

УДК 616.379-008.64:577.1+612.017.1'450.1"

© К.П. Павлюченко, Т.В. Олейник, А.В. Коробова, 2012.

## ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЕЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-9, ЕЕ ТКАНЕВОГО ИНГИБИТОРА И ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА: 1 ГОД НАБЛЮДЕНИЯ

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

*Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, кафедра офтальмологии  
(зав. - д.м.н. проф. К.П. Павлюченко), г. Донецк.*

### CHANGES OF LEVELS OF METALLOPROTEINASE-9, ITS TISSUE INHIBITOR AND CYTOKINES IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES: 1 YEAR OBSERVATION

K.P. Pavlyuchenko, T.V. Oleynyk, A.V. Korobova

#### SUMMARY

We investigated the levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  in serum and anterior chamber fluid of 40 patients (44 eyes) with type 2 diabetes and diabetic retinopathy. The content of all researched markers in the anterior chamber fluid and serum was statistically significantly higher in patients with type 2 diabetes and any stage of diabetic retinopathy compared to nondiabetic patients. The serum levels of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and cytokines increased in type 2 diabetic patients after 1 year observation.

### ЗМІНИ РІВНІВ МЕТАЛОПРОТЕІНАЗИ-9, ЇЇ ТКАНИННОГО ІНГІБІТОРА ТА ЦИТОКІНІВ У ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ 2 ТИПУ: 1 РІК СПОСТЕРЕЖЕННЯ

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

#### РЕЗЮМЕ

Досліджено рівні матричної металопротеїнази-9, тканинного інгібітора матричної металопротеїнази-1, фактора некрозу пухлин- $\alpha$ , інтерлейкіну-1 $\beta$  в сироватці і волозі передньої камери 40 пацієнтів (44 ока) з цукровим діабетом 2 типу та діабетичною ретинопатією. Встановлено, що рівні досліджуваних показників у волозі передньої камери і сироватці статистично значимо вище у пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу за будь-якого ступеню вираженості діабетичної ретинопатії в порівнянні з пацієнтами без діабету. Рівні металопротеїнази-9, тканинного інгібітора матричної металопротеїнази-1, фактора некрозу пухлин- $\alpha$ , інтерлейкіну-1 $\beta$  в сироватці хворих на цукровий діабет 2 типу зросли протягом 1 року спостереження.

**Ключевые слова:** диабетическая ретинопатия, металлопротеиназа-9, тканевой ингибитор матричной металлопротеиназы-1, цитокины, сахарный диабет 2 типа.

В настоящее время сахарный диабет относится к одной из самых значительных медицинских проблем и, по современным прогнозам, ожидается, что к 2025 году количество пациентов, страдающих СД, составит 6–8 % населения планеты, причем на долю СД 2 типа приходится до 85-90 % от всех его случаев. [2]. В связи с этим диабетическая ретинопатия (ДР), основное проявление СД со стороны органа зрения, занимает лидирующее место среди известных причин слабости зрения и слепоты, ее частота встречаемости сохраняет устойчивую тенденцию к постоянному росту. ДР среди пациентов с СД 2 типа обнаруживается в 28 % случаев через 5 лет после постановки диагноза, что объясняется более поздним или несвоевременным выявлением этого типа диабета [1, 3].

Патогенез ДР является сложным и достаточно широко изученным в настоящее время. Однако современный арсенал методов лечения ДР не всегда позволяет достичь желаемого эффекта, что приводит к дальнейшему ухудшению зрения. Отчасти это обусловлено недостаточной компенсацией основного заболевания, поскольку используемые методики лечения (лазерная коагуляция сетчатки, интравитреальное введение препаратов, витрэктомия) направлены на устранение тех проявлений ДР, которые непосредственно служат причиной нарушения зрения, а коррекции метаболических, иммунных сдвигов, играющих ведущую роль в патогенезе осложнений СД 2 типа, не происходит [6]. Ввиду этого, изучение патогенетических особенностей ДР при СД 2 типа является весьма актуальным. Иностранные авторы отмечают важ-

ное значение матриксной металлопротеиназы-9 (ММП-9) в появлении и прогрессировании ДР [8, 11, 13, 14]. Металлопротеиназа-9 – крупнейший член семейства цинкзависимых эндопептидаз, вовлекающих экстрацеллюлярный матрикс в процессы структурно-функционального ремоделирования, путем деградации базальных мембран и цепей коллагена [7, 12]. Доказано, что субстратом ММП-9 являются денатурированные коллагены, компоненты базальных мембран сосудов: коллаген IV, V типов и эластин [7]. Гемопексинподобный домен, имеющийся в структуре ММП, участвует во взаимодействии ММП с их ингибиторами. Тканевые ингибиторы ММП (ТИМП) экспрессируются во всех органах и тканях. Все ТИМП ингибируют активные формы металлопротеиназ, в то время как ТИМП-1 подавляет активность про-ММП-9, предшественника металлопротеиназы-9 [12]. Экспериментально доказано, что активация ММП-9 происходит под влиянием хронической гипергликемии, а также оксидативного стресса и повышения уровня цитокинов (фактора некроза опухолей- $\alpha$ , интерлейкина-1 $\beta$ ) [8, 11, 14]. Нами ранее было установлено повышенное содержание ММП-9 и ТИМП-1 в крови и влаге передней камеры больных с СД 2 типа и ДР [5]. Однако в литературе нет данных о том, насколько активность ММП-9 и ТИМП-1 меняется при прогрессировании ДР у больных с СД 2 типа. В связи с этим было бы логичным изучить изменение данных показателей в динамике, учитывая существенное влияние ММП-9, ее тканевого ингибитора, фактора некроза опухолей- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) и интерлейкина-1 $\beta$  (ИЛ-1 $\beta$ ) на течение диабетического поражения сетчатки.

Цель работы: изучить уровни матриксной металлопротеиназы-9, тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы-1, фактора некроза опухолей- $\alpha$  и интерлейкина-1 $\beta$  в крови и влаге передней камеры больных с сахарным диабетом 2 типа и разными стадиями диабетической ретинопатии.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено у 62 пациентов, из них 40 больных (44 глаза) с СД 2 типа составили основную группу, и 22 пациента (22 глаза) без диабета составили контрольную группу. Обе группы были статистически сопоставимы по полу и возрасту. В основной группе было 65 % женщин и 35 % мужчин, в контрольной - 36,4 % мужчин и 63,6 %. Средний возраст больных составил  $67,78 \pm 1,32$  лет в основной группе и  $67,09 \pm 1,49$  лет в контрольной группе ( $p=0,57$ ). Все пациенты

были прооперированы по поводу возрастной катаракты одним хирургом. У больных основной группы после удаления катаракты степень тяжести ДР варьировала от ее полного отсутствия до умеренной непролиферативной ДР (НПДР). Больные основной группы на момент операции находились в стадии компенсации сахарного диабета. Длительность сахарного диабета в среднем была равна  $5,02 \pm 0,49$  года. Из исследования исключались пациенты с декомпенсацией СД, онкопатологией, заболеваниями легких, инфарктом в анамнезе, гепатитами, ревматоидным артритом, а также с сопутствующей глазной патологией. Пациентам проводили общепринятые офтальмологические исследования (визометрия, авторефрактометрия, периметрия, биомикроскопия, тонометрия, офтальмоскопия). Для исследования уровней ММП-9, ТИМП-1, ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  производился забор венозной крови и влаги передней камеры в день операции и через 12 месяцев повторно производили только забор крови. Забор влаги передней камеры осуществляли во время вскрытия передней камеры при факоэмульсификации. 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. Уровни ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  определяли с помощью тест-систем производства «Укрмедсервис», (Донецк). Полученные данные обрабатывали при помощи программы STATISTICA 6,0 (StatSoft, Inc. 1984-2001, серийный номер 31415926535897). Для сравнения средних парных зависимых совокупностей использовался критерий Вилкоксона. Сравнение генеральных средних проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни для парных независимых совокупностей. Во всех процедурах статистического анализа рассчитывался достигнутый уровень значимости ( $p$ ), при этом критический уровень значимости в данном исследовании принимался равным 0,05.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По степени выраженности ДР в основной группе больные распределились следующим образом: отсутствие ДР наблюдалось у 24 больных (27 глаз), начальная НПДР – у 8 больных (8 глаз), и умеренная НПДР была отмечена у 8 больных (9 глаз). Уровни исследуемых показателей в сыворотке крови и влаге передней камеры пациентов основной и контрольной группы на момент начала наблюдения представлены в таблице 1.

Таблица 1

**Уровни ММП-9, ТИМП-1, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  в сыворотке крови и влаге передней камеры больных основной и контрольной группы: начало наблюдения (M $\pm$ m)**

Основная группа				Контрольная группа n=22
Сыворотка n=40	Стадии ДР			
	Нет (n=24)	Нач. НПДР (n=8)	Умер. НПДР (n=8)	
ММП-9 нг/мл	68,16 $\pm$ 1,44 *	78,52 $\pm$ 0,65 *	89,19 $\pm$ 0,9 *	53,49 $\pm$ 3,02
ТИМП-1 нг/мл	305,51 $\pm$ 6,18	322,72 $\pm$ 3,01	358,48 $\pm$ 4,58 *	246,91 $\pm$ 20,73
ФНО- $\alpha$ пг/мл	12,81 $\pm$ 1,74 *	43,14 $\pm$ 5,86 *	56,89 $\pm$ 8,95 *	9,58 $\pm$ 0,57
ИЛ-1 $\beta$ пг/мл	32,41 $\pm$ 3,76	58,09 $\pm$ 6,16 *	79,65 $\pm$ 13,57 *	28,60 $\pm$ 5,34
Влага п/к				Контрольная группа n=22
Нет (n=27)			Нач. НПДР (n=8)	
ММП-9 нг/мл	75,07 $\pm$ 2,16 *	79,15 $\pm$ 3,56 *	98,80 $\pm$ 4,33 *	51,76 $\pm$ 4,06
ТИМП-1 нг/мл	345,43 $\pm$ 7,12 *	365,83 $\pm$ 6,46 *	390,01 $\pm$ 8,44 *	269,89 $\pm$ 29,07
ФНО- $\alpha$ пг/мл	10,82 $\pm$ 0,55 *	23,03 $\pm$ 2,25 *	36,27 $\pm$ 3,59 *	7,56 $\pm$ 0,77
ИЛ-1 $\beta$ пг/мл	14,97 $\pm$ 0,72 *	26,37 $\pm$ 1,34 *	39,94 $\pm$ 4,13 *	9,81 $\pm$ 0,91

Примечание: \* – статистически значимое различие в сравнении с контрольной группой

Анализируя уровни всех исследуемых показателей как в сыворотке крови, так и во влаге передней камеры больных основной группы, обращает на себя внимание их возрастание пропорционально тяжести ДР. Увеличение сывороточных уровней ММП-9 и ее тканевого ингибитора в сравнении с уровнями этих показателей у лиц без диабета согласуются с данными иностранных авторов [9, 13]. Содержание ММП-9, ТИМП-1, ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  во влаге передней

камеры при любой из наблюдаемых стадий ДР было статистически достоверно выше аналогичных показателей в контрольной группе, что свидетельствует об их взаимонаправленном влиянии на степень диабетического поражения сетчатки.

Через год от начала наблюдения уровни ММП-9 и ТИМП-1, а также провоспалительных цитокинов в крови изменились у всех пациентов с СД (табл.2)

Таблица 2

**Уровни ММП-9, ТИМП-1, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  в сыворотке крови больных сахарным диабетом 2 типа в зависимости от стадии диабетической ретинопатии: через 12 месяцев (M $\pm$ m)**

Основная группа				Контрольная группа n=22
Сыворотка n=40	Стадии ДР			
	Нет (n=21)	Нач. НПДР (n=9)	Умер. НПДР (n=10)	
ММП-9 нг/мл	71,02 $\pm$ 1,45 *	82,03 $\pm$ 1,29 *	97,56 $\pm$ 2,32 *	53,49 $\pm$ 3,02
ТИМП-1 нг/мл	315,16 $\pm$ 6,68 *	317,3 $\pm$ 6,91	376,09 $\pm$ 8,85 *	246,91 $\pm$ 20,73
ФНО- $\alpha$ пг/мл	15,41 $\pm$ 2,11 *	34,17 $\pm$ 6,15 *	58,36 $\pm$ 7,97 *	9,58 $\pm$ 0,57
ИЛ-1 $\beta$ пг/мл	36,97 $\pm$ 4,10 *	50,83 $\pm$ 7,99 *	86,80 $\pm$ 10,84 *	28,60 $\pm$ 5,34

Примечание: \* – статистически значимое различие в сравнении с контрольной группой

Через 12 месяцев от начала наблюдения установлено, что сывороточные концентрации ММП-9 и ТИМП-1, а также ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  у больных СД 2 типа продолжали оставаться высокими. Так уровень ММП-9 у пациентов с отсутствием ДР составил 71,02 $\pm$ 1,45 нг/мл, что было достоверно выше уровня в контрольной группе – 53,49 $\pm$ 3,02 (p<0,001), при начальной НПДР содержание ММП-9 стало 82,03 $\pm$ 1,29 нг/мл, что также было достоверно выше аналогичного показателя контрольной группы (p<0,001). Самые высокие уровни всех исследуемых показателей наблюдались у пациентов с умеренной

НПДР: уровень ММП-9 был равным 97,56 $\pm$ 2,32 нг/мл, что было статистически значимо выше значения в группе контроля (p<0,001), уровень ТИМП-1 возрос до 376,09 $\pm$ 8,85 нг/мл в сравнении с контролем – 246,91 $\pm$ 20,73 нг/мл (p<0,001). Концентрации провоспалительных цитокинов в крови больных СД 2 типа даже при отсутствии ДР стали статистически достоверно выше, чем у пациентов без диабета: уровень ФНО- $\alpha$  составил 15,41 $\pm$ 2,11 пг/мл (p<0,001), а интерлейкина-1 $\beta$  – 36,97 $\pm$ 4,10 пг/мл (p<0,001).

Сравнивая средние уровни всех исследуемых маркеров в основной группе вне зависимости от

стадии ДР в начале наблюдения и через год, необходимо подчеркнуть их статистически достоверное увеличение: так средний уровень ММП-9 через год составил  $80,14 \pm 2,01$  нг/мл, а в начале наблюдения он был равен  $74,44 \pm 1,61$  ( $p < 0,001$ ), уровень ТИМП-1 через год увеличился до  $330,88 \pm 6,02$  в сравнении с началом наблюдения –  $319,55 \pm 5,04$  ( $p < 0,001$ ), содержание в крови ФНО- $\alpha$  через год составило в среднем  $30,37 \pm 3,84$  пг/мл, что было достоверно выше среднего уровня в начале наблюдения –  $27,69 \pm 3,77$  ( $p < 0,001$ ). Среднее значение уровня ИЛ-1 $\beta$  у больных СД 2 типа возросло с  $47,0 \pm 4,73$  до  $52,55 \pm 5,01$  пг/мл ( $p < 0,001$ ).

Увеличение активности металлопротеиназы-9, ТИМП-1, увеличение содержания ФНО- $\alpha$  и интерлейкина-1 $\beta$  в крови больных через 1 год наблюдения обусловлено не только глубокими иммунологическими сдвигами, присущими СД 2 типа [4, 10], дисбалансом в системе протеолиза-антипротеолиза, к которой относятся ММП и ТИМП [12, 13, 14], но и связано с прогрессированием ДР у наблюдаемых пациентов. Так у 3-х больных (3 глаза) с отсутствием ДР появились микроаневризмы, у 2-х больных (2 глаза) с начальной НПДР произошло прогрессирование до умеренной НПДР с увеличением числа микроаневризм, появлением микрогеморрагий, и у 1 пациента с умеренной НПДР наблюдалось увеличение числа микрогеморрагий. Признаков, соответствующих тяжелой непролиферативной и пролиферативной стадиям ДР в основной группе к концу срока наблюдения не было.

#### ВЫВОДЫ

Содержание металлопротеиназы-9, тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы-1, фактора некроза опухолей- $\alpha$  и интерлейкина-1 $\beta$  в крови и влаге передней камеры больных сахарным диабетом 2 типа и диабетической ретинопатией повышено по отношению к норме при любой степени выраженности диабетической ретинопатии.

Установлено статистически достоверное увеличение уровней ММП-9, ТИМП-1, ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  в сыворотке крови больных сахарным диабетом 2 типа и различными стадиями диабетической ретинопатии в течение 1 года.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Астахов Ю.С. Диабетическая ретинопатия (тактика ведения пациентов) / Ю.С. Астахов, Ф.Е. Щадричев, А.Б. Лисочкина // Клиническая офтальмология. Т. 5. – № 2. – 2004. – С. 85-88.
2. Бездетко П.А. Диабетическая ретинопатия – тяжелое проявление сахарного диабета / П.А. Бездетко, Я.В. Мужичук, Е.П. Добрица // Семейная медицина. № 3. – 2009. – С. 40-43.
3. Веселовская З.В. Осложнения сахарного диабета со стороны органа зрения // Практична ангиология. — 2006. — № 3. — С. 56-58.
4. Иванова Н.В. Роль дисбаланса цитокинового гомеостаза в патогенезе диабетической ретинопатии / Н.В. Иванова, Н.А. Ярошева // Офтальмологический журнал. №2. – 2008. – С. 11-14.
5. Павлюченко К.П. Анализ уровня матриксной металлопротеиназы-9 и тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы-1 при диабетической ретинопатии / К.П. Павлюченко, Т.В. Олейник, А.В. Коробова // Мат. Научно-практической конференции офтальмологов с международным участием «Филатовские чтения». – 2012. – С. 159-160.
6. Сизова М.В. Роль системных нарушений в развитии диабетического макулярного отека и основные принципы их коррекции // Вестник офтальмологии, № 3. – 2011. – С. 52-54.
7. Соболева Г.М. Семейство матриксных металлопротеиназ: общая характеристика и физиологическая роль. / Г.М. Соболева, Г.Т. Сухих // – Акушерство гинекология, 2007. – № 1. – С. 5-8.
8. Bhatt L.K. Attenuation of diabetic rethinopathy by enhanced ingibition of MMP-2 and MMP-9 using aspirin and minocycline in streptozocin-diabetic rats/ Lokesh Kumar Bhatt, Veeranjaneyulu Addepalli // Am. J Trans Res 2010; 2(2):181-189.
9. Evaluation of metalloproteinase 2 and 9 levels and their inhibitors in diabetic and healthy subjects/ Derosa G, D'Angelo A., Tinelli C. et al // Diabetes Metab. 33(2). – 2007. – P. 129-134.
10. Koleva-Georgieva D.N. Serum inflammatory cytokines IL-1beta, IL-6, TNF-alpha and VEGF have influence on the development of diabetic retinopathy/ Koleva-Georgieva D.N., Sivkova N.P., Terzieva D. // Folia Medica 53 (2). – 2011. – P. 44-50.
11. Kowluru R. A. Role of Matrix Metalloproteinase-9 in the Development of Diabetic Retinopathy and Its Regulation by H-Ras. / R. A. Kowluru // – Invest. Ophthalmol. Vis Sci. (8) – 2010. – P. 4320-4326.
12. Matrix metalloproteinases (with accent to collagenases) / Evrosimovska B., Velickovski B., Dimova C. and Veleska-Stefkowska D. // Journal of Cell and Animal Biology. – Vol. 5(7), July 2011. – P. 113-120
13. Rogowicz A. Role of matrix metalloproteinases in the development of vascular complications of diabetes mellitus – clinical implications/ Rogowicz A., Zozulińska D., Wierusz-Wysocka B. // Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej, 117 (3). – 2007. – P. 1-7.
14. Uemura S. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress / Uemura S, Matsushita H, Li W [et al. ] // Circ Res 2001; 88:1291-1298.