

К.П. Павлюченко, Т.В. Олейник, А.В. Коробова

СООТНОШЕНИЕ МАРКЕРОВ ДЕГРАДАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В ПАТОГЕНЕЗЕ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, Украина

Реферат. Изучена величина соотношения тканевой ингибитор матриксной металлопротеиназы-1/матриксная металлопротеиназа-9 в крови и влаге передней камеры больных с сахарным диабетом 2 типа и различными стадиями диабетической ретинопатии. Установлено, что среднее значение данного соотношения во влаге передней камеры больных с диабетической ретинопатией достоверно ниже аналогичного среднего соотношения у пациентов без сахарного диабета. Обнаружено, что самые низкие уровни этого соотношения во влаге передней камеры наблюдались при умеренной, тяжелой непролиферативной и пролиферативной диабетической ретинопатии. В крови достоверное снижение соотношения тканевой ингибитор матриксной металлопротеиназы-1/матриксная металлопротеиназа-9 было обнаружено у больных с умеренной непролиферативной и пролиферативной диабетической ретинопатией. Установлена сильная положительная корреляционная зависимость между давностью сахарного диабета 2 типа и уровнями металлопротеиназы-9 и тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы-1 в крови и во влаге передней камеры.

Ключевые слова: соотношение тканевой ингибитор матриксной металлопротеиназы-1/матриксная металлопротеиназа-9, влага передней камеры, диабетическая ретинопатия, корреляция, сахарный диабет 2 типа, давность диабета

Во всем мире сахарный диабет (СД) признан одним из наиболее распространенных заболеваний, он занимает четвертое место среди причин смертности в развитых странах. По данным IDF (International Diabetes Federation), распространенность СД среди взрослых составляет в среднем 5,1 %. Несмотря на многообразие форм СД, основную долю больных составляют лица с СД 2 типа (СД 2 типа), в разных популяциях и этнических группах их количество достигает 80–95 %. По данным Всемирной Организации Здравоохранения, к 2025 году число больных СД 2 типа может увеличиться до 380 миллионов человек, поэтому данное заболевание в настоящее время справедливо считается неинфекционной эпидемией мирового масштаба [3, 15].

Качество жизни больных СД в настоящее время определяется развитием и прогрессированием сосудистых осложнений этого заболевания. Риск развития слепоты у больных СД в 20 раз выше по сравнению с лицами без диабета [4]. Одним из наиболее частых и прогностически неблагоприятных проявлений сахарного диабета является диабетическая ретинопатия (ДР), имеющая специфическую клиническую и морфологическую картину. В Украине ДР занимает второе место среди причин инвалидности по зрению, причем распространенность ДР в нашей стране за последние 10 лет увеличилась в 7 раз [1]. Риск развития и прогрессирования ДР зависит в ос-

новном от давности, компенсации и тяжести течения сахарного диабета, а также наличия сопутствующей патологии (артериальная гипертензия, атеросклероз) [2, 7].

В современной научной литературе достаточно много работ, посвященных патогенезу возникновения диабетического поражения сетчатки [10, 11, 13], но патогенетические механизмы ДР настолько многообразны, что их изучение до сих пор продолжается. В настоящее время закономерности поражения сетчатой оболочки при СД 2 типа рассматриваются с позиции унифицированной гипотезы оксидативного стресса, которая объясняет взаимосвязь между гипергликемией и метаболическими расстройствами, инициирующими клеточные повреждения [11]. Иностранскими экспериментальными исследованиями доказано, что такие маркеры деградации внеклеточного матрикса, как матриксная металлопротеиназа-9 (ММП-9) и тканевой ингибитор матриксной металлопротеиназы-1 (ТИМП-1) занимают важное место в патогенезе появления доклинических стадий ДР, а также в ее последующем прогрессировании. ММП-9 индуцирует апоптоз эндотелия, перицитов ретинальных сосудов, клеток Мюллера и глии, приводит к повреждению внутреннего гемато-ретиального барьера путем протеолитического расщепления компонентов базальных мембран сосудистого русла сетчатки [12, 13]. Эндогенные тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ (ТИМП) уменьшают чрезмерную деградацию внеклеточного матрикса протеолитическими ММП, ТИМП-1 обратимо связывается с про-ММП-9 и таким образом регулирует ее активность [9].

Ранее нами было установлено, что средние уровни ММП-9 и ее тканевого ингибитора ТИМП-1 достоверно повышены как в крови, так и во влаге передней камеры (п/к) больных с диабетической ретинопатией и СД 2 типа в сравнении с уровнями этих показателей у больных без сахарного диабета [5]. Также нами было выявлено, что возрастание содержания в крови и во влаге п/к этих показателей происходит пропорционально увеличению тяжести ДР, наряду с однонаправленным повышением сывороточных и внутриглазных концентраций провоспалительных цитокинов – фактора некроза опухолей-альфа и интерлейкина-1бета [6]. Однако по мнению зарубежных авторов не только повышение активности, но и дисбаланс в соотношении активности ММП и ТИМП лежит в основе патогенеза многих сосудистых, хронических деструктивных воспали-

тельных и аутоиммунных заболеваний, а при ДР приводит к появлению микроаневризм капилляров и нарушению циркуляции крови в сетчатке [14].

Целью работы стало изучение величины соотношения ТИМП-1/ММП-9 в крови и влаге передней камеры у больных с различными стадиями ДР и проведение корреляционного анализа между давностью СД 2 типа и уровнями матриксной металлопротеиназы-9, ТИМП-1 в крови и во влаге передней камеры больных с различными стадиями ДР.

М а т е р и а л и м е т о д ы

Клинические исследования проводились сотрудниками кафедры офтальмологии Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького и офтальмологической клиники «ЛАЗЕР Плюс», г. Донецк. Проводилось наблюдение за 95 пациентами (104 глаза) с сахарным диабетом 2 типа и различными стадиями диабетической ретинопатии, которые составили основную группу. Контрольную группу составили 22 пациента (22 глаза) аналогичной возрастной категории без диабета, их кровь и влага передней камеры использовались для определения средне-статистических нормальных значений исследуемых в работе иммунологических показателей. Обе группы были статистически сопоставимы по полу и возрасту. Средний возраст больных в основной группе составил $67,55 \pm 0,83$ лет, и $67,09 \pm 1,49$ лет в контрольной группе ($p=0,64$). Пациенты обеих групп были прооперированы по поводу возрастной катаракты одним хирургом. В качестве оперативного лечения проводилась фактоэмульсификация катаракты (ФЭК) через роговичный доступ 2,2 мм с имплантацией интраокулярной линзы Akreos Adapt (Baush & Lomb, USA).

Давность постановки диагноза «сахарный диабет 2 типа» в основной группе в среднем была равна $6,35 \pm 0,45$ лет. Пациенты основной группы на момент оперативного лечения катаракты находились в стадии компенсации СД. После проведенного оперативного лечения катаракты в соответствии со шкалой тяжести ДР, предложенной Американской Академией Офтальмологии в 2002 г., пациенты распределились следующим образом: ДР отсутствовала в 52,88 % случаев (55 глаз), начальная непролиферативная ДР (НПДР) наблюдалась в 17,31 % случаев (18 глаз), также у 17,31 % (18 глаз) имелись признаки умеренной НПДР, тяжелая НПДР была обнаружена на 5 глазах (4,81 %) и пролиферативная ДР (ПДР) – на 8 глазах (7,69 %).

Для определения уровней ММП-9, ТИМП-1 производился забор венозной крови и влаги передней камеры (п/к) в день операции. Забор влаги п/к осуществляли во время ФЭК. Уровни ММП-9 и ТИМП-1

определяли наборами для твердофазного иммуноферментного анализа «Матриксная металлопротеиназа-9» и «Тканевой ингибитор матриксной металлопротеиназы-1» производства фирмы Bender Medsystems (Австрия) согласно инструкциям.

Статистическая обработка выполнялась при помощи программы STATISTICA 6,0 (StatSoft, Inc. 1984-2001, серийный номер 31415926535897). Количественные показатели представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, а m – стандартная ошибка среднего. Проверку гипотезы о равенстве генеральных средних в сравниваемых группах проводили с помощью непараметрического U -критерия Манна-Уитни для независимых совокупностей. Корреляционный анализ между давностью СД 2 типа и уровнями изучаемых показателей проводили при помощи расчета коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Во всех процедурах статистического анализа рассчитывался достигнутый уровень значимости (p), при этом критический уровень значимости в данном исследовании принимался равным 0,05 [8].

Р е з у л ь т а т ы и о б с у ж д е н и я

В таблице отображены результаты исследования средней величины соотношения ТИМП-1/ММП-9 в крови и влаге п/к больных основной и контрольной групп. Необходимо отметить, что у больных с различными стадиями диабетической ретинопатии и сахарным диабетом 2 типа происходит снижение средней величины соотношения ТИМП-1/ММП-9 как в крови, так и во влаге передней камеры (см. табл.). При сравнении средних соотношений в основной и контрольной группах во влаге передней камеры было получено достоверное отличие ($p=0,038$).

Было обнаружено, что снижение величины соотношения ТИМП-1/ММП-9 в крови больных основной группы наблюдалось при всех стадиях диабетической ретинопатии – от ее полного отсутствия до самой тяжелой, пролиферативной стадии. Так, при отсутствии ДР соотношение ТИМП-1/ММП-9 было равным $4,45 \pm 0,07$, при начальной непролиферативной

Таблица. Характеристика соотношения ТИМП-1/ММП-9 у больных основной и контрольной группы в сыворотке и влаге передней камеры ($M_{cp} \pm m$)

Сыворотка	Основная группа (n1=95)	Контрольная группа (n1=22)	p-уровень при сравнении ТИМП-1/ММП-9
ТИМП-1/ММП-9 ($M_{cp} \pm m$)	$4,30 \pm 0,07$	$4,58 \pm 0,26$	$p=0,08$
Влага передней камеры	Основная группа (n2=104)	Контрольная группа (n2=22)	p-уровень при сравнении ТИМП-1/ММП-9
ТИМП-1/ММП-9 ($M_{cp} \pm m$)	$4,46 \pm 0,41$	$5,28 \pm 0,38$	$p=0,038$

Примечание: n1 – количество больных; n2 – количество глаз

ДР $4,19 \pm 0,06$ соответственно, однако при сравнении с аналогичным показателем в контрольной группе различие не достигло достоверности. Сравняя величину соотношения ТИМП-1/ММП-9 в крови больных с умеренной НПДР – $4,02 \pm 0,07$ с соотношением ТИМП-1/ММП-9 в крови контрольной группы – $4,58 \pm 0,26$, было обнаружено статистически значимое различие ($p=0,046$). При тяжелой стадии непролиферативной ДР в крови больных соотношение ТИМП-1/ММП-9 возросло до $4,53 \pm 0,22$, а при пролиферативной ДР изучаемый показатель составил $4,10 \pm 0,12$, что статистически достоверно отличалось от аналогичного показателя в контрольной группе ($p=0,014$).

Во влаге п/к больных с отсутствием диабетической ретинопатии величина соотношения ТИМП-1/ММП-9 составила $4,66 \pm 0,06$, при начальной НПДР – $4,58 \pm 0,10$, а при умеренной непролиферативной ДР – $3,97 \pm 0,09$. У больных с тяжелой НПДР и пролиферативной стадией ДР изучаемый показатель был равным $4,08 \pm 0,17$ и $4,12 \pm 0,17$ соответственно. Анализируя влияние баланса ТИМП-1/ММП-9 на тяжесть поражения сетчатой оболочки при СД 2 типа, необходимо отметить, что, сравнив соотношения ТИМП-1/ММП-9 при умеренной непролиферативной, тяжелой непролиферативной и пролиферативной ДР с соотношением во влаге контрольной группы во всех случаях, было получено достоверное различие ($p=0,003$ для умеренной НПДР, $p=0,032$ для тяжелой НПДР, $p=0,006$ для ПДР). Указанные изменения этого соотношения в сторону снижения во влаге п/к при умеренной, тяжелой стадиях НПДР и ПДР вероятно объясняются недостаточной ингибирующей активностью ТИМП-1 по отношению к ММП-9 в сетчатке больных СД при наличии более выраженных стадий ДР, несмотря на параллельный рост уровня ТИМП-1 наряду с ММП-9 по мере прогрессирования диабетической ретинопатии.

Полученные нами клинические данные о статистически значимом снижении соотношения ММП-9/ТИМП-1, вызванные увеличением уровня ММП-9 как в крови, так и во влаге п/к при начальных стадиях ДР, а также при пролиферативной стадии ДР, в целом, согласуются с мнением иностранных авторов о двойной роли ММП-9 в развитии ДР: на ранних стадиях заболевания (непролиферативная ДР) эта протеаза способствует апоптозу капиллярных клеток сетчатки, и в более поздней пролиферативной стадии ММП-9 способствует неоваскуляризации [8].

Достоверное снижение уровня соотношения ТИМП-1/ММП-9 при умеренной НПДР как в крови, так и во влаге п/к свидетельствует о том, что эта стадия диабетической ретинопатии является своеобразной гранью, когда активность ММП-9 начинает превышать ингибиторную активность ТИМП-1. Относительное возрастание величины ТИМП-1/ММП-9 при тяжелой НПДР до $4,53 \pm 0,22$ в крови больных СД 2 типа и до $4,08 \pm 0,17$ во влаге п/к в сравнении с соответствующими соотношениями при умеренной НПДР вероятнее всего связано с тем, что тяжелая НПДР является «стадией декомпенсации» и началом

необратимых изменений в сетчатой оболочке, и оба эти фактора – металлопротеиназа-9 и ТИМП-1 под воздействием оксидативного стресса и провоспалительных цитокинов начинают вырабатываться бесконтрольно, инициируя предпосылки для последующих пролиферативных процессов.

При проведении корреляционного анализа между содержанием ММП-9, ТИМП-1 в крови и давностью СД 2 типа было обнаружено, что между уровнями ММП-9, тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы-1 и длительностью основного заболевания существует взаимосвязь. Корреляционный анализ показал, что связь между стажем СД 2 типа и уровнями ММП-9 и ТИМП-1 в крови имеет характер сильной положительной зависимости – $r=0,747$ для ММП-9, $r=0,704$ для ТИМП-1, что свидетельствует в пользу нарастания уровней этих показателей по мере увеличения давности СД 2 типа и соответственного прогрессирования ДР. Факт наличия такой взаимосвязи также подтверждается тем, что больные с тяжелой НПДР и пролиферативной ДР имели самые высокие уровни ММП-9 и ТИМП-1 в крови при самом большом стаже диабета в основной группе – $11,80 \pm 1,88$ лет и $15,00 \pm 1,02$ лет соответственно.

Корреляционный анализ между всеми изучаемыми показателями во влаге передней камеры больных основной группы и длительностью СД 2 типа также показал наличие прямой корреляционной зависимости. Обращает на себя внимание то, что уровни корреляции во всех случаях были выше 0,7, что свидетельствовало о сильной зависимости: $r=0,778$ для ММП-9, $r=0,714$ для ТИМП-1.

Таким образом, нами установлено, что во влаге передней камеры средняя величина соотношения ТИМП-1/ММП-9 у больных с различными стадиями ДР и СД 2 типа достоверно снижена в сравнении с аналогичным показателем у лиц без диабета, и наиболее низкие уровни этого соотношения наблюдались при умеренной, тяжелой НПДР и ПДР. В крови достоверное снижение соотношения ТИМП-1/ММП-9 было обнаружено только у больных с умеренной НПДР и пролиферативной ДР. Следствием возрастания уровня металлопротеиназы-9 при СД 2 типа по мере увеличения тяжести ДР как во влаге п/к, так и в крови, является нарушение тонкого баланса протеаза/ингибитор что, в конечном итоге, приводит к прогрессированию диабетического поражения сетчатки.

Была обнаружена сильная положительная корреляционная зависимость между стажем СД 2 типа и уровнями ММП-9 и ТИМП-1 в крови и во влаге п/к, что свидетельствует в пользу нарастания уровней этих показателей по мере увеличения давности СД 2 типа и соответственно тяжести диабетической ретинопатии.

K.P. Pavlyuchenko, T.V. Oleynyk, A.V. Korobova
The ratio of markers of extracellular matrix degradation in the pathogenesis of diabetic retinopathy

We studied the value of the ratio tissue inhibitor of

matrix metalloproteinase-1/matrix metalloproteinase-9 in blood and aqueous humor of patients with type 2 of diabetes and the various stages of diabetic retinopathy. It was found that the average value of the ratio tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1/matrix metalloproteinase-9 in aqueous humor of patients with diabetic retinopathy significantly lower in comparison with the same average ratio in patients without diabetes. The lowest levels of this ratio were observed in moderate, severe non-proliferative and proliferative diabetic retinopathy in aqueous humor. In blood the ratio tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1/matrix metalloproteinase-9 was significantly lower in patients with moderate nonproliferative and proliferative diabetic retinopathy than in patients without diabetes. A strong positive correlation was found between the duration of type 2 diabetes mellitus and levels of metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in blood and in aqueous humor (University clinic. — 2013. — Vol.9, №2. — P. 146-149).

Key words: ratio tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1/matrix metalloproteinase-9, aqueous humor, diabetic retinopathy, correlation, type 2 of diabetes, duration of diabetes.

К.П. Павлюченко, Т.В. Олейник, О.В. Коробова
Співвідношення маркерів деградації позаклітинного матриксу у патогенезі діабетичної ретинопатії

Вивчено величину співвідношення тканинний інгібітор матриксної металопротеїнази-1/матриксна металопротеїназа-9 в крові і волозі передньої камери хворих з цукровим діабетом 2 типу і різними стадіями діабетичної ретинопатії. Встановлено, що середнє значення цього співвідношення у волозі передньої камери хворих з діабетичною ретинопатією достовірно нижче середнього співвідношення у пацієнтів без цукрового діабету. Виявлено, що найнижчі рівні цього співвідношення у волозі передньої камери спостерігалися при помірній, важкій непроліферативній і проліферативній діабетичній ретинопатії. У крові достовірно зниження співвідношення тканинний інгібітор матриксної металопротеїнази-1/матриксна металопротеїназа-9 було виявлено у хворих з помірно непроліферативною і проліферативною діабетичною ретинопатією. Встановлено сильну позитивну кореляційну залежність між давністю цукрового діабету 2 типу та рівнями металопротеїнази-9 і тканинного інгібітора матриксної металопротеїнази-1 в крові та волозі передньої камери (Університетська клініка. — 2013. — Т.9, №2. — С. 146-149).

Ключові слова: співвідношення тканинний

інгібітор матриксної металопротеїнази-1/матриксна металопротеїназа-9, волога передньої камери, діабетична ретинопатія, кореляція, цукровий діабет 2 типу, давність діабету.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Бездетко Н.В.* Фармакоэкономические аспекты медикаментозной терапии больных с диабетической ретинопатией/Н.В. Бездетко, Л.В. Яковлева, П.А. Бездетко // Рациональная фармакотерапия - 2009. — № 1. — С.38-42.
2. *Бездетко П.А.* Диабетическая ретинопатия — тяжелое проявление сахарного диабета/ П.А. Бездетко, Я.В. Добрица, Е.П. Мужичук // Семейная медицина. № 3. — 2009. — С. 40-43.
3. *Касаткина С.Г.* Значение дисфункции эндотелия у больных сахарным диабетом 2 типа/ С.Г. Касаткина, С.Н. Касаткин//Фундаментальные исследования, № 7. — 2011. — С. 248-252.
4. *Маслова О.В.* Эпидемиология сахарного диабета и микрососудистых осложнений// О.В. Маслова, Ю.И. Сунцов//Сахарный диабет, 3/2011. — С. 6-11.
5. *Павлюченко К.П.* Возможность применения симвастина в лечении диабетической ретинопатии при сахарном диабете 2 типа/ Павлюченко К.П., Олейник Т.В., Коробова А.В.// Офтальмология. Восточная Европа. — 1(16). — 2013. — С. 108-118.
6. *Павлюченко К.П.* Металлопротеиназа-9 и ее тканевой ингибитор при диабетической ретинопатии/ К.П. Павлюченко, Т.В. Олейник, А.В. Коробова// Университетская клиника, Т.8. — № 1. — 2012. — С. 8-12.
7. *Романенко И.А.* Диабетический макулярный отек: классификация, клиника, лечение/ Романенко И.А., Черкасова В.В., Егоров Е.А. //Международный эндокринологический журнал, № 3, 2010. — С. 106-110.
8. *Халафян А.А.* Statistica 6. Статистический анализ данных/ А.А. Халафян//— М.: ООО «Бином-Пресс». — 2008. — 512 С.
9. *Evrosimovska B.* Matrix metalloproteinases (with accent to collagenases)/Evrosimovska B., Velickovski B., Dimova C. and Veleska-Stefkovska D. // Journal of Cell and Animal Biology. — Vol. 5(7), July 2011. — P. 113-120.
10. *Geng S.* Progress of research on pathogenesis and medical treatment of diabetic retinopathy/ Geng S, Ye J.J.// Chinese Journal of Ophthalmology — 2008, Jan;44(1). — P. 76-81.
11. *Giacco F.* Oxidative stress and diabetic complications/ Giacco F., Brownlee M.// Circ Res. 2010, October 29; 107(9) — P. 1058-1070.
12. *Kowluru R.A.* Role of Matrix Metalloproteinase-9 in the Development of Diabetic Retinopathy and Its Regulation by H-Ras. — Invest. Ophthalmol. Vis Sci. 2010 Aug;51(8) — P. 4320-4326.
13. *Kowluru R.A.* Matrix metalloproteinases in diabetic retinopathy: potential role of MMP-9/ Kowluru RA, Zhong Q, Santos JM.// Expert Opin Investig Drugs. — 2012, Jun;21(6). — P. 797-805.
14. *Rogowicz A.* Role of matrix metalloproteinases in the development of vascular complications of diabetes mellitus — clinical implications/ Rogowicz A., Zozulinska D., Wierusz-Wysocka B.// Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej, 117 (3). — 2007. — P. 1-7.
15. *Shaw J.E.* Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030 / Shaw J.E., Sicree R.A., Zimmet P.Z. // Diabetes Res. Clin. Pract. — 2010. — Vol. 87. — № 1. — P. 4-14.