

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)**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Чита – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

Фефелова Елена Викторовна

Официальные оппоненты:

Власов Тимур Дмитриевич – доктор медицинских наук, профессор. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой патофизиологии с курсом клинической патофизиологии, г. Санкт-Петербург

Власова Татьяна Ивановна – доктор медицинских наук, профессор.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, заведующий кафедрой нормальной и патологической физиологии, г. Саранск

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Владивосток

Защита состоится «__» июля 2025 года в __⁰⁰ на заседании диссертационного совета 21.2.077.01 при ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ (672000, г.Чита, ул. Горького, 39 а).

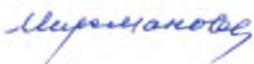
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ (672000, г.Чита, ул. Горького, 39 а; <http://chitgma.ru>).

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

д.м.н., доцент



Мироманова Наталья Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 [Yang L. et al., 2021; Du X. et al., 2022]. В настоящее время ДР признана нейроваскулярным дегенеративным заболеванием со сложным и многофакторным патогенезом, который включает в себя ряд процессов (гипергликемия, дислипидемия, хроническое воспаление), далее ведущих к окислительному стрессу, усилению выработки провоспалительных медиаторов и повышению секреции сосудистых факторов роста [Cecilia O.M. et al., 2021]. В итоге возникают изменения в микроциркуляторном русле сетчатки, такие как микроаневризмы, зоны неперфузии, повышение проницаемости сосудистой стенки и неоваскуляризация [Мошетова Л.К. и соавт., 2016]. Тем не менее поиск новых звеньев в цепи патогенеза, идентификация эффективных лабораторных маркеров ДР остаются актуальными [Yang L. et al., 2021; Du X. et al., 2022], 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 [Абдуллина Д.А. и соавт., 2020]. В последние десятилетия в связи с возросшим научным интересом к обмену незаменимой аминокислоты триптофан (TRP) была установлена взаимосвязь между реакциями кинуренинового пути и обменом углеводов, свободнорадикальными, иммунными процессами, а также возникли вопросы о роли нарушений обмена TRP в патогенезе метаболических заболеваний, в том числе СД [Ala M. et al., 2022]. Предполагается, что дисбаланс в кинуренинах может быть одним из факторов риска развития ДР.

Степень разработанности темы исследования. Патогенез ДР сложен и изучен еще не до конца. В центре внимания последних исследований оказался кинурениновый путь (КП) метаболизма TRP. Кинурениновый путь продуцирует ряд биологически активных метаболитов, воздействующих на различные системы организма, включая эндокринную, иммунную и др., а конечный продукт КП – NAD⁺ (и NADF⁺), является необходимым для жизненно важных клеточных процессов [Palego L. et al., 2016].

Поскольку КП активизируется в условиях воспаления и окислительного стресса, присутствующих при СД, а некоторые кинуренины сами могут модулировать оксидативное напряжение и иммунный ответ [Kozieł K., 2023; Gáspár R. et al., 2023], существует вероятность, что нарушение течения КП вызывает

развитие и прогрессирование сосудистых осложнений СД. Так, Yun J.H., и соавт. (2020) выявили, что TRP и кинуренин можно отнести к потенциальным виновникам утяжеления ретинопатии у пациентов с СД2. Вместе с тем изменения в кинурениновом пути при ДР остаются недостаточно изученными.

Проведение исследования по изучению нарушений в обмене TRP, расширяющего имеющееся представление о патогенезе ДР 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-гидрокси триптофана в зависимости от степени тяжести нарушения углеводного обмена и диабетической ретинопатии.

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-гидрокси триптофана, 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 гипергликемия, неконтролируемая в течение длительного периода времени, вызывает нарушение регуляции многих метаболических путей в сетчатке глаза, в том числе и в обмене триптофана, сопровождающееся 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 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 с применением 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 ДР 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 ДР.

Основные 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

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

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.

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

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедр офтальмологии, патологической физиологии, 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, 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Для достижения цели обследованы 146 человек, сформированы следующие группы:

- 1-я группа – 21 человек с «преддиабетом» (с гипергликемией натощак от 6,1 и менее 6,9 моль/л);

- 2-я группа – 21 пациент с СД 2 типа (диагноз СД верифицировали с использованием клиничко-anamnestических данных, результатов физикального, лабораторного инструментального исследований в соответствии с клиническими рекомендациями МЗ РФ «Сахарный диабет 2 типа у взрослых», 2019 г.);

- 3-я группа – 63 человека с СД 2 типа и ДР всех стадий.

В дальнейшем пациенты с ДР были распределены дополнительно на 3 группы в зависимости от стадии:

- 4-я группа – 21 человек с непролиферативной (НПДР) стадией;

- 5-я – 21 человек с препролиферативной стадией (ППДР);

- 6-я – 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.

Критерии включения: «преддиабет», СД-2 типа без осложнений и с наличием одного осложнения – ДР.

Критерии невключения: HbA1c > 12%, тяжелые осложнения СД, хронические почечная, печеночная, сердечная недостаточности, уровень артериального давления > 160/100 мм рт. ст.; нарушение прозрачности сред глаза, глаукома, зрелая катаракта, другие заболевания сетчатки.

Критерии исключения: прием ингибиторов глюкозо-натриевого котранспорта.

Все больные находились на высокобелковой диете с ограничением углеводов и получали препараты в соответствии с клиническими рекомендациями.

Исследование одобрено локальным этическим комитетом при ФГБОУ ВО ЧГМА Минздрава России (протокол № 127 от 25.04.2023 г.). От всех участников получено добровольное информированное согласие.

Общее клиническое исследование включало сбор жалоб, анализ анамнеза пациентов.

На момент включения в исследование хронические сопутствующие заболевания находились в состоянии стойкой ремиссии. Группы были сопоставимы по полу и возрасту. Краткая характеристика групп отражена в таблице 1.

Таблица 1 – Основные характеристики обследуемых групп

Группы	Возраст (Ме, 0,25; 0,75 перцентили)	Пол, М/Ж Абсолютные цифры	Длительность СД (Ме, 0,25; 0,75 перцентили)	Уровень глюкозы натощак, ммоль/л (Ме, 0,25; 0,75 перцентили)	НЬА1с, % (Ме, 0,25; 0,75 перцентили)
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)

Офтальмологическое обследование.

На начальном этапе все обследуемые прошли стандартное офтальмологическое обследование: оценку остроты зрения (с помощью проектора знаков ССЗ-3100, Корея), бесконтактную тонометрию (измерение внутреннего давления глаза проводили тонометром Маклакова массой 10,0 г; критическую частоту слияния мельканий – на «Периком», Россия), биомикроскопию переднего отрезка глаза (щелевая лампа XCEL250, США), офтальмоскопию и биомикроскопию сетчатки, хрусталика, стекловидного тела (щелевая лампа с 3-зеркальной линзой Гольдмана Ocular Instruments Inc., США) и бесконтактной линзой +60 - +90 D (Ocular Instruments Inc., США)).

Пациентам, включенным в обследование, проводили оптическую когерентную томографию сетчатки глаза (томограф RTVue-100, OptoVue, США).

Для объективизации процесса развития ДР использовалась шкала оценки изменений глазного дна, где, согласно международной классификации ETDRS (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study, 1991), степень тяжести ДР определяется в баллах (Дедов И.И. и соавт., 2017).

Лабораторные методы исследования.

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

Метод исследования триптофана и его метаболитов. Содержание TRP, кинуренинов (KYN, 3-НКYN, KYNA) и уровень 5HTRP определяли в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрической и спектрофотометрической детекцией с использованием хроматографа Shimadzu LC-20 (Япония).

Метод исследования уровня маркеров воспаления, растворимых форм костимулирующих и коингибирующих молекул, молекул адгезии, матричных металлопротеиназ и их ингибиторов. Содержание V7.2, 4-1BB, Галектина-9, CTLA-4, PD-1, PD-L1, Tim-3, LAG-3, SAA, NGAL, кальпротектина, ICAM-1, VCAM-1, MMP-2, MMP-9, MPO и цистатина С в сыворотке крови определяли, используя наборы для мультиплексного анализа Human Immune Checkpoint Panel 1 и Human Vascular Inflammation Panel 1 фирмы Biolegend (США). Результаты оценивали с помощью проточного цитофлуориметра CytoFlex (США).

Статистическая обработка результатов проводена с помощью программы IBM SPSS Statistics для Macintosh версии 23.0 (IBM Corp., Армонк, Нью-Йорк, США). Вариационные ряды тестировались на нормальность при помощи критерия Шапиро-Уилка. Учитывая распределение признаков, отличное от нормального, полученные данные представлены в виде медианы, 1-го и 3-го 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 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. 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 СД 2 типа использовали математическую модель бинарной логистической регрессии.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Закономерности изменений уровня маркеров воспаления в крови при «преддиабете», сахарном диабете 2 типа и при диабетической ретинопатии

У лиц с «преддиабетом» (рисунок 1А) относительно контроля оказались повышены концентрации NGAL, MRP8/14 и MPO на 54,4% ($p < 0,001$), 110,2% ($p < 0,001$) и

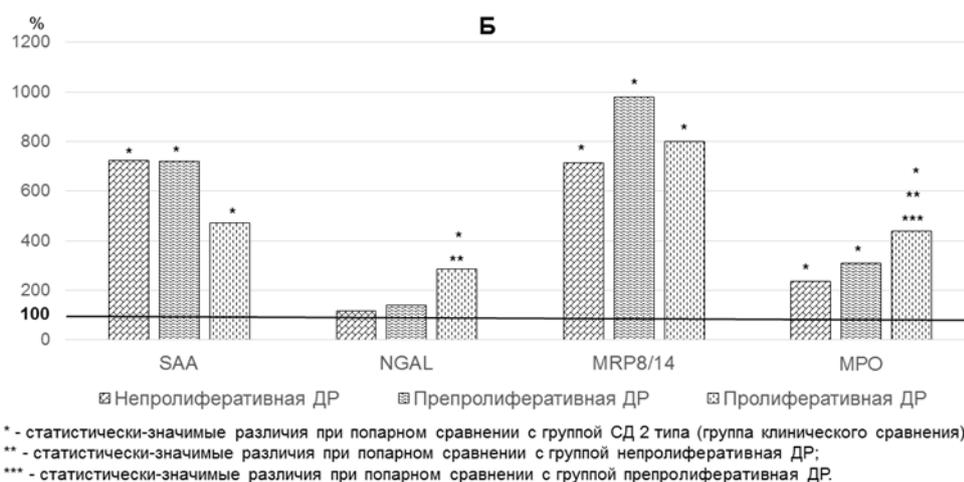
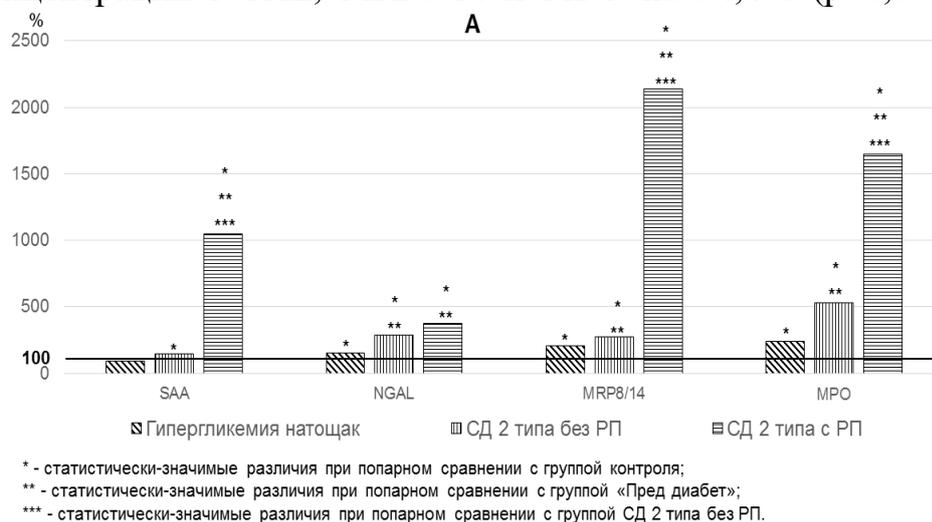


Рисунок 1 – Относительное содержание маркеров воспаления в сыворотке крови
 А. У лиц с разной степенью нарушения углеводного обмена (100% - здоровые лица)
 Б. У лиц с разными стадиями ДР (100% - группа с СД без осложнений)

У больных СД зафиксировано дальнейшее повышение уровней NGAL, MRP8/14 и MPO. По сравнению с группой «преддиабет» они увеличены: NGAL на 86,7% ($p < 0,001$), MRP8/14 – на 29,2% ($p = 0,049$) и MPO – на 121,3% ($p = 0,004$). Значения SAA превышают контроль на 46,4% ($p = 0,002$).

В группе больных СД с ДР все показатели увеличены и превышают контрольные значения; а также таковые 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 ($p < 0,001$), MPO – в 6,9 раза ($p < 0,001$)). Кроме того, при ДР уровни SAA, MRP8/14 и MPO 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 у лиц с разными стадиями ДР оказалось, что начиная с непролиферативной стадии, цифры SAA, MRP8/14 и MPO превышают таковые в группе сравнения (рисунок 1Б) на 623,0 % ($p < 0,001$), 615,0 % ($p < 0,001$) и 137,2 % ($p = 0,002$) соответственно.

При ППДР уровень маркеров практически не отличается от значений в 4-й группе.

При ПДР концентрация NGAL уже выше, чем в группе сравнения на, 86,2% ($p < 0,001$), и выше, чем в группе с начальной стадией ДР – на 58,7% ($p = 0,001$). Возросли значения фермента MPO.

Таким образом, при исследовании сывороточных уровней маркеров воспаления выявлено: повышение концентрации NGAL, MRP8/14, MPO относительно контроля при «преддиабете»; 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 MPO, с пролиферативной – для NGAL).

Закономерности изменений содержания костимулирующих и коингибирующих молекул при «преддиабете», сахарном диабете 2 типа и при диабетической ретинопатии

Рядом исследований установлено, что ДР сопровождается нарушением клеточного иммунитета [Демин Ю. А. и соавт., 2001]. Дифференцировка и протективные свойства антиген-специфических Т-клеток регулируются как позитивными, так и негативными сигналами – костимулирующими и коингибирующими молекулами (контрольными точками иммунитета).

Анализ контрольных точек иммунного ответа выявил следующее. Уже в группе с «преддиабетом» значения костимулирующих молекул V7.2 и 4-1BB больше, чем в контроле (рисунок 2А): указанные показатели составили 180,1% ($p < 0,001$) и 223,0% ($p < 0,001$).

В группе больных СД концентрация этих белков имела аналогичные изменения. У лиц с ДР концентрация V7.2 выше, чем у лиц с СД без осложнений на 43,9% ($p = 0,03$). Уровень 4-1BB в группе лиц с СД и ДР превышает таковой как у лиц с «преддиабетом», так и больных с СД без осложнений практически в 2 раза ($p < 0,001$).

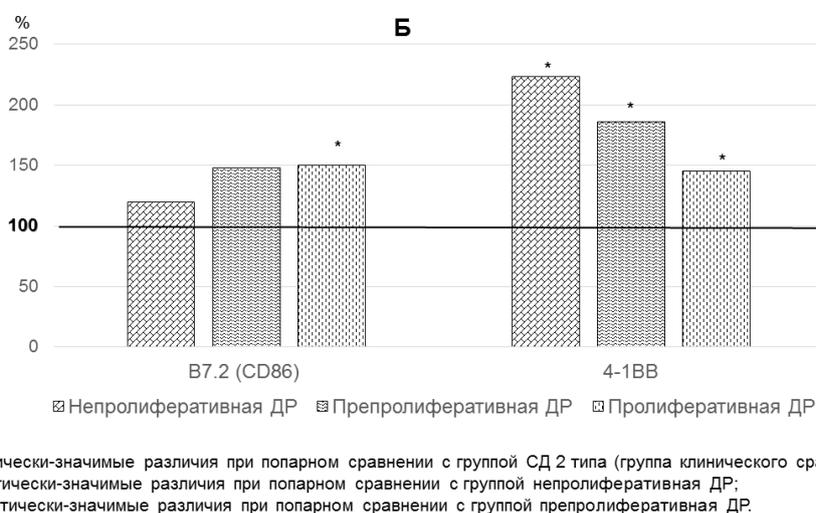
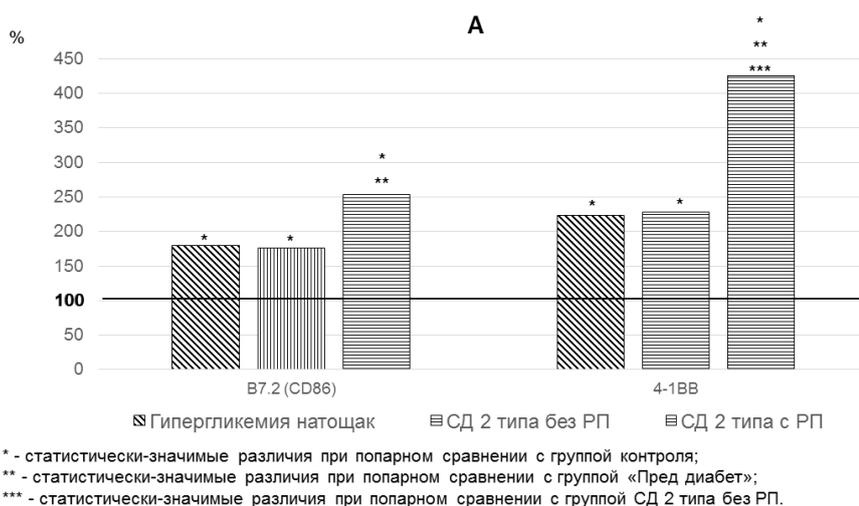


Рисунок 2 – Относительное содержание костимулирующих молекул в сыворотке крови
 А. У лиц с разной степенью нарушения углеводного обмена (100% - здоровые лица)
 Б. У лиц с разными стадиями ДР (100% - группа с СД без осложнений)

Сравнение значений костимулирующих молекул у пациентов с различными стадиями ДР (рисунок 2Б) с таковыми у лиц с СД без осложнений показало, что при НПДР повышены лишь концентрации 4-1BB. То же самое наблюдалось в препролиферативной стадии заболевания. При ПДР значения как 4-1BB на 45,1% ($p < 0,001$), так и В 7.2 – на 50,0% ($p = 0,004$) превышают таковые группы сравнения.

Анализ полученных результатов растворимых коингибирующих молекул и их рецепторов в группах лиц с разной степенью нарушения углеводного обмена показал, что концентрации этих молекул возросли относительно контроля (рисунок 3А).

Так, у лиц с «преддиабетом» в 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 PD-1 – на 90,5% ($p < 0,001$) и PD-L1 – на 300,3% ($p < 0,001$). Отмечен рост значений белка Galectin-9 на 47,0% ($p < 0,001$).

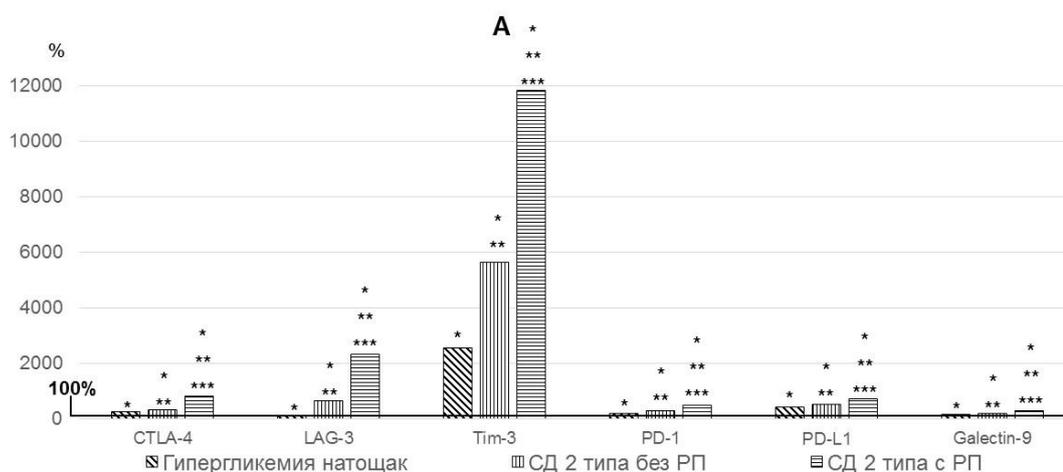
У пациентов с СД значения всех выше перечисленных молекул еще увеличиваются и между группами лиц с «преддиабетом» и с СД наблюдается статистическая разница всех показателей за исключением PD-1 (рисунок 3А).

У больных СД с ДР эти же параметры уже превышают не только таковые контрольной и группы лиц с «преддиабетом», но и таковые в группе с СД. При ДР уровень CTLA-4 выше, чем у больных СД без осложнений на 252,8% ($p < 0,001$), уровень LAG-3 – на 263,3% ($p < 0,001$), значения Tim-3 – в 2,1 раза ($p = 0,004$). Концентрации PD-1 и PD-L1 выше, чем у лиц группы с СД, на 72,6% ($p < 0,001$) и на 38,8% ($p = 0,006$) соответственно, цифры Galectin-9 – на 45,3% ($p = 0,001$).

Анализ этих же показателей у пациентов с различной стадией ДР показал, что все они уже при НПДР достоверно больше, чем у больных СД без осложнений (рисунок 3Б). В раннюю стадию ДР уровень CTLA-4 превышает таковой группы сравнения на 143,1% ($p < 0,001$), значения LAG-3 – 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% ($p < 0,001$).

При ППДР концентрация LAG-3 еще увеличилась и стала выше, чем у больных с НПДР, на 13,1% ($p = 0,004$).

При ПДР дальнейшего роста значений коингибирующих молекул не зафиксировано.



* - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой контроля;
 ** - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой «Пред диабет»;
 *** - статистически-значимые различия при попарном сравнении с группой СД 2 типа без РП.

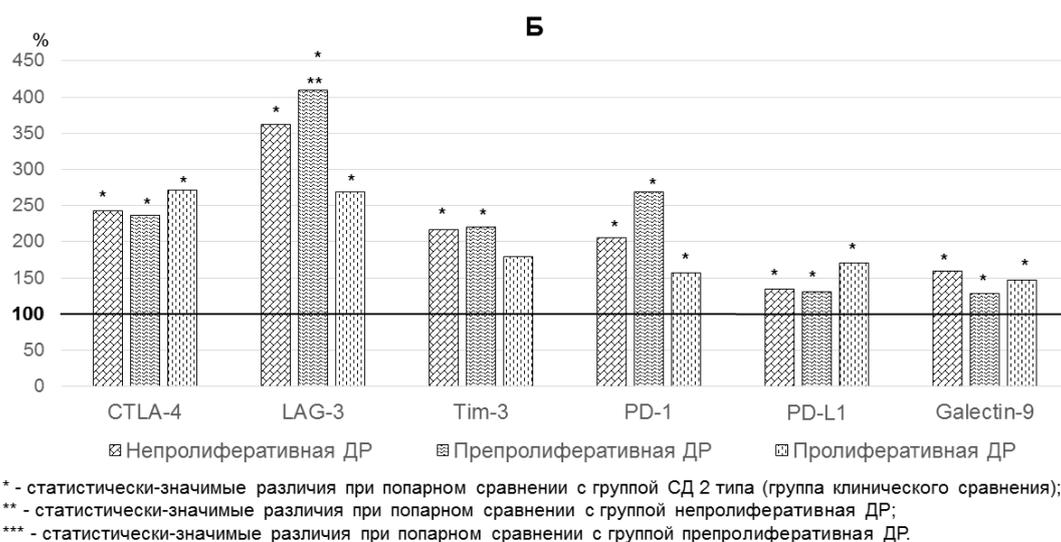


Рисунок 3 – Относительное содержание коингибирующих молекул в сыворотке крови

А. У лиц с разной степенью нарушения углеводного обмена (100% - здоровые лица)

Б. У лиц с разными стадиями ДР (100% - группа с СД без осложнений)

Таким образом, выявлен рост концентраций костимулирующих, коингибирующих молекул и их рецепторов в 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.

Особенности изменений уровня маркеров дисфункции эндотелия при «преддиабете», сахарном диабете 2 типа и при диабетической ретинопатии

Матриксные металлопротеиназы и ингибитор протеаз cystatin C

По мнению исследователей, значимыми участниками развития ДР являются ММР [Фабрикантов О.Л. и соавт., 2022], представляющие собой группу энзимов, отвечающих за деградацию компонентов внеклеточного матрикса соединительной ткани, и играющие решающую роль в ремоделировании сосудов [Lee E.J. et al., 2021].

Результаты исследований ММР и ингибитора протеаз Cystatin C в крови у лиц с разной степенью нарушения углеводного обмена показали, что при «преддиабете» содержание ММР-2 ниже на 17,1% ($p=0,04$), а белка cystatin C, напротив, выше на 34,5% ($p=0,02$), чем в контроле (рисунок 4 А).

В группе больных СД увеличены значения ММР-9 на 96,1% ($p<0,001$) от контроля, а концентрация Cystatin C превышает не только контрольную, но и таковую у лиц с «преддиабетом».

У пациентов с ДР уровень фермента ММР-9 уже достоверно превышает таковой группы лиц с «преддиабетом» и группы с СД без микроангиопатии. Содержание ММР-2 при ДР больше, чем в контроле, и выше, чем при «преддиабете» на 95,1% ($p=0,045$).

Значения cystatin C в группе с ДР составляют от уровня группы лиц с «преддиабетом» 465,4% ($p<0,001$) и от показателя группы СД без ДР – 355,9% ($p<0,001$).

В различные стадии ДР концентрации ММР и cystatin C также отличаются (рисунок 4Б).

При НПДР уровень cystatin C превышает таковой группы сравнения на 94,1% ($p<0,001$).

При ППДР наблюдается дальнейший рост в крови концентрации ММР-2 и ММР-9. Уровень последней и cystatin C превышают также значения группы пациентов с НПДР.

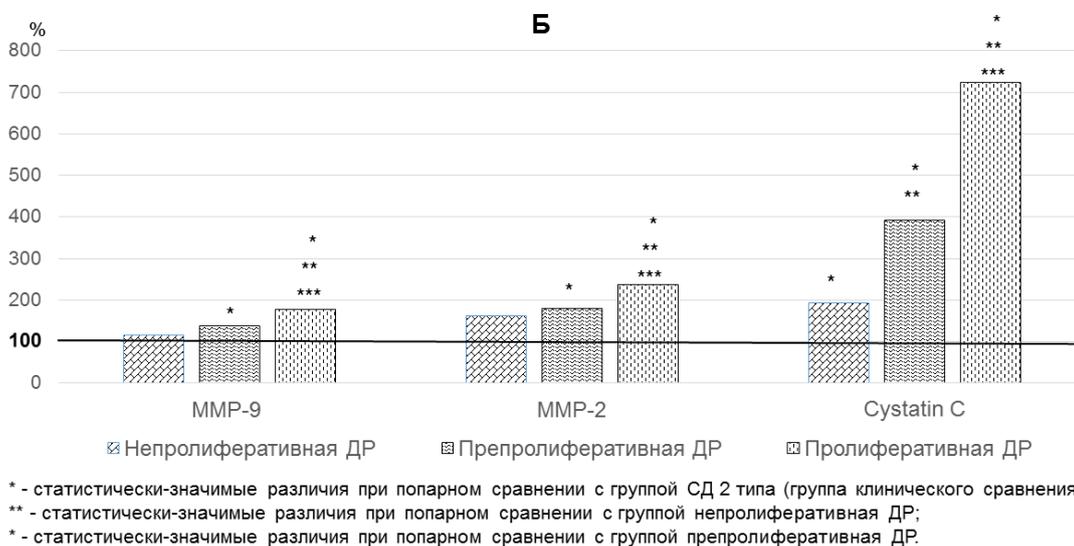
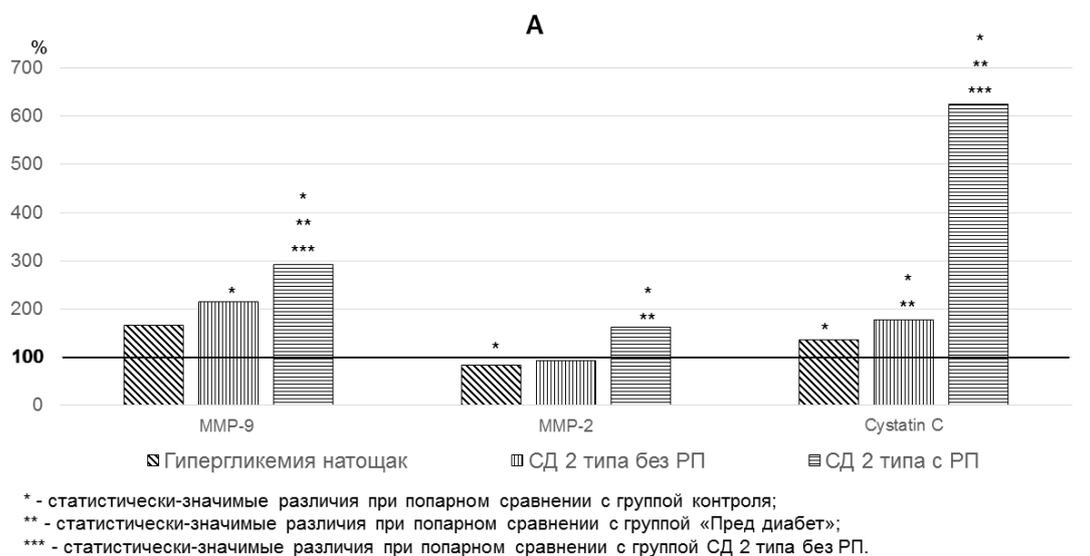


Рисунок 4 – Относительное содержание ММР и ингибитора протеаз в сыворотке крови
 А. У лиц с разной степенью нарушения углеводного обмена (100% - здоровые лица)
 Б. У лиц с разными стадиями ДР (100% - группа с СД без осложнений)

При ПДР как уровни ММР-9, ММР-2, так и концентрация ингибитора протеаз выше групп с НПДР и ППДР (рисунок 4Б).

То есть при «преддиабете» в крови уменьшается концентрация ММР-2, но увеличивается уровень ингибитора протеаз, при СД без осложнений увеличивается уровень ММР-9 и еще более cystatin С. Начиная с непролиферативной стадии ДР идет дальнейшее увеличение cystatin С, а с препролиферативной стадии ДР происходит рост значений ММР-9 и ММР-2.

Молекулы адгезии

Молекулы ICAM-1 и VCAM-1 считаются факторами неоваскуляризации при ДР [Kaur G. et al., 2023].

При рассмотрении изменений уровня ICAM-1 и VCAM-1 оказалось, что у лиц с «преддиабетом» и СД без осложнений, достоверных отличий от контроля не обнаруживается (рисунок 5А). В группе пациентов с ДР значения молекул адгезии значимо выше контроля, а также выше относительно лиц с «преддиабетом» и СД без осложнений.

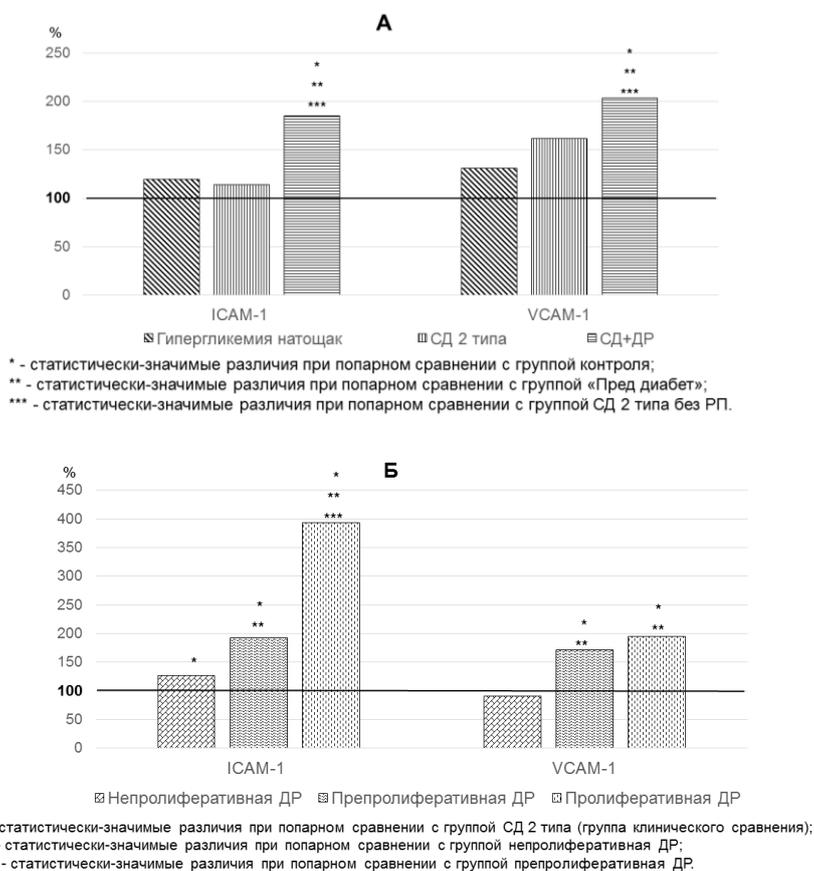


Рисунок 5 – Относительное содержание молекул адгезии в сыворотке крови

А. У лиц с разной степенью нарушения углеводного обмена (100% - здоровые лица)

Б. У лиц с разными стадиями ДР (100% - группа с СД без осложнений)

Изменения в группах с различными стадиями ретинопатии выглядели следующим образом (рисунок 5Б): у пациентов с НПДР значения ICAM-1 выше, чем в группе лиц с СД на 27,8% ($p=0,041$). При ППДР уровень молекул адгезии 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 уровень молекул ICAM-1 еще увеличился и уже превысил таковой у пациентов с препролиферативной ДР.

Таким образом, только при «преддиабете» и СД 2 типа уровень молекул адгезии остается на уровне контроля, при ДР наблюдается рост концентрации 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. При препролиферативной стадии значения ICAM-1 и VCAM-1 увеличиваются, при пролиферативной стадии показатели VCAM-1 остаются высокими, а уровень ICAM-1 продолжает расти.

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

В последнее время возрос интерес к метаболизму TRP. Установлено влияние многих кинуренинов на углеводный обмен, свободнорадикальные процессы, иммунные реакции, раскрыта их роль в некоторых заболеваниях, обусловленных хроническим системным вялотекущим воспалением.

В связи с этим интерес представляет изучение содержания кинуренинов в крови у больных с СД и ДР разной степени тяжести.

Как видно из рисунка 6А, в группе лиц с «преддиабетом» значения кинуренинов выше, чем в контроле: KYN – на 71,1% ($p<0,001$), 3-НКYN – на 25,2% ($p<0,001$), KYNA – на 49,4% ($p<0,001$).

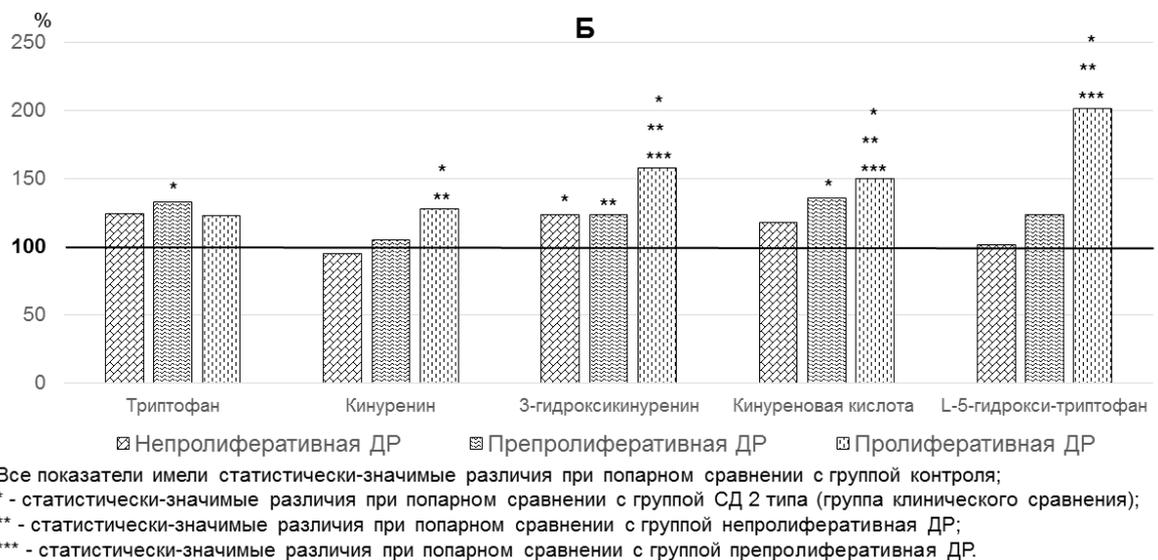
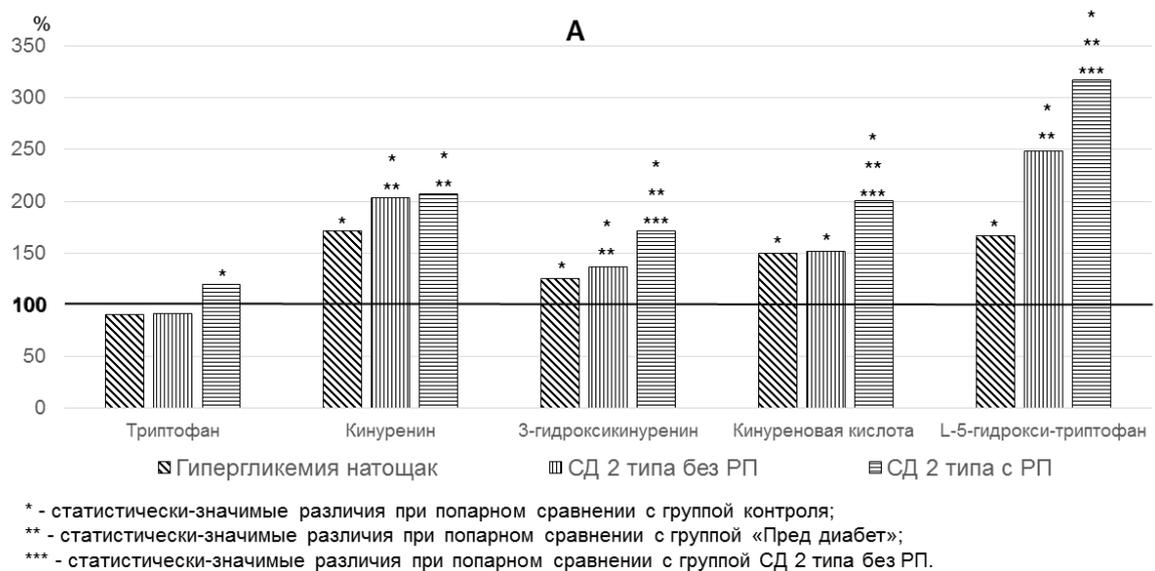


Рисунок 6 – Относительное содержание TRP и его метаболитов в плазме крови
 А. У лиц с разной степенью нарушения углеводного обмена (100% - здоровые лица)
 Б. У лиц с разными стадиями ДР (100% - группа с СД без осложнений)

У пациентов с СД 2 типа значения KYN, 3-НКYN и KYNA 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 оказались больше, чем в группе лиц с «преддиабетом», составляя от них 118,7% ($p = 0,025$) и 108,3% ($p = 0,030$). Выше, чем при «преддиабете», регистрируется концентрация 5HTRP.

В группе пациентов с ДР уровень TRP превышает контроль на 19,4% ($p = 0,040$); концентрация KYN выше контрольной на 107,2% ($p < 0,001$) и выше, чем в 1-й группе, на 21,1% ($p = 0,040$). В этой же группе наблюдается рост содержания 3-НКYN и KYNA на 26,0% ($p = 0,003$) и 32,0% ($p = 0,015$) по сравнению

с группой больных СД без ДР. Выявленные изменения в содержании кинуренинов при ДР являются неблагоприятными, учитывая, что 3-НКУН в ряде реакций должен превращаться в кофермент NAD, играющий важную роль в процессах клеточного дыхания и антирадикальной защиты. Накопление 3-НКУН скорее свидетельствует о замедлении скорости образования конечного продукта. Значения 5НТРР у больных с ДР выше чем в контроле, чем при «преддиабете» и больше, чем при СД на 27,9% ($p=0,042$).

При анализе TRP и его метаболитов у лиц с разными стадиями ДР (рисунок 6Б) выявлено, что в группе больных НПДР лишь значения 3НКУН превышали таковые группы сравнения на 23,4% ($p=0,002$).

При ППДР увеличены относительно группы сравнения – уровень TRP на 33,3% ($p=0,025$), концентрации 3НКУН и КУНА на 23,4 % ($p=0,002$) и на 35,8% ($p=0,015$) соответственно.

При ПДР значения кинуренинов максимально высокие: концентрация КУН превышает таковую группы сравнения на 27,9% ($p=0,030$) и таковую в НПДР – на 34,8 % ($p=0,025$); уровень 3НКУН увеличен не только относительно группы сравнения, но и относительно 4 и 5 групп – на 28,0% ($p=0,001$); содержание КУНА выше на 27,2% ($p=0,029$) чем у лиц с НПДР, на 10,3% ($p=0,007$) – чем у больных с ППДР. Значения 5НТРР в группе с ПДР превысили таковые в группах с НПДР и с ППДР.

Таким образом, высокий уровень метаболитов TRP зафиксирован уже в группе лиц с «преддиабетом», а максимально увеличен – при последней стадии ДР.

Корреляционные взаимоотношения между значениями метаболитов триптофана, другими лабораторными показателями и некоторыми офтальмологическими параметрами

Для того, чтобы доказать взаимосвязь между развитием ДР, имеющимися изменениями в обмене TRP, воспалением и повреждением сосудистой стенки, на следующем этапе проведен корреляционный анализ. Как сила, так и количество связей максимальны между 3НКУН и остальными показателями (таблица 2).

Таблица 2 – Оценка степени корреляции исследуемых параметров с 3-НКУН

Параметр	n	Коэффициент корреляции по <u>Спирмену</u>	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
MMP-2	126	0,06	Слабая прямая	p=0,081
<u>Cystatin C</u>	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
<u>TRp</u>	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 <u>фовеа</u>	126	0,75	Высокая прямая	p<0,001
Средняя толщина сетчатки <u>парафовеа</u>	126	0,76	Высокая прямая	p<0,001
средняя толщина сетчатки <u>перифовеа</u>	126	0,54	Умеренная прямая	p<0,001

Выявлено, что уровень TRP взаимосвязан с концентрацией глюкозы ($r=0,38$; $p=0,020$). Установлено множество корреляций между значениями кинуренинов и содержанием изученных белков, офтальмологическими изменениями.

Далее проведен многофакторный регрессионный анализ и определены наиболее значимые факторы развития ДР. В качестве переменных использованы все показатели. В результате построено уравнение множественной регрессии:

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

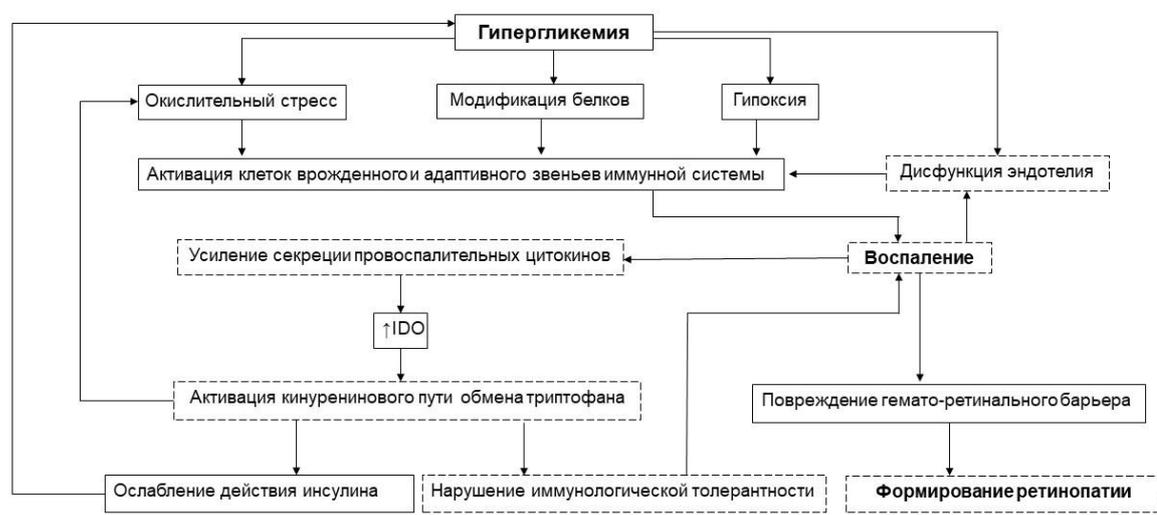
A – формирование ДР; ЗНКYN, CTLA-4 – уровень веществ в крови.

С помощью метода бинарной логистической регрессии было показано, что высокой прогностической значимостью развития ДР имеют концентрации 3 гидроксикинуренина и CTLA-4 в сыворотке крови. Это позволяет предсказать в 87% развитие диабетической ретинопатии (чувствительность модели 79%). Полученные данные подтверждают роль кинуренинов в патогенезе ДР, а также участие иммуноопосредованного воспаления в её развитии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нарушения регуляции иммунитета, субклиническое воспаление, изменения в метаболизме TRP и активности протеаз выражены уже на стадии «преддиабета», вероятно, способны осуществлять роль триггера в возникновении эндотелиальной

дисфункции, а в последующем являться звеньями в развитии патологических процессов при ДР (рисунок 7). В дальнейшем все названные метаболические сдвиги способствуют прогрессирующему нервно-сосудистому поражению сетчатки.



Собственные данные выделены пунктиром

Рисунок 7 – Патогенетические механизмы развития ДР, 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, $N=44,55$, $p<0,001$), 3-гидроксикинуренина (11,5; 14,4; 15,6; 19,7 мкмоль/л соответственно, $N=52,52$, $p<0,001$), кинуреновой кислоты (39,9; 59,6; 60,6; 80,01 мкмоль/л соответственно, $N=46,26$, $p<0,001$).
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 с «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 кинуриенинов 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.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ Статьи, опубликованные в рецензируемых журналах, определенных ВАК при Минобрнауки России:

1. Метаболиты кинуриенинового 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).

2. 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. (Scopus)

3. 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. – Вып. 91 – С. 77–83.

4. 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 10.29001/2073-8552-2024-39-3-89-95 // Сибирский

журнал клинической и экспериментальной медицины. – 2024. – Т. 39, № 3. – С. 89–95. (Scopus)

5. 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 : электронное научное издание. – 2024. – № 2. – С. 52–60. – URL: <https://www.zabmedvestnik.ru/jour/article/view/33> (дата обращения: 25.01.2025).

Публикации в прочих изданиях:

6. Саклакова О.А. Содержание в крови некоторых метаболитов кинуренинового пути обмена триптофана у пациентов с сахарным диабетом / О.А. Саклакова, З.Б. Доржиев ; научные руководители: Е.В. Фефелова, П.П. Терешков, Н.А. Шемякина // Медицина завтрашнего дня : материалы XXII научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием, 18-21 апреля 2023 года, г. Чита / ответственный за выпуск Д.М. Серкин. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2023. – С. 254–255. – 1 CD-ROM. – Загл. с титул. экрана. – ISBN 978-5-904934-54-5.

7. Концентрации растворимых форм молекул PD-1 и PD-L1 у пациентов с «преддиабетом» и сахарным диабетом 2 типа / О.А. Саклакова, Е.В. Фефелова, М.В. Максименя [и др.] // II ежегодная Научная сессия ФГБОУ ВО ЧГМА : сборник научных трудов, 4 октября 2023 г., г. Чита / под общей редакцией Н.В. Ларёвой. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2023. – С. 40–42. – 1 CD-ROM. – Загл. с титул. экрана. – ISBN 978-5-904934-55-2.

8. Роль факторов агрессии нейтрофилов в патогенезе диабетической ретинопатии / О.А. Саклакова, М.В. Максименя, Е.В. Фефелова, П.П. Терешков // Актуальные проблемы патофизиологии и лабораторной диагностики : сборник научных статей III научно-практической конференции с международным участием, 29-30 ноября 2023 г., г. Чита / под общей редакцией Н.В. Ларёвой. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2023. – С. 247-251. – ISBN 978-5-904934-57-6.

9. Саклакова О.А. Особенности содержания триптофана в крови пациентов с сахарным диабетом / О.А. Саклакова, Т.М. Караваева, М.В. Максименя // Экология. Здоровье. Спорт. Материалы IX Международной научно-практической конференции, 18-19 мая 2023 г., г. Чита / ответственный редактор С.Т. Кохан. – Чита : ЗабГУ, 2023. – С. 62–64. – ISBN 978-5-9293-3202-9.

10. Особенности в содержании некоторых кинуренинов при диабетической ретинопатии разной степени тяжести / О.А. Саклакова, М.В. Максименя, П.П.

Терешков, Е.В. Фефелова // Забайкальский медицинский журнал. – 2023. – № 3. – С. 11–13.

The role of disturbances in the regulatory function of the body's immune system in the pathogenesis of diabetic retinopathy / O.A. Saklakova, M.V. Maksimenya, P.P. Tereshkov, E.V. Fefelova. – DOI 10.34660/IFN.2025.82.75.042 // Scientific research of the SCO countries: synergy and integration : International Conference. Part 2, March 12, 2025, Beijing, PRC. – Beijing ; China, 2025. – P. 52–58.

Список сокращений

ДР	–	диабетическая ретинопатия
КП	–	кинурениновый путь
СД	–	сахарный диабет
3-НК	–	3-гидроксикинуренин
5HTRP	–	5-гидрокситриптофан
B7.2	–	мембранный белок суперсемейства иммуноглобулинов B7
CTLA-4	–	цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4
ICAM-1	–	молекула межклеточной адгезии 1
VCAM-1	–	васкулярная молекула клеточной адгезии 1
KYN	–	кинуренин
KYNA	–	кинуреновая кислота
Lag-3	–	белок гена активации лимфоцитов-3
MMP	–	матриксные металлопротеиназы
NAD	–	никотинамидадениндинуклеотид
PD-1	–	белок запрограммированной смерти клеток 1
Tim-3	–	белок Т клеточного иммуноглобулина и муцинового домена-3
TRP	–	триптофан
SAA	–	сывороточный амилоидный белок А
MRP8/14	–	кальпротектин 8/14
NGAL	–	липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов