

УДК 616.43+616-092+616-06

РОЛЬ ПОРУШЕНЬ У СИСТЕМІ ПРОТЕОЛІЗУ В РОЗВИТКУ ДІАБЕТИЧНОЇ РЕТИНОПАТІЇ

**С.В. Зяблицев¹, А.В. Коробова², О.В. Петренко³,
В.Н. Сердюк⁴, С.Ю. Могилевський³**

¹Український науково-практичний центр ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України, м. Київ

²Донецький національний медичний університет ім. М. Горького, м. Красний Лиман

³Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика, м. Київ

⁴ДУ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»



Зяблицев Сергій Володимирович

д-р мед. наук, проф., акад. Академії наук вищої освіти України,
зав. відділу патофізіології, імунології та трансплантології
01021, м. Київ, Кловський узвіз, 13-А
Тел./факс: (044) 253-66-26
E-mail: zsv@endosurg.com.ua

Матриксні металопротеїнази (ММП) являють собою цинк- або кальційзалежні протеїнази, які, утворюючи єдину функціональну систему з тканинними інгібіторами (ТІМП), беруть участь в ембріональному розвитку, морфогенезі та ремоделюванні тканини [1–3]. Існує достатньо публікацій про ММП-9 в зв'язку з її роллю в патогенезі інфаркту міокарда, ревматоїдного артриту, онкологічних захворювань, обструктивних захворювань легенів, розсіяного склерозу, гепатитів і цирозу печінки, а також у розвитку такого ускладнення цукрового діабету (ЦД), як діабетична ретинопатія (ДР) [4–6]. Субстратами для ММП-9 є білки екстрацелюлярного матриксу базальної мембрани судин сітківки ока – колаген IV типу, фібронектин, ламінін і вітронектин [7].

Хоча ДР традиційно вважається пізнім ускладненням ЦД, її цілком обґрунтовано можна розцінювати як закономірний прояв патологічних змін у ретинальному судинному руслі [8, 9]. Протягом останніх років було доведено позитивний ефект метаболічного контролю та контролю артеріального тиску в уповільненні прогресування ДР, однак в Україні 2014 р. тільки 13,1% хворих досягли цільового рівня глікозильованого гемоглобіну

(HbA1c) <7% [10]. Найбільшу загрозу для зору при ДР становлять діабетичний макулярний набряк і проліферативна діабетична ретинопатія (ПДР) [8, 9, 11, 12].

Мета роботи – визначити роль порушень у системі протеолізу (ММП-9 і ТІМП-1) в розвитку і прогресуванні ДР при ЦД 2 типу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження рівнів ММП-9 і ТІМП-1 у крові і внутрішньоочній рідині (ВОР) проводилося у 154 пацієнтів (163 ока), з них 112 осіб (121 око) з ЦД 2 типу склали основну групу і 42 (42 ока) без діабету склали контрольну групу. Всі пацієнти були прооперовані з приводу вікової катаракти методом факоемульсифікації з імплантацією інтраокулярної лінзи, оперативне лікування пройшло у всіх випадках без ускладнень. Середній вік хворих склав (67,55±0,83) року в основній групі, (67,09±1,49) року – в контрольній (p=0,84). В основній групі було 62,5% жінок і 37,5% чоловіків, у контрольній – 59,5% і 40,5%, відповідно (p=0,73). Давність захворювання в основній групі склала (6,07±0,31) року. Критеріями виключення були прийом статинів або фібрів, ниркова недостатність, панкреатит, онкологічні

захворювання, перенесений інфаркт міокарда, глаукома, вікова макулодистрофія, а також інтравітреальні ін'єкції і лазерна коагуляція сітківки в анамнезі. Хворі основної групи перебували під наглядом ендокринолога з контролем рівня HbA1c і глюкози в крові; хворих з рівнем HbA1c >8,0% у дослідження не включали. Дослідження рівнів ММП-9 і ТІМП-1 у крові і внутрішньоочній рідині виконували імуноферментним методом згідно з інструкціями фірми-виробника (Bender Medsystems, Австрія). Пацієнти основної групи перебували під офтальмологічним спостереженням протягом 4 років і проходили обстеження кожні 6 місяців. Ступінь тяжкості ДР визначали за шкалою Американської академії офтальмології [13]. Офтальмологічне обстеження включало візометрію, рефрактометрію, пневмотонометрію, біомікроскопію, контактну біомікроскопію сітківки з

лінзою Гольдмана. Виконували оптичну когерентну томографію (Stratus OCT, Carl Zeiss, Німеччина) і кольорове фотографування очного дна на апараті Visucam Zeiss. Для статистичного аналізу використовували методи біостатистики Statistica 7.0 (StatSoft Inc., 2004).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Після проведення оперативного лікування катаракти в основній групі було виявлено, що ДР була відсутня в 51,2% випадків (62 ока), початкова непроліферативна ДР (НПДР) спостерігалася в 16,5% випадків (20 очей), в 18,2% (22 ока) були ознаки помірної НПДР, важка НПДР була виявлена на 8 очах (6,6%), а ПДР – 9 очах (7,4%).

У хворих основної групи середні рівні ММП-9 і ТІМП-1 в крові були підвищеними порівняно з хворими контрольної групи (табл. 1).

Таблиця 1

Рівні ММП-9 і ТІМП-1 у крові (M±m)

| Показник | Основна група (n=112) | Контрольна група (n=42) | Рівень значущості різниці, p |
|---------------|-----------------------|-------------------------|------------------------------|
| ММП-9, нг/мл | 79,37±1,45 | 51,28±1,7 | p<0,001 |
| ТІМП-1, НГ/МЛ | 339,87±5,56 | 218,44±11,81 | p<0,001 |

Рівень ММП-9 у крові хворих на ЦД 2 типу та з різними стадіями ДР варіював від 55,89 нг/мл до 124,65 нг/мл, у той час як у крові пацієнтів без діабету мінімальний рівень ММП-9 склав 30,89 нг/мл, а максимальний – 80,00 нг/мл. Мінімальний рівень ТІМП-1 у крові хворих на ЦД 2 типу становив 239,34 нг/мл, максимальний – 496,50 нг/мл, у той час як в контрольній групі – 127,58 нг/мл і 433,90 нг/мл відповідно.

Ці дані узгоджуються з результатами, отриманими у пацієнтів з ЦД 2 типу [6, 14]. Однак у дослідженні М.Н. Тауеб'єє et al. не було отримано статистично значущої різниці щодо рівня ММП-9 у пацієнтів з ЦД 2 типу та контрольної групи [14]. Пояснити цей факт можна тим, що в цій роботі не виключалися пацієнти із соматичною патологією, яка може

впливати на рівень ММП-9 у крові. За даними G. Derosa et al., рівні ММП-9, ТІМП-1 і ТІМП-2 у крові підвищені у хворих на ЦД порівняно з особами без діабету, що, загалом, відображає патологічні зміни в ремоделюванні екстрацелюлярного матриксу при цьому захворюванні [6]. На нашу думку, підвищення рівнів ММП-9 і ТІМП-1 свідчить про те, що при ЦД 2 типу розвивається системне хронічне імунне запалення з посиленням атеросклеротичного ураження; ММП-9 можна розглядати і як маркер системного запалення, і як маркер дестабілізації атероматозної бляшки [15, 16].

При вивченні досліджуваних показників залежно від стадії ДР було виявлено, що вміст ММП-9 у хворих на ЦД 2 типу зростав відповідно до тяжкості ураження сітківки (табл. 2).

Рівні ММП-9 і ТІМП-1 у крові залежно від стадії ДР (M±m)

| Стадія ДР | ММП-9, нг/мл | ТІМП-1, нг/мл |
|-----------------------|-------------------|------------------|
| Відсутність ДР (n=54) | 70,59±1,15 * | 310,65±5,39 * |
| Початкова НПДР (n=19) | 77,61±1,31 * # | 330,25±6,81 * # |
| Помірна НПДР (n=22) | 84,55±2,0 * # | 349,88±7,23 * # |
| Тяжка НПДР (n=8) | 97,46±8,02 * # | 408,59±25,02 * # |
| ПДР (n=9) | 103,34 ± 6,14 * # | 436,06 ± 23,49 * |

Примітки: * – різниця порівняно з контрольною групою є статистично значущою на рівні $p < 0,05$; # – різниця порівняно з аналогічними показниками між різними стадіями ДР є статистично значущою на рівні $p < 0,05$.

В основній групі навіть за відсутності ознак ДР рівень ММП-9 перевищував аналогічний показник у контрольній групі ($p < 0,001$), а найвищі значення для ММП-9 у крові були виявлені у хворих з ПДР. Рівень ТІМП-1 в основній групі також був вищим, ніж у контрольній ($p < 0,05$), з максимальним значенням при ПДР. У дослідженні M. Beránek et al. (2010) було

виявлено підвищення рівня ММП-9 у крові хворих з ПДР порівняно з хворими без ЦД і рівня ММП-9 у хворих на ЦД 2 типу без ПДР порівняно з групою осіб без ЦД [17]. Загалом, отримані нами результати узгоджуються з результатами цього дослідження.

Також були визначені рівні ММП-9 і ТІМП-1 у ВОР (табл. 3).

Таблиця 3

Рівні ММП-9 і ТІМП-1 у внутрішньоочній рідині (M±m)

| Показник | Основна група (n=121) | Контрольна група (n=42) | Рівень значущості різниці, p |
|---------------|-----------------------|-------------------------|------------------------------|
| ММП-9, нг/мл | 85,97±1,57 | 46,92±2,35 | $p < 0,001$ |
| ТІМП-1, НГ/МЛ | 397,63±7,33 | 231,36±16,44 | $p < 0,001$ |

Встановлено, що при ЦД 2 типу середні рівні обох показників були підвищені порівняно з аналогічними показниками хворих контрольної групи.

У табл. 4 представлені рівні ММП-9 і ТІМП-1 у ВОР хворих на ЦД 2 типу залежно від стадії ДР.

Було встановлено, що рівні ММП-9 і ТІМП-1 при будь-якій стадії ДР, а також при її відсутності підвищені порівняно з показниками контрольної групи ($p < 0,05$). Рівень і ММП-9, і ТІМП-1 зростав відповідно до тяжкості ДР і досягав максимуму за проліферативної стадії захворювання.

A.M. Abu El-Asrar et al. (2013) за допомогою вестерн-блоту та желатинової зимографії в 32 зразках склоподібного тіла, отриманих від хворих з ПДР, показали статистично значуще збільшення рівнів експресії ММП-9, а також ММП-1, ММП-7 і фактора росту ендотелію судин (VEGF) порівняно з пацієнтами без діабету [18]. У тому ж дослідженні імуногістохімічними методами доведено збільшення експресії ММП-9 судинними ендотеліальними клітинами і клітинами строми в фіброваскулярних епіретинальних мембранах при ПДР. Ці дані свідчать

Рівні ММП-9 і ТІМП-1 у внутрішньоочній рідині залежно від стадії ДР (M±m)

| Стадія ДР | ММП-9, нг/мл | ТІМП-1, нг/мл |
|-----------------------|------------------|------------------|
| Відсутність ДР (n=62) | 76,32±1,51 * | 362,86±8,45 * |
| Початкова НПДР (n=20) | 81,54±1,61 * # | 391,38±14,74 * # |
| Помірна НПДР (n=22) | 96,67±1,8 * # | 433,57±16,12 * # |
| Тяжка НПДР (n=8) | 109,376±4,39 * # | 464,90±22,36 * # |
| ПДР (n=9) | 117,78±6,35 * # | 512,13±19,26 * |

Примітки: * – різниця порівняно з контрольною групою є статистично значущою на рівні $p < 0,05$; # – різниця порівняно з аналогічними показниками між різними стадіями ДР є статистично значущою на рівні $p < 0,05$.

про те, що саме внутрішньоочна клітинна секреція є важливим джерелом ММП-9, а ММП-1 і ММП-9 сприяють ретинальному неоангіогенезу і фіброзу, що і є критичним у розвитку ПДР [18].

Встановлене нами підвищення рівнів ММП-9 у ВОР як при НПДР, так і при ПДР, узгоджується з думкою про подвійну роль ММП-9 у розвитку ДР: на ранніх стадіях захворювання – сприяє загибелі капілярних клітин сітківки і підвищенню проникності внутрішнього гемато-ретинального бар'єру, а в пізній (проліферативній) стадії – бере участь в процесах ретинальної неоваскуляризації [11].

ВИСНОВКИ

1. Встановлено зміни в системі протеолізу у хворих з ДР і ЦД 2 типу, які полягають у підвищенні рівнів ММП-9 і ТІМП-1 у крові і ВОР як за відсутності ознак ДР, так і при будь-якій стадії ДР порівняно з рівнем цих показників у хворих без ЦД.
2. Підвищення рівнів ММП-9 і ТІМП-1 відбувалося в міру збільшення тяжкості ДР, а при ПДР рівні ММП-9, ТІМП-1 досягали максимуму.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Evrosimovska B., Velickovski B., Dimova C., Veleska-Stefkovska D.* Matrix metalloproteinases (with accent to collagenases). *Journal of Cell and Animal Biology*. 2011; 5(7): P. 113–120.
2. *Raffetto J.D., Khalil R.A.* Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors in Vascular Remodeling and Vascular Disease. *Biochemical Pharmacology*. 2008; 75 (2): P. 346–359. doi: 10.1016/j.bcp.2007.07.004
3. *Giebel S.J., Menicucci G., McGuire P.G.* Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. *Laboratory Investigation*. 2005; 85(5): P.597–607. DOI: 10.1038/labinvest.3700251
4. *Malemud C.J.* Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Frontiers in Bioscience*. 2006; 11: P. 1696–1701.
5. *Rogowicz A., Zozulińska D., Wierusz-Wysocka B.* Role of matrix metalloproteinases in the development of vascular complications of diabetes mellitus – clinical implications. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*. 2007; 117 (3): P. 1–7.
6. *Derosa G., D'Angelo A., Tinelli C., Devangelio E., Consoli A., Miccoli R., Penno G., Del Prato S., Paniga S., Cicero A.F.G.* Evaluation of metalloproteinase 2 and 9 levels and their inhibitors in diabetic and healthy subjects. *Diabetes&Metabolism*. 2007; 33 (2): P. 129–134. Doi: 10.1016/j.diabet.2006.11.008
7. *Rangasamy S., McGuire P.G., Das A.* Diabetic retinopathy and inflammation: novel therapeutic targets. *Middle East African Journal of Ophthalmology*. 2012; 19 (1): P. 52–59.
8. *Wilkinson-Berka J.L.* Angiotensin and diabetic retinopathy. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2006; 38: P. 752–765. doi:10.1016/j.biocel.2005.08.002
9. *Cheung N., Mitchell P., Wong T.Y.* Diabetic retinopathy.

- Lancet. Jul 10; 376(9735): P. 124–36. doi: 10.1016/S0140-6736(09)62124-3.
10. Тронько М.Д., Соколова Л.К., Власенко М.В., Костюкевич А.А. Досягнення цілей лікування пацієнтами із цукровим діабетом в Україні. Результати Міжнародного дослідження з вивчення практики ведення цукрового діабету (IDMPS). Ендокринологія. 2015; 20(4). С. 658–668 [Tronko M.D., Sokolova L.K., Vlasenko N.V., Kostukevich A.A., 2015. Achieving the goals in treatment of patients with diabetes mellitus in Ukraine. Results of the International Diabetes Management Practices Study (IDMPS). Endokrynologia. 20(4). P. 658–668 (in Ukrainian)].
 11. Kowluru R.A., Zhong Q., Santos J.M. Matrix metalloproteinases in diabetic retinopathy: potential role of MMP-9. Expert Opin Investig Drugs. 2012; 21(6): P. 797–805. doi: 10.1517/13543784.2012.681043
 12. Demirel S., Argo C., Agarwal A., Parriott J., Sepah Y.J., Do D.V., Nguyen Q.D. Updates on the Clinical Trials in Diabetic Macular Edema. Middle East African Journal of Ophthalmology. 2016; 23(1): P.3–12. <http://doi.org/10.4103/0974-9233.172293>
 13. Global Diabetic Retinopathy Project Group. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. Ophthalmology. 2003; 110(9): P. 1677–1682. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0161-6420\(03\)00475-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0161-6420(03)00475-5)
 14. Tayebjee M.H., Lim H.S., Macfadyen R.J. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in type 2 diabetes. Diabetes Care. 2004; 27(8): P. 2049–2051.
 15. Heo SH, Cho CH, Kim HO, Jo YH, Yoon KS, Lee JH, Park JC, Park KC, Ahn TB, Chung KC, Yoon SS, Chang DI. Plaque Rupture is a Determinant of Vascular Events in Carotid Artery Atherosclerotic Disease: Involvement of Matrix Metalloproteinases 2 and 9. Journal of Clinical Neurology. 2011; Jun;7(2): P. 69–76. <http://dx.doi.org/10.3988/jcn.2011.7.2.69>
 16. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. Circulation. 2002;106(25):3143–3421.
 17. Beránek M., Kolar P., Tschoplova S., Kankova K., Vasku A. Genetic variations and plasma levels of gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) and gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) in proliferative diabetic retinopathy. Molecular Vision. 2008; 14: P. 1114–1121.
 18. Abu El-Asrar A.M., Mohammad G., Nawaz M.I. et al. Relationship between Vitreous Levels of Matrix Metalloproteinases and Vascular Endothelial Growth Factor in Proliferative Diabetic Retinopathy. PLoS One. 2013;8(12):e85857. doi: 10.1371/journal.pone.0085857

РЕЗЮМЕ

Роль порушень у системі протеолізу в розвитку діабетичної ретинопатії

С.В. Зяблицев, О.В. Коробова, О.В. Петренко, В.М. Сердюк, С.Ю. Мозилевський

Мета роботи – визначити роль порушень у системі протеолізу за вмістом у крові та внутрішньоочній рідині матриксної металопротеїнази (ММП-9) та тканинного інгібітора матриксної металопротеїнази (ТІМП-1) у розвитку і прогресуванні діабетичної ретинопатії при цукровому діабеті 2 типу.

Матеріали та методи. Вивчення рівнів ММП-9 і ТІМП-1 у крові та внутрішньоочній рідині проводили імуноферментним методом (Bender Medsystems, Австрія) у 154 пацієнтів (163 ока), з них 112 хворих (121 око) з цукровим діабетом 2 типу склали основну групу і 42 пацієнти (42 ока) без діабету відповідного віку та статі – контрольну групу. Для статистичного аналізу використовували методи біостатистики Statistica 7.0 (StatSoft Inc., 2004).

Результати та обговорення. Встановлено зміни у системі протеолізу, які полягали в підвищенні рівнів ММП-9 і ТІМП-1 у крові і внутрішньоочній рідині як за відсутності ознак діабетичної ретинопатії, так і за її наявності порівняно з рівнем цих показників у пацієнтів без діабету. Встановлено, що підвищення рівнів ММП-9 і ТІМП-1 у хворих на цукровий діабет 2 типу спостерігалось в міру збільшення тяжкості діабетичної ретинопатії: при проліферативній формі рівні цих показників досягали максимуму.

Висновки. Таким чином, встановлено значне підвищення рівнів ММП-9 і ТІМП-1 у крові та внутрішньоочній рідині при діабетичній ретинопатії, що залежало від ступеня тяжкості ретинопатії з максимальною вираженістю при проліферативній діабетичній ретинопатії.

Ключові слова: металопротеїназа-9, тканинний інгібітор матриксної металопротеїнази-1, діабетична ретинопатія.

РЕЗЮМЕ

Роль нарушений в системе протеолиза в развитии диабетической ретинопатии**С.В. Зяблицев, А.В. Коробова, О.В. Петренко, В.Н. Сердюк, С.Ю. Могилевский**

Цель работы – определить роль нарушений в системе протеолиза по содержанию в крови и внутриглазной жидкости матриксной металлопротеиназы (ММП-9) и тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы (ТИМП-1) в развитии и прогрессировании диабетической ретинопатии при сахарном диабете 2 типа.

Материалы и методы. Определение уровней ММП-9 и ТИМП-1 в крови и внутриглазной жидкости проводили иммуноферментным методом (Bender Medsystems, Австрия) у 154 пациентов (163 глаза), из них 112 больных (121 глаз) с сахарным диабетом 2 типа составили основную группу и 42 пациента (42 глаза) без диабета соответствующего возраста и пола – контрольную группу. Для статистического анализа использовали методы биостатистики Statistica 7.0 (StatSoft Inc., 2004).

Результаты и обсуждение. Установлены изменения в системе протеолиза, которые заключались в повышении уровней ММП-9 и ТИМП-1 в крови и внутриглазной жидкости как в отсутствие признаков диабетической ретинопатии, так и при ее наличии в сравнении с уровнем этих показателей у пациентов без диабета. Установлено, что повышение уровней ММП-9 и ТИМП-1 у больных сахарным диабетом 2 типа наблюдалось по мере увеличения тяжести диабетической ретинопатии: при пролиферативной форме уровни этих показателей достигли максимума.

Выводы. Таким образом, установлено значительное повышение уровней ММП-9 и ТИМП-1 в крови и внутриглазной жидкости при диабетической ретинопатии, которое зависело от степени тяжести ретинопатии с максимальной выраженностью при пролиферативной диабетической ретинопатии.

Ключевые слова: металлопротеиназа-9, тканевой ингибитор матриксной металлопротеиназы-1, диабетическая ретинопатия.

SUMMARY

Role of proteolysis in the development of diabetic retinopathy**S.V. Ziablitsev, A.V. Korobova, O.V. Petrenko, V.N. Serduk, S.U. Mogilevsky**

The aim of this work is to study the role of disorders in the proteolytic system in concordance to the level of matrix metalloproteinase (MMP- 9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP-1) in the blood and aqueous humour and its role in the development of diabetic retinopathy.

Materials and methods. Determination of MMP-9 and TIMP-1 levels in blood and intraocular fluid by ELISA (Bender Medsystems, Austria) in 154 patients (163 eyes), out of which 112 patients (121 eyes) with the diabetes mellitus type 2 comprised the basic group and 42 patients (42 eyes) in the control group without diabetes with corresponding age and sex. Statistical analysis was performed by biostatistical methods Statistica 7.0 (StatSoft Inc., 2004).

Results and discussion. Changes in the proteolytic system were found, which consisted of increased levels of MMP-9 and TIMP-1 in the blood and intraocular fluid both in the absence and presence of diabetic retinopathy, its presence in comparison to the level of these indexes in patients without diabetes. Increased levels of MMP-9 and TIMP-1 in patients with diabetes mellitus type 2 were observed in concordance to the stage of retinopathy: in the proliferativestage the level of these indexes was maximum.

Conclusions. Thus, the considerable increase in the levels of MMP-9 and TIMP-1 in blood and intraocular fluid in the patients depended on the stage of diabetic retinopathy with the maximal levels in proleferative diabetic retinopathy.

Key words: matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, diabetic retinopathy.

Дата надходження до редакції 11.05.2016 р.