

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ЧИТИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи



Саклакова Ольга Алексеевна

**Патогенетическая роль нарушений кинуренинового пути обмена
триптофана в воспалении и повреждении сосудистой стенки при
диабетической ретинопатии**

3.3.3. Патологическая физиология (медицинские науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Фефелова Елена Викторовна

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. Основные аспекты развития диабетической ретинопатии, роль нарушений обмена триптофана в патогенезе сосудистых осложнений сахарного диабета (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	13
1.1. Эпидемиология, классификация и современные концепции патогенеза диабетической ретинопатии.....	13
1.1.2. Сосудистая и нейродегенеративные теории развития диабетической ретинопатии.....	17
1.2. Роль отдельных молекулярных механизмов в патогенезе ДР.....	19
1.2.1. Гипергликемия как ключевой фактор развития диабетической ретинопатии.....	19
1.2.2. Роль дисбаланса системы «ПОЛ-антиоксиданты» в развитии диабетической ретинопатии.....	22
1.2.3. Иммунная дисфункция: нарушение иммунного ответа и провоспалительное состояние.....	25
1.2.4. Взаимосвязь свободно-радикального окисления, воспаления и пироптоза при диабетической ретинопатии.....	28
1.3. Обмен триптофана и роль нарушений его обмена в патогенезе сосудистых заболеваний	30
1.3.1 Кинурениновый путь обмена триптофана.....	32
1.3.2 Участие триптофана и его метаболитов в метаболизме углеводов, окислительном стрессе, воспалении, иммунном ответе.	33
1.3.3 Роль продуктов кинуренинового пути в развитии ангиопатий при сахарном диабете	37
1.3.4 Кинуренин (KYN)	38

1.3.5 Кинуреновая кислота (KYNA)	40
1.3.6 3-гидроксикинуренин (3-НКYN), 3-гидроксиантраниловая кислота (3-НАА)	42
1.3.7 Ксантуреновая кислота (ХА)	43
1.3.8. Хинолиновая кислота (QA) или Хинолинат (Quin)....	44
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	48
2.1. Общий дизайн исследования.....	48
2.2. Общее клиническое исследование.....	51
2.3. Методы обследования органа зрения.....	53
2.4. Лабораторные методы исследования.....	61
2.5. Статистические методы обработки данных.....	65
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	67
3.1. Закономерности изменений уровня маркеров воспаления в крови при «преддиабете», сахарном диабете 2 типа и при диабетической ретинопатии.....	67
3.2. Закономерности изменений содержания костимулирующих и коингибирующих молекул при «преддиабете», сахарном диабете 2 типа и при диабетической ретинопатии.....	70
3.3. Особенности изменений уровня маркеров дисфункции эндотелия при «преддиабете», сахарном диабете 2 типа и при диабетической ретинопатии.....	76
3.4. Особенности содержания триптофана, кинуренинов и 5-гидрокситриптофана в крови при «преддиабете», сахарном диабете 2 типа и при диабетической ретинопатии.....	81
ГЛАВА 4. Корреляционные взаимоотношения между значениями метаболитов триптофана, другими лабораторными показателями и некоторыми офтальмологическими параметрами.....	86
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	98

ВЫВОДЫ.....	117
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	119
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ....	120
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	123

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Диабетическая ретинопатия (ДР) – распространенное хроническое осложнение сахарного диабета (СД), представляющее собой доминирующую причину приобретенного повреждения и/или потери зрения среди людей трудоспособного возраста во всем мире [15; 22; 123]. В настоящее время ДР признана нейроваскулярным дегенеративным заболеванием со сложным и многофакторным патогенезом, который включает в себя ряд патогенетических звеньев (гипергликемия, дислипидемия, хроническое воспаление) далее ведущих к окислительному стрессу, усилению выработки провоспалительных медиаторов и повышению секреции сосудистых факторов роста [132]. В итоге возникают изменения в микроциркуляторном русле сетчатки, такие как микроаневризмы, зоны неперфузии, повышение проницаемости сосудистой стенки и неоваскуляризация [15; 147]. Сложный и многофакторный патогенез ДР дает возможность выявления широкого спектра потенциальных биомаркеров заболевания которые помогают стратифицировать вероятность прогрессирования ретинопатии у пациента с СД [25; 103]. Поиск новых звеньев в цепи патогенеза, идентификация эффективных лабораторных маркеров ДР тоже остаются актуальными [1; 123], поскольку позволят решить социальные и медицинские проблемы ранней диагностики ретинопатии и сообразно с этим – своевременной профилактики, персонализированного лечения, прогноза заболевания, предотвращения слепоты, инвалидности у лиц, страдающих СД, улучшения качества их жизни [4; 30; 79]. Известно, что метаболический фенотип каждого индивидуума – это продукт взаимодействия генетических и средовых факторов в патогенезе любого заболевания. Вероятно, именно это обуславливает то, что у многих больных СД при отсутствии резких перепадов уровня глюкозы в крови,

интенсификации перекисного окисления липидов, без сдвигов в липидном спектре наблюдается развитие ДР, а у некоторых больных СД с длительным течением не отмечается прогрессирования ДР. На сегодняшний день несколько метаболитов идентифицированы как маркеры ДР – асимметричный диметиларгинин плазмы [1; 61], фумаровая кислота, уридин, уксусная кислота и цитидин [134; 133]. В последние десятилетия в связи с возросшим научным интересом к обмену аминокислоты триптофан (TRP) была установлена взаимосвязь между реакциями кинуренинового пути и обменом углеводов, липидов, свободнорадикальными, иммунными процессами, а также встали вопросы о роли нарушений обмена TRP в патогенезе метаболических заболеваний, в том числе СД [65].

Предполагается, что дисбаланс в кинуренинах может быть одним из факторов риска развития ДР [29].

Степень разработанности темы исследования

Патогенез диабетической ретинопатии сложен и изучен не до конца. В рамках современной концепции важную роль в патогенезе отводят патологическим изменениям на клеточном и молекулярном уровнях. В центре внимания последних биохимических исследований оказался кинурениновый путь (КП) метаболизма триптофана.

Незаменимая аминокислота L-триптофан (Trp), по-видимому, играет важную роль в развитии воспаления, выступая в качестве общего регулятора белкового гомеостаза. Основной путь деградации Trp, кинурениновый путь (КП), продуцирует ряд биологически активных метаболитов (кинуреновая кислота (KYNA), кинуренин (KYN), антраниловая кислота (AA), 3-ОН кинуренин (3-ОН KYN), ксантуреновая кислота (XA), 3-гидроксибутират антраниловой кислоты (3-НАА), хинолиновой кислоты (QA)), которые могут воздействовать или подвергаться воздействию различных систем организма, включая эндокринную, гемопоезическую, иммунную и нейрональные системы, а конечный продукт

кинуренинового пути – NAD^+ (и NADP^+), является необходимым для жизненно важных клеточных процессов [164; 168].

Показано, что производные гликозидов KYN и 3-OH-KYN действуют как УФ-фильтры и защищают сетчатку и хрусталик, поглощая УФ-излучение [77, 158]. С другой стороны, производные кинуренинового пути были идентифицированы как соединения, вызывающие образование катаракты [99, 120].

Поскольку кинурениновый путь активируется в условиях воспаления и окислительного стресса, присутствующих при СД, а некоторые метаболиты кинуренина сами могут модулировать окислительный стресс и изменять активность иммунитета [105], постольку существует вероятность, что нарушения его течения вызывает развитие и прогрессирование сосудистых осложнений СД.

Например, при проведении исследований, с последующим использованием множественного логистического регрессионного анализа и множественных корректировок тестирования, Yun J.H., и соавт. (2020) выявили, что триптофан и кинуренин, можно отнести к потенциальным виновникам прогрессирования ДР у пациентов с СД2 [29]. Однако исследования особенностей кинуренинового пути при ДР весьма немногочисленны [71].

Таким образом, проведение исследования по изучению нарушений в обмене триптофана, метаболизме кинуренинов, расширяющего имеющиеся представление о патогенезе диабетической ретинопатии на фоне СД 2 типа, и значит, дающего возможность разработки профилактических и терапевтических мероприятий, является актуальным.

Цель исследования

Выявить взаимосвязи изменений кинуренинового пути обмена триптофана с формированием воспаления и дисфункции эндотелия при диабетической ретинопатии.

Задачи исследования

1. Изучить в сыворотке крови содержание кинуренина, 3-гидроксикинуренина, кинуреновой кислоты, 5-гидрокситриптофана в зависимости от степени тяжести нарушения углеводного обмена и диабетической ретинопатией.
2. Оценить уровень маркеров воспаления (SAA, NGAL, MRP8/14 и MPO) в сыворотке крови в зависимости от степени нарушения углеводного обмена.
3. Определить количественные изменения растворимых форм костимулирующих и коингибирующих молекул и некоторых их рецепторов (B7.2, 4-1BB, CTLA-4, PD-1, PD-L1 Tim-3, LAG-3, Galectin-9) в зависимости от глубины дисбаланса углеводного обмена у пациентов с диабетической ретинопатией.
4. Изучить показатели эндотелиальной дисфункции: уровни матриксных металлопротеиназ (MMP-9 и MMP-2), ингибитора протеаз (cystatin C), молекул адгезии (ICAM-1 и VCAM-1) в зависимости от стадийности диабетической ретинопатии.
5. Представить новые звенья патогенеза диабетической ретинопатии у больных сахарным диабетом.

Научная новизна

Впервые выявлено, что у лиц с «преддиабетом» регистрируются высокие значения кинуренина, 3-гидроксикинуренина, кинуреновой кислоты и L-5-гидрокситриптофана, возрастающие по мере усугубления нарушений углеводного обмена и максимально увеличивающиеся при пролиферативной стадии ретинопатии. Впервые показано, что повышение концентраций маркеров воспаления (NGAL, MRP8/14, MPO) регистрируется при «преддиабете»; максимальный уровень всех параметров отмечается при диабетической ретинопатии.

Впервые продемонстрирован рост уровней растворимых костимулирующих, коингибирующих молекул и их рецепторов в сыворотке крови у лиц с «преддиабетом», дальнейший подъем уровня коингибирующих молекул и их рецепторов у больных сахарным диабетом 2 типа, и еще большее увеличение концентрации данных молекул у лиц с диабетической ретинопатией.

Впервые выявлены взаимосвязи между уровнем метаболитов кинуренинового пути и маркеров воспаления, эндотелиальной дисфункции и иммунитета. Новизной обладают данные, свидетельствующие, что одним из механизмов в развитии и прогрессировании диабетической ретинопатии является нарушение кинуренинового пути обмена триптофана, которое не только влияет на уровень глюкозы крови, но и вызывает срыв механизмов иммунологической толерантности, развитие дисфункции эндотелия, усиление воспалительного процесса.

Теоретическая и практическая значимость работы

Показано, что гиперликемия, неконтролируемая в течение длительного периода времени, вызывает нарушение регуляции многих метаболических путей в сетчатке глаза, в том числе в обмене триптофана и сопровождается развитием воспаления, нарушением регуляции иммунитета, эндотелиальной дисфункции, активацией матриксных металлопротеиназ, гипоксией, что способствует прогрессирующему нервно-сосудистому поражению сетчатки.

Полученные данные могут способствовать разработке ранних диагностических лабораторных критериев развития ретинопатии, новых эффективных профилактических и терапевтических подходов данного заболевания. Результаты работы могут быть использованы в лекционных и практических занятиях для студентов биологических и медицинских факультетов университетов и медицинских академий.

Методология и методы исследования

В основу методологии диссертационного исследования положены принципы доказательной медицины. Работа выполнена в дизайне одномоментного исследования в параллельных группах, методологической базой которого явилось использование методик общенаучного познания с приемами формальной логики, а также применение актуальных клинических, современных лабораторных технологий исследования, результаты которых обрабатывались обоснованными статистическими методами. Для лабораторных исследований использовались сыворотка и плазма крови. Объект исследования – лица с «преддиабетом», пациенты с СД 2 типа и диабетической ретинопатией различной степени тяжести. Предмет исследования – патогенетические взаимосвязи между содержанием кинуренинов, маркеров воспаления, дисфункции эндотелия, уровнем контрольных точек иммунитета, клиническими показателями при СД 2 типа и диабетической ретинопатии. Выводы сформулированы с позиций доказательной медицины.

Личный вклад автора в выполнение диссертационного исследования

Автором самостоятельно произведен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы по основным направлениям исследования, составлен план исследования, поставлены цель, задачи, определены клинические и лабораторные методы исследования. Соискателем самостоятельно выполнены: клиническое и офтальмологическое обследование пациентов, забор и транспортировка в лабораторию проб крови, проведение статистической обработки результатов исследования. Автором самостоятельно проведена систематизация данных, их анализ, обобщены полученные результаты, сформулированы выводы и практические рекомендации.

Положения, выносимые на защиту

1. По мере усугубления нарушения углеводного обмена и формирования диабетической ретинопатии наблюдаются изменения в обмене триптофана, сопровождающиеся накоплением кинуренинов.
2. Рост маркеров воспаления, повреждения сосудистой стенки и изменение регуляции иммунной системы ассоциированы с усугублением нарушения углеводного обмена и формированием диабетической ретинопатии.
3. Нарушение кинуренинового пути обмена триптофана вызывает срыв механизмов иммунологической толерантности, усиление воспалительного процесса, развитие дисфункции эндотелия и утяжеление диабетической ретинопатии.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты работы представлены в материалах III научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и лабораторной диагностики» (г. Чита, 2023), II ежегодной Научной сессии ФГБОУ ВО ЧГМА (г. Чита, 2023), XXII- XXIII межрегиональной научно-практической конференции «Медицина завтрашнего дня» (Чита, 2023-2024), International Conference «Scientific research of the sco countries: synergy and integration» (Haidian, Beijing, PRC, 2025).

Достоверность результатов работы обусловлена системной проработкой проблемы, достаточным объемом исследуемой выборки, использованием современных лабораторных и инструментальных методов обследования пациентов, а также применением адекватных поставленным задачам методов статистического анализа.

Локальный этический комитет ФГБОУ ВО ЧГМА Минздрава России одобрил исследование протоколом №127 от 25.04.2023 г. Тема исследования запланирована и утверждена на заседании Ученого совета ФГБОУ ВО ЧГМА

Минздрава России 16.05.2023 г., протокол №9. Регистрационная карта 050 (03).
Номер государственной регистрации 122031600255-1.

Внедрение результатов в практику

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры офтальмологии, кафедры патологической физиологии и кафедры химии и биохимии ФГБОУ ВО ЧГМА Минздрава России.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 5 в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, 2 из которых находятся в списке журналов, входящих в международные реферативные базы данных и систем цитирования Scopus.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 145 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, двух глав собственных исследований, главы обсуждения, выводов, списка условных сокращений, списка литературы, включающего 176 источников (60 отечественных, 116 иностранных). Работа иллюстрирована 22 таблицами, 14 рисунками.

ГЛАВА 1. ОСНОВНЫЕ АСПЕКТЫ РАЗВИТИЯ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ, РОЛЬ НАРУШЕНИЙ ОБМЕНА ТРИПТОФАНА В ПАТОГЕНЕЗЕ СОСУДИСТЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ САХАРНОГОР ДИАБЕТА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Эпидемиология, классификация и современные концепции патогенеза диабетической ретинопатии

Заболеваемость сахарным диабетом (СД) в мире растет и имеет черты пандемии. В течение последнего десятилетия количество заболевших СД возросло в 2 раза. По данным Международной диабетической федерации суммарно во всех странах число больных к 2015 составило 415 млн человек, а к 2040 г. ожидается рост больных СД до 642 млн человек [59].

Диабетическая ретинопатия (ДР) является одним из наиболее серьезных осложнений у пациентов с сахарным диабетом в возрасте от 27 до 75 лет и существенным этиологическим фактором инвалидизации [140]. Подсчитано, что к 2030 году это микрососудистое осложнение будет диагностировано уже у 191 млн человек [132]. Заболевание заключается в прогрессирующей потере структуры и функции сетчатки. [132].

Результаты глобальных популяционных исследований и метаанализов демонстрируют, что ДР это одна из ведущих причин слабовидения и слепоты пациентов с СД как в нашей стране, так и во всем мире, хотя многие из этих пациентов еще находятся в трудоспособном возрасте [137]. Среди ведущих факторов риска развития ДР указываются тип СД (риск выше у пациентов с СД 1-го типа) и длительностью заболевания (распространенность ДР составляет около 25% и 90% через 5 и 20 лет соответственно с момента постановки диагноза) [59, 49].

По заключению ВОЗ, ДР занимает 5-е место в мире среди причин слабовидения и 4-е - среди причин слепоты (4,8 млн. людей в мире слепы вследствие ДР) [59]. Уровень заболеваемости диабетической ретинопатии с 2012 по 2016 гг. демонстрирует рост: таковая в 2012 г. составила 6,9%, а в 2016 г. данный показатель увеличился до 7,5%. Анализ структуры первичной заболеваемости по классу болезней глаз показал, что в течение исследуемого периода ДР занимает пятое место [3]. В 2015 г. уже 145 млн. человек имели ДР, в том числе 45 млн. человек – на стадии, угрожающей потере зрения [5].

В работах Д.В. Липатова с соавт. (2018), указывается, что распространенность ДР в Российской Федерации при СД 1 типа составляет 38,3%, при СД 2 типа – 15,0% с выраженными межрегиональными различиями в 2,6 – 66,1% и в 1,1 – 46,4% соответственно. Распространенность ДР в РФ в динамике за 2013 и 2016 гг. составила: у пациентов с СД 1 типа - 3830,9 - 3805,6 на 10 тыс. взрослых; при СД 2 типа – 1586,0 - 1497,0 на 10 тыс. взрослых. Динамика новых случаев ДР в год имела тенденцию к повышению: при СД 1 типа зафиксированы около 153 тысяч в 2013 году и около 188 тысяч случаев в 2016 году; на фоне СД 2 типа – 99,7 - 114,9 случаев соответственно (2013-2016г.г.). Однако распространенность слепоты за три года несколько снизилась: на фоне СД 1 типа – 92,3 - 90,8 /10 тыс., при СД 2 типа – 15,4 - 15,2 /10 тыс. взрослых, однако отмечено увеличение новых случаев слепоты /год: СД 1 типа – 4,3-4,6/10 тыс., СД 2 типа – 1,2-1,4/10 тыс. взрослых [60]. Число пациентов с ДР в Российской Федерации по данным на 31.12.2017 года превысило 580000 человек. В большинстве регионов фактическая распространенность ДР превышает регистрируемую по обращаемости в несколько раз [3]. По данным клинико-статистического анализа распространенности осложнений при сахарном диабете в Российской Федерации на основании Регистра сахарного диабета, а также исследований по эпидемиологии СД и ДР в 2021 г. распределение частоты осложнений при СД 1 и 2 типов в РФ на 01.01.2021: 31,7% при СД 1 типа и 13,5% при СД 2 типа. Следует отметить, что ретинопатия среди всех осложнений СД 2 типа находится третьем месте, а при СД 1 типа – на втором. В целом ДР выявляют

у 35,4% больных СД и почти у 12% из них (по данным разных авторов, от 2,7 до 3,7 млн. пациентов) является причиной слепоты (максимальная корригированная острота зрения (МКОЗ) менее 0,02 на лучше видящем глазу) и тяжелых нарушений зрения (МКОЗ составляет 0,02—0,33) [5]. Хотя за последние годы отмечается положительная динамика уменьшения частоты терминальных стадий ДР (слепоты) [59].

Распространенность и встречаемость ДР, ее зависимость от типа сахарного диабета и длительности диабета также были изучены И.А. Пироговой (2018) путем проведения эпидемиологического скрининга среди больных. Полученные данные позволяют проследить зависимость распространенности различных стадий ДР от типа СД: ретинопатия чаще встречается у больных СД 1 типа при длительности заболевания более 15 лет, что составляет 88,5%. Процент больных СД 1 типа, имеющих пролиферативную стадию ДР выше, чем пациентов, страдающих диабетом 2 типа. Процент других стадий ДР у больных с СД 2 типа и с СД 1 типа имеет небольшие различия. Встречаемость ДР в зависимости от длительности типа СД выглядит следующим образом: при длительности заболевания СД 1 типа 5 лет встречаемость ДР составляет 5%, а СД 2 типа – 12,1%; при длительности 10 лет 59,3% и 45,3% соответственно, 15 лет – встречаемость ДР составляет 88,5% и 68,3% [59].

Общая заболеваемость диабетической ретинопатией, по состоянию на 01.01.2023 г. в Российской Федерации составляет 706407 человек. На долю ранней непролиферативной стадии приходится 79%, на долю поздних стадий – 6,58% всех пациентов. Согласно официальным данным федеральной статистической отчетности, в России ежегодно более 19 тыс. пациентов получают инвалидность по причине потери зрения, а в 25% случаев инвалидность развивается вследствие заболеваний сетчатки, что делает их второй причиной инвалидности по зрению. Установлено наличие существенной «невьявленной» инвалидности по зрению вследствие диабетической ретинопатии. Удельный вес слепоты среди больных диабетической ретинопатией, имеющих группу инвалидности по общему заболеванию, составляет в среднем 9,1%, слабовидения

– 16,4%. Динамика структуры первичной инвалидности по зрению взрослого населения Российской Федерации указывает на рост диабетической ретинопатии в 2019 / 2020 гг. с 2,72 до 2,92%. При этом диабетическая ретинопатия является одним из наиболее распространенных заболеваний сетчатки, приводящим к потере зрения. [16; 26; 38].

В настоящее время общепризнанной считается классификация ДР, предложенная М. Porta и Е. Kohner и принятая ВОЗ в 1992 г. [135]. В ее основе лежит степень выраженности клинических проявлений и сосудистых изменений сетчатки у пациентов с ДР. В Российской Федерации применяется модифицированная классификация, предложенная ретинологами в 2008-2010 гг.: – непролиферативная ДР (НПДР); – препролиферативная ДР (ППДР); – пролиферативная ДР (ПДР) [2, 49]. Более детальная классификация ДР, учитывающая степень выраженности описанных выше патологических изменений, разработана в рамках проведения масштабного исследования Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) [49]. Она является общепринятой для оценки состояния глаз пациентов с ДР при проведении клинических исследований. К ее несомненным плюсам следует отнести большое число градаций тяжести заболевания с возможностью количественного и качественного динамического наблюдения, а также включение в мониторинг состояния пациента оценки зрительных функций. Помимо описанных выше классификаций многими специализированными ассоциациями и национальными офтальмологическими институтами предложено большое количество альтернативных вариантов оценки тяжести ДР [19; 50]. Большинство из них можно условно считать производными от ETDRS, так как они представляют собой клинически ориентированное упрощение данной классификации [49]. Непролиферативная диабетическая ретинопатия идентифицирована как самая ранняя стадия развития диабетической ретинопатии, характеризующаяся усилением проницаемости сосудов сетчатки, образованием микроаневризм, экссудацией и кровоизлияниями. Дальнейшее прогрессирование ДР характеризуется разрывами слоев нервных волокон, неоваскулярной пролиферацией [132], извитостью сосудов стекловидного тела,

более высокой частотой кровоизлияний, что приводит к повышенному риску ухудшения зрения из-за тракционной отслойки сетчатки [161].

1.1.2. Сосудистая и нейродегенеративные теории развития диабетической ретинопатии

Диабетическая ретинопатия относят к сосудистым осложнениям сахарного диабета. Однако появились данные о вовлечении в патологический процесс нервной ткани сетчатки в связи с чем возникла нейродегенеративная теория заболевания, согласно которой ДР представляет собой комплексный процесс изменений структур сетчатки (в частности, ганглиозных клеток), возникающих вследствие метаболических и иных нарушений [16; 49].

Согласно «классической» теории патогенеза, первопричиной развития ДР служат нарушения строения, а затем и функции сосудов микроциркуляторного русла в условиях хронической гипергликемии. Результатом патологических изменений является поражение эндотелиальных клеток, их базальной мембраны, а также перицитов [49; 75; 80]. Нарушение структуры капилляров вследствие дисфункции эндотелия проявляется их запустеванием с формированием локальных зон ишемии. Ишемизированные ткани выделяют биологически активные соединения, основная роль которых состоит в активации компенсаторных механизмов и устранении ишемии. В числе этих молекул – факторы роста (фактор роста эндотелия сосудов – VEGF), основной эффект которых состоит в индукции пролиферации эндотелиоцитов с целью формирования новых сосудов и устранения ишемии и гипоксии [49; 81]. Между тем при этом происходит нарушение описанного компенсаторного механизма, и пролиферация эндотелиальных клеток ведет к формированию неполноценных, неспособных компенсировать ишемию сосудов [49]. Параллельно в некоторых сосудах наблюдается шунтирование кровотока. В результате описанных нарушений формируются обширные зоны отсутствия перфузии и ишемии, а также в ряде случаев возникает декомпенсация барьерной функции сосудистой

стенки с просачиванием жидкости в окружающие ткани и развитием ретинального отека. Последний дополнительно усугубляет ишемию и гипоксию тканей сетчатки, приводя к замыканию порочного круга сосудистых повреждений.

Современная концепция патогенеза ДР включает положения как сосудистой, так и нейродегенеративной теорий. В основе данной концепции лежит понятие нейроваскулярной единицы – комплексного структурно-функционального образования, включающего нейроны сетчатки, астроциты, клетки Мюллера, эндотелий ретинальных сосудов, перициты и клетки микроглии.

Согласно предложенной теории, в нормальных условиях весь этот комплекс находится во взаимодействии за счет межклеточных контактов и активного обмена биологически активными молекулами [42].

При СД хроническая гипергликемия и другие метаболические нарушения вызывают повреждение молекулярных структур компонентов нейроваскулярной единицы. Поэтому параллельно с изложенными выше процессами, происходящими в микрососудах, в результате ишемии и гипоксии наблюдается сначала нарушение метаболизма, а затем и повреждение нейронов сетчатки и клеток Мюллера с их последующим апоптозом и развитием гистологической и клинической картины нейродегенерации. Дальнейшее усугубление ишемии и дезадаптивной сосудистой пролиферации приводит к переходу ДР в последнюю стадию [42].

Таким образом, результаты исследований указывают как на рост заболеваемости СД, так и на рост ДР. В связи с этим проблема ранней диагностики ДР, адекватной профилактики и эффективной терапии остается актуальной. Для решения всех этих задач важным является более детальное изучение патогенеза данного осложнения СД.

Далее рассмотрим патогенетическое действие основных нарушений метаболизма при сахарном диабете, ведущих к развитию ДР.

Биохимическими патогенетическими пусковыми звеньями развития ДР являются: гипергликемия [13], ведущая к гликированию белков и активизации

полиолового пути, активация протеинкиназы C (ПКC), гипоксия и увеличение уровня свободных радикалов, активизация провоспалительных цитокинов сетчатки с продукцией фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A) [13]. VEGF-A влияет на матриксные металлопротеиназы (ММР), которые перестраивают экстрацеллюлярный матрикс. ММР могут вызывать как усиление ангиогенеза (VEGF-A), так и подавление его за счет ингибиторов ангиогенеза, связанных с матриксом.

1.2. Роль отдельных молекулярных механизмов в патогенезе ДР

1.2.1. Гипергликемия как ключевой фактор развития ретинопатии

Гипергликемия является ключевым фактором развития ретинопатии у пациентов как с СД1, так СД2 типа [13; 39; 41]. Это было продемонстрировано в результате массовых наблюдений, где тщательный контроль уровня глюкозы в крови у пациентов с СД значительно снижал риск развития микрососудистых осложнений [132].

Несмотря на то, что каждая клетка в организме периодически подвержена физиологической гипергликемии, повреждающие последствия хронически высокого уровня глюкозы при СД в основном касаются эндотелиальных клеток, периферических нервных клеток, а в сетчатке, перицитов, которые являются ключевыми клетками, обеспечивающими её функционирование [13]. Все эти клетки не успевают утилизировать внутриклеточную глюкозу при хронической гипергликемии, что является триггером для активации четырех ниже указанных механизмов, приводящих к повреждению тканей:

- повышение скорости полиолового пути;
- усиление неферментативного образования конечных продуктов гликирования (AGE) и рост экспрессии рецепторов AGE (RAGE);
- активация протеинкиназы C (ПКC);
- интенсификация активности гексозаминового пути.

1. Обычно полиоловый путь обеспечивает преобразование токсичных альдегидов в безвредные неактивные спирты с помощью фермента, альдозоредуктазы. Однако в случае гипергликемии альдозоредуктаза также превращает избыток внутриклеточной глюкозы в многоатомный спирт сорбитол, являющийся осмотически активным веществом, что приводит в частности к отеку перицитов и дисфункции гематоретинального барьера (BRB) [132]. Кроме этого, отек перицитов препятствует адекватной перфузии, особенно во внутренней части сетчатки, где кровоснабжение изначально более скудное по сравнению с наружной частью сетчатки [132].

Фруктоза, продуцируемая полиоловым путем, может фосфорилироваться до фруктозо-3-фосфата, и, выступать в качестве гликозилирующего агента и увеличивать образование продуктов гликозилирования [157].

2. Неферментативное образование конечных продуктов гликирования (AGE) является результатом сложного взаимодействия между глюкозой и липидами, белками или нуклеиновыми кислотами. В данном случае гликирование представляет собой спонтанную цепь реакций, которая инициируется реакцией карбонильной группы глюкозы со свободной аминогруппой. Обычно ϵ -аминогруппа остатков лизина и α -аминогруппа на N-конце белка образуют аддукт, обычно называемый основанием Шиффа [150], которые подвергаются ряду дальнейших перегруппировок, циклизаций, в результате которых образуется множество разнообразных соединений, которые в совокупности нарушают метаболизм [132]. Образование AGE сопровождается генерацией, среди прочего, ряда активных форм кислорода (АФК), α -оксоальдегидов, которые в дальнейшем модифицируют и повреждают белки и другие важные биологические молекулы посредством нескольких механизмов:

- Они могут изменять структуру внутриклеточных белков и других биополимеров и тем самым изменять их способность функционировать.
- Кроме того, AGE могут диффундировать из клетки и вызывать нарушение передачи сигналов между клеткой и ее мембраной, вызывая дисфункцию клетки.

- Наконец, после диффузии из клетки они могут модифицировать циркулирующие белки плазмы, которые, в свою очередь, связываются с рецепторами AGE на разных типах клеток, таких как макрофаги и эндотелиальные клетки, активируя их, что отражается повышенными уровнями воспалительных цитокинов в плазме, таких как интерлейкин 6 и 1 альфа (IL-6, IL-1 α) и фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) [13].

- AGES также могут образовывать поперечные связи в коллагеновых волокнах, изменяя их структуру и функциональность. В сочетании с вышеупомянутыми эффектами это может привести к повреждению структуры базальной мембраны (БМ) эндотелия сосудов, что тоже имеет Важную роль в патогенезе ДР. Все биополимеры, образующие базальную мембрану (коллаген IV типа, фибронектин, ламинин и перлкан, специфичным гепарансульфат-протеогликаном) вследствие хронической гипергликемии подвергаются неферментному гликозилированию, приводящему к её уплотнению и необратимому утолщению [130].

В норме БМ способствует сохранению избирательной проницаемости капилляров сетчатки и частично регулирует кровоток, за счет сократимости и расслабления перицитов. В условиях гипергликемии при повышении жесткости БМ, может измениться эластичность сосудов, тем самым ослабится способность перицитов регулировать кровоток сетчатки [141].

- AGE способствуют активации VEGF, изменяя при этом плотные контакты между клетками пигментированного эндотелия сетчатки (RPE). Такие изменения приводят к увеличению проницаемости сосудов и утечке компонентов крови в сетчатку [132]. VEGF также опосредует ангиогенез, поэтому, при сохранении хронической гипергликемии наблюдается патологический рост новых сосудов [132].

3. Внутриклеточная гипергликемия также вызывает активацию протеинкиназы, которая влияет на экспрессию различных факторов роста, активацию сигнальных путей и усиление окислительного стресса в клетке, что позволяет РКС регулировать клеточные функции, включая гибель и

пролиферацию клеток, транскрипцию и трансляцию генов, изменение формы клеток и их миграцию, регуляцию межклеточных контактов и секреции, а также регуляцию работы ионных каналов и рецепторов [136].

4. В норме внутриклеточная глюкоза метаболизируется в основном посредством гликолиза. Однако в состоянии гипергликемии часть этой глюкозы переходит в другой путь, известный как путь гексозамина, и повышенному образованию промежуточного продукта гликолиза – глицеральдегид-3 фосфата, неферментативно трансформирующегося в метилглиоксаль (МГ) [132], вызывающий гибель перicytов и снижение функции биполярных клеток сетчатки даже при отсутствии гипергликемии [132].

Гексозаминовый путь превращает фруктозо-6-фосфат в UDP-N-ацетилглюкозамин (UDP-GlcNAc), способный вступать в реакцию О-гликозил-N-ацетилирования (O-GlcNAc) и модификации белка, вызывая тем самым повышение активности как белковых молекул (например, одним из этих белков является ядерный фактор κ B (NF- κ B) [132], так и иммунокомпетентных клеток с увеличением выработки цитокинов (таких как PAI-1, TGF- α и TGF- β 1), индуцирующих апоптоз эндотелиальных клеток и нейронов сетчатки [153].

Кроме того, повышенный уровень внутриклеточной глюкозы усиливает образование активных форм кислорода (АФК) в митохондриях [126].

1.2.2. Роль дисбаланса системы «ПОЛ-антиоксиданты» в развитии диабетической ретинопатии

Многочисленные клинические и экспериментальные данные показали, что при диабете возникает окислительный стресс и в сетчатке и ее капиллярных клетках [66]. Сетчатка богата полиненасыщенными жирными кислотами с высоким поглощением кислорода, что делает ее подходящей мишенью для окислительного повреждения [47].

Полиоловый путь, который как было отмечено выше, увеличивается при диабете и заключается в образовании сорбитола в результате реакции, зависящих

от альдозоредуктазы. Далее сорбит, превращается во фруктозу с помощью и сорбитолдегидрогеназы и образуется восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (NADH), который теперь служит субстратом ферментов семейства Nox для производства супероксида [142], способствуя дисбалансу окислительно-восстановительного потенциала и окислительному стрессу. Другой способ, которым NADH может способствовать окислительно-восстановительному дисбалансу, – это редукирующий стресс, создающий псевдогипоксию и подавляющий функцию митохондриального комплекса I [126]. Комплекс I не способен окислить весь доступный NADH, хотя, пытаясь, он перекачивает больше электронов, чтобы частично восстановить кислород, что и приводит к образованию супероксиданион радикала вместо адекватного использования кислорода и электронов с образованием воды [126].

Работа Narayanan S.P. et al. (2013) показала, что при диабете также увеличивает активность аргиназы в сетчатке, которая, уменьшая поставку аргинина для синтазы оксида азота, снижает уровень оксида азота и увеличивает образование супероксида. Супероксид реагирует с оксидом азота, образуя пероксинитрит, повышенный уровень которого в сетчатке участвует в повреждении сосудов и нервной системы, связанном с диабетической ретинопатией [132].

Кроме этого, сахарный диабет сопровождается ингибированием Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) [132]. Из-за снижения ее активности повышаются уровни вышестоящего гликолитического метаболита глицеральдегид-3-фосфата, который индуцирует пути AGE, PKC и гексозамина за счет увеличения уровней метилглиоксаля, диацилглицерина и фруктозо-6 фосфата соответственно. Ингибирование GAPDH также увеличивает уровень глюкозы, которая может дополнительно подпитывать полиоловый путь и увеличивает потребление NADPH. Таким образом, перепроизводство супероксида митохондриальной цепью переноса электронов активирует основные пути гипергликемического повреждения [140].

Окислительный стресс вызывая образование реактивных карбонильных соединений, способных модифицировать белки и усиливать нитративный стресс, усиливает апоптоз клеток сетчатки [126]. Кроме того, повышенное перекисное окисление липидов при диабете также приводит к образованию реактивных альдегидов, таких как 4-гидроксиноненаль, малоновый диальдегид и акролеин, реагирующих в дальнейшем с белками, образуя относительно стабильные конечные продукты липооксидации (ALE). Считается, что ALE играют роль в патогенезе микрососудистой дисфункции, связанной с диабетической ретинопатией, возможно, за счет нарушения нормальной функции мюллеровой глиии сетчатки [103]. Более того, АФК также являются побочными продуктами образования AGE. Таким образом, AGE и окислительный стресс могут дополнять друг друга.

Кроме повышенной генерации АФК, при ДР понижена активность антиоксидантной защиты [132, 143].

Так показано, что уровни внутриклеточного антиоксиданта GSH снижаются в сетчатке при диабете, что сопровождается увеличением окисленного GSH (GSSG) [47]. GSH может быть регенерирован из GSSG с помощью окислительно-восстановительного цикла глутатиона, но при диабете также нарушены ферменты, ответственные за окислительно-восстановительный цикл глутатиона (глутатионпероксидаза и глутатионредуктаза). Это связано с тем, что в полиоловом пути используется восстановленная форма NADPH, необходимого также для работы глутатионредуктазы. Снижение количества GSH вызывает или усугубляет окислительный стресс, что приводит к повреждению или гибели клеток [132]. Так же нарушена активность ферментов, участвующих в биосинтезе и деградации глутатиона (гамма-глутамилтранспептидаза и глутаматцистеинлигаза) [143]. Клетка оснащена окислительно-восстановительным фактором транскрипции, ядерным фактором (Nrf2). Nrf2 регулирует транскрипцию фермента, критического для биосинтеза GSH, глутаматцистеинлигазы, путем связывания в промоторной области элемента 4 антиоксидантного ответа (ARE4). Установлено, что при диабетической

ретинопатии снижается транскрипционная активность Nrf2 и транскриптов каталитической субъединицы глутаматцистеинлигазы, что еще больше увеличивает окислительную нагрузку на сетчатку [126]. Через гексозаминовый путь глутамин: фруктозо-6-фосфатамидотрансфераза (GFAT) окисляет глутатион в качестве кофактора для превращения F6P в глюкозамин-6-фосфат; Активность GFAT значительно выше у больных сахарным диабетом, что приводит к низкому пулу глутатиона [140].

Кроме этого, при диабете снижается активность как Cu-Zn-СОД, так и MnSOD в сетчатке и ее капиллярных клетках. Таким образом, диабетическая среда наносит сетчатке двойной удар, так как, помимо производства большего количества оксидантов, она также ставит под угрозу систему антиоксидантной защиты [66].

Поврежденная мтДНК нарушает транскрипцию и синтез белка, и это еще больше ухудшает транспорт электронов и усугубляет продукцию АФК, вызывает повреждение мтДНК и ставит под угрозу ее репарацию, еще больше нарушая митохондриальный гомеостаз и усиливая окислительный стресс [126].

Таким образом, имеются неопровержимые доказательства связи между основными метаболическими нарушениями, вызванными диабетом, и окислительным стрессом, что делает его неотъемлемой частью патологического процесса.

1.2.3. Иммунная дисфункция: нарушение иммунного ответа и провоспалительное состояние

Иммунная дисфункция играет ключевую роль в патогенезе диабетических осложнений и проявляется в виде хронического провоспалительного состояния.

В ответ на метаболические и гемодинамические нарушения, осаждавшиеся ранее, активируются эндотелиальные клетки в тканях-мишенях. Это характеризуется повышенной экспрессией молекул адгезии (например, молекулы внутриклеточной адгезии 1 [ICAM-1] и VCAM-1) и высвобождением

хемотаксических факторов (например, CCL5 - хемокина, экспрессируемого и секретируемый Т-клетками при активации), что инициирует рекрутирование и инфильтрацию иммунных клеток в ткань, высвобождающих широкий спектр цитокинов (например, IL-1 β , IL-6 и TGF- α), которые еще больше усиливают воспалительный ответ. Если воспаление остается неразрешенным и становится хроническим, оно способствует развитию и прогрессированию ретинопатии [161].

Диабетическая ретинопатия имеет сходство с вялотекущими хроническими воспалительными заболеваниями, при этом уровни цитокинов в сетчатке и лейкостаз повышены. АФК считаются сильным стимулом для высвобождения цитокинов, например, сам интерлейкин-1 β может запускать сигнальные каскады, приводящие к избыточному АФК [13].

Лейкостаз был признан ключевым процессом на ранней стадии ДР. Так, в 1991 году Schroder S. и соавт. впервые сообщили об окклюзии микроциркуляторного русла сетчатки моноцитами и гранулоцитами у крыс с диабетом, индуцированным стрептозотоцином (STZ) [135]. Повышенная адгезия лейкоцитов была обнаружена в сосудистой сети сетчатки уже через три дня после индукции диабета у крыс. Генетический дефицит CD18 или ICAM-1 приводил к значительному снижению прикрепленных лейкоцитов [85]. Ингибирование CD18 или ICAM-1 с помощью анти-CD18 F(ab9)2-фрагментов или антител уменьшало лейкостаз сетчатки и сосудистые поражения у крыс с диабетом. Фактически эндотелиальные клетки сетчатки являются основными продуцентами ICAM-1, который усугубляет адгезию и трансмиграцию лейкоцитов [175].

Дальнейшие исследования показали, что стимулированные лейкоциты, в свою очередь, способствуют потере эндотелиоцитами пути активации Fas (CD95)/Fas-лиганд [124].

Предполагается также, что в инициации и усилении воспаления сетчатки при DR участвует развивающаяся дисфункция глиальных клеток сетчатки [174]. Глиальные клетки сетчатки, включая астроциты, клетки Мюллера и микроглию, отвечают за обеспечение структурной поддержки и поддержание гомеостаза в сетчатке [73]. При гипергликемическом стрессе активируется микроглия с

последующим увеличением секреции TNF- α , IL-6, MCP-1 и VEGF. Более позднее вовлечение клеток Мюллера и астроцитов связано с усилением воспалительных реакций за счет продукции провоспалительных цитокинов [73].

Гипергликемия увеличивает уровни белка тиоредоксин-интерактина (TXNIP), медиатора воспаления в мюллеровской глии. Повышающая регуляция TXNIP активирует механизмы клеточной защиты, включая аутофагию, гипоксически-подобную индукцию HIF-1 α [132].

Нарушения микроциркуляции, обусловленные воспалительным процессом, вызывают повышенную экспрессию сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), который, как известно, играет роль в ангиогенезе, повышении проницаемости сосудов и активации синтеза провоспалительных белков [132].

В дальнейшем обсуждаются биомеханизмы, участвующие в ДР, которые, как было описано, активируются или тесно связаны с окислительным стрессом: от воспаления до нейродегенерации.

Роль ишемии и гипоксии состоит преимущественно в формировании порочного круга метаболических нарушений, важнейшими из которых являются: — дефицит энергетических субстратов и превалирование низкоэффективного, анаэробного, метаболизма; — снижение функции антиокислительных систем (в частности, системы глутатиона); — нарушение работы ферментных систем (в частности, кальций-зависимых протеинкиназ, глутаминсинтетазы, сперминоксидазы и др.) с формированием метаболического порочного круга.

Последнее из описанных изменений крайне важно, так как приводит к индукции апоптоза, повреждению и дисфункции клеток вследствие неконтролируемого фосфорилирования белков и генерации активных форм кислорода, а также к нарушениям регуляции сосудистого тонуса, что усиливает ишемию и гипоксию.

1.2.4. Взаимосвязь свободно-радикального окисления, воспаления и пироптоза при диабетической ретинопатии

При диабете повышен уровень ряда цитокинов и медиаторов воспаления. Активные формы кислорода, такие как H_2O_2 и анион супероксида, способствуют выработке NF- κ B, который, в свою очередь, опосредует экспрессию VEGF; в то же время он активируется VEGF и перемещается в ядро, чтобы способствовать экспрессии провоспалительных медиаторов, таких как ICAM-1, молекула адгезии сосудистых клеток-1 (VCAM-1), моноцитарный хемотаксический белок-1 (MCP-1) и циклооксигеназа-2 (ЦОГ-2). Известно, что ЦОГ-2 увеличивает синтез простагландинов, стабилизирующих индуцированный гипоксией фактор-1 (HIF-1), который, в свою очередь, способствует экспрессии VEGF и NF- κ B. Таким образом формируется воспалительная медиаторная петля [132]. ICAM-1, VCAM-1 и VEGF вовлечены в разрушение BRB, которое вызывает образование микроаневризм и отеку сетчатки [132].

По мере активации воспалительных факторов (при встрече с молекулярными паттернами, ассоциированных с опасностью (DAMP), или молекулярными паттернами, ассоциированных с патогенами (PAMP)) формируется инфламмасома, реагирующая с клеткой через толл-подобные рецепторы (TLR) способная вызывать каспазо-1-зависимый тип смерти – пироптоз. Показано, что образование инфламассомы связано с заболеваниями сетчатки [132].

Предполагается, что АФК играют очень важную роль в развитии и прогрессировании ДР, так как они также способствуют сборке инфламмасом или пироптозом [132]

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) индуцирует экспрессию молекулы межклеточной адгезии сетчатки 1 (ICAM-1) и инициирует адгезию лейкоцитов сетчатки, что приводит к раннему разрыву ретинального барьера, не вызывает капиллярной перфузии, повреждения и гибели эндотелиальных клеток [132]. При ДР происходит разрыв внешней пограничной мембраны и соединения

внутреннего и наружного сегмента фоторецептора, что связано с тяжестью ДР и влияет на остроту зрения [132].

ICAM-1 вовлечен в развитие лейкостаза, характерного признака ДР. Его специфическое ингибирование предотвращает адгезию лейкоцитов на сетчатке при диабете и повышение проницаемости гематоретинального барьера. ICAM-1 является ключевым медиатором действия VEGF на лейкостаз сетчатки [13; 132].

АФК и нейродегенерация при диабетической ретинопатии. Сетчатка образована различными слоями; одной из них является нервная сетчатка, состоящая из ганглиозных, амакриновых, горизонтальных и биполярных клеток, а также светочувствительных фоторецепторов. Эти клетки взаимодействуют друг с другом для передачи визуальных сигналов в мозг [132]. Нервные клетки сетчатки изменяют свою функцию у пациентов с диабетом. Согласно лонгитюдному исследованию, проведенному Kim и соавт., у пациентов с диабетической ретинопатией, у которых было по крайней мере 2-ступенчатое прогрессирование в течение 4 лет наблюдения, выявлена более высокая скорость истончения внутреннего плексиформного слоя клеток макулярного ганглия [132].

В последнее десятилетие показано, что постоянно высокие концентрации глюкозы приводят к гибели нейронов сетчатки еще до начала апоптоза перицитов. Эти изменения могут быть результатом гипоксии и воспаления. Сетчатка является тканью с высоким потреблением энергии и кислорода; гипоксия – известный механизм, вызывающий дегенерацию нейронов [132].

Было описано, что ряд цитокинов и нейротрофических факторов, связанных с гипоксией, вовлечены в возникновение диабетической ретинопатии; некоторые из них также ответственны за нейродегенерацию. Секреция факторов IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, TNF- α и VEGF, которые, как известно, играют важную роль в путях воспаления, а пироптоз также может играть роль в нейродегенерации [132]. TNF- α также индуцируется H₂O₂ путем активации каспаз во многих нервных клетках. Окислительный стресс участвует в дегенерации аксонов и апоптозе нейронов при травматической и нетравматической дегенерации нервов посредством активации ZNRF1 при окислительном стрессе [132].

По-видимому, существуют некоторые факторы, которые защищают амакриновые, ганглиозные и мюллеровы клетки от деградации, такие как нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), фактор роста нервов (NGF) и нейротрофический фактор мезэнцефальных астроцитов (MANF). Клетки Мюллера продуцируют NGF, увеличивая экспрессию VEGF, способствуя ангиогенезу в физиологических условиях, чтобы защитить нейронные клетки от среды, лишенной кислорода и глюкозы. Окислительный стресс в сетчатке способен предотвратить активацию NGF из его формы-предшественника proNGF, которая, как известно, способствует апоптозу нейронных клеток сетчатки. Дисбаланс NGF/proNGF в стекловидном теле коррелирует с повреждением сетчатки [132]. Другими факторами, которые могут способствовать защите нейронов сетчатки, являются цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) и фактор роста фибробластов (FGF) [132]. Было показано, что снижение количества активных форм кислорода полезно для защиты от дегенерации нейронов и способствует экспрессии защитных факторов, таких как компактные миелиновые белки [132]. Выживанию ганглиозных клеток сетчатки также способствует PEDF (фактор, происходящий из пигментного эпителия) посредством активации STAT3 (сигнальная трансдукция и активатор транскрипции 3), секретируемой клетками Мюллера [132].

1.3. Обмен триптофана и роль нарушений его обмена в патогенезе сосудистых заболеваний

Триптофан (TRP) является незаменимой аминокислотой, которая используется в синтезе белков человека, а также служит источником различных биологически активных молекул, включая серотонин, триптамин (нейротрансмиттеры), мелатонин (гормон), индолы, а в кинурениновом пути преобразуется в никотинамидадениндинуклеотид (NADH) и NADPH (коферменты) [72].

У человека в кинурениновом пути (КП) метаболизируется большая часть TRP (около 95%) [72], где образуется ряд промежуточных соединений, называемых в совокупности кинуренинами [72; 76; 143] (рис. 1). Последние включают в себя несколько биологически активных веществ, проявляющих широкий спектр биохимических действий, часто противоположных друг другу, таких как цитотоксическое/цитопротекторное, оксидантное/антиоксидантное или про-/противовоспалительное. Каноническая классификация кинуренинов представляет их либо как защитные, такие как кинуреновая кислота (KYNA), либо как токсичные, такие как хинолиновая кислота (QUIN) или 3-гидроксикинуренин (3-ОН-KYN). Но конечный эффект во многом определяется их локальной концентрацией, типом клеток, активностью ферментов данного процесса и возможно другими факторами [105].

Было обнаружено, что промежуточные продукты КП играют важную роль в углеводном обмене, перекисном окислении, регуляции иммунного ответа и воспалении [14305; 143]. Поэтому очевидно, что несбалансированный кинуреновый путь вовлечен в патомеханизмы и диабетической ретинопатии.

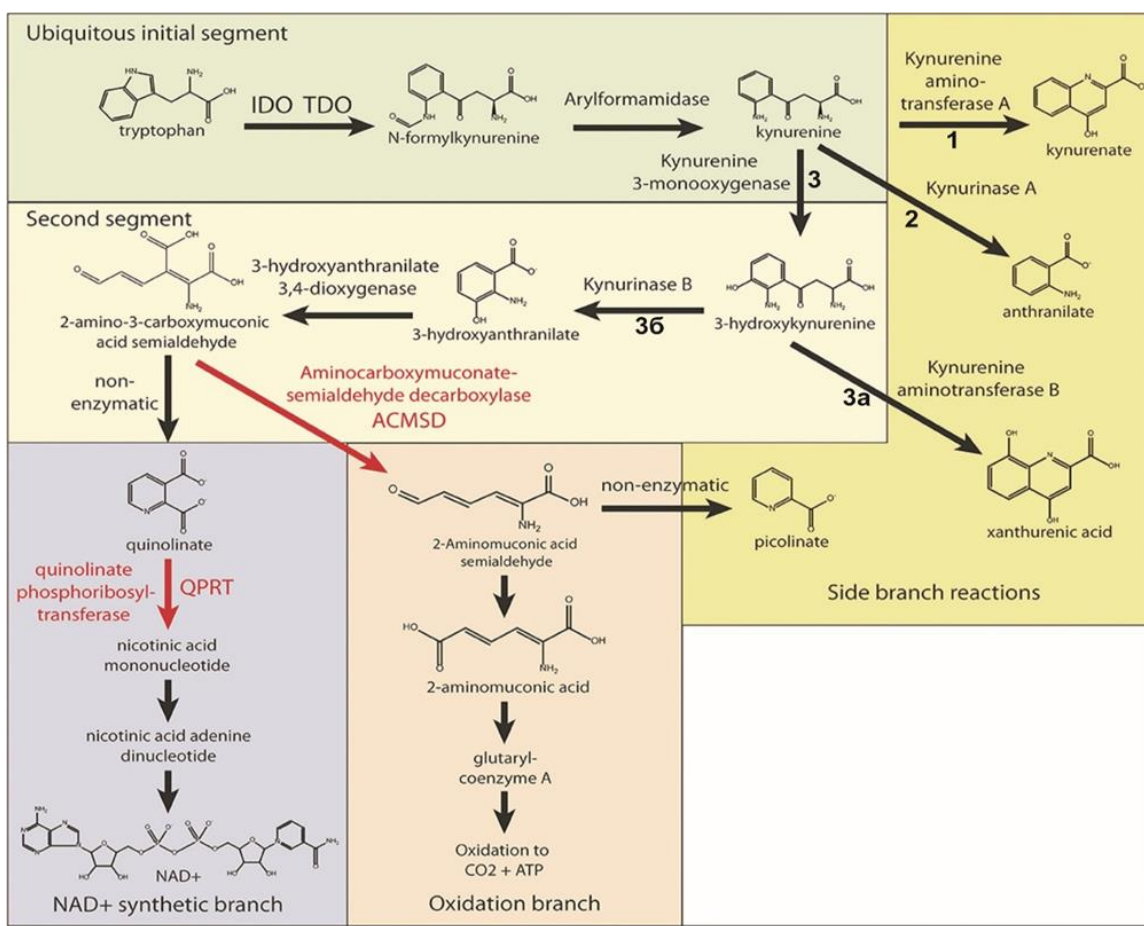


Рисунок 1 – Упрощенная схема кинуренинового пути катаболизма триптофана [138]

1.3.1. Кинурениновый путь обмена триптофана

КП является основным путем метаболизма TRP и приводит к биосинтезу NADH. В физиологических условиях КП регистрируется практически во всех тканях, преимущественно в печени. Этот процесс начинается с того, что из TRP получается N-формило-L-кинуренин. Данная реакция обеспечивается двумя независимыми ферментами, принадлежащими к семейству оксидоредуктаз: триптофан-2,3-диоксигеназой (TDO) и индоламин-2,3-диоксигеназой (IDO) [65]. Затем N-формило-L-кинуренин под действием фермента формаминидазы превращается в L-кинуренин (KYN). После чего KYN может быть преобразован в три разных соединения тремя энзимами:

1 – кинуренинаминотрансферазой А(КАТ), которая трансаминирует триптофан в кинуреновую кислоту (KYNA);

2 – кинурениназой А гидролизуется до антраниловой кислоты (АК); (из антраниловой кислоты с помощью антранилат 3-монооксигеназы может образовываться 3-НАА)

3 – кинуренингидроксилазой (КМО) гидроксилируется до 3-гидроксикинуренина (3-НКYN).

Обычно большая часть кинуренина превращается в 3-НКYN. Дальнейшее преобразование этого метаболита идет двумя путями: с помощью кинуренинаминотрансферазы (3а) преобразуется в ксантуреновую кислоту (ХА) и с помощью кинурениназы (3б) – в 3-гидроксиантраниловую кислоту (3-НАА). Последнее соединение далее превращается в хинолиновую кислоту (QA) путем неферментативной циклизации и способствует образованию никотинамидмононуклеотида (НМН) и никотинамидадениндинуклеотидов (NADH и NADFH), которые играют основную роль в окислительно-восстановительных реакциях в качестве коферментов дегидрогеназ, обеспечивающих прежде всего энергетический гомеостаз (рисунок 1). Но кроме того NADH⁺ выполняет множество функций, включая участие в реакции полимеризации поли-АДФ-рибозы (PARP), необходима для репарации ДНК, и являясь компонентом различных ферментов, таких как NAD⁺-зависимые деацетилазы, известные как сиртуины [65]. Кофермент NADFH, в свою очередь необходим для работы энзимов, участвующих в антирадикальной защите.

1.3.2. Участие триптофана и его метаболитов в метаболизме углеводов, окислительном стрессе, воспалении, иммунном ответе

Поскольку накопление тех или иных метаболитов зависит от активности ферментов, мы попытались сначала раскрыть механизмы их регуляции.

Ферменты КП и механизмы их регуляции

В первой и наиболее важной реакции КП участвуют две оксигеназы (IDO и TDO) [89; 94], различающиеся по месту действия, а также по факторам, которые их активируют.

Фермент TDO экспрессируется, главным образом, в печени и головном мозге и активируется высокими концентрациями TRP и кортикостероидов [165], концентрации которых возрастают при СД.

Энзим IDO идентифицируется в большинстве органов и тканей (в том числе в гепатоцитах, эндотелиоцитах, моноцитах, макрофагах, фибробластах, В-лимфоцитах, дендритных клетках, в β -островках поджелудочной железы [76; 119; 148]. Показано, что ингибирование IDO с помощью 1-метил-TRP (1-MT) при пероральном введении приводит к стимуляции экспрессии VCAM-1 и усилению инфильтрации макрофагов CD68⁺ в интимальную часть артериальной стенки Арое-/- мыши, что сопровождается усилением воспалительного процесса. Впоследствии было подтверждено, что репрессия IDO вызывает рост активности VCAM-1 в эндотелиоцитах человека [76; 113].

Незначительное увеличение экспрессии IDO1 и повышенный уровень фермента наблюдаются в перитонеальных макрофагах после введения липополисахарида (ЛПС) [165]. Рассматривается непосредственная роль IDO1 в модуляции иммунновоспалительных реакций и потенциальное влияние на развитие атеросклероза. Обнаружено, что диета с высоким содержанием жиров резко увеличивает активность IDO в макрофагах и VSMC синуса аорты у мышей [113; 165].

В одних исследованиях показано, что повышенная экспрессия IDO наблюдается в атеросклеротических бляшках при воспалении сосудов, а также в β -клетках при диабете [76; 113], в других работах наблюдали угнетение экспрессии фермента в некоторых инсулинсодержащих островках от доноров с множественными положительными аутоантителами (AAb⁺) или с СД1, что предполагает роль нарушения IDO1 в развитии заболевания [119].

К настоящему времени установлено, что активность IDO-1 индуцируют такие медиаторы воспаления и цитокины как фактор некроза опухоли-альфа

(ФНО- α), интерлейкины (ИЛ): ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, ИЛ-18, ИЛ-23, интерферон-альфа (ИФН- α) и интерферон-гамма (ИФН- γ). По данным одних авторов, наиболее мощным из них является ИФН- γ , другие исследователи акцентируют внимание на способности ФНО- α ускорять реакцию, катализируемую IDO на 300%. Экспрессия же IDO ингибируется противовоспалительным интерлейкином 4; в связи с чем можно считать, что фермент IDO служит важным связующим звеном между КП и иммунновоспалительным ответом [76]. Это обусловлено не только участием продуктов КП в иммунном ответе, но и тем, что в индукции активности фермента IDO решающая роль отводится цитокинам [76]. Отсюда три основные цели стимуляции IDO: - внепеченочный синтез кинуренина, который необходим клеткам иммунной системы; - образование NAD^+ в них же, для реакции PARP на повреждения ДНК и другие критические функции в иммунных клетках; - продуцирование иммуномодулирующих метаболитов для регуляции иммунного ответа, особенно реактивности Т-клеток [98; 138].

Фермент КАТ. Кинуренин может метаболизироваться с помощью различных кинуренинаминотрансфераз I, II, III и IV (КАТ-I, КАТ-II, КАТ-III и КАТ-IV) в кинуреновую кислоту (KYNA). Было доказано, что эндотелиоциты сосудов также способны синтезировать *de novo* KYNA из KYN [156], то есть содержат КАТ.

Однако, наибольшее значение в кинурениновом пути имеет фермент КМО (кинуренин-3-монооксигеназа) (рис. 1), представляющий собой гидроксилазу, принадлежащих к семейству NAD(P)H-зависимых флавинмонооксигеназ. Фермент в качестве кофермента включает FAD (активную форму витамина B₂), используя либо NADPH, либо NADH. Экспрессия КМО активируется провоспалительными цитокинами, зависит от уровня субстрата и изменяется в результате функциональных генетических мутаций [156].

Поскольку экспрессия КМО индуцируется провоспалительными цитокинами, при воспалении образование 3-гидроксикинуренина увеличивается намного быстрее, чем образование кинуреновой кислоты (с помощью фермента

КАТ), и баланс между формированием 3-НК и KYNA сдвигается в сторону 3-НК, что в этих условиях способствует накоплению ксантуреновой кислоты. При повышении генерации 3-гидроксикинурина также может усиливаться образование хинолиновой кислоты, о чем свидетельствует факт, что при активации макрофагов в условиях воспаления, они начинают активно продуцировать QA [76].

Фермент кинуриназа. Сообщалось также о снижении активности кинуриназы у кроликов с СД 1 типа [105].

Другой важный фермент кинуриназного пути это ACMSD представляет собой декарбоксилазу; она включает цинк-зависимую гидролазу и домен амидогидролазы [101]. При физиологических условиях этот фермент активно экспрессируется в печени [101]. Фермент локализуется в основном в цитозоле расположен в критической точке ветвления кинуриназного пути, где он влияет на судьбу предшественника 2-амино-3-карбоксимукон-6-полуальдегида (ACMS). В свою очередь, из ACMS в результате самопроизвольного превращения получается хинолиновая кислота. Однако, когда присутствует фермент ACMSD, он вместо этого катализирует превращение ACMS в аминомуконовый полуальдегид (AMS) [101]. Таким образом, ACMSD ограничивает и регулирует образование хинолиновой кислоты. Продукт действия фермента ACMSD - AMS, может входить в другой метаболический путь, выступая в качестве субстрата для синтеза глутарил-КоА и впоследствии ацетил-КоА, вливающегося затем в цикл лимонной кислоты. Известно, что экспрессия фермента ACMSD активируется в ответ на метаболические нарушения, такие как СД [78]. Tanabe A. И соавторами (2002) было продемонстрировано, что печеночная активность 2-амино-3-карбоксимуконат-полуальдегиддекарбоксилазы ACMSD значительно выше у крыс с диабетом 1 типа [88].

Образуемая из АМС пиколиновая кислота является стабильным конечным продуктом, который не подвергается дальнейшим преобразованиям. Это вещество представляет собой хелатор металлов, который, как предполагалось, защищает клетки от токсической хинолиновой кислоты [146].

Таким образом, ACMSD, располагаясь в ключевом месте ветвления кинуренинового пути, с одной стороны, ограничивает метаболизм триптофана в NADH^+ за счет предотвращения образования хинолиновой кислоты, с другой – катализирует выработку метаболитов, которые затем вступают в цикл лимонной кислоты или могут образовывать пиколиновую кислоту [101].

Фермент хинолинатфосфорибозилтрансфераза катализирует образование из QA мононуклеотида никотиновой кислоты, которое включает реакцию переноса фосфорибозила с последующим декарбоксилированием и конкурентно и неконкурентно ингибируется одним из его субстратов – PRPP (фосфорибозилпирофосфатом) [112].

Существуют некоторые различия между концентрациями отдельных метаболитов КП в крови у пациентов с СД1 и СД2, что свидетельствует о разной активности того или иного фермента данного процесса у этих больных (так, СД1 связан со значительно накоплением величин антраниловой кислоты, а при СД 2 типа наблюдается повышение уровня ХА) [149].

Это может быть связано как с вариациями в звеньях патогенеза развития абсолютной и относительной инсулиновой недостаточности, так и с разной выраженностью метаболических нарушений при СД1 и 2 типов. В патогенез диабета 2 типа большой вклад вносит воспалительный компонент, регулирующийся цитокинами про- и противовоспалительного действия. В то время как при СД 1 типа более выражены гипергликемия, ацидоз и повышенный уровень АФК, что, естественно, может повлиять на активность определенных ферментов.

Кроме того, содержание и окончательный суммарный эффект метаболитов будет также зависеть от ряда генетических и эпигенетических факторов [105].

1.3.3. Роль продуктов КП в развитии ангиопатий при СД

Продукты обмена триптофана, образуясь в клетках далее поступают в плазму крови.

У пациентов с СД 2 типа часто наблюдаются низкие цифры Trp и накопление нижестоящих метаболитов пути Trp-KYN [131; 151]. Предполагается, что образование большего количества кинуренинов может быть вызвано хроническим стрессом или вялотекущим воспалением, сопровождающими СД 2 типа [131; 166]. Однако результаты неоднозначны.

Имеются данные о значениях кинуренинов, наблюдаемых при осложнениях СД. Munipally P.K и соавт (2011) регистрировали усиление экспрессии IDO и рост величин ХА, KYN и 3-НКYN в сыворотке крови больных диабетической ретинопатией [86]. Причем по данным тех же авторов, сывороточные концентрации как KYN, так и KYNA были выше у пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией (PDR) по сравнению с пациентами с непролиферативной (NPDR). По мнению авторов, это указывает на то, что метаболиты TRP могут быть вовлечены в патогенез диабетической ретинопатии [86].

Было обнаружено, что содержание циркулирующего Trp обратно коррелирует со стадиями диабетической нефропатии, тогда как активность IDO и уровни KYN, KYNA и QUIN увеличиваются по мере прогрессирования заболевания [167].

Эта информация заставляет задуматься о том, могут ли кинуренины плазмы быть неизвестным до сих пор фактором риска развития Ретинопатии при СД.

1.3.4. Кинуренин (KYN)

KYN идентифицирован как эндогенный лиганд арилуглеводородного рецептора (AhR), функционирующий в качестве мишени для ксенобиотиков и как фактор транскрипции [110]. AhR принадлежит к семейству ядерных рецепторов, играющих серьезную роль в регуляции экспрессии генов и вовлеченных, среди прочего, в клеточную дифференцировку и воспаление. AhR локализуется в цитоплазме и ядрах большинства клеток, широко экспрессируется в барьерных тканях, особенно иммуннокомпетентными клетками, эпителиоцитами и

эндотелиоцитами, и в первую очередь, способствует иммуносупрессии. Активация AhR приводит к снижению активности естественных киллеров (NK), ингибированию пролиферации Т-лимфоцитов и усилению дифференцировки наивных Т-клеток в регуляторные Т-клетки (Treg). Следовательно, KYN, действуя посредством стимуляции AhR, является фактором, участвующим в иммунном ответе [146], способным уменьшать выраженность воспаления [76].

Между тем установлено, что активация AhR кинуренином стимулирует экспрессию фермента IDO1, который генерирует кинуренин, что представляет собой петлю положительной обратной связи [114].

Имеются данные, указывающие на участие передачи сигналов AhR-кинуренин в метаболизме глюкозы. Biljes D и соавт. (2015) наблюдали более высокие уровни глюкозы в крови у мышей с дефицитом AhR [96]. Хотя ранее Dabir P и соавт. (2008) обнаружили, что высокая концентрация глюкозы может быстро стимулировать AhR эндотелиоцитов аорты, что, в свою очередь, активирует мощный антиангиогенный и проатерогенный белок тромбоспондин-1 и способствует развитию диабетических сосудистых осложнений [70]. Интересно, что некоторые исследования на людях свидетельствуют о наличии связи между воздействием агонистов AhR (особенно TCDD) и повышенным риском развития СД 2 типа и других метаболических нарушений [78].

Wang Y. и соавторы показали, что KYN можно считать вазоактивным соединением, играющим свою роль через sGC-cGMP-зависимый протеинкиназный путь [112] в эндотелии, а также KYN действует посредством активации каналов Kv7 (потенциал-зависимые K (+) каналы, кодируемые семейством генов KCNQ) в гладких мышцах сосудов [109].

KYN проявляет свойства эндогенного антиоксиданта. Ortega D.R. и соавт. (2021) выявили, что KYN действует в двух направлениях: во-первых, является поглотителем АФК ($\bullet\text{OH}$ и ONOO^-), во-вторых повышает антиоксидантную способность, тем самым обеспечивая защиту в основном от окислительного повреждения посредством механизма, который еще до конца не выяснен [129]. Но с другой стороны, транскрипционный фактор Nrf2, индуцирующий

антиоксидантную систему, также может активировать экспрессию AhR. Отсюда, баланс между про- и антиоксидантными функциями AhR, опосредованными кинуренином, способствует модулированию уровней активных форм кислорода (АФК) и может регулировать процесс воспаления [102].

Таким образом, согласно литературным данным, KYN обладает многосторонними эффектами: влияет на секрецию инсулина, является иммуномодулятором, антиоксидантом, вазоактивным соединением.

1.3.5. Кинуреновая кислота (KYNA)

KYNA – прямой продукт трансаминирования KYN, является важным метаболитом пути Trp-KYN, обладающим плеiotропной биологической активностью [67; 107; 165]. KYNA может синтезироваться различными периферическими тканями, включая эндотелиальные и иммунные клетки [165].

Литературные данные об интимном влиянии KYNA на метаболизм углеводов и липидов в физиологических условиях немногочисленны. Кинуреновая кислота и Gpr35 усиливают экспрессию Pgc-1 α 1 и клеточное дыхание, а также повышают уровни Rgs14 в адипоцитах, что приводит к усилению передачи сигналов бета-адренергических рецепторов [108].

Совсем недавно было обнаружено, что KYNA значительно увеличивает фосфорилирование AMP-активируемой протеинкиназы (AMPK) и угнетает вызванные пальмитатом воспаление, резистентность к инсулину в скелетных мышцах и жировой ткани посредством путей, опосредованных GPR35/AMPK и SIRT6 [84].

Считают, что KYNA оказывает плеiotропное действие на иммунные механизмы, часто с противоположными эффектами [154]. Так, в условиях активации иммунного процесса установлено ингибирование ею выработки и высвобождения TNF α и белка группы высокой подвижности 1 (HMGB1) моноцитами и гранулоцитами [69]. В повышенных концентрациях KYNA уменьшает секрецию негистонового ядерного белка HMGB1(highmobilitygroupbox

1 protein) активированными макрофагами и моноцитами [165]. HMGB1 характерен для всех эукариотов, участвует в репликации, рекомбинации, транскрипции и репарации ДНК, тем самым обеспечивая регуляцию и поддержание баланса между аутофагией и апоптозом, контролируя созревание и миграцию дендритных клеток, и активацию клеточного звена иммунной системы [165].

Кроме того, KYNA, являясь эндогенным лигандом орфанного рецептора GPR35, уменьшает степень выраженности процесса воспаления за счет подавления секреции интерлейкина-4 (IL-4) и α -дефензина, ингибирования дифференцировки клеток Th17 [64; 165]. Фармакологический профиль KYNA, как и KYN, включает стимуляцию AhR, что приводит к противовоспалительной активности [67, 1675].

Описаны антиоксидантные свойства KYNA, заключающиеся в её способности связывать и выводить АФК: гидроксильные радикалы, супероксидный анион, пероксинитрит и другие свободные радикалы [105]. Эти антиоксидантные свойства, как и других метаболитов КП на наш взгляд отчасти связаны с наличием сопряженной системы (и даже фенольного фрагмента) в молекулах данных соединений, что делает их ловушками свободных радикалов.

С другой стороны, показано, что увеличение содержания кинуреновой кислоты снижает потребление кислорода, эффективность синтеза аденозинтрифосфата (АТФ) в митохондриях кардиомиоцитов (это свойство KYNA также является дозозависимым) [63]. Образование KYNA отклоняет путь от синтеза *de novo* NAD⁺/NADH, который регулирует митохондриальный ЦТК и биологическое окисление, что предполагает участие KYNA в регуляции энергетического метаболизма этих органоидов [107].

Таким образом, кинурениновая кислота обладает иммуномодулирующим, антиоксидантным эффектами.

1.3.6. 3-гидроксикинуруенин (3-НКYN), 3-гидроксиантраниловая кислота (3-НАА)

Имеются исследования 1985 г., согласно которым 3-гидроксикинуруенин (3-НКYN) и 3-гидроксиантраниловая кислота (3-НАА), ингибируют индуцированное лейцином высвобождение инсулина из островков, выделенных из поджелудочной железы крыс [63], хотя других сообщений о влиянии данных метаболитов на секрецию гормона в доступной литературе мы не обнаружили. В экспериментах Wang Q. и соавт. (2015), проведенных на мышах, было показано, что 3-НКYN вызывает эндотелиальную дисфункцию *посредством* активации NAD(P)H-оксидазы, участвующей в производстве АФК (супероксидных анионов), что способствует окислительному стрессу в клетках [170]. Zhang L и соавт. сообщили о прямом воздействии 3-НАА на макрофаги мышей и уменьшение местного воспаления в сосудах [170]. Cole J.E и соавт. (2015) также подтвердили, что пероральное введение 3-НАА снижает выраженность эндотелиита [100].

В литературе 3-НАА представлена как иммунорегуляторное соединение, которое, ингибируя провоспалительные клетки Th1 и Th2 при одновременном увеличении количества Treg, регулирует аутоиммунные механизмы. Эксперименты на модели аутоиммунного энцефалита грызунов показали, что 3-НАА уменьшает воспаление, обусловленное Th17 типа [93]. В другом исследовании, проведенном на мышинной модели астмы, сообщалось, что 3-НАА может ингибировать NF-κB, что приводит к гибели ранее активированных клеток Th2. Было показано, что 3-НАА представляет собой соединение со свойствами, снижающими экспрессию молекулы адгезии сосудистых клеток (VCAM)-1, которая опосредует адгезию иммунокомпетентных клеток к эндотелию сосудов и играет важную роль в развитии атеросклероза [76]. Кроме того, известно, что это соединение снижает секрецию моноцитарного хемоаттрактантного белка (MCP)-1 в эндотелии, хемокина, ответственного за привлечение моноцитов, Т-лимфоцитов и дендритов к месту воспаления [170].

Как 3- НК, так и 3-НАА могут способствовать синтезу АФК и вызывать окислительный стресс [68; 163]. В то же время предполагается противовоспалительная и нейропротекторная роль 3-НАА в момент воспаления. В астроцитах 3-НАА индуцирует экспрессию гемеоксигеназы-1, обладающей противовоспалительными и цитопротекторными свойствами [68].

1.3.7. Ксантуреновая кислота (ХА)

Стоит упомянуть, что еще в 1975г. на модели индуцированного СД крыс было доказано, что ксантуреновая кислота (ХА) способна ослаблять действие инсулина, связываясь с его циркулирующей фракцией [28; 76].

Предложены четыре возможных механизма, патогенного влияния ХА на организм:

- образование хелатных комплексов с инсулином (ХА-In), обладающих антигенными свойствами и на 49% меньшей активностью, чем свободный гормон. Подобная структура затрудняет транспорт глюкозы в клетки, нарушается углеводный обмен, что вносит существенный вклад в развитие метаболического синдрома и диабета 2 типа [76];

- образование комплекса инсулин- Zn^{++} в β -клетках, токсичного для изолированных островков поджелудочной железы [76];

- ингибирование секреции инсулина поджелудочной железой;

- инициация апоптоза бета-клеток поджелудочной железы через каспазо-3-зависимый механизм и разрушение их митохондрий и ядер [76].

Исследования показали, что ХА, является более эффективным сосудоуспокаивающим средством, чем KYN, но точный молекулярный механизм остается неясным и требует выяснения [172].

Обнаружено, что ХА обладает мощными антиоксидантными свойствами [173]. Поэтому некоторые ученые предлагают рассматривать соотношение 3-НК/ХА как коэффициент, отражающий нарушение баланса между клеточным апоптозом и антиоксидантными свойствами в эндотелии.

1.3.8. Хинолиновая кислота (QA) или Хинолинат (Quin)

Хинолиновая кислота является важным метаболитом КП как предшественник NAD^+ . Quin может регулировать катаболизм триптофана в сторону образования NAD^+ в ответ на воспаление. Макрофаги, микроглия и дендритные клетки являются основными генераторами QUIN при воспалительных состояниях. В работе Moffett J.R. и соавт. (2020) показано, что внутриклеточные уровни Quin резко увеличиваются в ответ на иммунную стимуляцию (например, LPS, IFN- γ или митоген лакомы (PWM)) в выше перечисленных клетках [138].

QA является агонистом NMDA-рецептора, ответственного за возбуждающее действие в ЦНС. Однако недавно было обнаружено его присутствие и в поджелудочной железе. Этот рецептор снижает количество инсулина, секретируемого β -клетками в ответ на повышение уровня глюкозы. Было доказано, что делеция рецептора NMDA в островках поджелудочной железы повышает уровень инсулина в плазме крови и приводит к нормогликемии. В исследовании PREDIMED было отмечено, что увеличение QA, как TRP в крови, было положительно связано с заболеваемостью СД2. Кроме того, изменения уровня метаболитов TRP связаны с изменениями в значениях индекса HOMA-IR [76]. Было продемонстрировано, что после воздействия QA цифры глюкозы и общего холестерина в сыворотке крови значительно уменьшаются [145]. Кроме этого, хинолиновая кислота путем ингибирования фосфоенолпируваткарбоксикиназы подавляя глюконеогенез, может индуцировать гипогликемию [76].

В других источниках отмечается, что QA склонна к комплексообразованию с ионами железа, что приводит к образованию многочисленных АФК и отсюда к увеличению интенсивности перекисного окисления липидов [69; 68]. Активация окислительного стресса возможна за счет развивающейся митохондриальной дисфункции на фоне высокой концентрации QUIN, активирующей рецепторы NMDA [69]. В последние годы появляются новые данные, связывающие функционирование иммунной системы с внеклеточным содержанием QUIN. Некоторые провоспалительные цитокины, такие как $\text{TNF}\alpha$ или $\text{IL-1}\beta$,

способствуют продукции QUIN, тогда как противовоспалительный IL-4 ингибирует IDO/TDO, тем самым подавляя ее продукцию [165].

Таким образом, метаболиты кинуренинового пути (особенно KYN, KYNA, XA) из-за их способности взаимодействовать со специфическими рецепторами (такими как AhR, NMDAR, Gpr35), экспрессируемыми в тканях, имеющих отношение к углеводному обмену (поджелудочная железа, жировая ткань, печень), считаются модуляторами метаболических нарушений. Некоторые кинуренины обладают противовоспалительными свойствами, способными влиять на механизмы аутоотолерантности [165]. Исследование, проведенное Braidy et al. продемонстрировало что активацию КП в DC с помощью IFN γ MDDCs могут опосредовать апоптоз Th-клеток *in vitro* [165]. Стимуляция AhR может влиять на воспаление и транскрипцию генов посредством перекрестной регуляции многих воспалительных сигнальных путей [117; 118]. В частности, активация AhR приводит в действие Toll-подобного рецептора 2 (TLR2) и нижележащих сигнальных путей NF- κ B и MAPK. Кроме того, она способствует фосфорилированию p65/NF- κ B, JNK/MAPK, p38/MAPK и ERK/MAPK, что обеспечивает дополнительную продукцию провоспалительных медиаторов, включая интерлейкин-1 β (IL-1 β) и интерлейкин-6 (Ил-6) [18; 64; 165]. В совокупности эти результаты показывают, что кинуренины, включая Kyn, 3-НК и ЗНАА являются молекулярными регуляторами воспаления, в том числе и сосудистого [106].

Тот факт, что кинурениновый путь эволюционно законсервирован, ясно указывает на то, что он выполняет важные биологические функции. Когда вся система работает так, как задумано, КП обеспечивает функционирование клеток, но, когда возникают сбои, это приводит к существенным пагубным последствиям. Для поддержания данного баланса в КП, по-видимому, задействован ряд сигнальных систем, а также экспрессия и регуляция различных отдельных ферментов КП в разных типах клеток.

Растущие усилия в области изучения обмена триптофана постепенно выявляют сложные взаимодействия между эффектами продуктов кинуренинового

пути, метаболическими нарушениями и сосудистыми осложнениями СД. Хотя многие положения остаются неясными, в представленном обзоре литературы мы регистрируем некоторые патогенетические взаимосвязи.

В отчетах, сделанных в рамках Шанхайского исследования диабета (SHDS), выявлено, что уровни TRP в сыворотке значительно выше у пациентов, у которых развился диабет 2 типа в течение 10 лет наблюдения, по сравнению с условно здоровыми добровольцами [169].

Но с другой стороны, может оказаться, что особенности диеты влияют на скорость и направленность процессов кинуренинового пути. Известно, что СД 2 типа развивается на фоне ожирения, т.е. избыточного поступления пищи. При этом богатая белком высококалорийная диета способна усиливать пагубные последствия увеличенной скорости КП и изменять течение воспалительных заболеваний. Человеку требуется около 250 мг триптофана в день для поддержания баланса азота, но современные диеты, обогащенные молочными продуктами и мясом, содержат его в 3–4 раза больше необходимого [138]. Исследования показывают, что хроническое поступление избыточных величин белка негативно влияет на уровень NAD^+ в плазме [138].

Также существуют экспериментальные доказательства того, что высокие уровни глюкозы и/или очищенного альбумина Амадори приводят к специфическим окислительным модификациям остатков триптофана в лизоцимы, подавляя таким образом их активность [10]. Окисленные остатки триптофана также повышены в сердечных белках крыс-диабетиков [76]. Эти результаты позволяют предположить, что окислительный стресс и окисление триптофана могут служить одной из причин снижения величин последнего в сыворотке крови как на животных моделях СД 1 типа, так и у пациентов с данным заболеванием [76].

В итоге нарушения метаболизма триптофана в кинурениновом пути, на наш взгляд, приводят к недостаточному синтезу NAD и NAD^+ , что в свою очередь, сказывается на функционировании системы «прооксиданты/антиоксиданты», накопление же побочных и промежуточных продуктов КП усугубит все процессы,

ведущие к развитию СД и сопутствующих ангиопатий (нарушение углеводного обмена, активация ПОЛ, угнетение иммунитета, хроническое воспаление). В свою очередь активация всех выше перечисленных процессов способно приводить к патологическим колебаниям активности ферментов КП, что замкнет порочный круг.

Конечно, многое во всех этих взаимосвязях остается не изученными, однако, без сомнения, можно заявить, что углубленное исследование колебаний метаболизма TRP ускорит понимание патогенеза осложнений сахарного диабета и в частности ДР.

Таким образом, кинурениновый путь преобразования TRP выполняет несколько важных функций в организме, и усилия в области изучения его звеньев постепенно выявляют сложные взаимоотношения между метаболическими нарушениями обмена триптофана и диабетической ретинопатией. И хотя еще многие вопросы остаются за семью печатями, в представленном обзоре литературы уже намечены некоторые патогенетические взаимосвязи.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общий дизайн исследования

Исследования проводились в 2022-2023 гг. Дизайн исследования был согласован с принципами надлежащей клинической (ГОСТР 52379-2005) и лабораторной (ГОСТ Р-53434-2009) практики.

Предварительно был проведен расчет минимального размера выборки, необходимого для подтверждения наличия предполагаемых различий между исследуемыми группами методом «Paired Samples T-Test» в программе Jamovi версия 2.3 (рисунок 2).

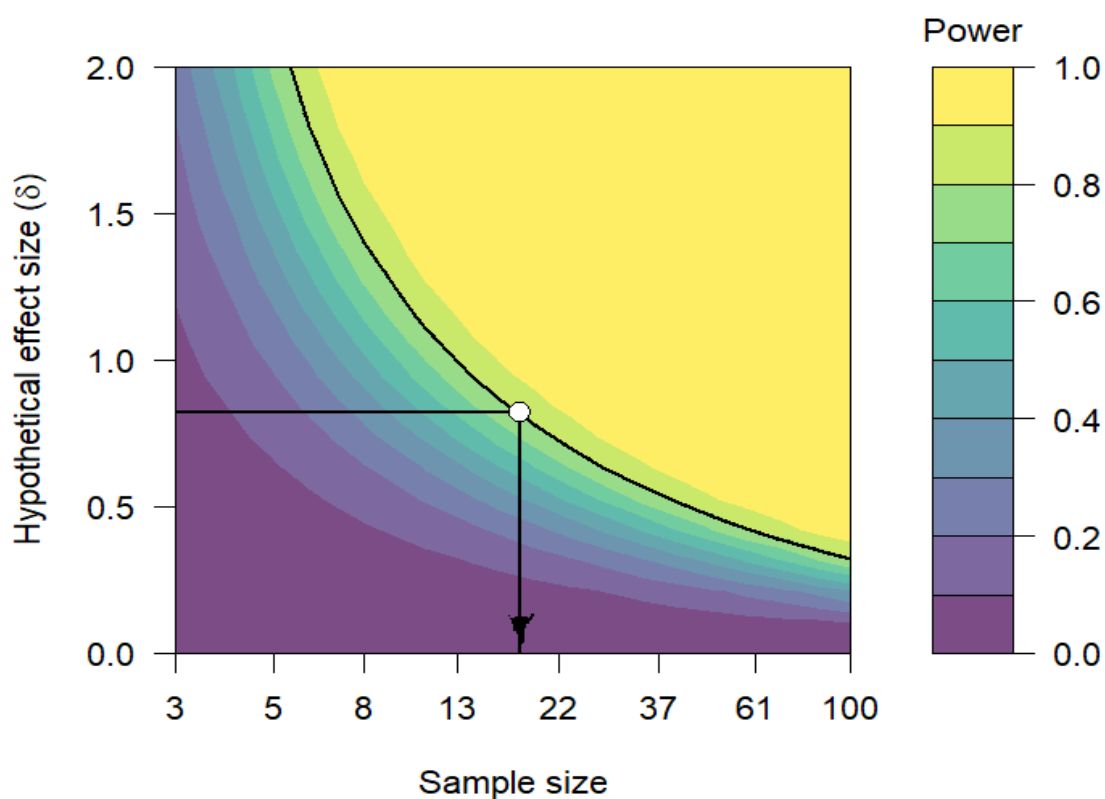


Рисунок 2 – Контур мощности

Сплошная черная кривая на контурном графике демонстрирует комбинации размера выборки/размера эффекта с мощностью 0,8. Точка показывает указанный дизайн и размер эффекта.

Для достижения цели работы были обследованы более 200 человек, из которых в дальнейшем (учитывая критерии не включения и исключения из исследования) были сформированы 3 группы.

- в 1-ю клиническую группу вошли 21 человек с «преддиабетом». В данную группу были включены 21 человек с гипергликемией натощак от 6,1 и менее 6,9 моль/л, проходившие диспансерное наблюдение на базе государственного автономного учреждения здравоохранения «Клинический медицинский центр г. Читы».

- во 2-ю группу вошел 21 пациент с СД 2 типа (диагноз СД верифицировали с использованием клинико-anamнестических данных, результатов физикального, лабораторного инструментального исследований в соответствии с клиническими рекомендациями МЗ РФ «Сахарный диабет 2 типа у взрослых» (2019 г.)). Данные пациенты были госпитализированы в отделение офтальмологии ГАУЗ «Забайкальская краевая клиническая больница» с диагнозом неполная осложненная катаракта для проведения плановой операции по замене хрусталика глаза.

- в 3-ю вошли 63 человека диспансерного наблюдения с СД 2 типа и диабетической ретинопатией всех стадий, проходивших обследование в поликлиническом отделении офтальмологии ГАУЗ «Забайкальская краевая клиническая больница» и офтальмологическом отделении стационара Клиники Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Все больные с сахарным диабетом 2 типа находились на высокобелковой диете с ограничением простых углеводов и получали следующие препараты: таблетки Galvus (50 мг по 1 таб 2 р\д), Metformin (1000 мг по 1 таб 2 р\д), Vipidia (25 мг по 1 таб 1 р\д), Diabeton (60 мг по 1 таб 1 р\д).

В дальнейшем пациенты с ДР были распределены еще на три группы в зависимости от стадии ДР:

в 3А группу были включены 21 человек с непролиферативной (НПДР) стадией заболевания,

в 3В – 21 человек с препролиферативной стадией (ППДР),

в 3С – 21 пациент с пролиферативной ДР (ПДР).

Диагностику ДР проводили в соответствии с международной классификацией болезней 10 пересмотра (МКБ-10. Класс VII. Болезни глаза и его придаточного аппарата H00-H59).

Контрольная группа состояла из 41 здорового человека (средний возраст 49,4 года).

Критериями включения в исследование явились: «преддиабет», СД 2-го типа без и с наличием одного микрососудистого осложнения (ДР).

Критериями невключения явились HbA1c выше 12%, тяжелые осложнения диабета, глаукома, острый инфаркт миокарда и острый коронарный синдром, хроническая почечная и печеночная недостаточность, уровень артериального давления выше 160/100 мм рт. ст.; острое нарушение мозгового кровообращения, сердечная недостаточность, а также нарушение прозрачности сред глаза, зрелая катаракта, другие заболевания сетчатки.

Критерии исключения: прием ингибиторов глюкозо-натриевого котранспорта.

Базисом для разработки дизайна исследования был анализ современной литературы, имеющихся методологических подходов к реализации поставленных задач, а также гипотеза об участии нарушений кинуренинового пути обмена триптофана в патогенезе ДР. В работе применяли следующие методы исследования: общеклиническое обследование (офтальмологический осмотр и анализ биохимических показателей крови), позволяющее характеризовать основные клинические факторы развития осложнений при СД 2-го типа, и специальные методы.

Клинические исследования проводились на базе Клиники ФГБОУ ВО ЧГМА Минздрава России, государственного автономного учреждения здравоохранения «Клинический медицинский центр г. Читы», ГАУЗ «Забайкальская краевая клиническая больница», Государственное учреждение здравоохранения «Городская клиническая больница № 1». Специфические методики по определению содержания триптофана и его активных метаболитов, уровня маркеров воспаления, растворимых форм костимулирующих и коингибирующих молекул, молекул адгезии, матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов проводились в лаборатории клинической и экспериментальной биохимии и иммунологии НИИ Молекулярной медицины при ФГБОУ ВО ЧГМА Минздрава России.

Работа организована и проведена в соответствии с положениями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Рекомендации для врачей, занимающихся биомедицинскими исследованиями с участием людей». Исследование одобрено локальным этическим комитетом при ФГБОУ ВО ЧГМА Минздрава России (протокол № 127 от 25 апреля 2023 года). Тема запланирована и утверждена на заседании Ученого Совета ЧГМА 16 мая 2023 г., протокол №9. РК 050 (03), номер государственной регистрации 122031600255-1.

От всех участников исследования было получено добровольное информированное согласие на проводимое исследование.

2.2. Общее клиническое исследование

Общее клиническое исследование включало сбор жалоб, данных анамнеза пациентов: длительность заболевания, возраст манифестации заболевания, сопутствующие заболевания (АГ/ГБ, панкреатит, дислипидемия и др.), предшествующие показатели гликемии, сопутствующая терапия. На момент включения в исследование все хронические сопутствующие заболевания находились в состоянии стойкой ремиссии. Возраст, пол пациентов, длительность

СД, уровень гликированного гемоглобина (по данным анализа, выполненного не ранее 3 месяцев до приема) отражены в таблице 1.

Группы статистически значимо не различались по возрастному и половому составу.

Таблица 1 – Основные характеристики обследуемых групп

Группы	Возраст (Ме, 0,25; 0,75 персентиля)	Пол, М/Ж Абсолютные цифры	Длительность СД (Ме, 0,25; 0,75 персентиля)	Уровень глюкозы натощак, ммоль/л (Ме, 0,25; 0,75 персентиля)	НЬА1с, % (Ме, 0,25; 0,75 персентиля)
Контроль	48 (43,8; 54,4)	15/26	-	5,1 (4,9; 5,3)	4,6 (3,8; 4,9)
«Преддиабет» 1 группа	49 (42,1; 54,5)	11/10	-	6,6 (6,2; 6,8)	6,4 (6,0; 6,8)
СД 2 группа	54 (44,5; 67,5)	9/12	7 (4; 9)	10,9 (6,9; 11,1)	8,0 (7,4; 9,9)
СД +РП 3 группа	56 (45,8; 60,5)	27/36	9 (6; 10)	10,1 (7,2; 11,8)	9,0 (6,9; 9,8)
СД + НПДР 3А группа	55 (52,1; 58,5)	10/11	8 (6; 9)	10,3 (7,1; 11,5)	8,5 (6,8; 9,6)
СД + ППДР 3В группа	56 (46,1; 61,0)	9/12	9 (6; 10)	10,7 (6,1; 11,9)	8,9 (7,2; 9,9)
СД+ ПДР 3С группа	58 (54,1; 61,5)	8/13	9 (7; 11)	10,6 (6,1; 11,9)	8,9 (7,6; 10,1)

2.3 Методы обследования органа зрения

Офтальмологическое обследование пациента с ДР включало обязательные и дополнительные методы.

Обязательные методы	Дополнительные методы
• Определение остроты зрения (визометрия). • Измерение внутриглазного давления (тонометрия). • Биомикроскопия переднего отрезка глаза. • Офтальмоскопия при расширенном зрачке. • Исследование поля зрения (периметрия).	• УЗИ при помутнении стекловидного тела и хрусталика. • Оптическая когерентная томография (ОКТ) сетчатки.

На начальном этапе все обследуемые прошли стандартное офтальмологическое обследование, включавшее в себя оценку остроты зрения, бесконтактную тонометрию, биомикроскопию переднего отрезка глаза, офтальмоскопию глазного дна при мидриазе.

- Остроту зрения оценивали с помощью проектора знаков ССЗ-3100 (Корея) и набора стекол.

- Измерение внутреннего давления глаза проводили тонометром Маклакова массой 10,0 г; критическую частоту слияния мельканий определяли на «Периком» (Россия);

- Биомикроскопию переднего отдела – на щелевой лампе XCEL250 (США).

- Офтальмоскопию и биомикроскопию сетчатки, хрусталика, стекловидного тела определяли на щелевой лампе с помощью 3-зеркальной линзы Гольдмана Ocular Instruments Inc. (США) и бесконтактной линзы +60 - +90 D (Ocular

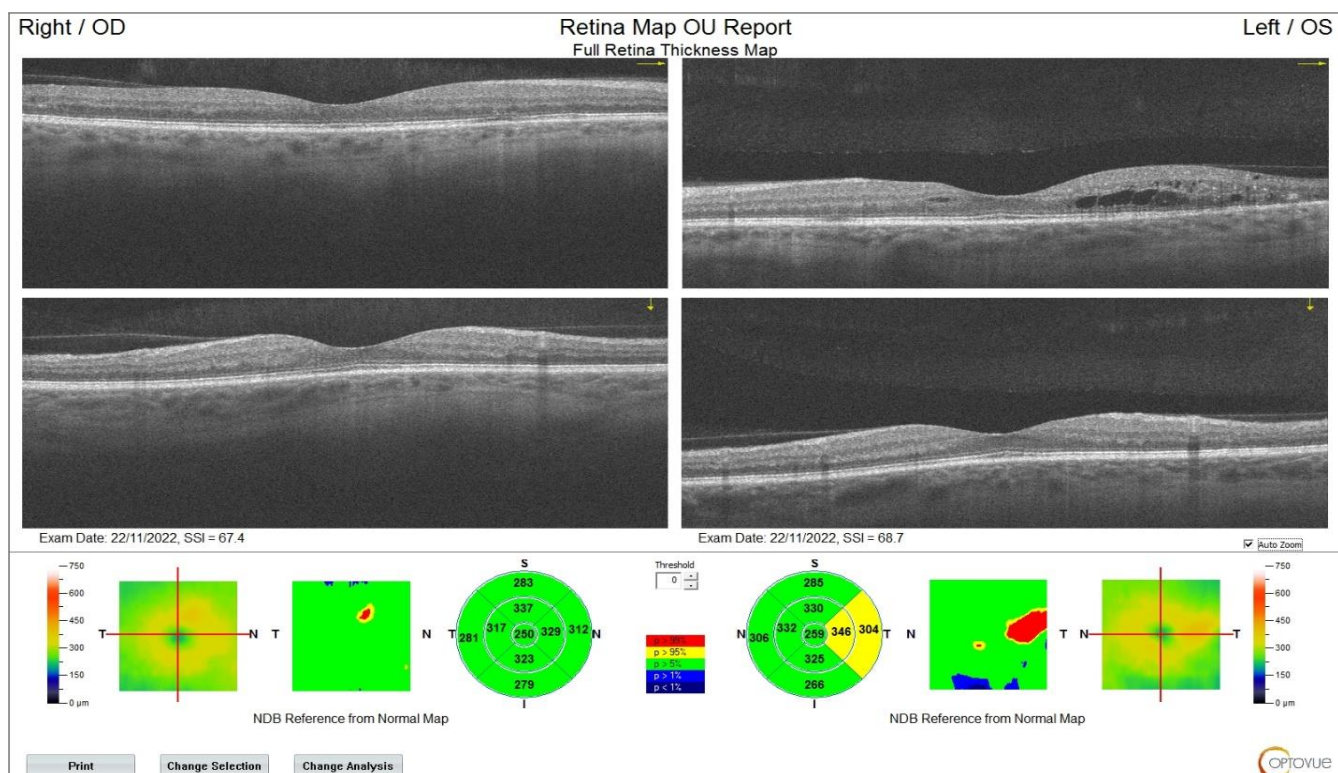
Instruments Inc., США). Перед проведением офтальмоскопии выполняли однократную инстилляцию 1,0% раствора тропикамида в форме глазных капель.

В дальнейшем, пациентам, включенным в обследование, проводили оптическую когерентную томографию сетчатки глаза, на томографе RTVue-100 (OptoVue, США).

Оптическая когерентная томография

Для оценки структурных изменений сетчатки проводили ОКТ макулярной зоны с помощью ОКТ-томографа RTVue-100 (OptoVue, США). В основе данной модели лежит технология частотно-модулируемого источника (Swept Source) с длиной волны 1050 нм, что обеспечивает проникновение лазерного луча в более глубокие ткани глаза и, как следствие, четкую визуализацию сетчатки и хориоидеи.

Были выбраны протоколы Angio Macula 3×3 мм и 6×6 мм (256 сканов×225 сканов). Полученные изображения были в дальнейшем экспортированы и



обработаны в программе ImageJ (v.1.8.0, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) [38] (рисунок 3-4)

Рисунок 3 – Оптическая когерентная томография глаз больного сахарным диабетом 2 типа осложненного неproлиферативной ангиоретинопатией обоих глаз.

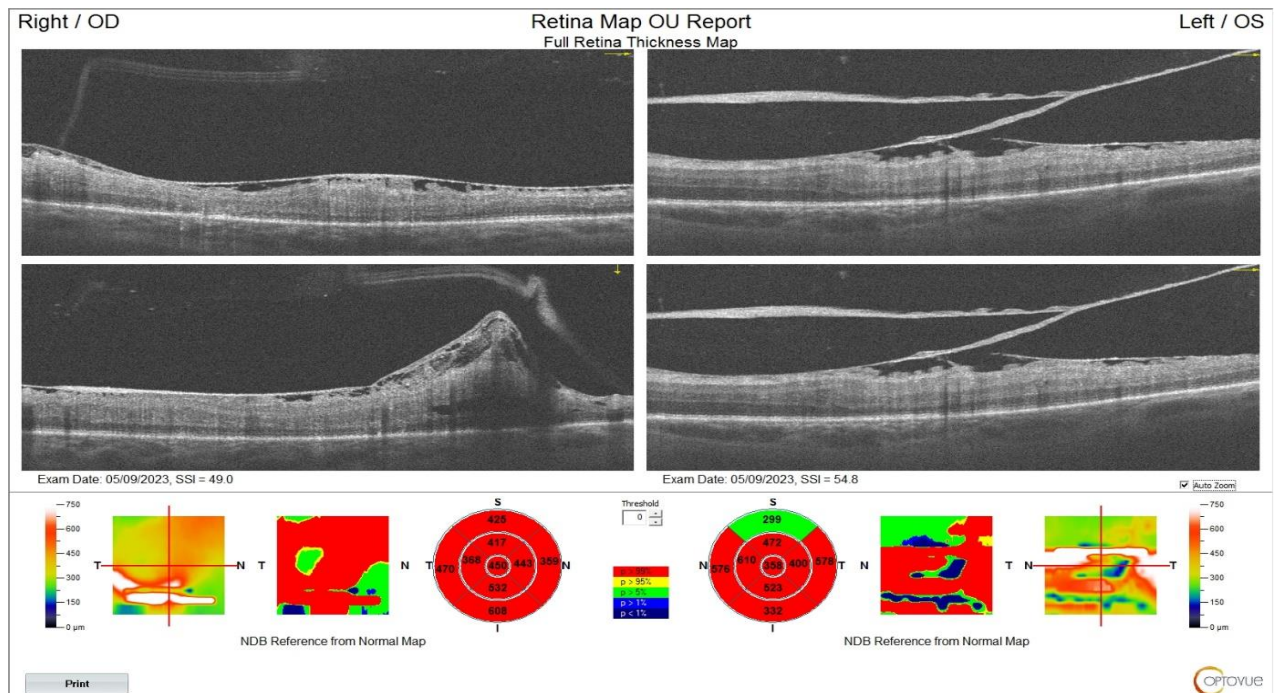


Рисунок 4 – Оптическая когерентная томограмма глаз больного сахарным диабетом 2 типа, осложненного пролиферативной ангиоретинопатией обоих глаз.

Встроенное программное обеспечение томографа (программа IMAGEnet) позволяет строить карты общей толщины сетчатки, внутренних слоев сетчатки (CHVC, СГК+ и СГК++) и толщины хориоидеи. В макулярной области измеряли относительную плотность сосудистого русла сетчатки (Vessel Density, VD, %) – отношение площади, занимаемой сосудами в исследуемой зоне, к общей площади этой зоны. Измерения проводили в фовеальной зоне (в окружности диаметром 1 мм), в парафовеа — в зоне между границей фовеа и окружностью диаметром 3 мм вокруг центра, а также перифовеа – от границы парафовеа до окружности диаметром 6 мм. Общую толщину сетчатки и ее отдельных слоев оценивали в соответствии с сеткой ETDRS. Полученные результаты отражены в таблице 2.

Таблица 2 – Значения толщины сетчатки, относительная плотность сосудистого русла, поверхностная относительную плотность сосудистого русла, глубокая относительная плотность сосудистого русла сетчатки в исследуемых зонах

Исследуемая зона	Группы					
	Контроль	«Пред диабет» 1 группа	СД 2 группа	НПДР 3А группа	ППДР 3В группа	ПДР 3С группа
	Средняя толщина сетчатки, микроны					
фовеа	215	252	275	279	200	248
парафовеа	291	313	325	312	290	312
перифовеа	289	278	290	285	276	269
	относительная плотность сосудистого русла сетчатки					
фовеа	212	252	283	276	199	241
парафовеа	302	317	345	327	300	316
пертифовеа	281	264	296	283	275	264
	поверхностная относительную плотность сосудистого русла сетчатки					
фовеа	18	24	19.5	18	17	23
парафовеа	50	50	48	46	49	49
пертифовеа	51	48	47	42	49	47
	глубокая относительная плотность сосудистого русла сетчатки					
фовеа	47	52	59	59	45	48
парафовеа	101	98	114	111	100	97
пертифовеа	105	83	112	100	98	82

Для объективизации процесса развития диабетической ретинопатии нами использовалась «Шкала оценки изменений глазного дна (баллы)». Где, согласно международной классификации ETDRS (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study, 1991), степень тяжести ДР можно определять в баллах от 0 до 90 (таблица 3).

Таблица 3 – Шкала оценки глазного дна

Уровень по ETDRS	Стадия ретинопатии	Офтальмоскопическая картина
Непролиферативная диабетическая ретинопатия		
10	нет ретинопатии	Микроаневризмы и другие изменения отсутствуют. Может быть расширение венул сетчатки.
14–35	начальная	Незначительное количество микроаневризм и микрогеморрагий. Могут выявляться «твердые» и «мягкие» экссудаты.
43	умеренная	Один из признаков: • умеренное количество микроаневризм и геморрагий; • умеренно выраженные интравитреальные микрососудистые аномалии (ИРМА) в одном квадранте.
47	выраженная	Оба признака 43 уровня или один из признаков: • множественные микроаневризмы и микрогеморрагии в двух-трех квадрантах; • множественные зоны ИРМА в одном-трех квадрантах; • четкообразность венул хотя бы в одном квадранте.

Продолжение таблицы 3

Уровень по ETDRS	Стадия ретинопатии	Офтальмоскопическая картина
53	тяжелая	Сочетание двух-трех признаков 47 уровня или один из признаков: - множественные микроаневризмы и микрогеморрагии во всех квадрантах; - выраженные ИРМА хотя бы в одном квадранте; - четкообразность венул в двух и более квадрантах.
Пролиферативная диабетическая ретинопатия		
61	начальная	Один из признаков: - фиброз на диске зрительного нерва (ДЗН) или сетчатке без неоваскуляризации; - неоваскуляризация сетчатки меньше половины площади ДЗН.
65	выраженная	Один из признаков: - неоваскуляризация сетчатки более половины площади ДЗН; - неоваскуляризация ДЗН менее трети его площади; - неоваскуляризация сетчатки менее половины площади ДЗН без неоваскуляризации ДЗН, но при наличии преретинальной или витреальной геморрагии площадью менее 1,5 ДЗН.

Продолжение таблицы 3

Уровень по ETDRS	Стадия ретинопатии	Офтальмоскопическая картина
71	тяжелая (высокого риска 1)	Один из признаков: • преретинальная или витреальная геморрагия площадью более 1,5 ДЗН; • преретинальная или витреальная геморрагия площадью менее 1,5 ДЗН в сочетании с неоваскуляризацией сетчатки более половины площади ДЗН; • преретинальная или витреальная геморрагия площадью менее 1,5 ДЗН в сочетании с неоваскуляризацией ДЗН менее трети его площади; • неоваскуляризация ДЗН более трети его площади.
75	тяжелая (высокого риска 2)	Неоваскуляризация ДЗН более трети его площади и преретинальная или витреальная геморрагия площадью более 1,5 ДЗН.
81–85	далеко зашедшая	Один и более признаков: • невозможно оценить площадь неоваскуляризации; • глазное дно офтальмоскопируется частично или не офтальмоскопируется в заднем полюсе; • преретинальная или витреальная геморрагия в заднем полюсе площадью более 4 ДЗН; • ретиношизис в макулярной зоне.
90	градация невозможна	Глазное дно не офтальмоскопируется даже фрагментарно.

Кроме этого, данная классификация позволяет определить степень тяжести ДР по шкале DRSS (DR severity scale – DRSS).

Для оценки используется шаг в 2–3 единицы. Так, улучшение на 2 шага – это клинически значимый показатель. Изменение ≥ 2 шага значительно повышает вероятность развития тяжелых стадий ПДР (рисунок 5).

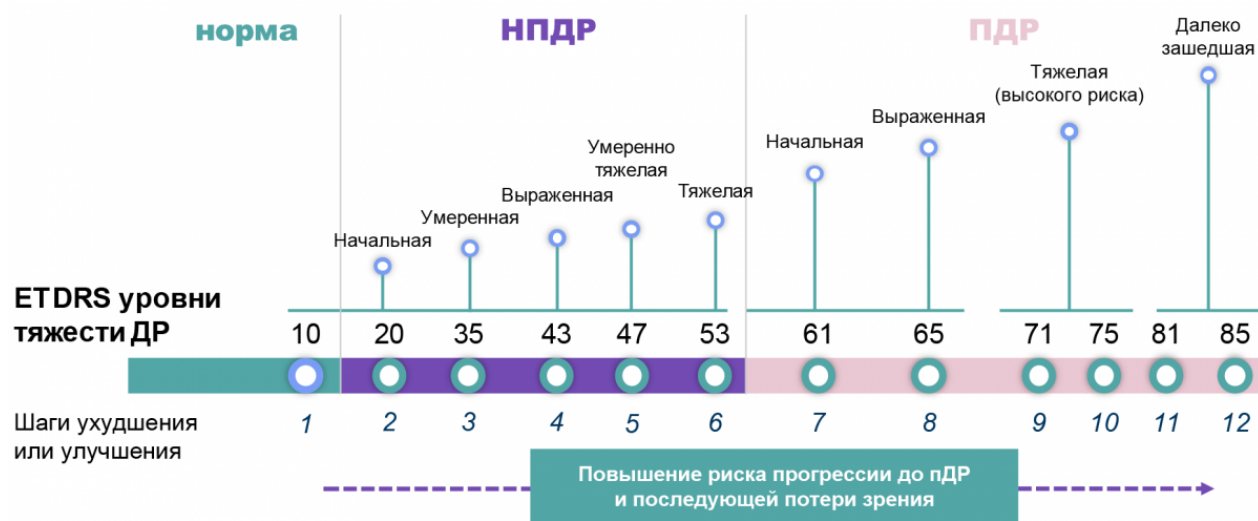


Рисунок 5 – Определение степени тяжести ДР по классификации ETDRS [2].

В нашем исследовании достоверных изменений средних значений толщины и объема сетчатки в макулярной зоне, по отношению к данным контрольной группы у пациентов с «преддиабетом», больных сахарным диабетом, а также у пациентов с единичными микроаневризмами и округлыми кровоизлияниями в ткань сетчатки, т. е. с начальной непролиферативной диабетической ретинопатией обнаружено не было. Следует отметить, что средние значения толщины сетчатки в различных частях макулярной зоны как у больных, не имеющих офтальмоскопических признаков диабетической ретинопатии, так и имеющих ее начальные проявления, были идентичны. Число баллов по шкале ETDRS у обследуемых 1, 2 и 3 групп было примерно идентично и составило 7,3 (6,5; 9,3) балла. У пациентов с непролиферативной ДР – 33,3 (19,2; 38,7), препролиферативной ДР – 57,3 (49,4; 58,7), пролиферативной ДР – 78,6 (67,4; 85,3).

2.4. Лабораторные методы исследования

У всех участников забирали кровь утром натощак в вакутейнеры с активатором свертывания и с ЭДТА. Методом центрифугирования получали сыворотку и плазму крови.

Уровень гликированного гемоглобина (HbA1c) определяли на биохимическом анализаторе Beckman Coulter AU 480 (США).

Метод исследования триптофана и его метаболитов

Содержание TRP, кинуренинов ((кинуренина (KYN), 3-гидроксикинуренина (3-HKYN), кинуреновой кислоты (KYNA)) и уровень L-5-гидрокситриптофана (5HTrp) определяли в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрической и спектрофотометрической детекцией. В работе был использован хроматограф Shimadzu LC-20 (Япония).

Методика определения состояла в следующем:

Реактивы. Стандарты: L-триптофан (TRP), L-кинуренин (KYN), кинуреновая кислота (KYNA), 3-гидроксикинуренин (3-HKYN) (Fluka, Германия), L-5-гидрокситриптофан (5HTrp) (Sigma, США). Муравьиная кислота (ROTIPURAN[®], Германия), уксусная кислота (Fisher Scientific, Австрия), HCl (ICN, США), ацетата аммония (ICN, США), метанол (Merk, Германия), ацетонитрил (Panreac, Испания).

Аппаратура и оборудование. Высокоэффективный жидкостный хроматограф LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) имеющий насос высокого давления LC-20AD (с градиентным блоком низкого давления, концентрационная точность создания градиента $\pm 0.5\%$), спектрофотометрический детектор с диодной матрицей SPD-M20A, флуориметрический детектор RF-10AXL, автодозатор SIL-20A с прямым механизмом дозирования (дозируемые объемы от 0,1 до 100 мкл), использована компьютерная программа для управления

хроматографом и анализа хроматограмм «LabSolutions» версия 5.96 SP1 (Shimadzu, Япония).

Колонка Synergi 4 μ Fusion-RP 150x4.6 мм, 4 мкм, около 25700 ТТ, с предколонкой C18 (4,0 мм $\times$ 4 мм $\times$ 4 мкм) (Phenomenex, США).

Ультрацентрифуга SIGMA 3K30 (Sigma, США), вортекс (ИКА, Германия).

Приготовление реактивов. Базовые стандарты готовили на 0.01М HCl в концентрации 1 мг/мл и хранили в холодильнике при 4⁰ С. Срок годности 6 месяцев. Стандартные растворы аналитов готовили в различных концентрациях: 1, 5, 10, 100 нг/мл.

Подвижная фаза для ЖХ-анализа состояла из двух растворов: А (0,1% муравьиной кислоты в воде) и В (ацетонитрил). Программа градиента подвижной фазы начиналась с 1% В, с 5,00 мин 5% В, с 10,00 мин 10% В, с 15,00 мин 80% В до 20 мин, затем 1% В с 20,01 мин и удерживалась в течение 10 мин. Колонку уравнивали в течение 10 мин.

LOD и LOQ были оценены расчетами на основе отношения сигнал/шум. Определение отношения сигнал/шум выполняется путем сравнения измеренных сигналов от образцов с известными низкими концентрациями аналита с сигналами холостой пробы и установления минимальной концентрации, при которой аналит может быть надежно обнаружен, или количественной концентрации, при которой аналит может быть определен достоверно количественно. Типичное отношение сигнал/шум составляет 3:1 для LOD и 10:1 LOQ.

Ход выполнения экстракции триптофана и его метаболитов. Образцы плазмы крови перед анализом очищали методом твердофазной экстракции (ТФЭ) с использованием картриджей SPE C18(2) (500 мг/3 мл, Phenomenex, США). Картриджи для твердофазной экстракции вставляли в манифолд на 12 позиций (Phenomenex, США) и кондиционировали 3 x 3 мл метанола, а затем 3 x 3 мл подкисленной воды до pH 3,5 уксусной кислотой. Перед загрузкой образцы плазмы разбавляли путем добавления 500 мкл образца к 800 мкл подкисленной воды (pH 3,5). После встряхивания и центрифугирования в течение 5 мин при

14000 g супернатант загружали на картридж для ТФЭ и промывали 1 мл 5% (об./об.) раствора метанола. Метаболиты элюировали 5×1 мл 0,1 М ацетата аммония в метаноле. Картриджные пробирки для ТФЭ центрифугировали после каждого этапа загрузки растворителя или образца при 1000 g в течение 30 с при 4°C. Собранный элюат сушили в течение 2 ч до абсолютной сухости в слабом токе азота (N 2 99,999%) и хранили при -20°C.

Стандарты

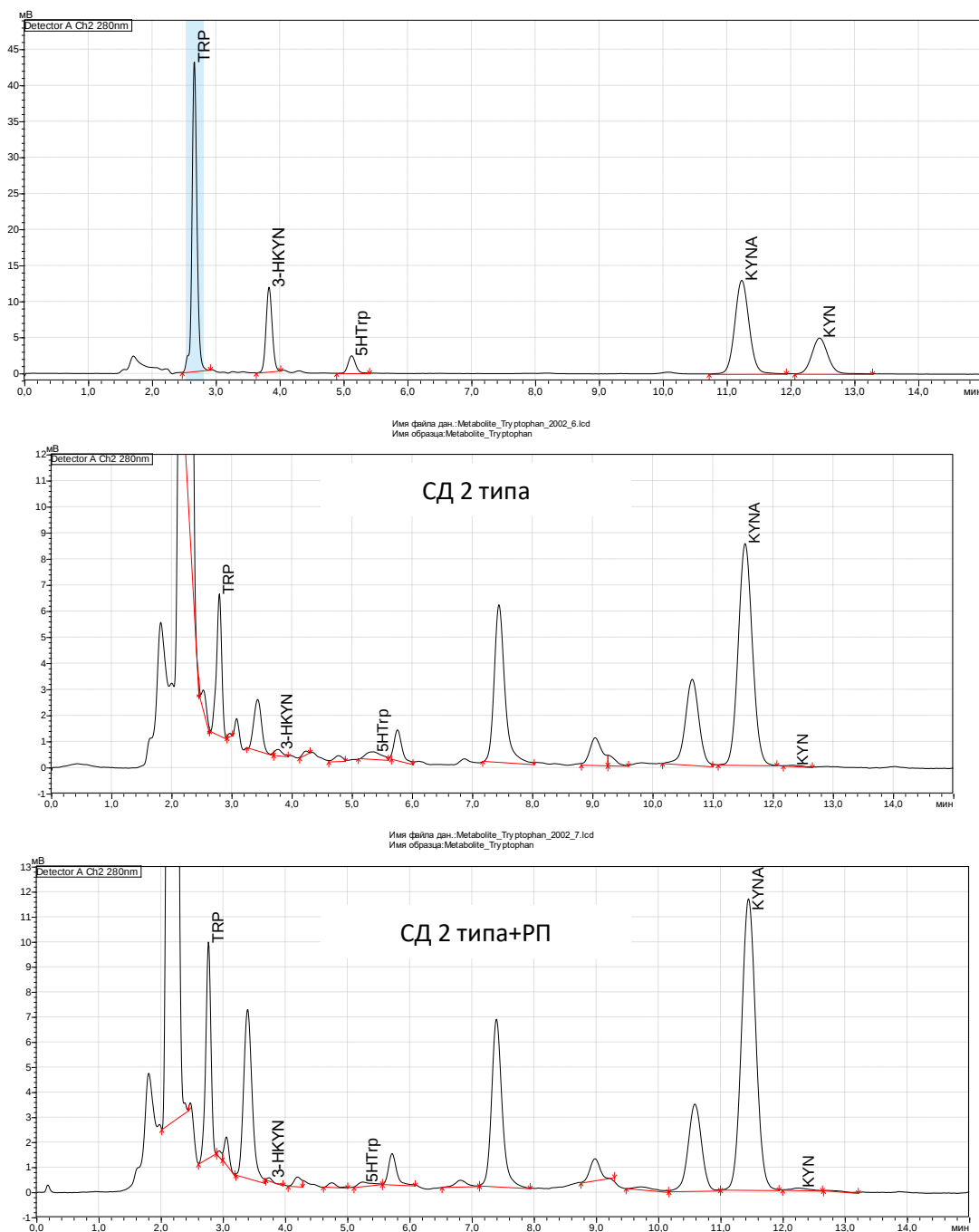


Рисунок 6 – Типовые хроматограммы стандартов и экстракт биологических образцов

Очищенные и высушенные образцы растворяли в 100 мкл 0,1% муравьиной кислоты в метаноле, центрифугировали при 21000 g и надосадочную жидкость переносили в стеклянные флаконы с микровкладышами, обжаты предварительно перфорированными крышками. Затем 50 мкл надосадочной жидкости экстракта вводили в колонку и записывали хроматограмму (рисунок 6).

Метод исследования уровня маркеров воспаления, растворимых форм костимулирующих и коингибирующих молекул, молекул адгезии, матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов

У всех лиц, вошедших в исследуемые группы в сыворотке крови определяли концентрацию растворимых мембранных белков (белка суперсемейства иммуноглобулинов, продукта гена CD86 (B7.2 (CD86)), белка суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (4-1BB), Галектина-9 (Galectin-9), коингибирующих рецепторов (цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (CTLA-4), белка запрограммированной смерти клеток 1 (PD-1), его лиганда (PD-L1), белка Т клеточного иммуноглобулина и муцинового домена-3 (Tim-3), белка гена активации лимфоцитов-3 (LAG-3)), сывороточного амилоидного белка А (SAA), липокалина, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов (NGAL), кальпротектина (MRP8/14) молекул межклеточной адгезии 1 (ICAM-1) и (VCAM-1) и концентрацию ферментов матричных металлопротеиназ 2 и 9 (MMP-2, MMP-9), а также миелопероксидазы (MPO) и ингибитора цистеиновых протеаз цистатина С (Cys-C) используя наборы для мультиплексного анализа Human Immune Checkpoint Panel 1 и Human Vascular Inflammation Panel 1 фирмы Biolegend (США).

Все этапы исследования выполнялись согласно инструкции наборов (https://www.biolegend.com/Files/Images/media_assets/pro_detail/datasheets/750000504_HU_Immune_Checkpoint_Panel_1_Manual_R01.pdf и <https://www.biolegend.com/en-us/legendplex>).

Результаты оценивали с помощью проточного цитофлуориметра CytoFlex (США). Данный анализ обеспечивает более высокую чувствительность обнаружения и более широкий динамический диапазон, чем традиционные методы ИФА (ELISA).

2.5. Статистические методы обработки данных

Анализ полученных результатов проводили с помощью программы Jamovi версия 2.3.

Перед началом анализа вариационные ряды тестировались на нормальность при помощи критерия Шапиро-Уилка. Учитывая распределение признаков, отличное от нормального, полученные данные представлены в виде медианы, первого и третьего квартилей: Me [Q₁; Q₃]. Сравнение количественных признаков выполняли с применением критерия Краскела-Уоллиса (H). При наличии статистически значимых различий с учетом поправки Бонферрони, проводилось попарное сравнение с помощью критерия Манна-Уитни (U). Для определения корреляционных связей между исследуемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (ρ). Силу связи между исследуемыми параметрами определяли по шкале Чеддока. Номинальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение номинальных данных исследования проводилось при помощи критерия χ^2 Пирсона, позволяющего оценить значимость различий между фактическим количеством исходов или качественных характеристик выборки, попадающих в каждую категорию, и теоретическим количеством, которое можно ожидать в изучаемых группах при справедливости нулевой гипотезы. Во всех случаях $p < 0,05$ считали статистически значимым. Для определения силы связи между фактором риска и исходом использовался критерий Крамера (V).

Для анализа факторов риска развития диабетической ретинопатии у больных сахарным диабетом 2 типа мы использовали математическую модель бинарной логистической регрессии, позволяющую описать взаимосвязи в

многомерном пространстве и построить статистическую модель прогноза вероятности развития осложнений [34, 35]. Для оценки прогностической способности модели использован показатель площади под кривой (AUC – Area Under Curve). Статистически достоверными считались данные при количественной характеристике случайностей (p-значение) не более 0,05.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для предупреждения развития ДР с возникновением катастрофических осложнений требуется глубокое понимание патогенеза заболевания для возможности воздействия на различные патогенетические звенья [13]. В связи с этим активно обсуждаются вопросы поиска новых факторов, участвующих в развитии ДР, поиска ранних специфичных биохимических маркеров эндотелиальной дисфункции, развития оксидативного стресса и воспаления, что особенно важно для диагностики доклинической стадии заболевания, а также для профилактики поражения сетчатки у пациентов с СД [137, 37; 40].

3.1. Изменения уровней маркеров воспаления в крови при «преддиабете», сахарном диабете 2 типа и при диабетической ретинопатии

Воспаление служит физиологической защитной реакцией организма, возникающей в ответ на повреждение в том числе различными биологическими и химическими раздражителями. В связи с этим воспаление является неизменным патогенетическим компонентом многих хронических заболеваний, в том числе и СД. Кроме того, воспаление может быть связующим звеном между метаболическими нарушениями при СД и его сосудистыми осложнениями. В качестве маркеров воспаления в первую очередь выступают различные белки [24].

В нашем исследовании, при рассмотрении уровней SAA, NGAL, MRP8/14 и MPO в сыворотке крови у лиц с «преддиабетом», СД и ДР оказалось (таблица 4), что уже при начальных нарушениях углеводного обмена (у лиц первой группы) относительно контрольной группы были повышены концентрации NGAL,

MRP8/14 и МРО на 54,4% ($p<0,001$), 110,2% ($p<0,001$) и на 140,0% ($p<0,001$) соответственно.

У больных СД уровни белков NGAL, MRP8/14 и МРО были выше контроля уже на 188,2% ($p<0,001$), 171,5% ($p<0,001$) и на 431,1% ($p<0,001$) соответственно. Эти же показатели были достоверно выше, чем у лиц с «преддиабетом»: NGAL на 86,7% ($p<0,001$), MRP8/14 – на 29,2% ($p=0,049$) и МРО – на 121,3% ($p=0,004$). Кроме того, у пациентов с СД значения SAA превышали контроль на 46,4% ($p=0,002$).

Таблица 4 – Уровни маркеров воспаления в сыворотке крови у лиц с «преддиабетом» и СД (Ме (25-й; 75-й))

Показатели/ Группы	Контроль (n=41)	«Преддиабет» (n=21) 1 группа	СД 2 типа (n=21) 2 группа	СД 2 типа+РП (n=63) 3 группа	Тестовая статистика, Df=3
SAA (нг/мл)	181 (156; 186)	172 (124; 182)	265* (222; 285)	1902* (498; 2287) P2<0,001 P3=0,007	H=39,37 P=0,008
NGAL (нг/мл)	68 (58,3; 81,3)	105* (102; 112)	196* (162; 247) P1=0,006	253* (220; 382) P2<0,001	H=50,80 p<0,001
MRP8/14 (нг/мл)	68,5 (38,5; 79,0)	144* (139; 158)	186* (155; 267) P1=0,049	1465* (1221; 1869) P2<0,001 P3<0,001	H=54,95 p<0,001
МРО (нг/мл)	45 (32,5; 74,5)	108* (98; 123)	239* (191; 322) P1=0,004	742* (539; 797) P2<0,001 P3=0,001	H=55,86 p<0,001

Примечание:

* - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой контроля;

p₁ – достоверность различий между первой и второй группой;

p₂ – достоверность различий между первой и третьей группой;

p₃ – достоверность различий между второй и третьей группой;

попарное сравнение между группами проведено с помощью критерия Двасса-Стила-Кричлоу-Флигнера.

В группе больных СД с ДР все показатели были увеличены и превышали контрольные значения: SAA – в 10,5 раз ($p<0,001$), NGAL – в 3,7 раза ($p<0,001$), MRP8/14 – в 21,4 раза ($p<0,001$), и МРО – в 16,5 раза ($p<0,001$). Концентрации всех данных маркеров воспаления при ДР также были статистически значимо выше, чем в группе лиц с «преддиабетом»: SAA – в 11,1 раз ($p<0,001$), NGAL – в

2,4 раза ($p<0,001$), MRP8/14 – в 10,2 раза ($p<0,001$), и МРО – в 6,9 раза ($p<0,001$). Кроме того, при ДР уровни белков SAA, MRP8/14 и МРО были выше, чем у лиц с СД без осложнений на 617,7 % ($p<0,001$), 687,6 % ($p<0,001$) и 210,5 % ($p=0,001$) соответственно.

При анализе маркеров воспаления в сыворотке крови у лиц с разными стадиями диабетической ретинопатии оказалось, что начиная с непролиферативной стадии, цифры SAA, MRP8/14 и МРО превышали таковые в группе сравнения (таблица 5) на 623,0 % ($p<0,001$), 615,0 % ($p<0,001$) и 137,2 % ($p=0,002$) соответственно.

В препролиферативную стадию уровень маркеров практически не отличался от значений в четвертой группе.

Таблица 5 – Уровень маркеров воспаления в сыворотке крови у лиц с СД и различной стадией ДР (Ме (25-й; 75-й))

Показатели/ Группы	СД 2 типа (группа сравнения) (n=21)	Непролиферативная ДР (3А группа) (n=21)	Препролиферативная ДР (3В группа) (n=21)	Пролиферативная ДР (3С группа) (n=21)	Тестовая статистика, Df=3
SAA (нг/мл)	265 (222; 285)	1916* (542; 2138)	1902* (1813; 2056)	1252* (1052; 2290)	H=11,93 P=0,008
NGAL (нг/мл)	196 (162; 247)	230 (176; 251)	274 (223; 410)	365* (321; 427) P2=0,001	H=17,79 p<0,001
MRP8/14 (нг/мл)	186 (155; 267)	1330* (566; 1698)	1823* (1443; 1956)	1490* (1289; 1757)	H=31,40 p<0,001
МРО (нг/мл)	239 (191; 322)	567* (519; 692)	742* (670; 763)	1047* (975; 1174) P2=0,001 P3=0,013	H=24,95 p<0,001

Примечание:

* - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой сравнения;

p₁ – достоверность различий между четвертой и пятой группой;

p₂ – достоверность различий между четвертой и шестой группой;

p₃ – достоверность различий между пятой и шестой группой;

попарное сравнение между группами проведено с помощью критерия Двасса-Стила-Кричлоу-Флигнера.

В пролиферативной стадии ДР концентрация NGAL увеличилась и уже была выше, чем в группе сравнения на 86,2% ($p<0,001$) и выше, чем в группе с начальной стадией ДР – на 58,7% ($p=0,001$). В 3С группе возросли значения и

фермента МРО и уже составили 184,7% ($p=0,001$) от таковых 3А группы, и 141,1% ($p=0,013$) – от значений 3В группы

Таким образом, при исследовании уровней маркеров воспаления (SAA, NGAL, MRP8/14, МРО) у лиц с «преддиабетом», СД и ДР в сыворотке крови выявлена общая тенденция: повышенная концентрация относительно контроля при «преддиабете» NGAL, MRP8/14, МРО; еще более высокие их цифры при СД в том числе и белка SAA; максимальный уровень всех параметров при ДР (начиная с непролиферативной стадии для SAA, MRP8/14 и МРО, с пролиферативной – для NGAL).

3.2. Изменения содержания костимулирующих и коингибирующих молекул при «преддиабете», сахарном диабете 2 типа и при диабетической ретинопатии

Рядом исследований установлено, что диабетическая ретинопатия сопровождается нарушением клеточного и гуморального иммунитета с изменением метаболизма лимфоцитов и фагоцитов, развитием аутоиммунных и иммунокомплексных реакций к аутоантигенам глаза [14]. К изменениям активности иммунитета приводит локальная воспалительная реакция, вызванная повреждением плазматических мембран клеток и внутриклеточных структур, и запускающая реакции врожденного иммунитета, ассоциированные с DAMP (damage-associated molecular patterns). Развитие этих реакций протекает с участием клеток микроглии и в конечном итоге приводит к гибели клеток и усилению локальных воспалительных реакций [54, 55].

Дифференцировка и протективные свойства антиген-специфических Т-клеток регулируются как позитивными, так и негативными сигналами. Согласно современным представлениям, первый сигнал – это распознавание антигенного пептида, представленного главным комплексом тканевой совместимости (major histocompatibility complex: МНС) на поверхности антигенпрезентирующей клетки (antigen presenting cells: APC) Вторым необходимым сигналом является

связывание костимулирующих молекул и их лигандов, экспрессированных на APC и Т-лимфоцитах [32, 33; 54, 55]. Относительно недавно были обнаружены коингибирующие молекулы, позволяющие регулировать интенсивность и продолжительность иммунного ответа [54, 55]. Костимулирующие и коингибирующие молекулы, являющиеся рецепторами, экспрессируемыми на иммунных клетках, называют контрольными точками (checkpoint) иммунитета.

В группах с «преддиабетом», СД без осложнений и СД с ДР значения костимулирующих молекул В7.2 и 4-1ВВ были существенно больше, чем в контроле (таблица 6). У лиц с «преддиабетом» выше указанные показатели составили 180,1% ($p<0,001$) и 223,0% ($p<0,001$) соответственно от контроля.

Таблица 6 – Уровни растворимых костимулирующих молекул в сыворотке крови у лиц с «преддиабетом» и СД (Ме (25-й; 75-й))

Показатели/ Группы	Контроль (n=41)	«Преддиабет» (1 группа) (n=21)	СД 2 типа (2 группа) (n=21)	СД 2 типа+РП (3 группа) (n=63)	Тестовая статистика, Df=2
В7.2 (CD86) (пг/мл)	21,10 (16,51; 26,71)	38,0* (34,92; 40,53)	37,20* (34,81; 40,10)	53,5* (38,1; 77,9) P3=0,03	H=37,57 p<0,001
4-1ВВ (пг/мл)	3, 83 (1,19; 4,81)	8,54* (7,82; 9,00)	8,75* (7,94; 9,55)	16,30* (13,70;21,40) P2<0,001 P3<0,001	H=57,06 p<0,001

Примечание:

* - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой контроля;

p₁ – достоверность различий между первой и второй группой;

p₂ – достоверность различий между первой и третьей группой;

p₃ – достоверность различий между второй и третьей группой;

попарное сравнение между группами проведено с помощью критерия Двасса-Стила-Кричлоу-Флигнера.

В группе больных СД концентрации белков В7.2 и 4-1ВВ отличались от контрольных практически на те же проценты и составили от них: 176,3% ($p<0,001$) и 228,5% ($p<0,001$) соответственно. В группе лиц с диабетической ретинопатией уровень костимулирующих молекул был еще больше и составил от контроля 253,6% ($p<0,001$) для В7.2 и 425,6% ($p<0,001$) – для 4-1ВВ. При этом у лиц с ДР концентрация В7.2 (CD86) была статистически значимо выше, чем у лиц с СД без осложнений на 43,9% ($p=0,03$). Уровень 4-1ВВ в третьей группе (СД и

ДР) превышал таковой как у лиц с «преддиабетом», так и больных с СД без осложнений практически в 2 раза ($p < 0,001$.)

Сравнение значений костимулирующих молекул у пациентов с различными стадиями ДР (таблица 7) с таковыми у лиц с СД без осложнений показало, что в непролиферативную стадию заболевания были повышены лишь концентрации 4-1ВВ на 122,9% ($p < 0,001$). То же самое наблюдалось в препролиферативной стадии заболевания: уровень 4-1ВВ был выше, чем в группе лиц с СД на 86,3% ($p < 0,001$). В пролиферативной стадии ДР значения как 4-1ВВ на 45,1% ($p < 0,001$), так и В 7.2 – на 50,0% ($p = 0,004$) превышали таковые группы сравнения.

Таблица 7 – Уровни растворимых костимулирующих молекул в в сыворотке крови у лиц с СД и различной стадией ДР (Ме (25-й; 75-й))

Показатели/ Группы	СД 2 типа (группа сравнения) (n=21)	Непролиферат ивная ДР (3А группа) (n=21)	Препролиферат ивная ДР (3В группа) (n=21)	Пролифератив ная ДР (3С группа) (n=21)	Тестовая статистика, Df=3
В7.2 (CD86) (пг/мл)	37,20 (34,81; 40,10)	44,81 (37,41; 84,82)	54,42 (28,80; 71,02)	55,81* (51,61; 68,11)	H=5,62 P=0,132
4-1ВВ (пг/мл)	8,75 (7,94; 9,55)	19,50* (14,00; 22,40)	16,30* (14,92; 23,48)	12,70* (11,59; 50,79)	H=22,02 p<0,001

Примечание:

* - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой сравнения;

p_1 – достоверность различий между четвертой и пятой группой;

p_2 – достоверность различий между четвертой и шестой группой;

p_3 – достоверность различий между пятой и шестой группой;

попарное сравнение между группами проведено с помощью критерия Двасса-Стила-Кричлоу-Флигнера.

Таким образом полученные результаты продемонстрировали рост уровня растворимых костимулирующих молекул в сыворотке крови у лиц уже с «преддиабетом», практически такой же, как и у пациентов с СД. При СД с развившейся ДР концентрации данных молекул еще более увеличены, особенно в пролиферативной стадии заболевания.

Дальнейший анализ полученных результатов растворимых коингибирующих молекул и их рецепторов в группах лиц с «преддиабетом», СД

без осложнений и с ДР показал, что концентрации и этих молекул увеличивались относительно контроля (таблица 8).

Таблица 8 – Уровни растворимых коингибирующих молекул и их рецепторов в сыворотке крови у лиц с «преддиабетом» и СД (Ме (25-й; 75-й))

Показатели/ Группы	Контроль (n=41)	«Преддиабет» (1 группа) (n=21)	СД 2 типа (2 группа) (n=21)	СД 2 типа+РП (3 группа) (n=63)	Тестовая статистика, Df=3
CTLA-4 (пг/мл)	3,8 (3,67; 5,25)	9,56* (8,26; 10,40)	12,3* (11,70; 19,0) P1=0,011	31,10* (25,60; 38,00) P2<0,001 P3<0,001	H=53,74 p<0,001
LAG-3 (пг/мл)	2,0 (1,88; 2,15)	2,31* (2,28; 2,36)	12,80* (12,30; 14,50) P1=0,001	46,50* (40,90; 47,3) P2<0,001 P3<0,001	H=58,60 p<0,001
Tim-3 (пг/мл)	6,17 (3,98; 8,25)	158* (456; 488)	348* (295; 550) P1=0,006	730* (634; 927) P2<0,001 P3=0,004	H=54,81 p<0,001
PD-1 (пг/мл)	5,46 (5,28; 5,68)	10,40* (9,66; 12,4)	14,77* (13,4; 15,1)	25,50* (22,0; 30,4) P2<0,001 P3<0,001	H=56,76 P<0,001
PD-L1 (пг/мл)	3,50 (2,54; 5,28)	14,01* (12,9; 14,1)	18,02* (17,5; 19,03) P1=0,003	25,01* (20,10; 31,10) P2<0,001 P3=0,006	H=53,11 p<0,001
Galectin-9 (пг/мл)	500 (439; 531)	735* (642; 837)	946* (843; 1024) P1=0,010	1375* (1106; 1735) P2<0,001 P3=0,001	H=57,30 p<0,001

Примечание:

* - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой контроля;

p₁ – достоверность различий между первой и второй группой;

p₂ – достоверность различий между первой и третьей группой;

p₃ – достоверность различий между второй и третьей группой;

попарное сравнение между группами проведено с помощью критерия Двасса-Стила-Кричлоу-Флигнера.

Так у лиц с «преддиабетом» в сыворотке крови отмечено увеличение CTLA-4 на 151,6% (p<0,001), LAG-3 – на 15,5% (p=0,002) и Tim-3 – в 25,6 раза (p<0,001). Зарегистрирован рост концентраций коингибирующей молекулы PD-1 – на 90,5% (p<0,001) и ее рецептора PD-L1 – на 300,3% (p<0,001). Отмечен рост значений белка Galectin-9 на 47,0% (p<0,001). Галектин-9 является β-галактозид-

связывающим лектином и тоже обладает выраженной иммунорегуляторной активностью. Основным лигандом для галектина-9 является молекула Tim-3 [9].

У пациентов с СД, включенных во вторую группу, значения CTLA-4 превышали контрольные уже на 223,7% ($p<0,001$), LAG-3 – на 540,5% ($p<0,001$), Tim-3 – в 56,4 раза ($p<0,001$), PD-1 – на 170,5% ($p<0,001$), PD-L1 – на 414,9% ($p<0,001$), Galectin-9 – на 89,2% ($p<0,001$). Такие высокие концентрации выше перечисленных молекул оказались причиной того, что между группами лиц с «преддиабетом» и с СД наблюдалась статистическая разница всех показателей за исключением PD-1. При СД уровень CTLA-4 был выше чем у лиц в 1 группе на 28,7% ($p=0,011$), LAG-3 – на 454,1% ($p=0,001$), Tim-3 – на 120,2 % ($p=0,006$), PD-L1 – на 28,6% ($p=0,003$), Galectin-9 – на 28,7% ($p=0,010$).

У больных сахарным диабетом с ДР эти же параметры еще возросли и уже превышали не только таковые контрольной и первой групп, но и таковые во второй группе. При ДР уровень CTLA-4 был увеличен относительно контроля в 8,2 раза ($p<0,001$) и был выше чем у больных СД без осложнений на 252,8% ($p<0,001$). Уровень LAG-3 был выше чем в контрольной группе в 23,3 раза ($p<0,001$) и выше чем у лиц 2 группы на 263,3% ($p<0,001$), значения Tim-3 соответственно увеличились – в 118,3 раза ($p<0,001$) относительно контроля и в 2,1 раза ($p=0,004$) относительно значений 2 группы. Концентрации PD-1 и PD-L1 превышали контрольные в 4,7 ($p<0,001$) и в 7,1 раза ($p<0,001$) соответственно, были выше чем у лиц 2 группы – на 72,6% ($p<0,001$) и на 38,8% ($p=0,006$). Цифры белка Galectin-9 превышали контрольные в 2,75 раза ($p<0,001$) и таковые у лиц с СД – на 45,3% ($p=0,001$).

Анализ этих же показателей у пациентов с различной стадией ретинопатии показал, что все они уже на непролиферативной стадии были достоверно выше, чем у больных СД без осложнений (таблица 9). В раннюю стадию ДР уровень CTLA-4 превышал таковой группы сравнения на 143,1% ($p<0,001$), значения LAG-3 были выше – на 262,5% ($p<0,001$), Tim-3 – на 116,3% ($p<0,001$), PD-1 – на 170,5% ($p<0,001$), PD-L1 – на 414,9% ($p<0,001$), Galectin-9 – на 59,2% ($p<0,001$).

Таблица 9 – Уровни растворимых коингибирующих молекул и их рецепторов в сыворотке крови у лиц с СД и различной стадией ДР
(Ме (25-й; 75-й))

Показатели/ Группы	СД 2 типа (группа сравнения) (n=21)	Непролифера- тивная ДР (3А группа) (n=21)	Препролифера- тивная ДР (3В группа) (n=21)	Пролифератив- ная ДР (3С группа) (n=21)	Тестовая статистика, Df=3
CTLA-4 (пг/мл)	12,30 (11,70; 19,0)	29,90* (24,30; 37,70)	28,40* (19,80; 36,40)	34,40* (32,30; 38,80)	H=12,76 P=0,005
LAG-3 (пг/мл)	12,80 (12,30;14,50)	46,40* (40,90; 47,30)	52,50* (50,00;63,60) p1=0,004	34,40* (41,80; 64,40)	H=26,62 P<0,001
Tim-3 (пг/мл)	348 (295; 550)	754* (667; 943)	766* (673; 927)	622 (526; 801)	H=12,55 P=0,006
PD-1 (пг/мл)	14,77 (13,4; 15,1)	30,41* (25,3; 35,2)	24,03* (22,2; 28,3)	23,14* (21,8; 25,4)	H=22,06 p<0,001
PD-L1 (пг/мл)	18,02 (17,5; 19,0)	24,33* (19,0; 29,2)	22,42* (20,20 31,3)	30,91* (25,0; 50,3)	H=14,95 P=0,002
Galectin-9 (пг/мл)	946 (843; 1024)	1506* (1025; 1681)	1212* (1034; 1735)	1387* (1064; 1711)	H=19,76 p<0,001

Примечание:

* - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой сравнения;

p₁ – достоверность различий между четвертой и пятой группой;

p₂ – достоверность различий между четвертой и шестой группой;

p₃ – достоверность различий между пятой и шестой группой;

попарное сравнение между группами проведено с помощью критерия Двассы-Стила-Кричлоу-Флигнера.

В препролиферативной стадии цифры растворимых коингибирующих молекул и их рецепторов продолжали оставаться высокими, практически не изменяясь. Исключением явились концентрации LAG-3, которые у пациентов с препролиферативной стадией были не только выше значений группы сравнения на 310,1% (p<0,001), но и выше, чем у больных с непролиферативной ДР на 13,1% (p=0,004).

В пролиферативную стадию ДР дальнейшего роста значений коингибирующих молекул в плазме крови зафиксировано не было. Более того концентрации LAG-3, хоть и оставались выше таковых группы сравнения (также

как и концентрации других параметров из таблицы 6) на 168,8% ($p < 0,001$), но уже статистически значимо не отличались от концентраций в 3А и 3В группах.

Таким образом анализ результатов также выявил рост концентраций растворимых коингибирующих молекул и их рецепторов в сыворотке крови у лиц с «преддиабетом», еще больший подъем уровня данных белков у больных СД. Максимальные значения определены при СД с ДР начиная с непролиферативной стадии. Достоверных различий между показателями (за исключением LAG-3) у лиц с разными стадиями ДР не обнаружено.

3.3. Изменения уровней маркеров дисфункции эндотелия при «преддиабете», сахарном диабете 2 типа и при диабетической ретинопатии

Матриксные металлопротеиназы и ингибитор протеаз cystatin C

По мнению ряда исследователей, не менее значимыми участниками развития ДР являются матриксные металлопротеиназы (ММР) [27; 152], представляющие собой группу цинксодержащих ферментов, которые отвечают за деградацию компонентов внеклеточного матрикса соединительной ткани, и играющие решающую роль в ремоделировании сосудов [121].

Результаты исследований матриксных металлопротеиназ и ингибитора протеаз Cystatin C в сыворотке крови у лиц с «преддиабетом» и СД (таблица 10) показали, что у лиц с «преддиабетом» содержание ММР-2 было достоверно ниже на 17,1% ($p = 0,04$), а белка cystatin C, напротив выше на 34,5% ($p = 0,02$) чем в контроле.

В группе больных СД были увеличены значения ММР-9 на 96,1% ($p < 0,001$) относительно контроля. Концентрации в крови ингибитора протеаз при диабете превышали не только контрольные на 75,9% ($p < 0,001$), но и таковые у лиц с «преддиабетом» - на 30,8% ($p = 0,013$).

Таблица 10 – Уровни матриксных металлопротеиназ и ингибитора протеаз Cystatin C в сыворотке крови у лиц с «преддиабетом» и СД (Ме (25-й; 75-й))

Показатели/ Группы	Контроль (n=41)	«Преддиабет» (1 группа) (n=21)	СД 2 типа (2 группа) (n=21)	СД 2 типа+РП (3 группа) (n=63)	Тестовая статистика, Df=3
ММР-9 (нг/мл)	103 (81,0; 148)	171 (121; 216)	220* (170; 282)	301* (260; 311) P2<0,001 P3=0,002	H=45,73 p<0,001
ММР-2 (нг/мл)	41,01 (35,81; 54,04)	34,03* (29,03; 45,04)	37,50 (28,92; 43,02)	66,32* (53,84; 67,57) P2=0,045	H=11,81 p=0,033
Cystatin C (нг/мл)	116 (92,0; 131)	156* (143; 170)	204* (175; 240) P1=0,013	726* (426; 819) P2<0,001 P3<0,001	H=57,97 p<0,001

Примечание: * - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой контроля;
 p_1 – достоверность различий между первой и второй группой;
 p_2 – достоверность различий между первой и третьей группой;
 p_3 – достоверность различий между второй и третьей группой;
 попарное сравнение между группами проведено с помощью критерия Двасса-Стила-Кричлоу-Флигнера.

У пациентов с ДР уровень фермента ММР-9 превышал не только контрольный на 192,2% ($p<0,001$), но и таковой группы лиц с «преддиабетом» на 76,0% ($p<0,001$) и группы с СД без микроангиопатии на 36,8% ($p=0,002$). Содержание ММР-2 при ДР было выше, чем в контроле на 61,8% ($p=0,02$), и выше, чем при «преддиабете» – на 95,1% ($p=0,045$). Цифры протеина cystatin C в группе с ДР составляли от контроля 625,8% ($p<0,001$), от таковых лиц с «преддиабетом» - 465,4% ($p<0,001$) и от значений при СД без ДР - 355,9% ($p<0,001$).

Как видно из таблицы 11 концентрации определяемых нами желатиназ и ингибитора протеаз отличались в различные стадии диабетической ретинопатии.

Оказалось, что при непролиферативной стадии ДР наблюдались высокий уровень cystatin C, превышающий таковой группы сравнения на 94,1% ($p<0,001$) и некая тенденция к росту содержания ММР-2.

При препролиферативной стадии наблюдалось достоверное увеличение в крови ММР-2 на 79,0% ($p=0,010$) и ММР-9 – на 37,3% ($p=0,002$) относительно группы сравнения. Уровень последней желатиназы превышал также значения группы пациентов с непролиферативной стадией на 21,3% ($p=0,020$). В этой

стадии ДР также зарегистрированы высокие концентрации белка cystatin C, которые составили 393,6% ($p<0,001$) от цифр группы больных СД и 202,7% ($p<0,001$) – от группы с непролиферативной ДР.

В пролиферативную стадию заболевания уровни ММР-9 и ММР-2 оказались еще выше и статистически значимо превышали и таковые в группе сравнения на 77,7% ($p<0,001$) и 136,8% ($p<0,001$) соответственно, и были выше групп с непролиферативной (ММР-9 – на 57,0% ($p=0,002$), ММР-2 – на 45,6% ($p=0,045$)) и препролиферативной стадией заболевания (ММР-9 – на 29,5% ($p=0,002$), ММР-2 – на 32,3% ($p=0,030$)) (таблица 11). Концентрации ингибитора протеаз cystatin C тоже были увеличены как относительно значений 3А группы пациентов на 272,5% ($p<0,001$), так и относительно 3В – на 83,7% ($p<0,001$).

Таблица 11 – Уровни матриксных металлопротеиназ и ингибитора протеаз Cystatin C в сыворотке крови у лиц с СД и различной стадией ДР (Ме (25-й; 75-й))

Показатели/ Группы	СД 2 типа (группа сравнения) (n=21)	Непролифера- тивная ДР (3А группа) (n=21)	Препролифера- тивная ДР (3В группа) (n=21)	Пролифератив- ная ДР (3С группа) (n=21)	Тестовая статистика, Df=3
ММР-9 (нг/мл)	220 (170; 282)	249 (219; 284)	302* (291; 344) P1=0,020	391* (353; 767) P2=0,002 P3=0,002	H=24,10 p<0,001
ММР-2 (нг/мл)	37,50 (18,92; 46,02)	61,01 (45,04; 80,91)	67,14* (61,03; 76,01)	88,82* (76,66; 95,91) P2=0,045 P3=0,030	H=32,21 p<0,001
Cystatin C (нг/мл)	204 (175; 240)	396* (336; 487)	803* (777; 816) P1<0,001	1475* (1349; 1550) P2<0,001 P3<0,001	H=42,23 p<0,001

Примечание:

* - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой сравнения;

p₁ – достоверность различий между четвертой и пятой группой;

p₂ – достоверность различий между четвертой и шестой группой;

p₃ – достоверность различий между пятой и шестой группой;

попарное сравнение между группами проведено с помощью критерия Двасса-Стила-Кричлоу-Флигнера.

То есть на стадии «преддиабет» в сыворотке крови уменьшается концентрация ММР-2, но увеличивается уровень ингибитора протеаз cystatin C, при СД без осложнений увеличивается уровень ММР-9 и еще более cystatin C.

Начиная с непролиферативной стадии ДР идет дальнейшее увеличение cystatin C, а с препролиферативной стадии ДР происходит рост значений MMP-9 и MMP-2, что подтверждает значение данных нарушений в формировании диабетической ретинопатии [57].

Молекулы адгезии

Молекулы адгезии, такие как молекула внутриклеточной клеточной адгезии (ICAM-1) и молекула адгезии сосудистых клеток (VCAM-1), по мнению ряда авторов являются факторами неоваскуляризации при диабетической ретинопатии [43; 171].

При рассмотрении изменений уровня ICAM-1 и VCAM-1 в сыворотке крови, оказалось, что у лиц с «преддиабетом» и СД без осложнений достоверных отличий от контроля не обнаруживается (таблица 12). В группе пациентов с ДР значения молекул адгезии были статистически значимо выше контроля, выше чем у лиц с «преддиабетом», а также выше, чем у пациентов с СД без осложнений.

Таблица 12 – Уровень молекул адгезии в сыворотке крови у лиц с «преддиабетом» и СД (Ме (25-й; 75-й))

Показатели/ Группы	Контроль (n=41)	«Преддиабет» (1 группа) (n=21)	СД 2 типа (2 группа) (n=21)	СД типа+РП (3 группа) (n=63)	Тестовая статистика, Df=3
ICAM-1 (нг/мл)	675 (606; 728)	812 (694; 813)	772 (705; 812)	1248* (927; 1889) P2<0,001 P3<0,001	H=46,86 p<0,001
VCAM-1 (нг/мл)	334 (231; 496)	438 (361; 462)	543 (301; 630)	682* (608; 999) P2<0,001 P3<0,001	H=21,74 P=0,002

Примечание:

* - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой контроля;

p₁ – достоверность различий между первой и второй группой;

p₂ – достоверность различий между первой и третьей группой; 1

p₃ – достоверность различий между второй и третьей группой;

попарное сравнение между группами проведено с помощью критерия Двасса-Стила-Кричлоу-Флигнера.

Изменения в группах с различными стадиями ретинопатии выглядели следующим образом (таблица 13): у пациентов с непролиферативной стадией ДР значения ICAM-1 были выше, чем в группе лиц с СД на 27,8% ($p=0,041$).

При препролиферативной стадии уровень молекул адгезии вырос и превысил значения группы с непролиферативной стадией: ICAM-1 – на 51,3% ($p=0,049$), VCAM-1 – на 88,3% ($p=0,03$).

При пролиферативной стадии значения VCAM-1 продолжали оставаться высокими, а уровень молекул ICAM-1 еще увеличился и уже превысил таковой у пациентов 3А группы на 207,6% ($p<0,001$) и у больных 3В группы – на 103,3% ($p=0,040$).

Таблица 13 – Уровень молекул адгезии сыворотки крови у лиц с СД и различной стадией ДР (Ме (25-й; 75-й))

Показатели/ Группы	СД 2 типа (группа сравнения) (n=21)	Непролифера- тивная ДР (3А группа) (n=21)	Препролифе- ративная ДР (3В группа) (n=21)	Пролифера- тивная ДР (3С группа) (n=21)	Тестовая статистика, Df=3
ICAM-1 (нг/мл)	772 (705; 812)	987* (831; 1377)	1493* (1248; 1879) P1=0,049	3036* (2047; 3824) P2=0,009 P3=0,040	H=27,10 p<0,001
VCAM-1 (нг/мл)	543 (301; 630)	496 (393; 651)	934* (642; 1019) P1=0,03	1059* (792; 1131) P2<0,001	H=11,53 P=0,009

Примечание:

* - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой сравнения;

p₁ – достоверность различий между четвертой и пятой группой;

p₂ – достоверность различий между четвертой и шестой группой;

p₃ – достоверность различий между пятой и шестой группой;

попарное сравнение между группами проведено с помощью критерия Двасса-Стила-Кричлоу-Флигнера.

Таким образом только при «преддиабете» и СД 2 типа уровень молекул адгезии остается на уровне контроля, при ДР наблюдается рост концентрации и ICAM-1 и VCAM-1. Уровень молекул ICAM-1 значительно повышается в крови больных уже с непролиферативной стадией ДР относительно пациентов с СД без осложнений, что свидетельствует об участии ICAM-1 в инициации микроангиопатии. При препролиферативной стадии значения как ICAM-1, так и

VCAM-1 увеличиваются, при пролиферативной стадии цифры VCAM-1 остаются высокими, а уровень ICAM-1 продолжает расти [43].

3.4 Особенности содержания триптофана, кинуренинов и 5-гидрокситриптофана в крови при «преддиабете», сахарном диабете 2 типа и при диабетической ретинопатии

В последние десятилетия возрос научный интерес к метаболизму триптофана, в частности к его кинурениновому пути (КП) [58]. В ходе детального изучения данного процесса было установлено влияние многих кинуренинов на углеводный обмен, свободнорадикальные процессы, иммунные реакции, раскрыта их роль во многих заболеваниях, в том числе таких, как метаболический синдром, сахарный диабет и его сосудистые осложнения, прежде всего обусловленные хроническим системным вялотекущим воспалением. Все больше внимания уделяется роли индоламин-2,3-диоксигеназы (ключевого фермента, катализирующего метаболизм триптофана по кинурениновому пути, изменяющего соотношение кинуренина/триптофана) и арилуглеводородного рецептора (фактора транскрипции, который, путем связывания со специфическими лигандами, в том числе кинуренином, регулирует широкий спектр биологических эффектов, включая поддержание тканевого гомеостаза, регуляцию иммунного ответа) в поддержании баланса между иммунной реактивностью и толерантностью при различных заболеваниях [58; 62].

В связи с этим большой интерес представляет изучение содержания триптофана и его метаболитов в крови у больных с СД и ДР разной степени тяжести.

Как видно из таблицы 14, в группе лиц с «преддиабетом» (1 группа) концентрация триптофана в плазме крови не отличалась от контроля, однако значения всех изучаемых нами метаболитов кинуренинового пути в плазме были выше, чем в контрольной группе: кинуренина (KYN) – на 71,1% ($p<0,001$), 3-гидроксикинуренина (3-НКYN) – на 25,2% ($p<0,001$), кинуреновой кислоты

(KYNA) – на 49,4% ($p<0,001$). Также в первой группе относительно контроля были повышены цифры L-5-гидрокситриптофана (5HTp) на 66,1% ($p<0,001$).

Таблица 14 – Уровни триптофана и его метаболитов в плазме крови у лиц с «преддиабетом» и СД (Ме (25-й; 75-й))

Показатели/ Группы	Контроль (n=41)	Пред диабет (1 группа) (n=21)	СД 2 типа (2 группа) (n=21)	СД 2 типа+РП (3 группа) (n=63)	Тестовая статистика, Df=3
триптофан (TRP) (мкМ/л)	59,7 (55,8; 59,9)	53,7 (52,8; 59,8)	54,4 (52,8; 79,3)	71,3* (40,5; 80,8)	H=12,30 p=0,011
кинуренин (KYN) (мкмоль/л)	0,97 (0,89; 1,09)	1,66* (1,62; 1,75)	1,97* (1,84; 1,97) P1=0,025	2,01* (1,82; 2,21) P2=0,004	H=44,55 p<0,001
3- гидроксикинуренин (3-НКYN) (мкмоль/л)	11,50 (10,80; 11,81)	14,40* (14,10; 14,61)	15,64* (14,80; 16,00) P1=0,030	19,70* (17,70; 21,50) P2<0,001 P3=0,003	H=52,52 p<0,001
Кинуреновая кислота (KYNA) (нмоль/л)	39,90 (33,70; 54,60)	59,6* (59,20; 61,30)	60,60* (59,11; 68,00)	80,01* (67,80; 88,70) P2<0,001 P3=0,015	H=46,26 p<0,001
L-5- гидрокситриптофан (5HTp) (нМ/л)	0,62 (0,59; 0,70)	1,03* (0,97; 1,08)	1,54* (1,35; 1,75) P1=0,034	1,97* (1,69; 2,96) P2<0,001 P3=0,042	H=54,15 p<0,001

Примечание:

* - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой контроля;

p₁ – достоверность различий между первой и второй группой;

p₂ – достоверность различий между первой и третьей группой;

p₃ – достоверность различий между второй и третьей группой;

попарное сравнение между группами проведено с помощью критерия Двассы-Стила-Кричлоу-Флигнера.

У пациентов с СД 2 типа значения KYN, 3-НКYN и KYNA уже были выше контрольных на 103,1% ($p<0,001$), 35,6% ($p<0,001$) и 51,9% ($p<0,001$) соответственно. Кроме того, уровни KYN и 3-НКYN были статистически значимо выше, чем в группе лиц с «преддиабетом», составляя от них 118,7% ($p=0,025$) и 108,3% ($p=0,030$). При СД выше чем при «преддиабете» оказалась концентрация L-5-гидрокситриптофана на 49,5% ($p<0,001$).

В третьей группе (пациенты с ДР) уровень триптофана превышал контрольные значения на 19,4% ($p=0,040$). На наш взгляд, это обусловлено коррекцией диеты у этой группы обследуемых. Концентрация KYN была выше

контрольной на 107,2% ($p < 0,001$) и выше чем в первой группе на 21,1% ($p = 0,040$). В этой же группе наблюдался рост содержания 3-НКYN и KYNA со статистически значимой разницей на 26,0% ($p = 0,003$) и 32,0% ($p = 0,015$) по сравнению с группой больных СД, не осложненным микроангиопатией. На наш взгляд, выявленные изменения в содержании кинуренинов при ДР являются неблагоприятными. Учитывая то, что 3-НКYN в ряде реакций должен превращаться в кофермент NAD, играющий важную роль в окислительно-восстановительных процессах клеточного дыхания и антирадикальной защиты, накопление 3-НКYN в крови скорее свидетельствует о замедлении скорости образования конечного продукта. Значения еще одного метаболита триптофана – 5НТр у больных с ДР были выше чем в контрольной группе на 217,7% ($p < 0,001$), выше чем при «преддиабете» на 91,3% ($p < 0,001$) и больше чем при СД – на 27,9% ($p = 0,042$).

При анализе триптофана и его метаболитов в сыворотке крови у лиц с разными стадиями диабетической ретинопатии (таблица 15) было выявлено, что в группе больных с непролиферативной стадией лишь значения 3НКYN превышали таковые группы сравнения на 23,4% ($p = 0,002$).

В препролиферативную стадию отличался от группы сравнения уровень триптофана, составляя 133,3% ($p = 0,025$). Концентрации 3НКYN и KYNA в 3В группе тоже были увеличены относительно группы сравнения на 23,4 % ($p = 0,002$) и на 35,8% ($p = 0,015$) соответственно.

При последней стадии ретинопатии значения кинуренинов были максимально высокими. Так, концентрация KYN превысила таковую группы сравнения на 27,9% ($p = 0,030$) и таковую в 3А группе – на 34,8 % ($p = 0,025$). В 3С группе уровень 3НКYN был увеличен относительно группы сравнения на 57,9% ($p = 0,001$), относительно 3А и 3В групп – на 28,0% ($p = 0,001$). Содержание KYNA в группе с пролиферативной стадией было увеличено на 49,8% ($p = 0,010$) относительно лиц с СД без осложнений, было выше на 27,2% ($p = 0,029$) чем у пациентов с непролиферативной стадией, на 10,3% ($p = 0,007$) – чем у больных с препролиферативной стадией заболевания. При этом значения L-5-

гидрокситриптофана в группе с пролиферативной стадией ДР статистически значимо превысило таковое в группах с непролиферативной на 99,4% ($p=0,001$) и препролиферативной стадиями на 63,0% ($p=0,035$).

Таблица 15 – Уровни триптофана и его метаболитов в плазме крови у лиц с СД и различной стадией ДР (Ме (25-й; 75-й))

Показатели/ Группы	СД 2 типа (группа сравнения) (n=21)	Непролиферати вная ДР (3А группа) (n=21)	Препролифер ативная ДР (3В группа) (n=21)	Пролифератив ная ДР (3С группа) (n=21)	Тестовая статистика, Df=3
триптофан (TRP) (мкМ/л)	54,4 (52,8; 79,3)	67,8 (51,0; 78,0)	72,5* (70,2; 86,6)	66,9 (56,10; 73,90)	H=8,86 P=0,031
кинуренин (KYN) (мкМ/л)	1,97 (1,84; 1,97)	1,87 (1,73; 1,95)	2,07 (1,97; 2,10)	2,52* (2,41; 2,60) P2=0,025	H=22,73 P=0,010
3- гидроксикину ренин (3- HKYN) (нМ/л)	15,60 (14,80; 16,00)	19,30* (17,4; 20,2)	19,30* (17,5; 19,9)	24,70* (22,80; 25,20) P2=0,001 P3=0,001	H=31,22 P=0,001
Кинуреновая кислота (KYNA) (нМ/л)	60,60 (59,11; 68,00)	71,41 (63,61; 76,33)	82,33* (73,31; 87,24)	90,81* (89,71; 92,92) P2=0,029 P3=0,007	H=32,33 p<0,001
L-5-гидрокси- триптофан (5HTrp) (нМ/л)	1,55 (1,38; 1,77)	1,57 (1,41; 1,71)	1,92 (1,71; 2,04)	3,13* (2,58; 3,33) P2=0,001 P3=0,035	H=9,97 P=0,019

Примечание:

* - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой сравнения;

p₁ – достоверность различий между четвертой и пятой группой;

p₂ – достоверность различий между четвертой и шестой группой;

p₃ – достоверность различий между пятой и шестой группой;

попарное сравнение между группами проведено с помощью критерия Двасса-Стила-Кричлоу-Флигнера.

Таким образом, высокий уровень триптофана зафиксирован в группе пациентов с препролиферативной стадией ДР, а его метаболитов, уже в группе на лиц с «преддиабетом». Максимально увеличены значения как кинуренинов, так и L-5-гидрокситриптофана при последней стадии ретинопатии (статистически значимо превышают таковые в группах с непролиферативной и препролиферативной стадиями) [17].

Подводя итог анализу изменений со стороны маркеров воспаления, эндотелиальной и иммунной дисфункции, ангиогенеза, метаболитов триптофана в крови при «преддиабете», сахарном диабете 2 типа и при диабетической ретинопатии следует заключить, что, начиная с группы лиц «преддиабет» регистрируется повышение маркеров воспаления (SAA, NGAL, MRP8/14, MPO), всех изученных нами растворимых костимулирующих и коингибирующих молекул и метаболитов триптофана. При СД отмечены еще более высокие цифры маркеров воспаления, коингибирующих молекул и метаболитов триптофана. При СД и ДР в сыворотке крови выявлена еще более увеличенная концентрация маркеров воспаления, растворимых костимулирующих и коингибирующих молекул, подъем уровня ММР и ингибитора протеаз, молекул адгезии и метаболитов триптофана. У пациентов с ДР концентрации молекул адгезии, ММР и кинуренинов нарастают по мере прогрессирования патологического процесса.

ГЛАВА 4. КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ ЗНАЧЕНИЯМИ МЕТАБОЛИТОВ ТРИПТОФАНА, ДРУГИМИ ЛАБОРАТОРНЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ И НЕКОТОРЫМИ ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ

В ходе анализа полученных данных нами были выявлены существенные различия в уровнях биохимических показателей, в том числе и метаболитов триптофана у лиц с «преддиабетом», СД 2 типа диабетической ретинопатией. Для того, чтобы доказать взаимосвязь развития ретинопатии с имеющимися изменениями в обмене триптофана, на следующем этапе был проведен корреляционный анализ в общей группе обследуемых.

В ходе данного анализа выявлено что сывороточный уровень триптофана взаимосвязан с концентрацией глюкозы в крови ($r=0,38$; $p=0,020$, коэффициент корреляции Спирмена).

В тоже время значения кинуренина демонстрируют множество прямых заметных корреляционных взаимосвязей с различными биохимическими параметрами крови (таблица 16): с концентрациями протеинов NGAL ($r=0,68$; $p<0,001$), MPO ($r=0,52$; $p<0,001$), CTLA-4 ($r=0,51$; $p<0,001$), LAG-3 ($r=0,64$; $p<0,001$), Tim-3 ($r=0,63$; $p<0,001$), PD-1 ($r=0,66$; $p<0,001$), PD-L1 ($r=0,55$; $p<0,001$), с концентрацией 3-гидрокикинуруенина ($r=0,60$; $p<0,001$). Кроме того уровень кинуренина взаимосвязан прямыми умеренными связями со значениями гликемии ($r=0,34$; $p=0,021$), гликированного гемоглобина ($r=0,45$; $p=0,001$), с концентрациями белков SAA ($r=0,47$; $p=0,001$), MRP8/14 ($r=0,49$; $p=0,010$), B7.2 ($r=0,42$; $p=0,001$), Galectin-9 ($r=0,47$; $p<0,001$), Cystatin C ($r=0,45$; $p=0,007$) и уровнем кинуреновой кислоты ($r=0,48$; $p=0,001$). Также имеется умеренная прямая взаимосвязь между цифрами кинуренина и значениями шкалы глазного

дна ($r=0,41$; $p=0,005$). Заметная прямая связь зафиксирована со средней толщиной сетчатки в области фовеа и парафовеа.

Таблица 16 – Оценка степени корреляции исследуемых параметров с KYN

Параметр	N	Коэффициент корреляции по Спирмену	Сила и направленность связи	Статистическая значимость
Гликемия	126	0,34	Умеренная прямая	$P=0,021$
HbA1c	126	0,45	Умеренная прямая	$P=0,001$
SAA	126	0,47	Умеренная прямая	$P=0,001$
NGAL	126	0,68	Заметная прямая	$P<0,001$
MRP8/14	126	0,49	Умеренная прямая	$P=0,010$
MPO	126	0,52	Заметная прямая	$P<0,001$
B7.2 (CD86)	126	0,42	Умеренная прямая	$P=0,001$
4-1BB	126	0,22	Слабая прямая	$P=0,128$
CTLA-4	126	0,51	Заметная прямая	$P<0,001$
LAG-3	126	0,64	Заметная прямая	$P<0,001$
Tim-3	126	0,63	Заметная прямая	$P<0,001$
PD-1	126	0,66	Заметная прямая	$P<0,001$
PD-L1	126	0,55	Заметная прямая	$P=0,015$
Galectin-9	126	0,47	Умеренная прямая	$P<0,001$
MMP-9	126	0,32	Умеренная прямая	$P=0,057$
MMP-2	126	0,21	Слабая прямая	$P=0,081$
Cystatin C	126	0,45	Умеренная прямая	$P=0,007$
ICAM-1	126	0,29	Слабая прямая	$P=0,050$
VCAM-1	126	0,23	Слабая прямая	$P=0,151$
TRp	126	0,19	Слабая прямая	$P=0,110$
3-HKYN	126	0,60	Заметная прямая	$P<0,001$
KYNA	126	0,48	Умеренная прямая	$P=0,001$
5HTp	126	0,28	Слабая прямая	$P=0,051$
Шкала глазного дна	126	0,41	Умеренная прямая	$P=0,005$
Средняя толщина сетчатки фовеа	126	0,75	Заметная прямая	$P<0,001$
Средняя толщина сетчатки парафовеа	126	0,73	Заметная прямая	$P<0,001$
средняя толщина сетчатки перифовеа	126	0,49	Умеренная прямая	$P<0,001$

Далее были оценены корреляционные взаимосвязи 3-гидрокикинурина с различными показателями. Как видно из таблицы 17 количество корреляций и их сила были более существенны. Так между уровнем 3-гидрокикинурина с одной стороны и концентрациями глюкозы ($r=0,75$; $p<0,001$), NGAL ($r=0,72$; $p<0,001$), и CTLA-4 ($r=0,71$; $p<0,001$) с другой зафиксированы прямые взаимосвязи высокой силы. Также высокая прямая связь наблюдается между уровнем 3-гидрокикинурина и цифрами шкалы глазного дна ($r=0,71$; $p<0,001$). Заметные корреляционные взаимосвязи имеются между значениями 3-гидрокикинурина с одной стороны и уровнями гликированного гемоглобина ($r=0,70$; $p<0,001$), MRP8/14 ($r=0,61$; $p<0,010$), MPO ($r=0,64$; $p<0,001$), LAG-3 ($r=0,66$; $p<0,001$), Tim-3 ($r=0,52$; $p<0,001$), PD-1 ($r=0,58$; $p<0,001$), PD-L1 ($r=0,63$; $p<0,001$), Galectin-9 ($r=0,67$; $p<0,001$) и кинуреновой кислоты ($r=0,48$; $p=0,001$) с другой стороны. Сила и направленность взаимосвязей между толщиной сетчатки и содержанием 3-гидрокикинурина в сыворотке крови по сравнению с концентрацией кинурина не изменились.

Таблица 17 – Оценка степени корреляции исследуемых параметров с 3-НКУН

Параметр	N	Коэффициент корреляции по Спирмену	Сила и направленность связи	Статистическая значимость
Гликемия	126	0,75	Высокая прямая	$P<0,001$
HbA1c	126	0,70	Заметная прямая	$P<0,001$
SAA	126	0,42	Умеренная прямая	$P=0,001$
NGAL	126	0,72	Высокая прямая	$P<0,001$
MRP8/14	126	0,61	Заметная прямая	$P<0,001$
MPO	126	0,64	Заметная прямая	$P<0,001$
B7.2 (CD86)	126	0,41	Умеренная прямая	$P=0,001$
4-1BB	126	0,46	Умеренная прямая	$P=0,001$
CTLA-4	126	0,71	Высокая прямая	$P<0,001$
LAG-3	126	0,66	Заметная прямая	$P<0,001$
Tim-3	126	0,52	Заметная прямая	$P<0,001$
PD-1	126	0,58	Заметная прямая	$P<0,001$
PD-L1	126	0,63	Заметная прямая	$P=0,015$
Galectin-9	126	0,67	Заметная прямая	$P<0,001$
MMP-9	126	0,31	Умеренная прямая	$P=0,020$

Продолжение таблицы 17

Параметр	N	Коэффициент корреляции по Спирмену	Сила и направленность связи	Статистическая значимость
MMP-2	126	0,06	Слабая прямая	P=0,081
Cystatin C	126	0,32	Умеренная прямая	P=0,007
ICAM-1	126	0,25	Слабая прямая	P=0,050
VCAM-1	126	0,50	Умеренная прямая	P=0,001
TRp	126	0,15	Слабая прямая	P=0,150
KYNA	126	0,62	Заметная прямая	P<0,001
5HTp	126	0,15	Слабая прямая	P=0,001
Шкала глазного дна	126	0,71	Высокая прямая	P<0,001
Средняя толщина сетчатки фовеа	126	0,75	Высокая прямая	P<0,001
Средняя толщина сетчатки парафовеа	126	0,76	Высокая прямая	P<0,001
средняя толщина сетчатки перифовеа	126	0,54	Умеренная прямая	P<0,001

Сила и направленность корреляционных взаимосвязей уровней следующего метаболита триптофана – кинуреновой кислоты (KYNA) с другими изученными нами параметрами отражены в таблице 18. Видно, что между цифрами KYNA с одной стороны и значениями гликемии ($r=0,62$; $p<0,001$), гликированного гемоглобина ($r=0,62$; $p<0,001$), концентрациями белков NGAL ($r=0,66$; $p<0,001$), MRP8/14 ($r=0,56$; $p<0,001$), MPO ($r=0,57$; $p<0,001$), LAG-3 ($r=0,53$; $p<0,001$), PD-L1 ($r=0,53$; $p=0,015$), Cystatin C ($r=0,52$; $p=0,001$), средней толщиной сетчатки в зонах фовеа и парафовеа с другой стороны – имеются прямые заметные взаимосвязи.

Выявлена заметная прямая связь между уровнем кинуреновой кислоты и значением шкалы глазного дна ($r=0,68$; $p<0,001$).

Кроме того, обнаружено множество прямых умеренных взаимосвязей между цифрами KYNA с одной стороны и концентрациями протеина SAA ($r=0,37$; $p=0,001$), B7.2 ($r=0,34$; $p=0,001$), 4-1BB ($r=0,48$; $p=0,001$), CTLA-4 ($r=0,49$;

p=0,001), Tim-3 (r=0,47; p=0,001), PD-1 (r=0,47; p=0,001), Galectin-9 (r=0,48; p=0,001), MMP-9 (r=0,35; p=0,004), ICAM-1 (r=0,31; p=0,008), VCAM-1 (r=0,50; p=0,001) с другой стороны.

Таблица 18 – Оценка степени корреляции исследуемых параметров с KYNА

Параметр	N	Коэффициент корреляции по Спирмену	Сила и направленность связи	Статистическая значимость
Гликемия	126	0,62	Заметная прямая	P<0,001
HbA1c	126	0,62	Заметная прямая	P<0,001
SAA	126	0,37	Умеренная прямая	P=0,001
NGAL	126	0,56	Заметная прямая	P<0,001
MRP8/14	126	0,56	Заметная прямая	P<0,001
MPO	126	0,57	Заметная прямая	P<0,001
B7.2 (CD86)	126	0,34	Умеренная прямая	P=0,001
4-1BB	126	0,48	Умеренная прямая	P=0,001
CTLA-4	126	0,49	Умеренная прямая	P=0,001
LAG-3	126	0,53	Заметная прямая	P<0,001
Tim-3	126	0,47	Умеренная прямая	P=0,001
PD-1	126	0,47	Умеренная прямая	P=0,001
PD-L1	126	0,53	Заметная прямая	P=0,015
Galectin-9	126	0,48	Умеренная прямая	P=0,001
MMP-9	126	0,35	Умеренная прямая	P=0,004
MMP-2	126	0,15	Слабая прямая	P=0,065
Cystatin C	126	0,52	Заметная прямая	P=0,001
ICAM-1	126	0,31	Умеренная прямая	P=0,008
VCAM-1	126	0,50	Умеренная прямая	P=0,001
TRp	126	0,46	Умеренная прямая	P=0,005
5HTp	126	0,50	Умеренная прямая	P=0,001
Шкала глазного дна	126	0,68	Заметная прямая	P<0,001
Средняя толщина сетчатки фовеа	126	0,67	Заметная прямая	P<0,001
Средняя толщина сетчатки парафовеа	126	0,64	Заметная прямая	P=0,001
средняя толщина сетчатки перифовеа	126	0,48	Умеренная прямая	P<0,001

Выявлена умеренная связь между концентрацией кинуреновой кислоты и значениями как триптофана ($r=0,46$; $p=0,005$), так и 5-гидрокситриптофана ($r=0,50$; $p<0,001$).

Таким образом, как сила, так и количество взаимосвязей максимальны между 3-гидрокскинуренином и остальными изученными показателями.

Таблица 19 – Оценка степени корреляции исследуемых параметров с 5-гидрокси триптофаном 5HTrp

Параметр	N	Коэффициент корреляции по Спирмену	Сила и направленность связи	Статистическая значимость
Гликемия		0,12	Слабая прямая	$P=0,71$
HbA1c		0,15	Слабая прямая	$P=0,50$
SAA		0,23	Слабая прямая	$P=0,15$
NGAL		0,21	Слабая прямая	$P=0,35$
MRP8/14		0,19	Слабая прямая	$P=0,35$
MPO		0,16	Слабая прямая	$P=0,40$
B7.2 (CD86)		0,20	Слабая прямая	$P=0,15$
4-1BB		0,16	Слабая прямая	$P=0,35$
CTLA-4		0,21	Слабая прямая	$P=0,45$
LAG-3		0,13	Слабая прямая	$P=0,19$
Tim-3		0,47	Слабая прямая	$P=0,001$
PD-1		0,47	Слабая прямая	$P=0,001$
PD-L1		0,53	Слабая прямая	$P=0,015$
Galectin-9		0,48	Слабая прямая	$P=0,001$
MMP-9		0,35	Слабая прямая	$P=0,004$
MMP-2		0,15	Слабая обратная	$P=0,065$
Cystatin C		0,52	Умеренная прямая	$P=0,001$
ICAM-1		0,31	Слабая прямая	$P=0,008$
VCAM-1		0,51	Умеренная прямая	$P=0,001$
TRp		0,25	Слабая прямая	$P=0,005$
Шкала глазного дна		0,11	Слабая прямая	$P=0,700$
Средняя толщина сетчатки фовеа	126	0,64	Заметная прямая	$P<0,001$
Средняя толщина сетчатки парафовеа	126	0,58	Умеренная прямая	$P<0,001$
средняя толщина сетчатки перифовеа	126	0,48	Слабая прямая	$P=0,05$

Оценка степени корреляций исследуемых показателей с еще одним метаболитом триптофана – 5 гидрокситриптофаном, уже не являющегося участником кинуренинового пути обмена, показала отсутствие значимых взаимосвязей (таблица 19), за исключением толщины сетчатки в области фовеа.

Таким образом, в ходе корреляционного анализа нами выявлено множество корреляционных связей между значениями метаболитов кинуренинового пути обмена триптофана и содержанием белков, являющихся маркерами воспаления, эндотелиальной дисфункции, контрольными точками иммунитета, и в свою очередь свидетельствующих о сопряженности нарушения кинуренинового процесса с воспалением, иммунным дисбалансом, повреждением сосудов при ДР.

Корреляционные взаимосвязи между значениями кинуренинов с клиническими показателями (шкала глазного дна) также свидетельствуют о вероятной роли нарушения в обмене триптофана в качестве одного из патогенетических факторов в развитии ДР при СД 2 типа.

Все обнаруженные нами взаимосвязи можно представить в виде схемы (рисунок 7).

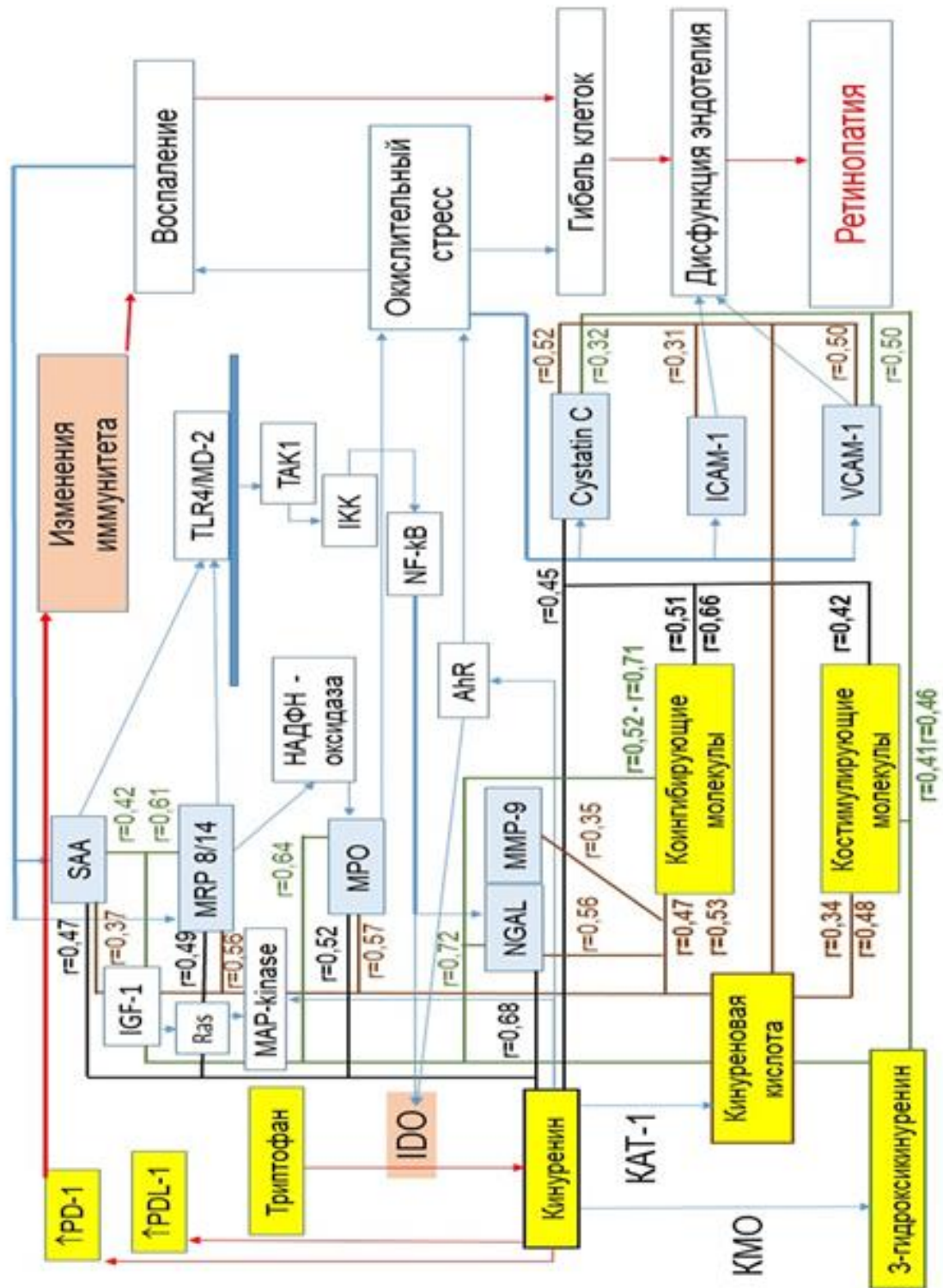


Рисунок – 7 Схема корреляционных связей между метаболитами триптофана, маркерами воспаления, иммунитета и дисфункции эндотелия

Задачей нашего следующего этапа было проведение многофакторного регрессионного анализа и определение наиболее значимых факторов, играющих роль в развитии диабетической ретинопатии у больных сахарным диабетом 2

типа. Для выделения факторов, ответственных за развитие ДР нами в качестве переменных данных использовались все изучаемые показатели.

В результате пошаговой регрессии было подобран оптимальный набор независимых предикторов развития ДР у больных, страдающих сахарным диабетом 2 типа, сочетание которых объясняет практически 60% всей выборки ($R^2 = 0,578$).

В качестве прогностических коэффициентов были отобраны такие переменные, как уровень ЗНКYN и CTLA-4 в сыворотке крови (таблица 20).

Таблица 20 – Параметры линейной части модели

<i>Предиктор</i>	<i>Вес</i>	<i>p</i>	<i>Отношение шансов [95% ДИ]</i>
Константа	-17,430	0,01	
Уровень 3- Hydroxycynurenine (ЗНКYN) в сыворотке крови	0,889	0,014	2.43 [1,18 – 1,59]
Концентрация CTLA-4	0,180	0,013	1,20[0,037 – 0,322]

Далее, нами из полученных данных было построено уравнение множественной регрессии (Формула №1)

$$A = -17,43 + (0,889 * \text{ЗНКYN}) + (0,18 * \text{CTLA-4})$$

Формула №1. Уравнение множественной линейной регрессии развития диабетической ретинопатии у больных сахарным диабетом 2 типа.

A – формирование ДР; ЗНКYN – уровень гидроксикинурина в сыворотке крови (мкг/мл); CTLA-4 – уровень CTLA-4 в сыворотке крови (пг/мл).

Для подсчета вероятности развития ДР использовалось уравнение логит-преобразования, результатом которого и будет являться значение, располагающееся в интервале от 0 до 1. (Формула №2)

$$P = \frac{1}{1 + e^A}$$

Формула №2. Логит-преобразование. Р - вероятность того, что разовьётся ДР; е - основание натуральных логарифмов 2,7; А – уравнение множественной линейной регрессии (Формула №1).

После создания формулы нами была произведена проверка эффективности модели и найдено пороговое значение вероятности. Значение отсечки является числом, расположенным в месте перекреста максимального числа истинно положительных (87,5%) и истинно отрицательных значений (79,5%) (таблица 21). Для данной модели оно составило 0,9 (рисунок 8). Следовательно, если значение Р будет больше значения отсечки, то можно сказать, что у пациента с сахарным диабетом сформируется диабетическая ретинопатия.

Таблица 21 – Классификационная таблица прогнозирования формирования ретинопатии

	<i>Предсказанный</i>		
<i>Наблюдаемый</i>	<i>Есть сформированная ретинопатия</i>	<i>Отсутствует сформированная ретинопатия</i>	<i>% Правильных</i>
Есть сформированная ретинопатия	7	1	87,5
Отсутствует сформированная ретинопатия	8	31	79,5

При рассмотрении графика отсечки и результатов ROC-анализа, видно, что численный показатель площади под кривой (AUC=0,949) занимает практически 95%, от общей площади истинно положительных и истинно отрицательных значений можно сказать, что построенная модель имеет высокий уровень прогнозирования (таблица 22), (рисунок 9).

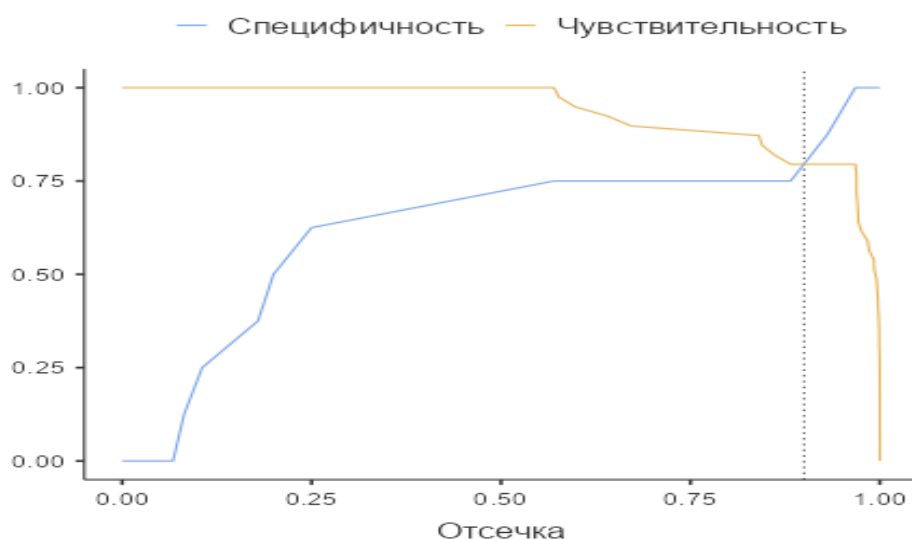


Рисунок 8 – График баланса специфичности и чувствительности

Таблица 22 – Прогностические меры

<i>Точность</i>	<i>Специфичность</i>	<i>Чувствительность</i>	<i>AUC</i>
0,848	0,875	0,795	0,949

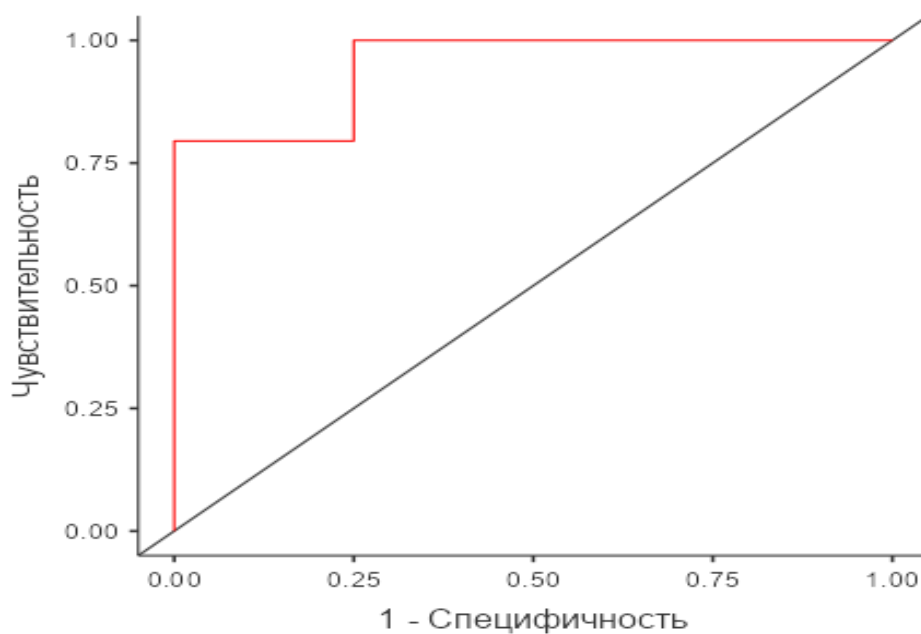
ROC кривая

Рисунок 9 – ROC-кривая предсказательной способности модели формирования диабетической ретинопатии

С помощью применения метода бинарной логистической регрессии нами было показано, что высокой прогностической значимостью развития диабетической ретинопатии у больных сахарным диабетом 2 типа имеют концентрации 3 гидроксикинурина и CTLA-4 в сыворотке крови. Набор этих тестов позволяет предсказать в 87 % наличие диабетической ретинопатии и позволит увеличить эффективность прогнозирования процесса развития ДР.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод о патогенетической роли продуктов обмена триптофана не только в патогенезе сахарного диабета, но и в формировании ретинопатии, а также подтверждают участие иммуноопосредованного воспаления в механизмах их развития.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сахарный диабет 2 типа является заболеванием с многофакторностью развития нарушений углеводного и других видов обмена, причем механизмы этих нарушений раскрыты не полностью. Инсулиновая резистентность считается первым звеном патогенеза СД 2 типа [47].

К основным факторам риска инсулиновой резистентности относят ожирение, воспаление, стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и оксидативный стресс [47]. Все эти факторы провоцируют латентное воспаление жировой ткани за счет ее гипертрофии и гипоксии, инфильтрации макрофагами с их последующим переходом в воспалительный фенотип и секрецией спектра воспалительных цитокинов [53]. Эти цитокины запускают в адипоцитах воспалительные сигнальные каскады с участием NF- κ B, IKK, JNK и других киназ [53; 116]. Последние используют IRS как один из субстратов, фосфорилируя его по нескольким сериновым остаткам, переводя в неактивное состояние и прерывая передачу сигнала по инсулиновому каскаду [53; 74; 92; 125].

Следующее за инсулиновой резистентностью развитие событий в патогенезе СД 2 типа включает усиление секреции инсулина как ответную реакцию организма на недостаток его действия. Однако длительная гиперинсулинемия ведет к дисфункции β -клеток поджелудочной железы и снижению синтеза гормона. Как следствие, инсулинзависимый транспорт глюкозы из кровотока в клетки мышечной и жировой тканей окончательно нарушается, в печени активируется глюконеогенез. Развивается стабильная гипергликемия, при которой глюкоза и побочные продукты ее метаболизма, имеющие альдо- и кетогруппы, реагируют с белками плазмы и клеток крови, а также с молекулами эндотелиоцитов, модифицируя и нарушая их функции [47; 53].

Состояние, задолго предшествующее развитию СД 2 типа, преддиабет. В это понятие входят такие нарушения углеводного обмена, как гипергликемия натощак от 6,1 и менее 6,9 моль/л и нарушение толерантности к глюкозе [47].

В большинстве случаев течение СД сопровождается проявлением осложнений со стороны различных органов и систем [47], в том числе со стороны органа зрения. Таким хроническим осложнением является диабетическая ретинопатия [49] (код по МКБ-10: H36.0). Данные крупных метаанализов, популяционных и других научных исследований, специализированных рекомендаций, подтверждают, что ДР служит одной из ведущих причин тяжелых нарушений зрения и слепоты как в целом мире, так и наиболее распространенной причиной слепоты, и инвалидности среди лиц трудоспособного возраста и в России [36].

Согласно федеральным клиническим рекомендациям, ДР – специфичное позднее микрососудистое осложнение сахарного диабета, которое на начальных стадиях протекает бессимптомно, развиваясь, как правило, последовательно от изменений, связанных с повышенной проницаемостью и окклюзией ретинальных сосудов до появления новообразованных сосудов и фиброглияльной ткани [26]. Накопление новых сведений о нейродегенеративных процессах в сетчатке у пациентов с СД послужило причиной корректировки понятия ДР Американской ассоциацией сахарного диабета, и с 2019 года Ассоциация определяет ДР как высокоспецифичное нейроваскулярное осложнение СД [42].

Пусковым патомеханизмом диабетической ретинопатии признана хроническая гипергликемия, вызывающая изменения в основных молекулярных процессах, таких как действие протеникиназы, полиоловый и гексозаминовый пути, гликирование биополимеров и свободнорадикальные процессы. Это тесно связано с нарушением регуляции аутофагии, митохондриальной дисфункцией, окислительным стрессом, активацией глии и воспалением при прогрессировании ДР [42] и способствует микрососудистой дегенерации и разрушению гемато-ретинального барьера. Апоптоз перицитов и эндотелиальных клеток, окклюзия капилляров и повышение проницаемости сосудов приводят к нарушению

микроциркуляции, создают гипоксически-ишемическую среду в сетчатке. Возникающие биохимические нарушения ответственны за повреждения нейронов (нейродегенерацию, апоптоз, изменение нейронных связей, глиоз), а также за дегенерацию сосудов (ишемию, неоваскуляризацию) [42].

Патогенетическая роль биохимических изменений в развитии ДР подчеркивает важность исследований, раскрывающих изменения метаболизма отдельных молекул и тем самым способствующих выявлению ранних лабораторных маркеров этой патологии и указывающих на перспективные терапевтические цели.

Эндотелий сосудов не является классически инсулинзависимым, но служит первичной мишенью инсулина. Диабетическая ретинопатия, в клинике и эксперименте реализуются путем развития и прогрессирования эндотелиальной дисфункции [31]. В условиях гипергликемии идет развитие оксидативного и карбонильного стресса, нарушающих функции эндотелия, что проявляется в снижении его барьерных свойств, синтеза главного вазорелаксанта, оксида азота NO, и усилении синтеза мощного вазоконстриктора, эндотелина-1 [31]. Инсулин, напротив, поддерживает барьерную функцию эндотелия, активируя синтез NO. Параллельно активируя Erk1/2 MAP-киназный каскад, инсулин контролирует также синтез эндотелина-1, тем самым влияя на тонус сосудов. В условиях ДР, гиперинсулинемии и дисфункции эндотелия действие инсулина нарушается, снижается вазорелаксирующая активность NO, усиливается констрикторное влияние эндотелина и увеличивается проницаемость эндотелиального барьера. Изменяется проникновение самого инсулина сквозь эндотелий и его доступность для мышечных и жировых клеток, что вносит дополнительный вклад в изменение инсулинзависимого захвата глюкозы этими клетками из кровотока. Таким образом, нарушение барьерной функции эндотелия может являться одним из факторов, усугубляющих гипергликемию и потенцирующих развитие сосудистых осложнений СД 2 типа (рисунок 10).

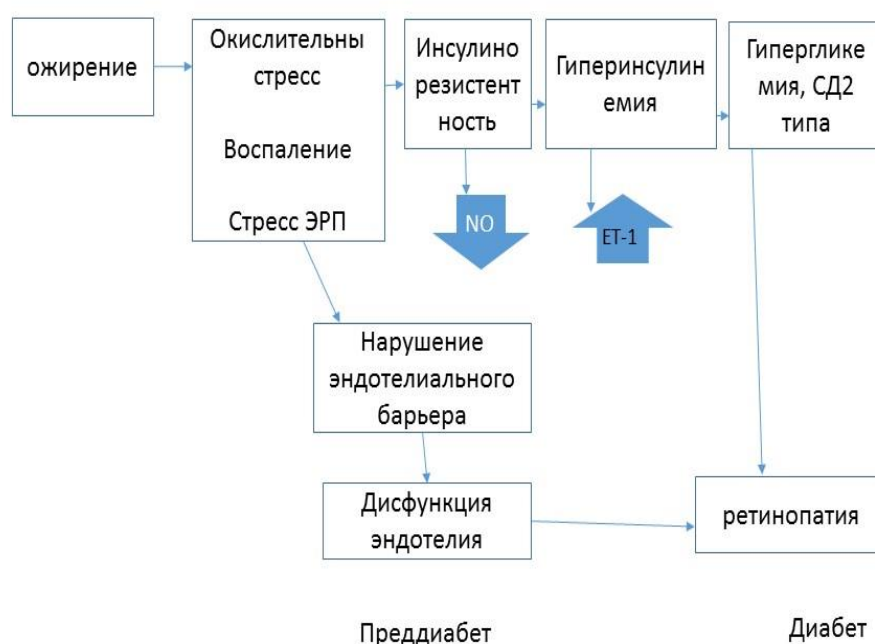


Рисунок 10 – Схема, отражающая основные патогенетические звенья развития «преддиабета», СД 2 типа и ДР (по данным И.И. Дедова и соавт., 2018) .

Вместе с тем мало известно о том, для какого этапа патогенеза СД 2 типа характерны эти изменения и что происходит с эндотелием сосудов на ранних этапах предиабета. Стресс ЭРП является одним из факторов риска ДР. Стресс ЭРП возникает как реакция клеток на избыточное количество белков [46, 83]. Как правило, эта ситуация возникает при избытке поступающих в клетку пищевых ресурсов, в том числе и аминокислот.

Вовлеченность аминокислоты триптофан и её метаболитов в патологические процессы активно исследуется в настоящее время, с учетом большого разнообразия производных триптофана, образующихся в ходе трех путей превращения (кинуруенинового, серотонинового и индольного) (рис.1). Наиболее хорошо изучена роль метаболитов серотонинового пути при нервнопсихических заболеваниях [52].

В последние годы ведутся активные исследования роли триптофана (TRP) в системном воспалении при сердечно сосудистых заболеваниях. И наибольший интерес в регуляции воспаления представляет изучение активности кинуренинового пути (КП) обмена аминокислоты. Считается, что провоспалительные цитокины усиливают экспрессию начальных ферментов КП – ИДО и кинуренинмонооксигеназы, что в свою очередь ведет к повышенному образованию хинолиновой и ксантуреновой кислот. Стоит отметить, что последняя вносит существенный вклад в развитие метаболического синдрома и диабета [52].

Несмотря на то, что исследования катаболизма TRP при СД получают все большее распространение, изучаются маркеры воспаления, нарушения иммунитета, дисфункция эндотелия, работ по сравнительному анализу содержания всех указанных метаболитов, изучению взаимосвязей между ними у клинически здоровых людей, пациентов с преддиабетом, СД и ДР не проводилось.

Учитывая все вышеизложенное, нами было запланировано настоящее исследование.

В ходе анализа показателей воспаления в крови у лиц с «преддиабетом», было отмечено повышение уровней NGAL на 54,4%, MRP8/14 – на 140,0%, MPO – на 110,2%.

Все эти молекулы, являются участниками иммунных или/и воспалительных процессов. Так, липокалин, связанный с желатиназой нейтрофилов (NGAL) – белок, который секретируется в основном нейтрофилами, макрофагами и дендритными клетками, однако, его экспрессируют и эпителиальные клетки в ответ на воспаление, ишемию и неоплазию. Он участвует во врожденном иммунитете посредством антимикробного защитного механизма, секвестрируя бактериальные сидерофоры катехолатного типа и ограничивая рост бактерий [159]. Белок также участвует в активации и трансформации Т-клеток в сторону типа Th1 [90]. Установлено, что при дефиците NGAL нарушается хемотаксис, адгезия и миграция воспалительных клеток, в частности нейтрофилов [91].

Кроме того, показано, что NGAL принимает участие в регуляции метаболических процессов. Так, у детей с СД уровень NGAL коррелирует с концентрацией гликированного гемоглобина и дислипидемией [159]. NGAL может связываться с proMMP-9 (которая как NGAL экспрессируется активированными эпителиальными и воспалительными клетками (моноцитами и нейтрофилами)) с образованием гетеродимера с дисульфидной связью массой 130 кДа. Комплексообразование NGAL/proMMP-9 происходит внутри клетки, повышает активность MMP-9 и защищает ее от деградации [159].

Молекула MRP8/14 или иначе кальпротектин 8/14, также известный как миелоидный белок, представляет собой гетеродимер двух кальций-связывающих белков (S100A8 и S100A9, называемых еще MRP8 и MRP14, участвующих в кальций-зависимой передаче сигналов. MRP8/14 экспрессируется активированными гранулоцитами и макрофагами человека при воспалении. Среди его функций – активация NADPH-оксидазы (а затем и MPO) [162], TLR-подобных рецепторов 4 (TLR4) и рецепторов конечных продуктов гликирования, что, в свою очередь, запускает в клетках целый ряд сигнальных систем, имеющих важное значение как в развитии механизмов, приводящих к воспалению в жировой ткани и резистентность к инсулину, так и в патогенезе микро- и макрососудистых осложнений сахарного диабета [20; 73]. TLR (толл-подобные рецепторы) представляют собой трансмембранные рецепторы, экспрессируемые на мембране моноцитов/макрофагов. Помимо своей роли в инфекционной защите хозяина, некоторые из TLR вовлечены в воспаление и инсулинорезистентность [82]. Так, они способны не только распознавать инфекционные патогены, но и метаболические стрессоры или DAMP (ассоциированный с повреждением молекулярный паттерн), связанные с воспалением и глюкозотоксичностью.

Показано, что включение TLR 4 вызывает хроническое воспаление и резистентность к инсулину из-за прямого вмешательства в передачу сигналов инсулина [82]. Скоординированное действие TLR, адаптерных белков и киназ приводит к устойчивой активации основных транскрипционных программ (рис. 12).

При этом стимуляция через TLR4 индуцирует экспрессию IDO в определенных клетках [21] (рисунок 11).



Рисунок 11 – Взаимосвязь MRP 8/14 и кинуренинов, их роль в развитии эндотелиальной дисфункции на фоне инсулинорезистентности

Примечание: IKK - киназный комплекс

TAK1 - трансформирующий фактор роста-β (TGF-β)

NF-κB - Ядерный фактор транскрипции

PI3K - Фосфоинозитид-3-киназа

АКТ1 — внутриклеточный фермент, один из трёх членов семейства протеинкиназ

В литературных источниках сообщается о роли миелопероксидазы (МПО) в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний [155], что подтверждает высокую повреждающую способность фермента. МПО выбрасывается нейтрофилами во внеклеточное пространство во время активации последних с целью инициации каскада иммунологических реакций. Повышенный уровень МПО в крови рассматривается как маркёр воспалительного и окислительного стресса [155]. Недавние исследования накапливают знания о неферментативной роли МПО в сосудах и за их пределами. Благодаря своему катионному заряду он может серьезно влиять на свойства эндотелиального гликокаликса и изменять профиль экспрессии биологически активных молекул эндотелиальных клеток, предположительно вызывая эндотелиальную дисфункцию [155].

Так, МПО способна снижать биодоступность NO в субэндотелиальном пространстве, нарушать механочувствительность эндотелия и тем самым,

изменять адгезию лейкоцитов, окислять липопротеины низкой плотности, модифицируя их и индуцируя атерогенез [155].

Так же при «преддиабете» нами обнаружен рост концентраций костимулирующих молекул B7.2 – на 80,1% и 4-1BB – на 123,0%, зафиксирован подъем концентраций CTLA-4 на 151,6%, LAG-3 – на 15,5%, Tim-3 – в 25,6 раза относительно контроля. Зарегистрирован рост значений молекулы PD-1 – на 90,5%, ее рецептора PD-L1 – на 300,3%, увеличение уровня белка Galectin-9 на 47,0%. Кроме того, было обнаружено, что у лиц с «преддиабетом» содержание MMP-2 ниже на 17,1%, а уровень cystatin C, напротив выше на 34,5% чем в контроле. Параллельный рост как молекул активации иммунного ответа, так и его ингибиторов свидетельствует о повышенной активности иммунной системы и сдерживающих ее механизмах саногенеза.

Цистатин С (Cys-C) относится к важным внеклеточным эндогенным ингибиторам цистеиновых протеаз, представляет собой негликозилированный основной белок с низкой молекулярной массой (13кДа), состоящий из цепочки 120 аминокислот и экспрессируется практически всеми клетками организма человека [97]. Имеются исследования, в которых продемонстрировано, что более высокие уровни Cys-C в сыворотке крови положительно коррелируют с развитием некоторых сосудистых осложнений у пациентов с СД 2 типа при нормальной функции почек, в том числе – с диабетической ретинопатией [127]. Национальное исследование здоровья и питания (NHANES) показало, что Cys-C может быть лучшим предиктором ДР по сравнению с креатинином, что, вероятно, обусловлено участием данного белка в патогенетических механизмах развития ретинопатии, однако эти механизмы остаются не понятыми до конца. Cys-C являясь ингибитором всех папаин-подобных протеаз участвует в различных физиологических процессах, в том числе и в регуляции иммунного ответа за счет того, что может способствовать протеолитическому процессингу програнзимов и других субстратов в иммунных клетках, презентации антигена МНС-II, созреванию дендритных клеток, [160], экспрессии костимулирующих молекул [176].

При «преддиабете» содержание триптофана не отличалась от контроля, однако уровни метаболитов были выше: кинуренина – на 71,1%, 3-гидроксикинуренина – на 25,2%, кинуреновой кислоты – на 49,4%, L-5-гидрокситриптофана – на 66,1%.

Таким образом изменения в метаболизме триптофана, субклиническое воспаление, нарушения регуляции иммунитета и активности протеаз, достаточно выражены уже на стадии «преддиабета» и, вероятно, способны осуществлять роль триггера в возникновении эндотелиальной дисфункции, а в последующем являться связующими звеньями в развитии патологических процессов при ДР.

У пациентов с СД 2 типа значения многих показателей были достоверно выше, даже чем у лиц с «преддиабетом»: NGAL – на 86,7%, MRP8/14 – на 29,2%, MPO – на 121,3%, CTLA-4 – на 28,7%, LAG-3 – на 454,1%, Tim-3 – на 120,2 %, PD-L1 – на 28,6%, Galectin-9 – на 28,7%, Cystatin C – на 30,8%, KYN – 18,7%, 3-НКYN – на 8,3%, L-5-гидрокситриптофана – на 49,5%. Полученные данные свидетельствуют о еще большем усугублении воспаления, иммунной дисфункции и нарушениях метаболизма белков (Cystatin C как индикатор процесса протеолиза) и аминокислот, в частности триптофана.

Безусловно, эндотелий сосудов является первой мишенью инсулина в организме. Аналогично эндотелий является первой мишенью активных форм кислорода и карбонильных продуктов метаболизма глюкозы и жирных кислот, образующихся в результате окислительного и карбонильного стресса при пищевой перегрузке и СД 2 типа. Вместе с тем на данный момент не вполне изучены, какие еще изменения происходят в эндотелии, и как провоцируется развитие и прогрессирование сосудистых осложнений сахарного диабета.

Согласно современным представлениям, низкоуровневое системное воспаление запускает процесс иммунного ответа, что приводит к активации цитокинов, Т-лимфоцитов и дальнейшему усугублению эндотелиальной дисфункции. Среди провоспалительных цитокинов особое значение придают интерлейкину-6 и интерферону- γ , которые рассматривают как медиаторы и индукторы кинуренинового пути метаболизма триптофана [52]. При этом

продукты катаболизма TRP, такие как кинуренин, выступают в роли регуляторов иммунных реакций, способствующих дифференцировке регуляторных Т-клеток.

В физиологических условиях в конце кинуренинового пути из TRP происходит образование NAD⁺, следовательно, TRP опосредованно, через данный кофермент способен влиять на клеточный энергетический баланс, на углеводный и липидный обмены [52, 144]. Вместе с тем накопление промежуточных продуктов кинуренинового пути при «преддиабете», СД и ДР способствует снижению концентрации NAD⁺. С другой стороны, роль остальных метаболитов основного пути деградации аминокислоты в развитии и прогрессировании сосудистых заболеваний, в том числе и ДР, далеко не изучена. Однако есть предположения, что некоторые метаболиты КП (кинуренин, ксантуреновая кислота) могут способствовать регуляции сосудистого тонуса, особенно при воспалении [172]. Ассоциация метаболитов КП и системного воспалительного ответа была продемонстрирована в исследовании Farouk A. и соавт. (2022) при операции аортокоронарного шунтирования [122]. Исследователями отмечено повышение интраоперационных уровней кинуренина, IL-6 и лейкоцитов в плазме крови, но снижение отношения TRP:кинуренин. Также выявлены положительная корреляция лейкоцитов с IL-6 и отрицательная корреляционная связь с отношением TRP:кинуренин [122].

В исследовании, проведенном нами, было выявлено, что группе пациенты с ДР уровень триптофана и KYN в крови превышал контрольные значения. У этих же больных зафиксирован рост содержания 3-НКYN и KYNA по сравнению с группой больных СД без осложнений. Значения 5HTp у больных с ДР тоже были выше чем в при СД без осложнений.

Причем в группе больных с непролиферативной стадией лишь значения 3НКYN превышали таковые группы с СД. А в препролиферативную стадию отличался от группы сравнения уровень триптофана и концентрации 3НКYN и KYNA. При пролиферативной стадии ДР значения как кинуренинов, так и L-5-гидрокситриптофана были максимально высокими (с достоверной разницей с группами пациентов с непролиферативной и препролиферативной стадиями).

Более того нами выявлено множество корреляционных связей между значениями метаболитов кинуренинового пути обмена триптофана и содержанием белков, являющихся маркерами воспаления, эндотелиальной дисфункции, контрольными точками иммунитета, обнаружена сопряженность метаболических и клинических изменений, интенсивность которых в изучаемых группах была неоднородной.

Полученные нами результаты в некотором роде согласуются с похожими клиническими исследованиями [95; 122]. Так, в исследовании Wirleitner В. с соавт. было продемонстрировано повышение концентрации кинуренина в крови у пациентов с ИБС [95]. В другом многоцентровом рандомизированном исследовании PREDIMED была показана прогностическая роль кинурениновой кислоты в отношении развития сердечно-сосудистых событий (инфаркт миокарда или любая другая причина сосудистой смерти) у пациентов с высоким риском сердечно-сосудистых заболеваний [52].

В отличие от проведенных исследований мы изучали уровни метаболитов, связанных с катаболизмом триптофана на стадии «преддиабет» а также на разных этапах ДР, показав, что первые изменения происходят уже на ранней стадии доклинического проявления ретинопатии и усугубляются по мере прогрессирования.

Кроме того, в проведенном нами исследовании у пациентов с ДР в сыворотке крови был зафиксирован максимально высокий уровень изученных маркеров воспаления, значения которых превышали таковые у больных СД без осложнений – начиная с непролиферативной стадии концентрации SAA, MRP8/14 и MPO, а при пролиферативной стадии также – NGAL. С учетом полученных результатов и литературных данных на рисунке 12 представлено наше представление об участии перечисленных молекул в развитии ретинопатии.

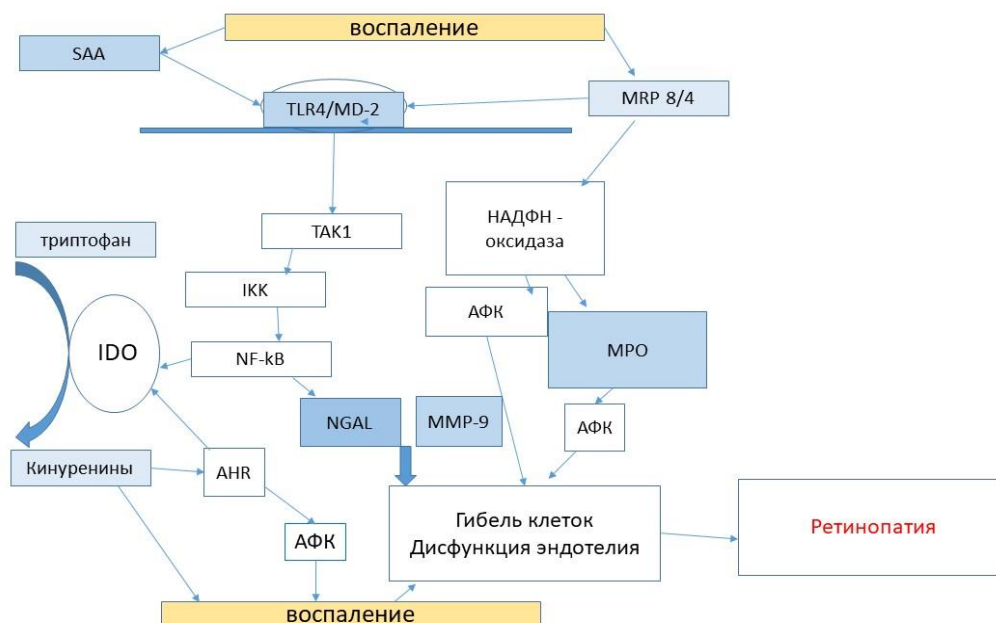


Рисунок 12 – Взаимосвязь маркеров воспаления и кинуренинов, их роль в развитии ретинопатии

Также нами выявлено еще большее увеличение уровня растворимых костимулирующих и коингибирующих молекул в сыворотке крови у больных ДР, особенно в пролиферативной стадии заболевания.

Следует подчеркнуть, что в группе пациентов с ДР значения молекул адгезии были статистически значимо выше контроля, выше чем у лиц с «преддиабетом», а также выше, чем у пациентов с СД без осложнений.

Повышение адгезивности сосудистой стенки имеет огромное значение в формировании эндотелиальной дисфункции при воспалении. Известно, что на эндотелии в норме экспрессия молекул межклеточной адгезии отсутствует, а при развитии эндотелиальной дисфункции в сыворотке крови повышается концентрация ICAM-1 и VCAM-1 [12]. Растворимая форма ICAM-1 – (sICAM-1) образуется в результате протеолитического расщепления мембранной формы ICAM-1.

Эндотелиальные клетки метаболически активны и обладают множеством функций, необходимых для поддержания гомеостаза сосудов в физиологических

условиях [56]. Функции эндотелия включают в себя регулирование целостности сосудов и их проницаемости, ангиогенеза, гемостаза. Эндотелий участвует в иммунных реакциях, играет ключевую роль в регуляции тонуса сосудов, воспалительных реакциях и др. [8]. Эндотелий поддерживает баланс между вазодилатацией и вазоконстрикцией, ингибированием и стимулированием миграции и пролиферации клеток гладких мышц, фибринолизом и тромбообразованием, а также участвует в регуляции адгезии и агрегации тромбоцитов [7]. Нарушение этого регулируемого равновесия приводит к эндотелиальной дисфункции [44]. Молекулы ICAM-1 контролируют адгезию лейкоцитов к поверхности эндотелия, формирование иммунного воспаления и развитие васкулопатии. Также ICAM-1 играет важную роль в формировании контакта тромбоцитов с поврежденным эндотелием и способствует тем самым повышенному тромбообразованию [8].

Интересным на наш взгляд является обнаруженный факт, увеличения уровня cystatin C и тенденции к росту содержания MMP-2 начиная с непролиферативной стадии ДР относительно пациентов с СД без осложнений, а с препролиферативной стадии ДР - роста значений MMP-9 и MMP-2.

При препролиферативной стадии наблюдалось достоверное увеличение в крови MMP-2 на 87,9% ($p=0,030$) и MMP-9 – на 37,3% ($p=0,049$) относительно группы СД. В пролиферативную стадию заболевания уровни MMP-9 и MMP-2 выросли и статистически значимо превышали таковые у лиц не только группы с СД без осложнений, но групп с непролиферативной и препролиферативной стадией заболевания.

Поскольку диабетическая ретинопатия относится к микрососудистым осложнениям сахарного диабета, то важную роль в её патогенезе играет нарушение структуры базальной мембраны (БМ) эндотелия сосудов. Один из механизмов повреждения данной структуры может быть связан с тем, что биополимеры, образующие базальную мембрану (коллаген IV типа, фибронектин, ламинин и перлкан, гепарансульфат-протеогликан) вследствие хронической гипергликемии подвергаются гликированию, приводящему к её уплотнению и

необратимому утолщению [56; 130]. В норме БМ способствует сохранению избирательной проницаемости капилляров сетчатки и частично регулирует кровоток за счет сокращения и расслабления перицитов. В условиях гипергликемии при повышении жесткости БМ, может измениться эластичность сосудов, что ослабит способность перицитов регулировать кровоток сетчатки. Возникающая при этом гипоксия сетчатки, приводит к повышению уровня проангиогенных факторов роста, в том числе активирует транскрипцию VEGF. Связывание проангиогенных факторов роста с рецепторами, находящимися на эндотелиальных клетках сосудов, приводит к активации этих клеток, результатом чего является увеличение экспрессии молекул, необходимых для ангиогенеза, в том числе MMP [104; 121].

При активации эндотелиальных клеток микрососудов сетчатки человека усиленно продуцируются MMP-2 и MMP-9, поэтому на более поздних стадиях ДР повышенная локальная активность MMP-2 и MMP-9, продемонстрированная в том числе и в нашей работе, способствует прорастанию эндотелиальных клеток при ДР [23; 104; 121].

Неконтролируемая неоваскуляризация является отличительной чертой пролиферативной диабетической ретинопатии. Инициация неоваскуляризации включает сложное взаимодействие нескольких факторов, ферментов и локальное растворение сосудистой БМ. MMP-2, MMP-9 участвуют в локальной деградации БМ, позволяя эндотелиальным клеткам начать прорасти. По мере того, как клетки пролиферируют, мигрируют и синтезируют коллаген IV, другие молекулы высокоорганизованным образом собираются на каркасе коллагена, что в конечном итоге приводит к развитию зрелого базального матрикса. Одновременно клетки продолжают мигрировать к месту ангиогенеза и способствуют расширению и формированию новососудов [141].

Дисфункция эндотелия нарушает транспорт веществ в перициты и обратный транспорт продуктов обмена, что приводит к накоплению цитотоксических метаболитов в цитозоле и гибели клеток. Кроме того, повреждение эндотелия стимулирует тромбообразование. Тромбоциты выделяют

воспалительные цитокины, вызывая хемотаксис лейкоцитов, которые, в свою очередь, индуцируют апоптоз эндотелиоцитов. Свободные радикалы и продукты перекисного окисления липидов увеличивают ригидность мембран эритроцитов, снижают их способность к деформации, что приводит к задержке форменных элементов в микроциркуляторном русле [45].

Неферментативное гликирование биополимеров БМ изменяет её антигенные свойства. Последнее может приводить к разрушению БМ клетками микроглии. Также возможна деструкция ее элементов активными формами кислорода [103].

Такие дефекты, даже локальные, являются крайне важными, так как, во-первых, нарушают взаимодействие эндотелиальных клеток с матриксными белками и гликозаминогликанами, во-вторых, вызывают нарушение контактов между соседними эндотелиоцитами. Результатом описанных изменений является воспалительная реакция [23; 130]. Локальное воспаление приводит к соответствующим изменениям метаболизма эффекторных клеток. Происходит активация эндотелиоцитов, перицитов, клеток Мюллера, микроглии с выделением большого количества цитокинов, факторов роста, нейромедиаторов. При этом ответ клеток на цитокины определяется состоянием внутриклеточных сигнальных путей, в частности JAK/STAT, MAPK/SAPK, и ядерного фактора транскрипции (NF-κB) [8; 11; 87].

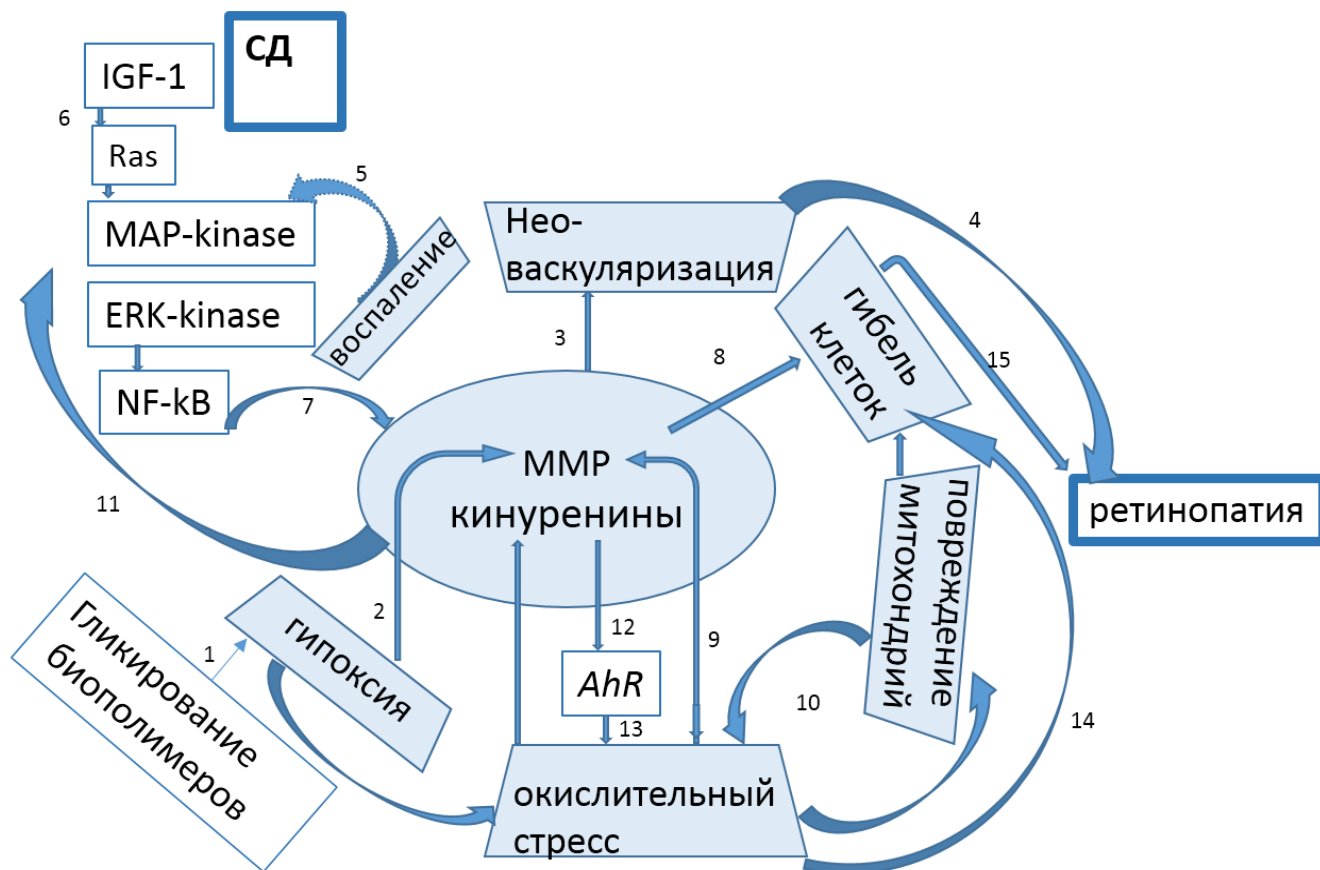
Состояние нарушения толерантности к глюкозе и ранний СД 2 типа, как уже было отмечено выше, характеризуются инсулинорезистентностью и гиперинсулинемией. Хроническая гиперинсулинемия связана с повышенным уровнем циркулирующего IGF-1 [48]. Известно, что IGF-1, способствует пролиферации клеток через каскад Ras/Raf/MEK/ERK [128]. В патогенезе диабетической ретинопатии каскад Ras-Raf-MEK-ERK отвечает за активацию MMP-9 в сетчатке, что, кроме всего прочего, приводит к апоптозу ее капиллярных клеток [170]. MMP регулируются митохондриальным окислительным стрессом, и, напротив, индукция MMP приводит к нарушению функции митохондрий, замыкая порочный круг повреждения митохондрий и активации MMP [104].

Метаболизм триптофана (Trp) или кинурениновый путь (КП) является основным путем деградации Trp в большинстве клеток млекопитающих. КП генерирует несколько биоактивных метаболитов, включая кинуренин, кинуреновую кислоту и 3-гидроксикинуренин. В зависимости от типа клеток, эти метаболиты могут оказывать как гипер-, так и противовоспалительное действие. Например, литературные данные указывают на то, что накопление 3-гидроксиантраниловой кислоты (3-НАА), образующейся в КП способствует воспалительному процессу при развитии сосудистых заболеваний, особенно атеросклероза [170].

По данным Li Y. и соавт. (2014) кинуренин (Kyn) заметно повышает активность экспрессии MMP-1 и MMP-3 за счет активации митоген-активируемой протеинкиназы (MAP-киназы), регулируемой сигналами ERK1. С другой стороны, Kyn подавляет экспрессию коллагена I типа в фибробластах [111].

Замедление скорости процесса на определенном этапе вызывает дефицит никотинамидадениндинуклеотидфосфата ($\text{NADPH} + \text{H}^+$) – кофермента антиоксидантной защиты и накопление промежуточных метаболитов – кинуренинов [139], которые могут вызывать изменения в многочисленных сигнальных механизмах посредством активации арилуглеводородного рецептора (AhR), функционирующего в качестве фактора транскрипции, а также инициирующего образование активных форм кислорода [115]. Некоторые производные кинуренина (KYN) сами способны провоцировать окислительный стресс [105, 6]. Супероксид может ускорить процесс апоптоза в эндотелиальных клетках, приводя к эндотелиальной дисфункции [103; 112].

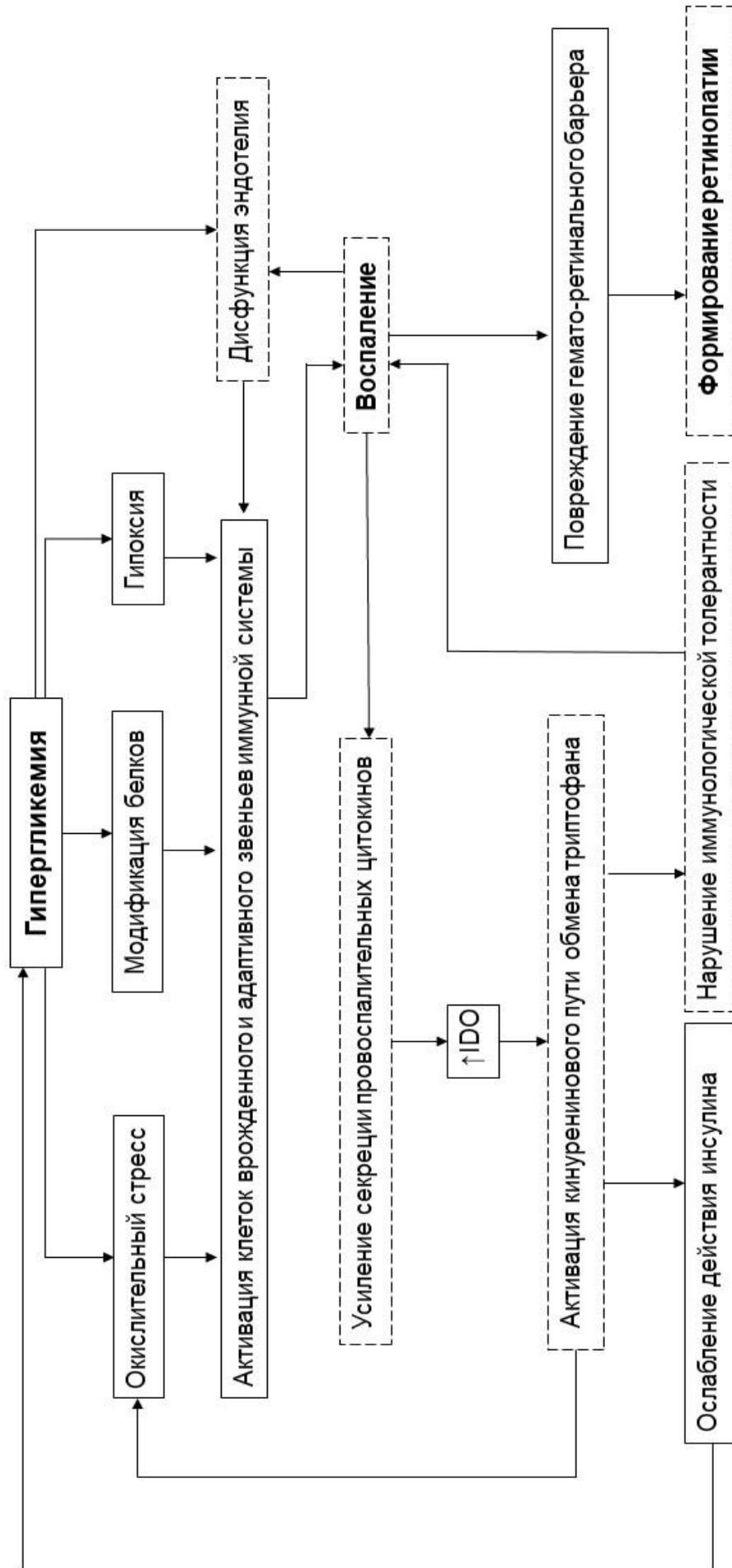
Установлено, что в ходе развития диабетической ретинопатии клетки сетчатки, капиллярные, ганглиозные клетки, клетки Мюллера подвергаются ускоренному апоптозу, что предшествует появлению микрососудистой гистопатологии, характерной для диабетической ретинопатии [104]. К апоптозу клеток могут быть причастны как нарушения в кинурениновом пути обмена триптофана, так и в системе металлопротеиназ.



Примечание: при СД повышается скорость гликирования различных биополимеров (1), в том числе гемоглобина. Гипоксия сетчатки сопровождается гиперпродукцией матричных металлопротеиназ (ММР) (2), участвующих в неоваскуляризации (3), характерной для пролиферативной диабетической ретинопатии (ДР) (4). Воспалительные цитокины иницируют сигнальные пути (5), в частности через mitogen-activated protein kinase митоген-активируемую протеинкиназу (МАР-киназу) и ядерный фактор транскрипции (NF-κB). Кроме того, хроническая гиперинсулинемия стимулирует повышение уровня циркулирующего IGF-1, запускающего каскад Ras/Raf/MAPk/ERK. Данный механизм приводит к активации ММР-9 в сетчатке (7) и к гибели клеток (8). Индукция ММР регулируется продуктами свободнорадикального окисления (9), с последующим нарушением функции митохондрий, замыкая порочный круг повреждения митохондрий и активации ММР (10). Кинуренины повышают скорость экспрессии ММР за счет активации МАР-киназы (11). Кинуренины вызывают изменения в многочисленных сигнальных механизмах посредством активации арилуглеводородного рецептора (AhR) (12), функционирующего в качестве фактора транскрипции, а также иницирующего образование активных форм кислорода (13). Некоторые производные кинуренина сами провоцируют окислительный стресс (13). Окислительный стресс ускоряет гибель клеток (14), приводя к диабетической ретинопатии (15).

Заключение

Таким образом, выявленные изменения в изучаемых параметрах, обнаруженные корреляционные связи между кинуренинами и другими показателями у пациентов (рис. 7) свидетельствуют о том, что гиперликемия, неконтролируемая в течение длительного периода времени, вызывает нарушение регуляции многих метаболических путей в сетчатке глаза, в том числе и в обмене триптофана. Воспаление, нарушение регуляции иммунитета, эндотелиальная дисфункция, активация ММР, гипоксическое влияние и накопление промежуточных продуктов метаболизма кинуренинового пути способствует прогрессирующему нервно-сосудистому поражению сетчатки. Полученные нами данные могут быть использованы для разработки лабораторных критериев ранней диагностики развития ДР, в которых можно учитывать изменения в кинурениновом пути обмена триптофана. Дальнейшие исследования этих изменений могут стать основой для новых способов профилактики возникновения микроангиопатий при СД. Учитывая результаты, полученные нами в ходе исследования, а также литературные данные, механизм развития диабетической ретинопатии представлен в схеме, отраженной на рисунке 14.



Собственные данные выделены пунктиром

Рисунок 14. Патогенетические механизмы развития диабетической ретинопатии, реализованные метаболитами кинуренинового пути обмена триптофана

ВЫВОДЫ

1. Нарушение обмена углеводов сопровождается активацией кинуренинового пути обмена триптофана и увеличением по мере формирования сосудистых осложнений сахарного диабета 2 типа концентрации кинуренина (0,97 мкмоль/л в группе здоровых лиц, 1,66 – «преддиабет», 1,97 – сахарный диабет без осложнений, 2,01 – диабетическая ретинопатия, $H=44,55$, $p<0,001$), 3-гидроксикинуренина (11,5, 14,4, 15,6, 19,7 мкмоль/л соответственно, $H=52,52$, $p<0,001$), кинуреновой кислоты (39,9, 59,6, 60,6, 80,01 мкмоль/л соответственно, $H=46,26$, $p<0,001$).
2. Динамика уровня метаболитов кинуренинового пути обмена триптофана взаимосвязана с увеличением концентрации маркеров воспаления (нейтрофильной желатиназой, кальпротектином, миелопероксидазой, сывороточным амилоидом) и усугублением нарушений углеводного обмена.
3. Диабетическая ретинопатия сопровождается повышением концентрации растворимых костимулирующих (B7.2 (CD 86), 4-1BB), коингибирующих молекул и их рецепторов (CTLA-4, LAG-3, Tim-3, PD-1, PD-L1, Galectin-9) в сыворотке крови независимо от стадии ретинопатии.
4. Нарушение обмена углеводов сопровождается изменением концентраций металлопротеиназ и цистатина С: у лиц «преддиабетом» – снижение содержания MMP-2 на 17,1% ($p=0,04$) и увеличение уровня ингибитора протеаз (cystatin C) на 34,5% ($p=0,02$); при сахарном диабете 2 типа без сосудистых осложнений – повышение MMP-9 на 96,1% ($p<0,001$) и cystatina C на 75,9% ($p<0,001$) относительно контроля, при препролиферативной стадии диабетической ретинопатии – увеличение MMP-9 на 37,3% ($p=0,002$), MMP-2 – на 79,0% ($p=0,010$), cystatina C – на 293,6% ($p<0,001$) относительно пациентов с сахарным диабетом без осложнений.

5. При диабетической ретинопатии регистрируется повышение уровня молекул адгезии: при непролиферативной стадии – рост концентрации ICAM-1 в 1,3 раза по сравнению с группой пациентов с сахарным диабетом ($p=0,041$), при препролиферативной и пролиферативной – ICAM-1 в 1,9 раз ($p=0,04$) и 3,9 ($p=0,009$) соответственно и VCAM-1 – в 1,7 раз ($p=0,03$) и в 2 раза ($p=0,001$) соответственно.

6. Увеличение концентрации кинуренинов сопровождается нарушением баланса между регуляторными и провоспалительными реакциями иммунной системы, прогрессированием эндотелиальной дисфункции и усугублением клинических проявлений диабетической ретинопатии у больных сахарным диабетом 2 типа.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в проведении дополнительных исследований по изучению метаболических изменений, происходящих в эндотелии сосудов сетчатки и периоцитах (объектом исследования может стать слезная и внутриглазная жидкости) в том числе и при сахарном диабете 1 типа, для разработки персонифицированных подходов к профилактике и лечению диабетической ретинопатии, создании биохимических критериев для прогнозирования риска её развития, а также для обоснования ранней коррекции нарушений обмена триптофана.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДР – диабетическая ретинопатия

КП – кинурениновый путь

СД – сахарный диабет

PKC - протеинкиназа C

3-НК – 3-гидроксикинуренин

5-HIAA – 5-гидроксииндолуксусная кислота

5-НТР – 5-гидрокситриптофан

5-НТ – 5-гидрокситриптамин (серотонин),

AADC – декарбоксилаза ароматических L-аминокислот

AFM – арилформамидаза

ANA – антраниловая кислота, 3-НАА – 3-гидроксиантраниловая кислота, ACMS – 2-амино-3-карбоксимуконат семиальдегид

B7.2 (CD86) – мембранный белок суперсемейства иммуноглобулинов B7, продукт гена *CD86*

CD – (cluster of differentiation) кластер дифференциации

Cys-C – ингибитор цистеиновых протеаз цистатин C

CTLA-4 – (cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) цитотоксический T-лимфоцит-ассоциированный белок 4

Free Active TGF- β 1 – (free active transforming growth factor) свободная фракция трансформирующего ростового фактора бета-1

НААО – 3-гидроксиантранилат диоксигеназа

ICAM-1 – (inter-cellular adhesion molecule) молекула межклеточной адгезии 1

IDO – индоламин 2,3-диоксигеназа,

IL – (interleukin) интерлейкин

КАТ – кинуренин аминотрансфераза,

KMO – кинуренин 3-монооксигеназа

KYN – кинуренин

KYNA – кинуреновая кислота,

LOD – (Limit of detection) предел обнаружения

LOQ – (Limit of Quantitation) предел количественного определения

Lag-3 – (lymphocyteactivation gene 3) белок гена активации лимфоцитов-3

LPS – (lipopolysaccharide) липополисахарид

MEL – мелатонин

MMP – (matrix metalloproteinases) матриксные металлопротеиназы

NAD – никотинамидадениндинуклеотид;

NFK – N-формилкинуренин,

NF-kB – (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) ядерный фактор каппа

PD-1 – (programmed cell death 1) белок запрограммированной смерти клеток 1

PD-L1 – лиганд белка запрограммированной смерти клеток 1

PIC – пиколиновая кислота

QPRT – хинолинат фосфорибозилтрансфераза.

QUIN – хинолиновая кислота

TDO – триптофан 2,3-диоксигеназа,

TH – триптофангидроксилаза,

Tim-3 (T-cell immunoglobulin mucin-3) белок Т клеточного иммуноглобулина и муцинового домена-3

TRP – триптофан

XAN – ксантуреновая кислота

SAA (amyloid A protein) сывороточный амилоидный белок А

MPO – (myeloperoxidase) миелопероксидаза

MRP8/14 – кальпротектин 8/14

NGAL – (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов

VCAM-1 – (vascular Cell Adhesion Molecule 1) васкулярная молекула клеточной адгезии 1

4-1BB (TNFRSF9) – (tumor necrosis factor receptor superfamily member 9 (TNFRSF9)) член 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Абдуллина Д.А. Особенности лабораторных исследований диабетической ретинопатии на ранних стадиях (обзор литературы) / Д.А. Абдуллина, А.В. Балмуханова, Э.Г. Канафьянова // Вестник КазНМУ. – 2020. – № 2–1. – С. 389–392.
2. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, А.Ю. Майоров [и др.]. – DOI 10.14341/DM221S1 // Сахарный диабет. – 2019. – Т. 22, № 1-1. – С. 1–144.
3. Бадимова А.В. Медико-социальные, экономические и организационные аспекты диспансерного наблюдения пациентов с офтальмологическими заболеваниями в субъекте Российской Федерации специальность 3.2.3 «Общественное здоровье, организация и социология здравоохранения» автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Бадимова Анна Вячеславовна; Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова. – Москва, 2022. – 24 с.
4. Биомаркеры диабетической ретинопатии / М.В. Будзинская, Д.В. Липатов, В.Г. Павлов, Д.В. Петрачков. – DOI 10.14341/DM10045 // Сахарный диабет. – 2020. – Т. 23, № 1. – С. 88–94.
5. Величко П.Б. Медико-социальные аспекты сахарного диабета и диабетической ретинопатии / П.Б. Величко, Э.М. Османов, Р.Р. Маньяков // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2017. – Т. 13, № 3. – С. 453–457.
6. Взаимосвязи между молекулами, отражающими нарушения клеточного дыхания, степень окислительного стресса, и гликированным гемоглобином при ретинопатии на фоне сахарного диабета 2 типа / Е.В. Фефелова, М.В. Максименя, О.А. Саклакова [и др.]. – DOI 10.36604/1998-5029-2024-91-77-83 // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2024. – № 91. – С. 77–83.

7. Власова Т.И. Дисфункция эндотелия как типовое патологическое состояние / Т.И. Власова, Н.Н. Петрищев, Т.Д. Власов. – DOI 10.24884/1682-6655-2022-21-2-4-15 // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2022. – Т. 21, № 2 (82). – С. 4–15.
8. Власова Т.И. Эндотелий и старение: механизмы формирования сенесцентного фенотипа эндотелиальных клеток / Т.И. Власова, Н.Н. Петрищев, Т.Д. Власов. – DOI 10.24884/1682-6655-2023-22-3-19-33 // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2023. – Т. 22, № 3 (87). – С. 19–33.
9. Влияние галектина-9 на экспрессию молекулы Tim-3 в разных субпопуляциях натуральных киллеров / Е.Г. Орлова, О.А. Логинова, О.Л. Горбунова, С.В. Ширшев. – DOI 10.15789/1563-0625-GIT-2778 // Медицинская иммунология. – 2023. – Т. 25, № 3. – С. 469–476.
10. Влияние некоторых D-металлов на образование конечных продуктов гликирования, агрегацию и амилоидную трансформацию альбумина в реакции гликирования / Р.А. Литвинов, А.В. Гонтарева, Л.Э. Усмиянова, Д.Р. Клименко. – DOI 10.19163/2307-9266-2021-9-4-306-317 // Фармация и фармакология. – 2021. – Т. 9, № 4. – С. 306–317.
11. Воспалительные цитокины и сигнальные системы мононуклеарных клеток периферической крови при ишемической болезни сердца / А.В. Логаткина, В.С. Никифоров, С.С. Бондарь, И.В. Терехов. – DOI 10.18821/0023-2149-2017-95-3-238-244 // Клиническая медицина. – 2017. – № 3. – С. 238–244.
12. Григоренко Е.А. Дисфункция эндотелия как фактор риска ишемической болезни сердца у реципиентов трансплантата печени / Е.А. Григоренко, Н.П. Митьковская, О.О. Руммо. – DOI 10.31550/1727-2378-2020-19-5-30-34 // Доктор.Ру. – 2020. – Т. 19, № 5. – С. 30–34.
13. Демидова Т.Ю. Диабетическая ретинопатия: история, современные подходы к ведению, перспективные взгляды на профилактику и лечение / Т.Ю. Демидова, А.А. Кожевников. – DOI 10.14341/DM10273 // Сахарный диабет. – 2020. – Т. 23, № 1. – С. 95–105.

14. Демин Ю.А. Характер нарушения иммунного гомеостаза у больных простыми диабетическими ретинопатиями / Ю.А. Демин, Н.Н. Попов, Е.А. Романова // Вестник ХНУ им. В.Н. Каразина. Серия Медицина. – 2001. – № 2. – С. 523.
15. Диабетическая ретинопатия: возможности и перспективы ретинопротекции / А.В. Малышев, С.В. Янченко, Е.Н. Саверская [и др.]. – DOI 10.18008/1816-5095-2024-2-256-263 // Офтальмология. – 2024. – Т. 21, № 2. – С. 256–263.
16. Диспансерное наблюдение пациентов с предиабетом врачом-терапевтом в первичном звене здравоохранения / Драпкина О.М., Мокрышева Н.Г., Шестакова М.В., Лавренова Е.А. и др.- М.: ФГБУ «НМИЦ ТПМ» Минздрава России, 2024 г., 38 с. ISBN: 978-5-6052598-2-4.
17. Изменения уровней некоторых метаболитов триптофана в крови пациентов с сахарным диабетом 2-го типа, осложненного диабетической ретинопатией / О.А. Саклакова, М.В. Максименя, Е.В. Фефелова [и др.]. – DOI 10.29001/2073-8552-2024-39-1-135-139 // Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины. – 2024. – Т. 39, № 1. – С. 135–139.
18. Индуцированная IFN γ продукция кинуренина и экспрессия гена индоламин 2,3-диоксигеназы при псориазе / Д.А. Каут, Р.С. Ямиданов, С.В. Садовников [и др.]. – DOI 10.15789/1563-0625-2009-2-3-147-152 // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11, № 2-3. – С.147–152.
19. К вопросу о классификации диабетической ретинопатии / М.В. Будзинская, Д.В. Петрачков, О.А. Савочкина, Д.Д. Аржуханов. – DOI 10.17116/oftalma2019135052272 // Вестник офтальмологии. – 2019. – Т. 135, № 5. – С. 272–277.
20. Каландия М.М. Роль конечных продуктов гликирования в развитии и прогрессировании диабетической нейроостеоартропатии / М.М. Каландия, А.Ю. Токмакова, Г.Р. Галстяню. – DOI 10.14341/probl12778 // Проблемы эндокринологии. – 2021. – Т. 67, № 3. – С. 4–9.

21. Козлов В.А. Триптофан и indoleamine-2,3-dioxygenase (ido) в патогенезе иммунокомпрометированных заболеваний / В.А. Козлов, Д.В. Демина // Медицинская иммунология. – 2017. – № 3. – С. 225–240.
22. Липинский Д.А. Научное обоснование мероприятий по совершенствованию оказания офтальмологических услуг в платных медицинских организациях (по материалам Республики Татарстан) : специальность 14.02.03 "Общественное здоровье и здравоохранение" : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Липинский Дмитрий Андреевич. – Казань, 2015. – 22 с.
23. Маркелова Е.В. Сывороточный уровень цитокинов у пациентов с нейродегенерацией сетчатки при диабетической ретинопатии на фоне сахарного диабета II типа / Е.В. Маркелова, М.П. Ручкин, Г.А. Федяшев. – DOI 10.17816/CI2022221-4-6 // Цитокины и воспаление. – 2022. – Т. 19, № 1-4. – С. 34–37.
24. Маркеры воспаления и инфекция кровотока (обзор литературы) / Н.М. Каргальцева, В.И. Кочеровец, А.Ю. Миронов [и др.]. – DOI 10.18821/0869-2084-2019-64-7-435-442 // Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – № 7. – С. 435–442.
25. Маркеры пролиферативной диабетической ретинопатии / В.А. Билецкая, Д.В. Липатов, И.Ю. Саяпина [и др.]. – DOI 10.18008/1816-5095-2022-3-557-564 // Офтальмология. – 2022. – Т. 19, № 3. – С. 557–564.
26. Мартусевич Я.А. Диабетическая ретинопатия и её социальная значимость (обзор литературы) / Я.А. Мартусевич, О.С. Кобякова, В.В. Люцко. – DOI 10.24412/2312-2935-2023-3-877-902 // Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики. – 2023. – № 3. – С. 877–902.
27. Матриксные металлопротеиназы в прогнозировании непролиферативной диабетической ретинопатии в пожилом возрасте / О.Л. Фабрикантов, И.В. Лев, Н.М. Агарков, Р.Э. Османов. – DOI 10.18008/1816-5095-2022-4-803-807 // Офтальмология. – 2022. – Т. 19, № 4. – С. 803–807.

28. Мейрамов Г.Г. О диабетогенном действии ксантуреновой кислоты / Г.Г. Мейрамов, К.Д. Конерт, А.Г. Мейрамова. – DOI 10.14341/probl11316 // Проблемы эндокринологии. – 2001. – Т. 47, № 1. – С. 39–44.
29. Метаболиты кинуренинового пути обмена триптофана в развитии ангиопатий при сахарном диабете / Е.В. Фефелова, О.А. Саклакова, М.В. Максименя [и др.]. – DOI 10.52485/19986173_2023_2_173 // Забайкальский медицинский вестник : электронное научное издание. – 2023. – № 2. – С. 173–189. – URL: <https://www.zabmedvestnik.ru/jour/article/view/181> (дата обращения: 19.03.2024).
30. Методы ранней диагностики и профилактики инвалидизирующих осложнений диабетической ретинопатии при сочетанном течении сахарного диабета 2-го типа и гипертонической болезни / Л.К. Мошетова, И.В. Воробьева, Д.Н. Гигинеишвили, Е.А. Нешкова // Медико-социальная экспертиза и реабилитация. – 2015. – № 2. – С.12–18.
31. Механизмы развития дисфункции эндотелия и методы патогенетической коррекции при сахарном диабете / С.Г. Дзугкоев, И.В. Можаяева, О.И. Маргиева, Ф.С. Дзугкоева // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2015. – № 4. (38). – С. 451–458.
32. Молекулы контроля иммунитета семейства B7. Часть 1. Общая характеристика и первые представители: B7-1, B7-2, B7-H1, B7-H2 и B7-DC / А.И. Шаповал, С.П. Шаповал, Н.С. Щербакова, Д.Н. Щербаков // Биоорганическая химия. – 2019. – Т. 45, № 4. – С. 348–364.
33. Молекулы контроля иммунитета семейства B7. Часть 2. Представители семейства B7: B7-H3, B7-H4, B7-H5, B7-H6, B7-H7 и ILDR2 и их рецепторы / А.И. Шаповал С.П. Шаповал, Н.С. Щербакова, Д.Н. Щербаков // Биоорганическая химия. – 2019. – Т. 45, № 5. – С. 472–487.
34. Мудров В.А. Алгоритм применения ROC-анализа в биомедицинских исследованиях с помощью пакета программ SPSS / В.А. Мудров. – DOI 10.52485/19986173_2021_1_148 // Забайкальский медицинский вестник :

электронное научное издание. – 2021. – № 1. – С. 148–153. – URL: <https://www.zabmedvestnik.ru/jour/article/view/63> (дата обращения: 20.03. 2024).

35. Мудров В.А. Алгоритмы статистического анализа количественных признаков в биомедицинских исследованиях с помощью пакета программ SPSS / В.А. Мудров. – DOI 10.52485/19986173_2020_1_140 // Забайкальский медицинский вестник : электронное научное издание. – 2020. – № 1. – С. 140–150. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=42736765> (дата обращения: 19.03. 2024).

36. Нероев В.В. Заболеваемость диабетической ретинопатией в Российской Федерации по данным федеральной статистики / В.В. Нероев, О.В. Зайцева, Л.А. Михайлова // Российский офтальмологический журнал. – 2018. – Т. 11, № 2. – С. 5–9.

37. Общие патогенетические аспекты развития диабетической ретинопатии и нефропатии. Трансплантация почки и течение диабетической ретинопатии / И.В. Воробьева, Л.К. Мошетова, А.В. Пинчук [и др.]. – DOI 10.32364/2311-7729-2021-21-2-90-95 // Клиническая офтальмология. – 2021. – Т. 21, № 2. – С. 90–95.

38. Петрачков Д.В. Биомаркеры диабетической ретинопатии, полученные при помощи оптической когерентной томографии в режиме ангиографии / Д.В. Петрачков, М.В. Будзинская. – DOI 10.17116/oftalma2020136042344 // Вестник офтальмологии. – 2020. – Т. 136, № 4. – С. 344–353.

39. Предиабет: распространенность, ассоциации с сердечно-сосудистыми факторами риска и вклад в выживаемость в российской популяции. / Ю.А.Баланова, С.А.Шальнова, А.Э. Имаева [и др.]. – DOI doi.org/10.15829/1728-8800-2024-4022 // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2024. – Т. 23, № 5. С. 34-44.

40. Предикторы ранних изменений сетчатки при сахарном диабете / В.С. Кулыбышева, И.А. Ронзина, А.А. Гамидов [и др.]. – DOI 10.18008/1816-5095-2020-1-88-95 // Офтальмология. – 2020. – Т. 17, № 1. – С. 88–95.

41. Распространенность нарушений углеводного обмена у лиц с различными сочетаниями факторов риска сахарного диабета 2 типа в когорте пациентов

- исследования NATION. / Е.А. Шестакова, Е.Ю. Лунина., Г.Р. Галстян [и др.]. – DOI 10.14341/DM12286. 4. // Сахарный диабет. – 2020. – Т. 23, № 1. – С. 4-11.
42. Роль биомаркеров нейродегенерации при диабетической ретинопатии / В.М. Филиппов, Д.В. Петрачков, М.В. Будзинская, А.Г. Матющенко // Вестник офтальмологии. – 2021. – Т. 137, № 5-2. – С. 314–322.
43. Роль молекул межклеточной адгезии (ICAM-1), адгезии сосудистых клеток (VCAM-1) и кальпротектина (MRP8/14) в патогенезе диабетической ретинопатии при сахарном диабете 2 типа / О.А. Саклакова, М.В. Максименя, Е.В. Фефелова [и др.]. – DOI 10.52485/19986173_2024_2_52 // Забайкальский медицинский вестник. – 2024. – № 2. – С. – 52-60. – URL: <https://www.zabmedvestnik.ru/jour/article/view/33> (дата обращения: 20.07.2024).
44. Роль сахарного диабета в возникновении и развитии эндотелиальной дисфункции / Э.Б. Попыхова, Т.В. Степанова, Д.Д. Лагутина [и др.]. – DOI 10.14341/probl12212 // Проблемы эндокринологии. – 2020. – Т. 66, № 1. – С. 47–55.
45. Роль сосудистых изменений при фотоиндуцированном поражении сетчатки / Е.Ю. Варакута, С.В. Логвинов, А.В. Потапов [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10-5. – С. 847–850. – URL: <https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=35750> (дата обращения: 08.12.2023).
46. Сахарный диабет 1 типа у взрослых / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, А.Ю. Майоров [и др.]. – DOI 10.14341/DM12505 // Сахарный диабет. – 2020. – Т. 23 (1S). – С. 42–114.
47. Сахарный диабет 2 типа и метаболический синдром: молекулярные механизмы, ключевые сигнальные пути и определение биомаркеров для новых лекарственных средств / И.И. Дедов, В.А. Ткачук, Н.Б. Гусев [и др.]. – DOI 10.14341/DM9730 // Сахарный диабет. – 2018. – Т. 21, № 5. – С. 364–375.
48. Сахарный диабет и онкопатология: система инсулиноподобных факторов роста / Е.М. Франциянц, Е.И. Сурикова, И.В. Каплиева [и др.]. – DOI 10.14341/probl12741 // Проблемы эндокринологии. – 2021. – Т. 67, № 5. – С. 34–42.
49. Современные концепции патогенеза диабетической ретинопатии / В.М. Филиппов, Д.В. Петрачков, М.В. Будзинская, А.Л. Сидамонидзе. – DOI

10.17116/oftalma2021137052306 // Вестник офтальмологии. – 2021. – Т. 137, № 5-2. – С. 306–313.

50. Современные подходы к выявлению доклинических признаков диабетической ретинопатии с помощью ОКТ-ангиографии / А.Н. Стулова, Н.С. Семенова, А.В. Железнякова [и др.] // Офтальмология. – 2022. – Т. 19, № 2. – С. 391–398.

51. Соловьев Н.В. Возможность фармакологической коррекции, NMDA-индуцированной эксайтотоксичности сетчатки производными 3-гидроксипиридина / Н.В. Соловьев. – DOI 10.25276/2312-4911-2023-2-64-70 // Современные технологии в офтальмологии. – 2023. – № 2. – С. 64.

52. Сравнительный анализ содержания триптофана и метаболитов кинуренинового и серотонинового путей у пациентов с артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца / М.В. Кожевникова, А.В. Кривова, Е.О. Коробкова [и др.]. – DOI 10.18087/cardio.2022.11.n2283 // Кардиология. – 2022. – Т. 62, № 11. – С. 40–48.

53. Ткачук В.А. Молекулярные механизмы развития резистентности к инсулину / В.А. Ткачук, А.В. Воротников. – DOI 10.14341/DM2014229-40 // Сахарный диабет. – 2014. – Т. 17, № 2. – С. 29–40.

54. Топтыгина А.П. Коингибирующие молекулы в норме и при патологии. Контрольные точки (CHECKPOINT) иммунорегуляции. Часть 1. Роль коингибирующих молекул в нормальном иммунном ответе, при аллергии и аутоиммунных заболеваниях // Российский иммунологический журнал. – 2017. – Т. 20, № 4. – С. 3–14.

55. Топтыгина А.П. Коингибирующие молекулы в норме и при патологии. Контрольные точки (CHECKPOINT) иммунорегуляции. Часть 2. Участие коингибирующих молекул в развитии инфекционной и онкологической патологии. Моноклональные антитела – блокаторы контрольных точек / А.П. Топтыгина. – DOI 10.7868/S102872211801001X // Российский иммунологический журнал. – 2018. – Т. 12, № 1. – С. 3–16.

56. Функциональные и биохимические изменения в центральной нервной системе и эндотелии сосудов при сахарном диабете 2-го типа и возможность их фармакологической коррекции / А.В. Симаненкова, О.С. Фукс, Н.В. Тимкина [и др.] // Клиническая патофизиология. – 2024. – Т. 30, № S2. – С. 109–110.
57. Цистатин С: взаимосвязь с некоторыми маркерами иммунитета, воспаления и его роль в прогрессировании диабетической ретинопатии у больных сахарным диабетом 2-го типа / О.А.Саклакова, Е.В.Фефелова, М.В. Максименя [и др.]. – DOI org/10.29001/2073-8552-2024-39-3-89-95 // Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины. – 2024. – Т. 39, №3. – Р. 89-95.
58. Шатова О.П. Метаболизм триптофана: новый взгляд на роль триптофановых производных в организме человека / О.П. Шатова, А.В. Шестопапов. – DOI 10.31857/S0042132423010076 // Успехи современной биологии. – 2023. – Т. 143, № 1. – С. 3–15.
59. Эпидемиологические характеристики сахарного диабета в Российской Федерации: клинико-статистический анализ по данным регистра сахарного диабета на 01.01.2021 / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, О.К. Викулова [и др.] // Сахарный диабет. – 2021. – Т. 24, № 3. – С. 204–221.
60. Эпидемиология диабетической ретинопатии в Российской Федерации по данным федерального регистра пациентов с сахарным диабетом (2013-2016 гг.) / Д.В. Липатов, О.К. Викулова, А.В. Железнякова [и др.] // Сахарный диабет. – 2018. – Т. 21, № 4. – С. 230–240.
61. A hypothesis from metabolomics analysis of diabetic retinopathy: Arginine-creatine metabolic pathway may be a new treatment strategy for diabetic retinopathy / Y. Sun, L. Kong, A.H. Zhang [et al.]. – DOI 10.3389/ fendo.2022.858012 // Front. Endocrinol. (Lausanne). – 2022. – Vol. 13. – P. 858012.
62. Abnormal kynurenine pathway of tryptophan catabolism in cardiovascular diseases / P. Song, T. Ramprasath, H. Wang, M.H. Zou. – DOI 10.1007/s00018-017-2504-2 // Cell Mol. Life Sci. – 2017. – Vol. 7, № 16. – P. 2899–2916.
63. Administration of Kynurenic Acid Reduces Hyperlipidemia-Induced Inflammation and Insulin Resistance in Skeletal Muscle and Adipocytes / T.W. Jung, J.

- Park, J.L. Sun [et al.]. – DOI 10.1016/j.mce.2020.110928 // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2020. – Vol. 518. – P. 110928.
64. AhR Regulates Peptidoglycan-Induced Inflammatory Gene Expression in Human Keratinocytes / L. Wang, B. Cheng, Q. Ju, B.K. Sun. – DOI 10.1159/000517627 // *J Innate Immun.* – 2022. – Vol. 14 (2). – P. 124–134.
65. Ala M. The Footprint of Kynurenine Pathway in Cardiovascular Diseases / M. Ala, S.P. Eftekhari. – DOI 10.1177/11786469221096643 // *Int. J. Tryptophan. Res.* – 2022. – Vol. 15. – URL: <https://journals.sagepub.com/doi/epub/10.1177/11786469221096643> (date accessed: 19.03. 2024).
66. Albert-Garay J.S. High glucose concentrations induce oxidative stress by inhibiting Nrf2 expression in rat Müller retinal cells in vitro / J.S. Albert-Garay, J.R. Riesgo-Escovar, R. Salceda. – DOI 10.1038/s41598-022-05284-x // *Sci. Rep.* – 2022. – Vol. 12. – P. 1261.
67. Alves L.F. The Biology and Biochemistry of Kynurenic Acid, a Potential Nutraceutical with Multiple Biological Effects. / L.F. Alves, J.B. Moore, D.B. Kell – DOI 10.3390/ijms25169082 // *Int. J. Mol. Sci.* – 2024. – V. 25, № 16. – P.9082.
68. An Emerging Cross-Species Marker for Organismal Health: Tryptophan-Kynurenine Pathway / L. Jamshed, A. Debnath, S. Jamshed [et al.]. – DOI 10.3390/ijms23116300 // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 11. – P. 6300.
69. An expanding range of targets for kynurenine metabolites of tryptophan / T.W. Stone, N. Stoy, L.G. Darlington. – DOI 10.1016/j.tips.2012.09.006 // *Trends Pharmacol Sci.* – 2013. – Vol. 34, № 2. – P. 136–143.
70. Aryl Hydrocarbon Receptor Is Activated by Glucose and Regulates the Thrombospondin-1 Gene Promoter in Endothelial Cells / P. Dabir, T.E. Marinic, I. Krukovets [et al.]. – DOI 10.1161/CIRCRESAHA.108.176990 // *Circ. Res.* – 2008. – Vol. 102. – P. 1558–1565.
71. Association between cystatin C and diabetic retinopathy among type 2 diabetic patients in China: a Meta-analysis / N. Yan, Y.F. Lu, X. Yang [et al.]. – DOI 10.18240/ijo.2021.09.21 // *Int. J. Ophthalmol.* – 2021. – Vol. 14, № 9. – P. 1430–1440.

72. Badawy A.A. Kynurenine pathway and human systems / A.A. Badawy. – DOI 10.1016/j.exger.2019.110770 // *Exp. Gerontol.* – 2020. – Vol. 129. – P. 110770.
73. Balasundaram M.K. Serum calprotectin: A marker for early diagnosis of diabetic peripheral neuropathy / M.K. Balasundaram, P.G. Sheth, A. Singh. – DOI 10.4103/jfmmpc.jfmmpc_891_21 // *J. Family. Med. Prim. Care.* – 2021. – Vol. 10 (11). – P. 4324–4325.
74. Boura-Halfon S. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance / S. Boura-Halfon, Y. Zick. – DOI 10.1152/ajpendo.90437.2008 // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2009. – Vol. 296, № 4. – P. 581–591.
75. Commentary: Recent concepts of pathophysiology and advancements in treatment strategies of diabetic retinopathy / A. Singh, I. Sharma, G.K. Das [et al.]. – DOI 10.4103/ijo.IJO_2606_21 // *Indian J. Ophthalmol.* – 2021. – Vol. 69, № 11. – P. 3050–3051.
76. Crosstalk between Tryptophan Metabolism via Kynurenine Pathway and Carbohydrate Metabolism in the Context of Cardio-Metabolic Risk-Review / M. Kiluk, J. Lewkowicz, D. Pawlak, A. Tankiewicz-Kwedlo. – DOI 10.3390/jcm10112484 // *J. Clin. Med.* – 2021. – Vol. 10 (11). – P. 2484.
77. Determination of Tryptophan and Its Major Metabolites in Fluid from the Anterior Chamber of the Eye in Diabetic Patients with Cataract by Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS/MS) / J. Flieger, A. Świąch-Zubilewicz, T. Śniegocki [et al.]. – DOI 10.3390/molecules23113012 // *Molecules.* – 2018. – Vol. 23 (11). – P. 3012.
78. Diabetes, Cardiovascular Disorders and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin Body Burden in Czech Patients 50 Years After the Intoxication / T. Pelcl, J. Skrha, M. Prazny [et al.]. – DOI 10.1111/bcpt.13013 // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* – 2018. – Vol. 123. – P. 356–359.
79. Diabetic Retinopathy: An Overview on Mechanisms, Pathophysiology and Pharmacotherapy / P. Ansari, N. Tabasumma, N.N. Snigdha [et al.]. – DOI 10.3390/diabetology3010011 // *Diabetology.* – 2022. – Vol. 3 (1). – P. 159–175.

80. Early diabetic eye damage: Comparing detection methods using diagnostic power / B.B. Rai, J.P. van Kleef, F. Sabeti [et al.]. – DOI 10.1016/j.survophthal.2023.09.002 // Survey of Ophthalmology. – 2024. – Vol. 69, Issue 1. 2024. – P. 24–33.
81. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Grading Diabetic Retinopathy from Stereoscopic Color Fundus Photographs – An Extension of the Modified Airlie House Classification: ETDRS Report Number 10 / Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. – DOI 10.1016/j.opthta.2020.01.030 // Ophthalmology. – 2020. – Vol. 127 (4S). – S99–S119.
82. Effect of acute TLR4 inhibition on insulin resistance in humans / H. Liang, N. Sathavarodom, C. Colmenares [et al.]. – DOI 10.1172/JCI162291 // J. Clin. Invest. – 2022. – Vol. 132 (21). – e162291.
83. Eizirik D.L. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus / D.L. Eizirik, A.K. Cardozo, M. Cnop. – DOI 10.1210/er.2007-001 // Endocr Rev. – 2008. – Vol. 29, № 1. – P. 42–61.
84. Endogenous Metabolite, Kynurenic Acid, Attenuates Nonalcoholic Fatty Liver Disease via AMPK/autophagy- and AMPK/ORP150-Mediated Signaling / D.H. Pyun, T.J. Kim, M.J. Kim [et al.]. – DOI 10.1002/jcp.30199 // J. Cell Physiol. – 2021. – Vol. 236, № 7. – P. 4902–4912.
85. Etzioni A. Genetic etiologies of leukocyte adhesion defects / A. Etzioni. – DOI 10.1016/j.coi.2009.07.005 // Current opinion in immunology. – 2009. – Vol. 21. – P. 481–486.
86. Evaluation of indoleamine 2,3-dioxygenase expression and kynurenine pathway metabolites levels in serum samples of diabetic retinopathy patients / P.K. Munipally, S.G. Agraham, V.K. Valavala [et al.]. – DOI 10.3109/13813455.2011.623705 // Arch. Physiol. Biochem. – 2011. – Vol. 117. – P. 254–258.
87. Exploring the Therapeutic Potential of Cannabinoid Receptor Antagonists in Inflammation, Diabetes Mellitus, and Obesity / A. Vasincu, R.N. Rusu, D.C. Ababei [et al.]. – DOI 10.3390/biomedicines11061667 // Biomedicines. – 2023. – Vol. 11, № 6. – P. 1667.

88. Expression of rat hepatic 2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase is affected by a high protein diet and by streptozotocin-induced diabetes / A. Tanabe, Y. Egashira, S. Fukuoka [et al.]. – DOI 10.1093/jn/132.6.1153 // J. Nutr. – 2002. – Vol. 132, № 6. – P. 1153–1159.
89. Expression of the kynurenine pathway enzymes in the pancreatic islet cells. Activation by cytokines and glucolipotoxicity / J.J. Liu, S. Raynal, D. Bailbe [et al.]. – DOI 10.1016/j.bbadis.2015.02.001 // Biochim. Biophys. Acta. – 2015. – Vol. 1852. – P. 980–991.
90. Floderer M. Dendritic cell-secreted lipocalin2 induces CD8⁺ T-cell apoptosis, contributes to T-cell priming and leads to a TH1 phenotype / M. Floderer, M. Prchal-Murphy, C. Vizzardelli. – DOI 10.1371/journal.pone.0101881 // PLoS One. – 2014. – Vol. 9 (7). – e101881.
91. Functions and regulation of lipocalin-2 in gut-origin sepsis: a narrative review / F. Lu, K. Inoue, J. Kato [et al.]. – DOI 10.1186/s13054-019-2550-2 // Crit Care. – 2019. – Vol. 23. – P. 269.
92. Hojlund K. Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance // Dan Med J. – 2014. – Vol. 61 (7). – B4890.
93. IDO upregulates regulatory T cells via tryptophan catabolite and suppresses encephalitogenic T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis / Y. Yan, G.X. Zhang, B. Gran [et al.]. – DOI 10.4049/jimmunol.1001628 // J. Immunol. – 2010. – Vol. 185, № 10. – P. 5953–5961.
94. IDO1 scavenges reactive oxygen species in myeloid-derived suppressor cells to prevent graft-versus-host disease / J.M. Ju, G. Nam, Y.K. Lee [et al.]. – DOI 10.1073/pnas.2011170118 // Proc Natl Acad Sci USA. – 2021. – Vol. 118 (10). – e2011170118.
95. Immune activation and degradation of tryptophan in coronary heart disease: Tryptophan in coronary heart disease / B. Wirleitner, V. Rudzite, G. Neurauter [et al.]. – DOI 10.1046/j.1365-2362.2003.01186.x // European Journal of Clinical Investigation. – 2003. – Vol. 33, № 7. – H. 550–554.

96. Impaired glucose and lipid metabolism in ageing aryl hydrocarbon receptor deficient mice / D. Biljes, C. Hammerschmidt-Kamper, S. Kadow [et al.]. – DOI 10.17179/excli2015-638 // EXCLI. J. – 2015. – Vol. 14. – P. 1153–1163.
97. Increased serum cystatin C levels and responses of pancreatic α - and β -cells in type 2 diabetes / H.Q. Yuan, J.X. Miao, J.P. Xu [et al.]. – DOI 10.1530/EC-21-0597 // Endocr Connect. – 2022. – Vol. 11 (3). – e210597.
98. Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Deletion–Mediated Kynurenine Insufficiency in Vascular Smooth Muscle Cells Exacerbates Arterial Calcification / L. Ouyang, C. Yu, Z. Xie [et al.]. – DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.057868 // Circulation. – 2022. – Vol. 145 (24). – P. 1784–1798.
99. Indoleamine 2,3-dioxygenase overexpression causes kynurenine-modification of proteins, fiber cell apoptosis and cataract formation in themouse lens / M. Mailankot, M.M. Staniszewska, H. Butler [et al.]. – DOI 10.1038/labinvest.2009.22 // Lab. Investig. – 2009. – Vol. 89. – P. 498–512.
100. Indoleamine 2,3-dioxygenase-1 is protective in atherosclerosis and its metabolites provide new opportunities for drug development / J.E. Cole, N. Astola, A.P. Cribbs [et al.]. – DOI 10.1073/pnas.1517820112 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2015. – Vol. 112. – P. 13033–13038.
101. Is the Enzyme ACMSD a Novel Therapeutic Target in Parkinson's Disease? / K. Thirtamara-Rajamani, P. Li, M.L. Escobar Galvis [et al.]. – DOI 10.3233/JPD-171240 // J. Parkinsons Dis. – 2017. – Vol. 7, № 4. – P. 577–587.
102. Kaiser H. Kynurenine signaling through the aryl hydrocarbon receptor: Implications for aging and healthspan / H. Kaiser, E. Parker, M.W. Hamrick. – DOI 10.1016/j.exger.2019.110797 // Exp. Gerontol. – 2020. – Vol. 130. – P. 110797.
103. Kang Q. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications / Q. Kang, C. Yang. – DOI 10.1016/j.redox.2020.101799 // Redox. Biol. – 2020. – Vol. 37. – P. 101799.
104. Kowluru R.A. Matrix metalloproteinases in diabetic retinopathy: potential role of MMP-9 / R.A. Kowluru, Q. Zhong, J.M. Santos. – DOI

- 10.1517/13543784.2012.681043 // *Expert Opin. Investig. Drugs.* – 2012. – Vol. 21, № 6. – P. 797–805.
105. Koziel K. Kynurenine Pathway in Diabetes Mellitus-Novel Pharmacological Target? / K. Koziel, E.M. Urbanska. – DOI 10.3390/cells12030460 // *Cells.* – 2023. – Vol. 12, № 3. – P. 460.
106. Krupa A. The Kynurenine Pathway-New Linkage between Innate and Adaptive Immunity in Autoimmune Endocrinopathies / A. Krupa, I. Kowalska. – DOI 10.3390/ijms22189879 // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22 (18). – P. 9879.
107. Kynurenic Acid Acts as a Signaling Molecule Regulating Energy Expenditure and Is Closely Associated With Metabolic Diseases / D. Zhen, J. Liu, X.D. Zhang, Z. Song. – DOI 10.3389/fendo.2022.847611 // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2022. – Vol. 13. – P. 847611.
108. Kynurenic Acid and Gpr35 Regulate Adipose Tissue Energy Homeostasis and Inflammation / L.Z. Agudelo, D.M.S. Ferreira, I. Cervenka [et al.]. – DOI 10.1016/j.cmet.2018.01.004 // *Cell Metab.* – 2018. – Vol. 27, № 2. – P. 378–392.e5.
109. Kynurenine causes vasodilation and hypotension induced by activation of KCNQ-encoded voltage-dependent K (+) channels / K. Sakakibara, G.G. Feng, J. Li [et al.]. – DOI 10.1016/j.jphs.2015.07.042 // *J. Pharmacol. Sci.* – 2015. – Vol. 129. – P. 31–37.
110. Kynurenine emerges from the shadows – Current knowledge on its fate and function / M. Marszalek-Grabska, K. Walczak, K. Gawel [et al.]. – DOI 10.1016/j.pharmthera.2021.107845 // *Pharmacol. Ther.* – 2021. – Vol. 225. – P. 107845.
111. Kynurenine increases matrix metalloproteinase-1 and -3 expression in cultured dermal fibroblasts and improves scarring in vivo / Y. Li, R.T. Kilani, E. Rahmani-Neishaboor [et al.]. – DOI 10.1038/jid.2013.303 // *J. Invest. Dermatol.* – 2014. – Vol. 134, № 3. – P. 643–650.
112. Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation / Y. Wang, H. Liu, G. McKenzie [et al.]. – DOI 10.1038/nm.2092 // *Nat. Med.* – 2010. – Vol. 16. – P. 279–285.

113. Kynurenine Pathway Metabolites as Potential Clinical Biomarkers in Coronary Artery Disease / R. Gáspár, D. Halmi, V. Demján [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2021.768560 // Front Immunol. – 2022. – Vol. 12. – P. 768560.
114. Kynurenine signaling through the aryl hydrocarbon receptor maintains the undifferentiated state of human embryonic stem cells / T. Yamamoto, K. Hatabayashi, M. Arita [et al.]. – DOI 10.1126/scisignal.aaw3306 // Sci. Signal. – 2019. – Vol. 12. – eaaw3306.
115. Kynurenine/Aryl Hydrocarbon Receptor Modulates Mitochondria-Mediated Oxidative Stress and Neuronal Apoptosis in Experimental Intracerebral Hemorrhage / R. Ren, Y. Fang, P. Sherchan [et al.]. – DOI 10.1089/ars.2021.0215 // Antioxid Redox Signal. – 2022. – Vol. 37, № 16-18. – P. 1111–1129.
116. Lackey D.E. Regulation of metabolism by the innate immune system / D.E. Lackey, J.M. Olefsky. – DOI 10.1038/nrendo.2015.189 // Nat. Rev. Endocrinol. – 2016. – Vol. 12, № 1. – P. 15–28.
117. Latent Inflammation and Insulin Resistance in Adipose Tissue / I.S. Stafeev, A.V. Vorotnikov, E.I. Ratner [et al.]. – DOI 10.1155/2017/5076732 // Int. J. Endocrinol. – 2017. – Vol. 2017. – P. 5076732.
118. Liu J.J. Emerging role for kynurenines in metabolic pathologies / J.J. Liu, J. Movassat, B. Portha. – DOI 10.1097/MCO.0000000000000529 // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. – 2019. – Vol. 22. – P. 82–90.
119. Loss of IDO1 Expression From Human Pancreatic β -Cells Precedes Their Destruction During the Development of Type 1 Diabetes / F. Anquetil, G. Mondanelli, N. Gonzalez [et al.]. – DOI 10.2337/db17-1281 // Diabetes. – 2018. – Vol. 67. – P. 1858–1866.
120. Mailankot M. Kynurenine inhibits fibroblast growth factor 2-mediated expression of crystallins and MIP26 in lens epithelial cells / M. Mailankot, S. Howell, R.H. Nagaraj. – DOI 10.1016/j.bbadis.2010.05.005 // Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease. – 2010. – Vol. 1802 (7-8). – P. 609.
121. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) are localized in the nucleus of retinal Müller glial cells and modulated by

- cytokines and oxidative stress / E.J. Lee, M. Zheng, C.M. Craft, S. Jeong. – DOI 10.1371/journal.pone.0253915 // PloS. One. – 2021. – Vol. 16, № 7. – P. e0253915.
122. Measuring the Systemic Inflammatory Response to On- and Off-Pump Coronary Artery Bypass Graft (CABG) Surgeries Using the Tryptophan/Kynurenine Pathway / A. Farouk, R.A. Hamed, S. Elsayy [et al.]. – DOI 10.1080/08941939.2022.2084188 // Journal of Investigative Surgery. – 2022. – Vol. 35, № 8. – P. 1621–1625.
123. Metabolomics of various samples advancing biomarker discovery and pathogenesis elucidation for diabetic retinopathy / X. Du, L. Yang, L. Kong [et al.]. – DOI 10.3389/fendo.2022.1037164 // Front. Endocrinol. (Lausanne). – 2022. – Vol. 13. – P. 1037164.
124. Miloro G. Deciphering the role of the death receptor Fas/CD95 in T cell co-stimulation / G. Miloro // Cellular Biology. Université Côte d’Azur, 2020. English. ffNNT : 2020COAZ6036ff. fftel-03179255f
125. Molecular Mechanisms of Latent Inflammation in Metabolic Syndrome. Possible Role of Sirtuins and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Type gamma / I.S. Stafeev, M.Y. Menshikov, Z.I. Tsokolaeva [et al.]. – DOI 10.1134/S0006297915100028 // Biochemistry (Mosc). – 2015. – Vol. 80, № 10. – P. 1217–1226.
126. Mukai E. Role of Reactive Oxygen Species in Glucose Metabolism Disorder in Diabetic Pancreatic β -Cells / E. Mukai, S. Fujimoto, N. Inagaki. – DOI 10.3390/biom12091228 // Biomolecules. – 2022 – Vol. 12, № 9. – P. 1228.
127. Multicenter Evaluation of Diagnostic Circulating Biomarkers to Detect Sight-Threatening Diabetic Retinopathy / S. Gurudas, K. Frudd, J.J. Maheshwari [et al.]. – DOI 10.1001/jamaophthalmol.2022.1175 // JAMA Ophthalmol. – 2022. – Vol. 140, № 6. – P. 587–597.
128. NBS1 is required for IGF-1 induced cellular proliferation through the Ras/Raf/MEK/ERK cascade / A. Hematulin, D. Sagan, F. Eckardt-Schupp, S. Moertl. – DOI 10.1016/j.cellsig.2008.08.017 // Cell Signal. – 2008. – Vol. 20, № 12. – P. 2276–2285.

129. On the Antioxidant Properties of L-Kynurenine: An Efficient ROS Scavenger and Enhancer of Rat Brain Antioxidant Defense / D.R. Ortega, P.E.U. Muñoz, T.B. Ayala [et al.]. – DOI 10.3390/antiox11010031 // *Antioxidants*. – 2021. – Vol. 11 (1). – P. 31.
130. Oshitari T. Neurovascular Impairment and Therapeutic Strategies in Diabetic Retinopathy / T. Oshitari. – DOI 10.3390/ijerph19010439 // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. – 2021. – Vol. 19, № 1. – P. 439.
131. Oxenkrug G.F. Increased Plasma Levels of Xanthurenic and Kynurenic Acids in Type 2 Diabetes / G.F. Oxenkrug. – DOI 10.1007/s12035-015-9232-0 // *MolNeurobiol*. – 2015. – Vol. 52 (2). – P. 805–810.
132. Oxidative stress as the main target in diabetic retinopathy pathophysiology / O.M. Cecilia, C.G. José Alberto, N.P. José [et al.]. – DOI 10.1155/2019/8562408 // *J. Diabetes Res*. – 2019. – Vol. 2019. – P. 8562408.
133. Plasma metabolomic profiling of proliferative diabetic retinopathy / X.R. Zhu, F.Y. Yang, J. Lu [et al.]. – DOI 10.1186/s12986-019-0358-3 // *Nutr. Metab. (Lond)*. – 2019. – Vol. 16. – P. 37.
134. Plasma Metabolomics Reveals Metabolic Profiling For Diabetic Retinopathy and Disease Progression / Y. Sun, H. Zou, X. Li [et al.]. – DOI 10.3389/fendo.2021.757088 // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2021. – Vol. 12. – P. 757088.
135. Porta M. Screening for diabetic retinopathy in Europe / M. Porta, E. Kohner. – DOI 10.1111/j.1464-5491.1991.tb01571.x 12 // *Diabetic Medicine*. – 1991. – Vol. 8 (3). – P. 197–198.
136. Potential Role of Protein Kinase C in the Pathophysiology of Diabetes-Associated Atherosclerosis / C.F. Lien, S.J. Chen, M.C. Tsai, C.S. Lin. – DOI 10.3389/fphar.2021.716332 // *Front Pharmacol*. – 2021. – Vol. 12. – P. 716332.
137. Prevalence, awareness and control of diabetes in Russia: The Ural Eye and Medical Study on adults aged 40+ years / M.M. Bikbov, R.R. Fayzrakhmanov, G.M. Kazakbaeva [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0215636 // *PLoS. One*. – 2019. – Vol. 14 (4). – P. e0215636.
138. QUINolate as a Marker for Kynurenine Metabolite Formation and the Unresolved Question of NAD⁺ Synthesis During Inflammation and Infection / J.R.

Moffett, P. Arun, N. Puthillathu [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2020.00031 // Front Immunol. – 2020. – Vol. 11. – P. 31.

139. Role of Kynurenine Pathway in Oxidative Stress during Neurodegenerative Disorders / A. Mor, A. Tankiewicz-Kwedlo, A. Krupa, D. Pawlak. – DOI 10.3390/cells10071603 // Cells. – 2021. – Vol. 10, № 7. – P. 1603.

140. Role of Oxidative Stress in Retinal Disease and the Early Intervention Strategies: A Review / J. Wang, M. Li, Z. Geng [et al.]. – DOI 10.1155/2022/7836828 // Oxid Med Cell Longev. – 2022. – Vol. 2022. – P. 7836828.

141. Roy S. Retinal capillary basement membrane thickening: Role in the pathogenesis of diabetic retinopathy / S. Roy, D. Kim. – DOI 10.1016/j.preteyeres.2020.100903 // Prog Retin Eye Res. – 2021. – Vol. 82. – P. 100903.

142. Samuel V.T. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism / V.T. Samuel, K.F. Petersen, G.I. Shulman. – DOI 10.1016/s0140-6736(10)60408-4 // Lancet. – 2010. – Vol. 375 (9733). – P. 2267–2277.

143. Sas K. Mitochondria, Oxidative Stress and the Kynurenine System, with a Focus on Ageing and Neuroprotection / K. Sas, E. Szabo, L. Vecsei. – DOI 10.3390/molecules23010191 // Molecules. – 2018. – Vol. 23. – P. 19.

144. Savitz J. The kynurenine pathway: a finger in every pie / J. Savitz. – DOI 10.1038/s41380-019-0414-4 // Molecular Psychiatry. – 2020. – Vol. 25, № 1. – P. 131–147.

145. Serum metabolic fingerprinting after exposure of rats to QUINolinic acid / B. Kalaska, M. Ciborowski, T. Domaniewski [et al.]. – DOI 10.1016.08.02/j.jpba.20164 // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2016. – Vol. 131. – P. 175182.

146. Single cell analysis of kynurenine and System L amino acid transport in T cells / L.V. Sinclair, D. Neyens, G. Ramsay [et al.]. – DOI 10.1038/s41467-018-04366-7 // Nat. Commun. – 2018. – Vol. 17, № 9 (1). – P. 1981.

147. Sofizadeh S. Prevalence and risk factors for diabetic retinopathy at diagnosis of type 2 diabetes: an observational study of 77 681 patients from the Swedish National

Diabetes Registry / S. Sofizadeh, K. Eeg-Olofsson, M. Lind // *BMJ Open Diabetes Research & Care*. – 2024. – Vol. 12. – P. e003976.

148. Stone T.W. Interactions of IDO and the Kynurenine Pathway with Cell Transduction Systems and Metabolism at the Inflammation-Cancer Interface / T.W. Stone, R.O. Williams. – DOI 10.3390/cancers15112895 // *Cancers (Basel)*. – 2023. – Vol. 15, № 11. – P. 2895.

149. Successful metformin treatment of insulin resistance is associated with down-regulation of the kynurenine pathway / O. Muzik, P. Burghardt, Z. Yi [et al.]. – DOI 10.1016/j.bbrc.2017.04.155 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2017. – Vol. 488. – P. 29–32.

150. Tantipanaporn A. Development and Recent Advances in Lysine and N-Terminal Bioconjugation for Peptides and Proteins / A. Tantipanaporn, M.-K. Wong. – DOI 10.3390/molecules28031083 // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28. – P. 1083.

151. Targeted metabolomic analysis identifies increased serum levels of GABA and branched chain amino acids in canine diabetes / A.L. O’Kell, C. Wasserfall, J. Guingab-Cagmat [et al.]. – DOI 10.1007/s11306-021-01850-y // *Metabolomics*. – 2021. – Vol. 17. – P. 1–13.

152. Targeting Matrix Metalloproteinases for Diabetic Retinopathy: The Way Ahead? / A. Solanki, L.K. Bhatt, T.P. Johnston, K.S. Prabhavalkar. – DOI 10.2174/1389203719666180914093109 // *Curr. Protein Pept. Sci.* – 2019. – Vol. 20, № 4. – P. 324–333.

153. TGF- β signaling in health, disease, and therapeutics / Z. Deng, T. Fan, C. Xiao [et al.]. – DOI 10.1038/s41392-024-01764-w // *Sig. Transduct. Target Ther.* – 2024. – Vol. 9. – P. 61.

154. The Complex World of Kynurenic Acid: Reflections on Biological Issues and Therapeutic Strategy. T.W. Stone, L.G. Darlington, A.A. Badawy [et al.]. – DOI 10.3390/ijms25169040. PMID: 39201726 // *Int. J. Mol. Sci.* – 2024. – Vol. 25(16). P. 9040.

155. The Enzymatic and Non-Enzymatic Function of Myeloperoxidase (MPO) in Inflammatory Communication / Y. Kargapolova, S. Geißen, R. Zheng [et al.]. – DOI 10.3390/antiox10040562 // *Antioxidants* (Basel). – 2021. – Vol. 10, № 4. – P. 562.
156. The Kynurenine Pathway and Kynurenine 3-Monooxygenase Inhibitors / T.D. Hughes, O.F. Güner, E.C. Iradukunda [et al.]. – DOI 10.3390/molecules27010273 // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27 (1). – P. 273.
157. The Mechanism of Hyperglycemia-Induced Renal Cell Injury in Diabetic Nephropathy Disease: An Update / T. Wu, L. Ding, V. Andoh [et al.]. – DOI 10.3390/life13020539 // *Life*. – 2023. – Vol. 13. – P. 539.
158. The Multi-Elemental Composition of the Aqueous Humor of Patients Undergoing Cataract Surgery, Suffering from Coexisting Diabetes, Hypertension, or Diabetic Retinopathy / J. Flieger, J. Dolar-Szczasny, R. Rejdak [et al.]. – DOI 10.3390/ijms22179413 // *Int J Mol Sci*. – 2021. – Vol. 22 (17). – P. 9413.
159. The Review of Current Knowledge on Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) / K. Romejko, M. Markowska, S. Niemczyk. – DOI 10.3390/ijms241310470 // *Int. J. Mol. Sci*. – 2023. – Vol. 24. – P. 10470.
160. The Role of Cysteine Peptidases in Hematopoietic Stem Cell Differentiation and Modulation of Immune System Function / M. Perišić Nanut, U. Pečar Fonović, T. Jakoš, J. Kos. – DOI 10.3389/fimmu.2021.680279 // *Front Immunol*. – 2021. – Vol. 12. – P. 680279.
161. The role of inflammation in immune system of diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications / T. Yue, Y. Shi, S. Luo [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2022.1055087 // *Front Immunol*. – 2022. – Vol. 13. – P. 1055087.
162. The Roles of Neutrophil-Derived Myeloperoxidase (MPO) in Diseases: The New Progress / W. Lin, H. Chen, X. Chen, C. Guo. – DOI 10.3390/antiox13010132 // *Antioxidants* (Basel). – 2024. – Vol. 13 (1). – P. 132.
163. 3-Hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid generate hydrogen peroxide and promote alpha-crystallin cross-linking by metal ion reduction / L.E. Goldstein,

M.C. Leopold, X. Huang [et al.]. – DOI 10.1021/bi992997s // *Biochemistry*. – 2000. – Vol. 39 (24). – P. 7266–7275.

164. Tryptophan Biochemistry: Structural, Nutritional, Metabolic, and Medical Aspects in Humans / L. Palego, L. Betti, A. Rossi, G. Giannaccini. – DOI 10.1155/2016/8952520 // *J. Amino Acids*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 8952520.

165. Tryptophan Catabolism and Inflammation: A Novel Therapeutic Target For Aortic Diseases / T. Ramprasath, Y.M. Han, D. Zhang [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2021.731701 // *Front Immunol*. – 2021. – Vol. 12. – P. 731701.

166. Tryptophan Metabolism in Inflammaging: From Biomarker to Therapeutic Target / F.J.H. Sorgdrager, P.J.W. Naudé, I.P. Kema [et al.]. – DOI 10.3389/fimmu.2019.02565 // *Front. Immunol*. – 2019. – Vol. 10. – P. 2565.

167. Tryptophan Metabolism in Patients with Chronic Kidney Disease Secondary to Type 2 Diabetes: Relationship to Inflammatory Markers / S. Debnath, C. Velagapudi, L. Redus [et al.]. – DOI 10.1177/1178646917694600 // *Int. J. Tryptophan Res*. – 2017. – Vol. 10. – URL: <https://journals.sagepub.com/doi/epub/10.1177/1178646917694600> (date accessed: 09.05. 2023).

168. Tryptophan Metabolites Along the Microbiota-Gut-Brain Axis: An Interkingdom Communication System Influencing the Gut in Health and Disease / A. Bosi, D. Banfi, M. Bistolett [et al.]. – DOI 10.1177/1178646920928984 // *Int J Tryptophan Res*. – 2020. – Vol. 13. – 1178646920928984.

169. Tryptophan Predicts the Risk for Future Type 2 Diabetes / T. Chen, X. Zheng, X. Ma [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0162192 // *PLoS ONE*. – 2016. – Vol. 11. – e0162192.

170. Tryptophan-Derived 3-Hydroxyanthranilic Acid Contributes to Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Mice In Vivo / Q. Wang, Y. Ding, P. Song [et al.]. – DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030972 // *Circulation*. – 2017. – Vol. 136, № 23. – P. 2271–2283.

171. Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) regulates JunB-mediated IL-8/CXCL1 expression and pathological neovascularization / G. Kaur, D. Sharma, S.

Bisen [et al.]. – DOI 10.1038/s42003-023-04905-z // Commun. Biol. – 2023. – Vol. 6. – P. 516.

172. Vasorelaxing Action of the Kynurenine Metabolite, Xanthurenic Acid: The Missing Link in Endotoxin-Induced Hypotension? / F. Fazio, A. Carrizzo, L. Lionetto. [et al.]. – DOI 10.3389/fphar.2017.00214 // Front Pharmacol. – 2017. – Vol. 8. – P. 214.

173. Xanthurenic Acid Formation from 3-Hydroxykynurenine in the Mammalian Brain: Neurochemical Characterization and Physiological Effects / K.V. Sathyaikumar, M. Tararina, H.Q. Wu [et al.]. – DOI 10.1016/j.neuroscience.2017.10.006 // Neuroscience. – 2017. – Vol. 367. – P. 85–97.

174. Yang S. The role of retinal Müller cells in diabetic retinopathy and related therapeutic advances / S. Yang, S. Qi, C. Wang. – DOI 10.3389/fcell.2022.1047487 // Front. Cell. Dev. Biol. – 2022. – Vol. 10. – P. 1047487.

175. Yuxiang D. Ocular immune privilege and retinal pigment epithelial cells / D. Yuxiang, Y. Bo. – DOI 10.1093/jleuko/qiac016 // Journal of Leukocyte Biology. – 2023. – Vol. 113, № 3. – P. 288–304.

176. Zi M. Involvement of cystatin C in immunity and apoptosis / M. Zi, Y. Xu. – DOI 10.1016/j.imlet.2018.01.006 // Immunol Lett. – 2018. – Vol. 196. – P. 80–90.