1а подгруппы наиболее показательным оказалось увеличение экскреции HPT у больных 1б группы - TRF и HPT, 2а и 2б групп - Ig M и A. Для дифференциальной диагностики этих групп больных наиболее пригодны высокомолекулярные белковые маркёры. Кроме того, характер экскреции со слезой C3, C4 позволяет дифференцировать больных 1а, 1б, 2а и 2б подгрупп (табл. 7).

На основании анализа результатов исследования

белкового состава СЖ нами предложен диагностический тест определения степени тяжести ДПОЗ.

По концентрации в СЖ низкомолекулярных белков (β2-MG 0,81+0,03 мг/дл, α1- AT 8,45±0,29 мг/дл, ALB 263,86±5,79 мг/дл) и отсутствию Ig M можно достоверно прогнозировать (p<0,001), что данный больной относится к группе больных, у которых отсутствует ДР, а ангиопатия сетчатки, если



Уровень экскреции со слезой общего белка (1) и суммарная экскреция индивидуальных белков (2).

таковая имеет место, возможно, объясняется состоянием декомпенсации на момент осмотра. При нормализации обменных процессов ангиопатии может не отмечаться.

По концентрации в СЖ среднемолекулярных белков (TRF 106,92±4,57 мг/дл, HPT 44,87±2,01 мг/дл) и отсутствию Ig M можно достоверно прогнозировать (p<,0,001), что данный пациент относится к группе без ДК, а ангиопатию сетчатки надо рассматривать как преклиническую стадию ДР. Нарушение микроциркуляции носит функциональный характер.

По концентрации в СЖ высокомолекулярных белков (C_3 37,77±4,46 мг/дл, C_4 14,34±2,37 мг/дл, Ig M 20,32±2,96 мг/дл) можно достоверно прогнозировать (p<0,001), что данный пациент относится к группе, для которой характерно наличие ДК и непролиферативной стадии ДР, а ангиопатию сетчатки, если таковая будет иметь место, надо рассматривать как преклиническую стадию ДР, которая, возможно, может перейти в последующую стадию (ДР 1 стадии). Система микроциркуляции, по нашему мнению, находится уже на стадии органических изменений.

По концентрации в СЖ высокомолекулярных белковых маркеров (C3 60,06±2,96 мг/дл., C4 21,62±1,41 мг/дл., Ig M 68,34±6,41 мг/дл) можно достоверно прогнозировать (p<0,001), что данный пациент относится к группе, где имеют место ДК и не- /или препролиферативная стадия ДР, а ангиопатию сетчатки надо рассматривать как преклиническую стадию ДР, которая может быстро перейти в последующую стадию (ДР 1 стадии). Система микроциркуляции, возможно, находится на стадии органических изменений.

Для создания прогностического теста ДПОЗ и оценки достоверности предполагаемого прогноза был проведен динамический офтальмологический осмотр больных детей и подростков с СД (n=31) через 12 мес. после первичного осмотра, которым исследовали СЖ.

Прогностический тест

1. Принадлежность больного к группам, где нет значительных изменений белкового спектра СЖ и нет клинических форм ДР, возможно, говорит о более благоприятном течении патологического процесса на глазном дне. При оценке достоверности благоприятного прогноза у больных 1а и 1б групп по фактической динамике состояния глазного дна различий между прогнозом и фактической динамикой не обнаружено (W=0,32); у 12 (85,7%) пациентов - благоприятная фактическая динамика; у 2 (14,28%) пациентов - неблагоприятная фактическая динамика, что говорит о состоятельности прогноза в данных группах.

2. Принадлежность больного к группам (2а, 2б), где имеют место клинические формы ДР и выраженное изменение белкового спектра СЖ, обусловленное значительными морфологическими изменениями сосудистой стенки слёзной железы, возможно, говорит о вероятности неблагоприятного течения (прогрессирования) патологического процесса на глазном дне. При оценке достоверности неблагоприятного прогноза у больных 2а и 2б групп оказалось, что фактическая динамика достоверно отличалась от прогноза в сторону увеличения благоприятного течения патологического процесса (W=0,025); у 12 (70,6%) пациентов - неблагоприятная фактическая динамика; у 5 (29,4%) пациентов - стабильная фактическая динамика. Однако это не говорит о несостоятельности неблагоприятного прогноза в данных группах больных (более чем у 2/3 больных неблагоприятный прогноз оправдывается), а скорее всего говорит о том, что лечение данных больных с не оправдавшимся неблагоприятным прогнозом (5 пациентов) проводилось правильно (стандартный курс лечения в стационаре, дополнительное лечение ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента проводили 2 пациентам из 5).

Таким образом, доказана высокая прогностическая ценность предложенного теста (благоприятного прогностического теста) оценки динамики диабетических изменений на глазном дне у детей и подростков с СД.

Выводы

1. Изменения качественного и количественного белкового состава слёзной жидкости у детей и подростков с СД отражают тяжесть структурных нарушений в стенках сосудов слёзной железы и глазного дна, тем самым характеризуют степень тяжести диабетического поражения органа зрения.

2. Предложенные прогностический и диагностический тесты высокоинформативны, точны и могут быть применены на практике не только врачом офтальмологом, но и эндокринологом в условиях поликлиники и стационара.

Литература

1. Балаболкин М.И., Мамаева Г.Г. и соавт. Почечно - ретинальный синдром у больных сахарным диабетом. // 3-й Всероссийский съезд эндокринологов. Тез. докл. М. - 1996. - С. 32
2. Раков С.С. // Лабор. дело. - 1987. - № 2. - С. 3-4.
3. Сафонова Т.Н., Овчинникова А.А. и соавт. // Вестник офтальмол. 1998. - № 2. - С. 40 - 42.
4. Смирнова Н.Б. Прогноз и лечебная тактика на ранних стадиях ретинопатии // Дисс. к.м.н, М - 1998.
5. Bredford J. K. // Anal. Biochtm. - 1976. Vol. 72. - P. 248-254.
6. Mathitsen E.R. et al. // Diabetologia. - 1996. Vol. 29. P. 640 - 643.