

Рівень маркерів нейрозапалення в пацієнтів на діабетичну ретинопатію на фоні цукрового діабету 2-го типу та генетично детермінованої гіпергомоцистеїнемії

Ю. О. Панченко¹, д-р мед. наук, В. С. Цибульський¹, аспірант,
Л. В. Натрус², д-р мед. наук, професор, Г. Є. Захаревич³, доктор філософії

¹ Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика
Київ (Україна)

² Національний медичний університет імені О. О. Богомольця
Київ (Україна)

³ Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
Львів (Україна)

Ключові слова:

цитокіни, ненейрональна енолаза, діабетична ретинопатія, сітківка

Вступ. Гіпергомоцистеїнемія внаслідок поліморфізмів генів, що кодують синтез ферментів фолатного циклу, тісно корелює з маркерами системного запалення. Хронічна гіперпродукція цитокінів у нервовій тканині пацієнтів з цукровим діабетом 2-го типу (ЦД2) викликає гліоз і є загрозою виникнення нейрозапалення, яке може бути важливою патогенетичною ланкою діабетичної ретинопатії (ДР).

Мета роботи – дослідити рівень маркерів нейрозапалення (IL-1b, IL-10) й маркеру гліозу (ненейрональної енолази, NNE) у пацієнтів на ДР на фоні ЦД2 типу та генетично детермінованої гіпергомоцистеїнемії.

Матеріал та методи. Під спостереженням було 106 пацієнтів із ЦД2 та ДР. Стадія ДР визначена відповідно до шкали ETDRS: непроліферативна (level 47–53e), проліферативна (level 61–75) та прогресуюча (level 81–85). Контрольну групу (КГ) склали 64 особи, які були порівняні за віком, статтю, способом життя з пацієнтами. Усім встановили генотип генів MTHFR C677T (rs1801133); MTHFR A1298C (rs1801131); MTR A2756G (rs1805087) з використанням системи TaqMan® SNP Genotyping Assay (США) на ампліфікаційній системі Applied Biosystems 7500 RealTime PCR System (США). Шляхом твердофазного імуно-ферментного аналізу визначили вміст L-гомоцистеїну, цитокінів та енолази.

Результати. Виявили підвищення в 1,7 раза ($p < 0,05$) цитокіну IL-1b у пацієнтів з ДР, у яких ЦД2 триває менше 15 років, порівняно з хворими з більшою тривалістю основного захворювання. Вміст енолази також був децю вище в цій групі пацієнтів, але без статистично значущої різниці. Виявлена кореляція рівня L-гомоцистеїну з IL-1b ($R = 0,320$, $p < 0,01$), із IL-10 на рівні ($R = 0,357$, $p < 0,01$) та з NNE ($R = 0,286$, $p < 0,01$). Виявлений кореляційний зв'язок NNE з цитокінами на рівні ($R = 0,279$, $p < 0,01$) із IL-10 та ($R = 0,368$, $p < 0,01$) із IL-1b.

Висновок. Підвищення рівня прозапальних цитокінів у плазмі крові пацієнтів свідчить про значну роль нейрозапалення в патогенезі ДР. Носійство генотипів: CC гену rs1801133, GG гену rs1805087, CC гену rs1801131 можна вважати фактором ризику розвитку ДР на тлі ЦД2.

Вступ. Цукровий діабет 2-го типу (ЦД2) є одним із найрозповсюджених неінфекційних захворювань, яке набуває масштабу епідемії. Особливу загрозу для пацієнтів мають ускладнення діабету, серед яких визначають діабетичну ретинопатію (ДР), що спричиняє різке зниження зору, навіть його втрату. Вивчення патогенезу ДР триває і не втрачає своєї актуальності через значну кількість патогенетичних факторів. [1]. В останні роки парадигма поглядів на ушкодження сітківки зміщується в бік більш комплексного підходу, й патогенез ДР розглядається як тканинспецифічне нейроваскулярне ускладнення. Дослідники визначають субстрат, який пошкоджується при ретинопатії у вигляді нейроваскулярної одиниці сітківки, що складається з нейронів, гліальних клітин і інтратетинальної судинної мережі. Як важливу причину розвитку ДР розглядають результат дисфункції нервових елементів – активацію гліальних клітин (астроцитів, клітин Мюллера й мікроглії) та дегенерацію нейронних елементів (гангліозних, біполярних, горизонтальних та амакринових клітин). Ці ланки позиціонуються як таргетні для потенційних фармакологічних впливів у пацієнтів з ДР. [2, 3].

Отже, вважається, що тривала гіперглікемія спричиняє не лише мікросудинне пошкодження та ішемію, але й інтратетинальне запалення та нейрональну дегенерацію. Нейрозапалення та нейрональна дегенерація є загальними явищами, що виникають на всіх стадіях ДР, і пов'язані з ефектами судинної ексудації та ішемії сітківки. [4–7].

Отже, вважається, що тривала гіперглікемія спричиняє не лише мікросудинне пошкодження та ішемію, але й інтратетинальне запалення та нейрональну дегенерацію. Нейрозапалення та нейрональна дегенерація є загальними явищами, що виникають на всіх стадіях ДР, і пов'язані з ефектами судинної ексудації та ішемії сітківки. [4–7].

Сьогодні активно вивчається зв'язок розвитку нейродегенеративних процесів на фоні генетично детермінованого порушення фолатного обміну [8–10]. Установлено, що кожна третя людина є носієм хоча б одного відомого поліморфізму генів, що кодують синтез ферментів фолатного циклу. Гіпергомоцистеїнемія, яка виникає через комбінацію несприятливих поліморфізмів генів, є визнаним фактором ризику атеросклеротичних і серцево-судинних захворювань. [11]. Індукована гомоцистеїном токсичність впливає на стан ендотеліальних клітин судин і стає підґрунтям виникнення ушкодження сітківки. [12]. Дослідники демонструють гіпергомоцистеїнемію, порушення фолатного циклу, обміну вітамінів групи В у пацієнтів з ДР на фоні ЦД2, як важливі патогенетичні ланки [13, 14]. Виявлені закономірності відкривають шлях до персоналізованого ведення пацієнтів з ДР і рекомендації щодо запобігання ускладнень ЦД2.

Більшість досліджень, що присвячені впливу гіпергомоцистеїнемії на розвиток аутизму, деменції, хвороби Паркінсона, Альцгеймера, дають підґрунтя розглядати нейрозапалення як важливий елемент нейродегенерації. [15]. Однак бракує даних про те, які ланцюги мозку особливо сприйнятливі до пошкодження, спричинених гіпергомоцистеїнемією і про роль нейрозапалення, індукованого гіпергомоцистеїнемією у пацієнтів з ДР.

Описано структурно-функціональні властивості двох енолаз мозку, які розглядають як функціональні маркери клітин мозку. Імуноцитохімічні методи встановили, що одна енолаза мозку обмежена нейрональними клітинами (нейроспецифічна енолаза, NSE), тоді як інша локалізована в гліальних клітинах (ненейрональна енолаза, NNE). Відомо, що на системне запалення й каскад цитокінів перш за все реагують гліальні клітини. [16].

Мета роботи – дослідити рівень маркерів нейрозапалення (IL-1b, IL-10) і маркеру гліюзу (ненейрональної енолази, NNE) у пацієнтів на діабетичну ретинопатію на фоні цукрового діабету 2-го типу та генетично детермінованої гіпергомоцистеїнемії.

Матеріал та методи

Дослідження було проспективним, обсерваційним, клінічним, за типом «випадок-контроль».

Усі дослідження проведено з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964, з подальшими доповненнями, включаючи версію 2000 р.) та відповідали чинному законодавству України.

Усі пацієнти дали письмову інформовану згоду на участь у дослідженні.

У дослідженні взяло участь 106 пацієнтів з основним діагнозом ЦД2, які склали дослідну групу (ДГ). Середній вік (Me [Min-Max]) становив 65,68 [48–80]

років. Жінок було 71 (67%), чоловіків – 35 (33%). Тривалість ЦД2 7–14 років виявлена у 63 пацієнтів, 15–34 років у 43 хворих.

Усім пацієнтам проведено обстеження в офтальмологічній клініці (загальноприйняті офтальмологічні обстеження: візометрія, рефрактометрія, статична периметрія Humphrey, тонометрія, біомікроскопія, офтальмоскопія, офтальмоскопія за допомогою асферичної лінзи Volk SuperField і контактної тридзеркальної лінзи Гольдмана). Зокрема, всім пацієнтам виконували спектральнодоменну оптичну когерентну томографію (ОСТ) на приладі Corneiscus REVO, а також проводили дослідження очного дна на фундус-камері з його фотографуванням у 7 стандартних полях відповідно до модифікованої ETDRS системи клінічних ознак AirlieHouse. Гоніоскопія проводилася за необхідності. За результатами обстеження виявляли стадію ДР. Визначаючи стадії ДР, орієнтувалися на критерії шкали ETDRS [17]. До 1 групи – «НПДР» – віднесли 58 пацієнтів, у яких визначили непроліферативну ДР (НПДР) різної тяжкості (level 47–53e), до 2-ї групи – «ПДР_1» віднесли 25 пацієнтів із помірно проліферативною ретинопатією (ПДР) (level 61–75) та у 23 визначили прогресуючу ПДР (Advans_PDR, level 81–85), з якої сформували 3-тю групу – «ПДР_2».

Контрольну групу (КГ) склали 64 особи, які не мали діагностованих порушень метаболізму й звернулися до клініко-діагностичної лабораторії Університетської клініки НМУ імені О. О. Богомольця з метою профілактичного огляду. Серед них жінок було 38 осіб (60%). Середній вік КГ (Me [Min-Max]) становив 58,4 [42–79] років.

Кров для молекулярно-генетичних досліджень збирали в пробірку (4 мл) з фіолетовою кришкою, що містила (EDTA, K3) як антикоагулянт. Далі відокремлювали плазму, та обидві проби маркували й заморожували при -20°C . Пробу з клітинами використовували для визначення генотипу молекулярно-генетичним методом ПЛР реал-тайм через ідентифікацію поліморфізму (Single Nucleotide Polymorphism, англ., SNP). У плазмі визначали вміст цитокінів, NNE та гомоцистеїну методом твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА, ELISA). Вимірювання проводили на фотометрі для мікропланшетів HiPo MPP-96, (Biosan, Латвія) з використанням планшетного промивача 3D-IW8 Inteliwasher, (Biosan, Латвія) та термощейкера PST-60HL-4, (Biosan, Латвія) за допомогою наборів: Elabscience Human IL-1 β (Interleukin 1 Beta, IL-1b) ELISA Kit, E-EL-H0149, чутливість – 4,69 пг/мл, межі вимірювання 7.81–500 пг/мл). Elabscience Human IL-10 (Interleukin 10, IL-10) ELISA Kit, E-EL-H6154, чутливість – 0.94 пг/мл, межі вимірювання – 1.56–100 пг/мл). Elabscience Human NNE (Non-Neuronal Enolase, NNE) ELISA Kit, E-EL-H1260, чутливість – 0.19 нг/мл, межі вимірювання 0,31–20 нг/мл). L-гомоцистеїн визначали в плазмі крові за допомогою реактивів Axis-Shield (FHCY100, Lot 902943161) (Великобританія).

Обробка даних здійснювалася за допомогою програмного забезпечення QuantAssay 0.8.2.6.

Аналіз генотипу проводили шляхом визначення поліморфізмів генів, що кодують ферменти фолатного циклу: MTHFR C677T (rs1801133); MTHFR A1298C (rs1801131); MTR A2756G (rs1805087). Усі етапи проводили згідно з інструкцією та стандартними протоколами. Виділяли геномну ДНК за допомогою наборів PureLink® Genomic DNA Kits For purification of genomic DNA, виробник INVITROGEN (США). Аналіз поліморфних ДНК-локусів виконували з використанням системи TaqMan® SNP Genotyping Assay (США) на ампліфікаційній системі Applied Biosystems 7500 RealTime PCR System (США).

Указані дослідження проводили в лабораторії Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини Національного медичного університету імені О. О. Богомольця за договором про співпрацю.

Статистичний аналіз проводили за допомогою програм IBM SPSS Statistics 23 та MedStat. Розподіл даних перевіряли на відповідність Гаусовському за допомогою одновибіркового критерію Шапіро-Уїлка. Кореляційний аналіз здійснювали відповідно до критеріїв Пірсона та Спірмена. Для опису даних (більшість вибірок були непараметричні) використовували значення медіани (Me) та стандартне відхилення ($\pm\sigma$). Діаграми надавали у вигляді стовпчиків із вказівкою довірчого інтервалу (ДІ 95%).

Результати

На першому етапі ми провели аналіз поліморфізмів генів, які траплялися у групах пацієнтів дослідної (об'єднаної) групи ДГ (n= 106) та КГ (рис. 1). За нашими даними, більшість осіб мали гетерозиготний поліморфізм гену rs1801133 СТ, який був у 53% пацієнтів та 59% осіб КГ. Генотипи СС та ТТ цього гену в КГ зустрічалися майже однаково, ТТ у 19%, а СС у 22%. У пацієнтів домінував генотип СС – у 39%, а ТТ спостерігалися лише у 8% хворих.

Аналіз генотипів гену rs1805087 виявив, що в осіб КГ мажорним є генотип АА (у 64%), а гетерозиготний поліморфізм АГ присутній у 36%. Осіб з генотипом GG серед здорових осіб ми не виявили. Проте, в пацієнтів на ДР 7% мали генотип GG. Відповідно генотип АА мали 51% пацієнтів, а гетерозиготу АГ – 42% пацієнтів.

Аналіз розподілу генотипів гену rs1801131 показав домінування носіїв гетерозиготи АС. Серед пацієнтів таких було 51%, а серед осіб КГ – 54%. Носії мажорного генотипу АА серед пацієнтів траплялися в 32% випадках, а серед осіб КГ у 40%. Носіїв генотипу СС серед пацієнтів було майже у двічі більше й складало 17%, а серед осіб КГ – 6%.

Подальший аналіз розподілу відповідних алелей, а також співвідношення шансів між досліджуваними показниками не виявив зв'язку генотипів генів MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G з ризиком роз-

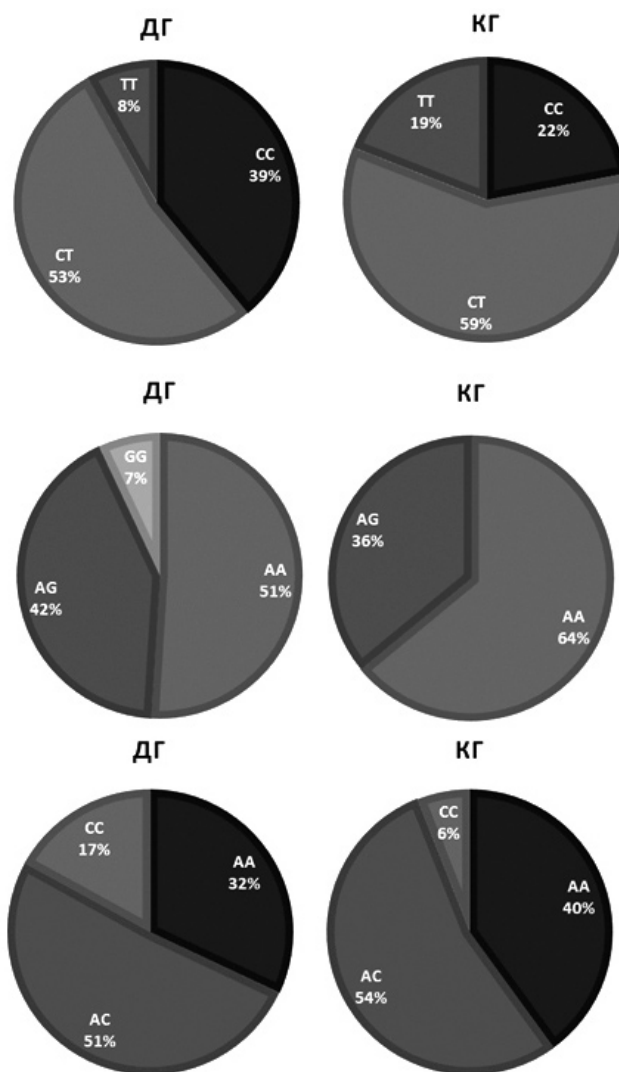


Рис. 1. Діаграми розподілу (%) частоти зустрічальності алелей і генотипів генів rs1801133 (СС, СТ, ТТ), rs1805087 (АА, АГ, GG), rs1801131 (АА, АС, СС) у пацієнтів дослідної групи (ДГ) та осіб контрольної (КГ).

витку ДР на фоні ЦД2. Однак вказані дані ми використовували для подальшого виявлення зв'язку найбільш розповсюджених варіантів генотипів та поліморфізмів генів з фенотипічними ознаками гіпергомоцистемії, системного запалення й ушкодження нервової тканини.

Вивчення гомоцистемії у плазмі пацієнтів та осіб КГ (рис. 2) показало статистично значуще збільшення показника у хворих. У групі ДГ вміст L-гомоцистеїну складав $22,21 \pm 6,3$ мкмоль/л, що було в 1,58 рази більше ($p \leq 0,05$), ніж в осіб КГ – $14,00 \pm 5,6$ мкмоль/л. Однак у групах з різною стадією ДР показник майже не відрізнявся: у пацієнтів з НДР був $21,7 \pm 7,08$ мкмоль/л, в групі ПДР_1 – $22,33 \pm 4,9$ мкмоль/л, в групі ПДР_2 – $22,36 \pm 5,28$ мкмоль/л.

Концентрація IL-1b у плазмі пацієнтів ДГ складала $8,7 \pm 6,4$ пг/мл, що у 9 разів ($p \leq 0,05$) більше, ніж у осіб КГ, де вміст цитокіну визначався $0,96 \pm 0,8$ пг/мл.

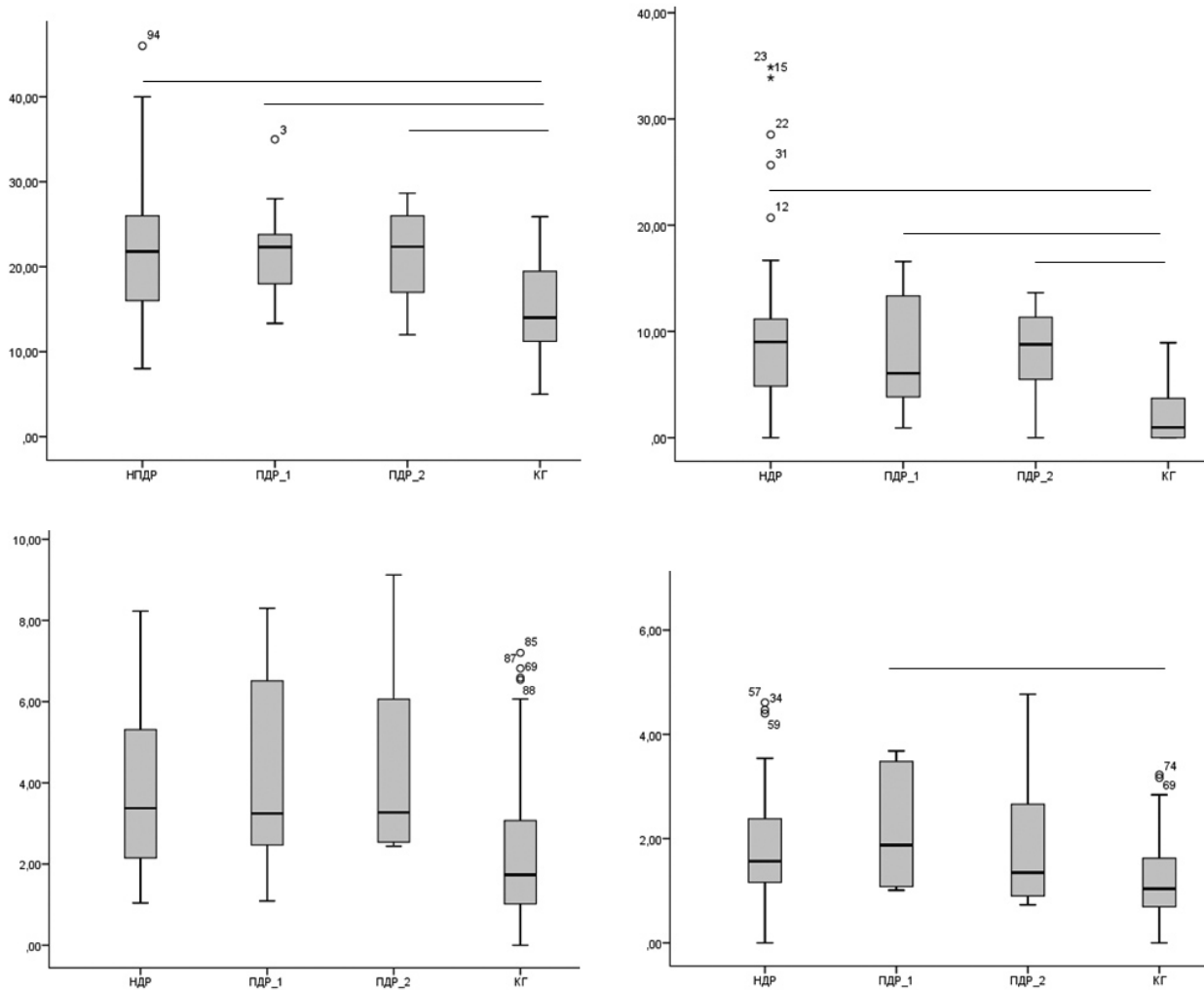


Рис. 2. Вміст L-гомоцистеїну (А), IL-1b (Б), IL-10 (В), ненейрональна енолаза (NNE) (Г) в плазмі крові пацієнтів дослідних груп: непроліферативна діабетична ретинопатія (НДР), проліферативна діабетична ретинопатія_1 (ПДР_1), проліферативна діабетична ретинопатія_2 (ПДР_2) у порівнянні з особами контрольної групи (КГ). Указано значення медіани, ДІ 95%, та * – відмінність між групами ($p \leq 0,05$).

У пацієнтів з НДР він був найбільшим – $9,01 \pm 6,3$ пг/мл, у групі ПДР_1 – $6,06 \pm 3,2$ пг/мл, а в групі ПДР_2 – $8,7 \pm 2,6$ пг/мл. Отже, виявлення статистично значущої відмінності показника цитокіну IL-1b у плазмі пацієнтів з ДР на фоні ЦД2 свідчить про наявність запального процесу у вказаного контингенту.

Вміст IL-10 також у пацієнтів ДГ був статистично значуще вищий, ніж у осіб КГ, і склав $3,37 \pm 2,0$ пг/мл, що в 2 рази ($p \leq 0,05$) вище у порівнянні з контролем $1,73 \pm 1,2$ пг/мл. У групах з різною стадією ушкодження сітківки показник практично не відрізнявся й склав відповідно: $3,37 \pm 1,87$ пг/мл у групі НДР, $3,24 \pm 1,6$ пг/мл у групі ПДР_1, $3,27 \pm 1,4$ пг/мл у групі ПДР_2. Що майже в 2 рази перевищувало значення в контролі, проте завдяки значній дисперсії статистично значущої різниці виявити не вдалося.

Вміст NNE в пацієнтів з ДР склав $1,51 \pm 0,33$ нг/мл, що було вище, ніж в осіб КГ – $1,07 \pm 0,06$ нг/мл, але з незначною різницею. Статистично значущо відмін-

ність показника ми виявили з групою ПДР_1, де вміст протеїну був $1,87 \pm 1,3$ нг/мл, що в 1,7 рази ($p \leq 0,05$) вище за контроль. У групі НДР вміст NNE склав $1,56 \pm 0,9$ нг/мл, а в групі ПДР_2 молекулярно-генетичних досліджень – $1,35 \pm 0,15$ нг/мл.

Отже, за нашими даними, показники системного запалення та ушкодження нервової тканини в пацієнтів були вищими, ніж у осіб КГ, що свідчить про значну роль нейрозапалення в патогенезі ДР.

Значення зміни вказаних показників в залежності від тривалості основного захворювання відображені в таблиці 1.

Ми виявили статистично значуще підвищення в 1,7 рази ($p < 0,05$) цитокіну IL-1b у пацієнтів з ДР, у яких ЦД2 триває менше за 15 років, порівнюючи з хворими з більшою тривалістю основного захворювання. Вміст енолази також був дещо вище у цій групі пацієнтів, але без статистично значущої різниці. Вміст цитокіну IL-10 майже не відрізнявся, тобто не залежав від

Таблиця 1. Маркери запалення в пацієнтів з ДР в залежності від тривалості ЦД2 (Ме±σ)

Маркер	У пацієнтів з ЦД2 тривалістю до 15 років	У пацієнтів з ЦД2 тривалістю понад 15 років	p
IL-1b, пг/мл	9,4±3,6	5,6±3,4	p=0,02
IL-10, пг/мл	3,24±1,3	3,38±2,1	p> 0,05
NNE, нг/мл	2,02±1,5	1,34±0,6	p=0,068

Примітка: p – рівень статистичної значущості різниці між показниками; IL – інтерлейкіни; NNE – ненеурональна енолаза; ЦД – цукровий діабет.

Таблиця 2. Рівень кореляційного зв'язку між вмістом інтерлейкінів, нейроенолази та гомоцистеїном плазми крові в осіб з діабетичною ретинопатією на фоні цукрового діабету 2-го типу

Показник	L-гомоцистеїн	IL-1b	IL-10	NNE
L-гомоцистеїн	1	0,320** p=0,002	0,357** p=0,001	0,286** p=0,007
IL-1b		1	0,355** p=0,001	0,368** p=0,000
IL-10			1	0,279** p=0,009
NNE				1

Примітка: ** – кореляція значима, двостороння; p – рівень статистичної значущості різниці між показниками за критерієм Спірмена <0.01; NNE – ненеурональна енолаза.

тривалості ЦД2. Імовірно, на початкових термінах розвитку ретинопатії відбувається більш активний синтез прозапальних цитокінів, які впливають на стан гліальних елементів нервової тканини, викликають гліоз і привносять свій вклад у розвиток нейропатії. Згодом організм адаптується до стану запалення, й воно набуває характер низькоінтенсивного.

Вивчення кореляційних зв'язків указаних показників (табл. 2) продемонструвало двосторонню кореляцію вмісту L-гомоцистеїну з IL-10 на рівні (R = 0,357, p <0,01), з IL-1b (R= 0,320, p <0,01) та з NNE (R = 0,286, p <0,01). Також виявлений зв'язок NNE з цитокінами на рівні: з IL-10 (R = 0,279, p <0,01), із IL-1b (R = 0,368, p <0,01). Це свідчить про патогенетичний зв'язок гіпергомоцистеїнемії з маркерами системного та нейрозапалення в пацієнтів з ДР на фоні ЦД2.

Далі ми провели аналіз вмісту інтерлейкінів та нейроенолази в плазмі пацієнтів з різними генотипами генів фолатного циклу. Отримані дані наведені в діаграмах (рис. 3–5).

Обговорення

Отже, наявність генотипу CC гену rs1801133 можна розглядати як фактор ризику виникнення системного запалення та гліозу, оскільки у всіх носіїв цього генотипу спостерігали статистично значуще підвищення IL-1b, особливо на стадії НДР та початку розвитку ретинопатії. Присутність генотипу TT цього ж гену, навпаки, можна розглядати як фактор протекції, через найменшу різницю вмісту цитокіну IL-1b та NNS.

Також для цього контингенту є притаманним найбільший вміст IL-10 – цитокіну з потужними протизапальними властивостями, який відіграє центральну роль в обмеженні імунної відповіді.

Генотип GG гену rs1805087 може бути фактором ризику виникнення ДР на фоні ЦД2, оскільки його носії в наших групах виявилися лише серед хворих, та в них спостерігається максимальна концентрація IL-1b, що майже в 15 разів більше, ніж у КГ, особливо на стадії НДР. У цього ж контингенту пацієнтів ми помітили максимальне (у 2 рази) збільшення й NNE на стадії НДР. Генотип AA rs1805087 може розглядатися як протекторний через несуттєві відмінності у концентрації протеїну NNE і максимальний вміст протизапального IL-10.

За нашими спостереженнями, генотип CC гену rs1801131 є кандидатом у фактор ризику розвитку ДР на фоні ЦД2, оскільки в його носіїв і була виявлена в 10 разів більша концентрація IL-1b на стадії НДР та спостерігався зріст NNE на стадії розвинутої ПДР. У цього контингенту різниця у вмісті протизапального IL-10 між пацієнтами та особами КГ була найменшою.

Отримані дані узгоджуються з даними про те, що потенційними факторами ризику розвитку ДР на фоні ЦД2 можна вважати генотип CC гену rs1801133 через продемонстроване 14-кратним збільшенням ендотеліну-1 (ET-1) у пацієнтів з ДР [13]. Автори стверджують, що певну загрозу розвитку ДР мають пацієнти з ЦД2, які є носіями мінорного генотипу GG гену MTR 2756A/G (rs 1805087). У них поява мікросудинного ускладнення базується на багатьох механізмах, зокрема на підвищенні гомоцистеїну, ET-1, аргінази-1 та на дефіциті фолатів [13].

Таким чином, отримані дані підтверджують існуючу теорію щодо участі запальних процесів у нейродегенерації сітківки та патогенезі ДР. Імовірно, поряд з добре відомим механізмом ушкодження нейронів через продукти глікації, через накопичення продуктів оксидативного стресу варто розглядати й розвиток нейрозапалення та гліозу, що неодмінно створює загрозу для нейронів сітківки.

Взаємозв'язок між діабетичною нейропатією та васкулопатією активно обговорюється: нейродегенерація може бути наслідком субклінічних змін внутрішньоретинального мікроциркуляторного русла [4]. Нейродегенерацію сітківки можна розглядати лише як патологічну ознаку ДР, принаймні частково незалежну від мікросудинних змін. Такий по-

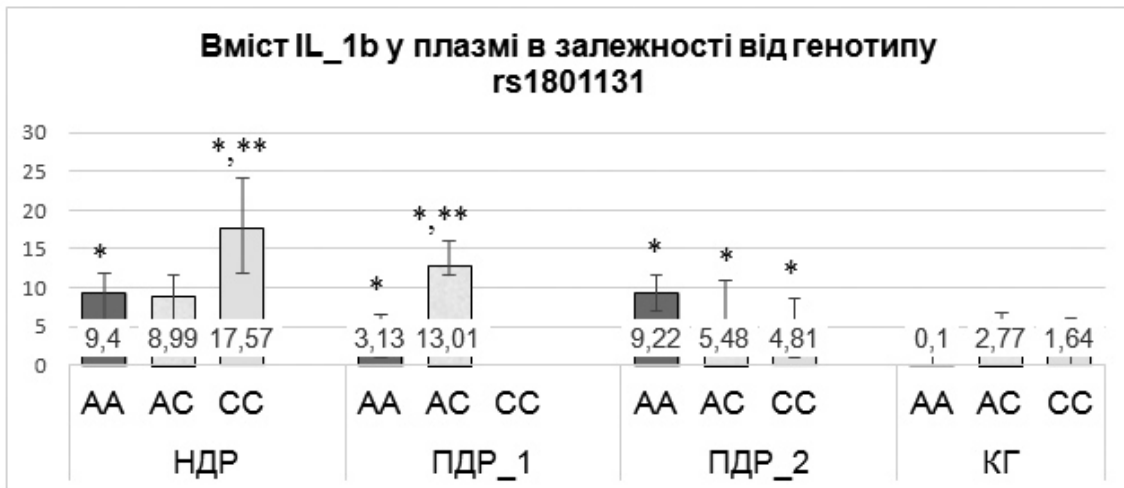
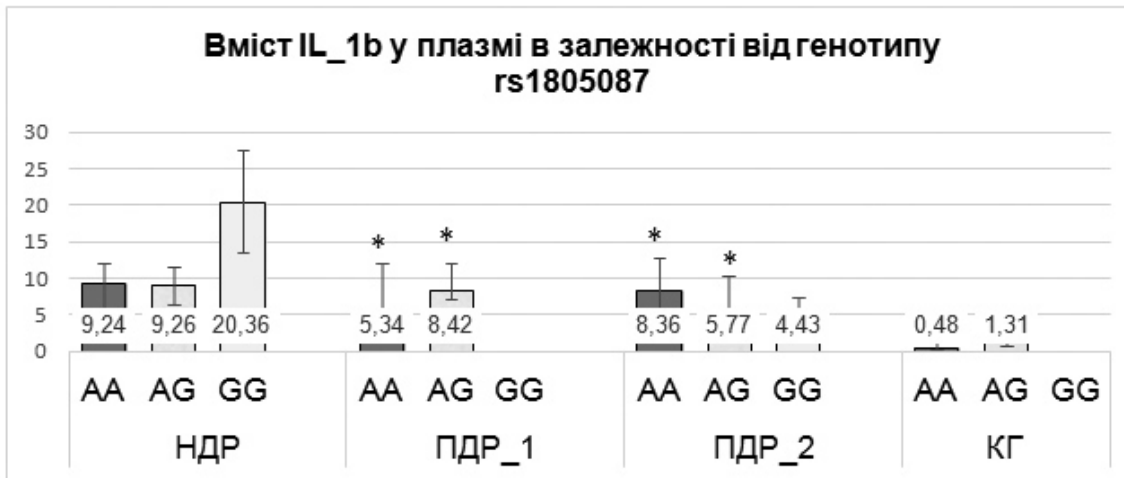
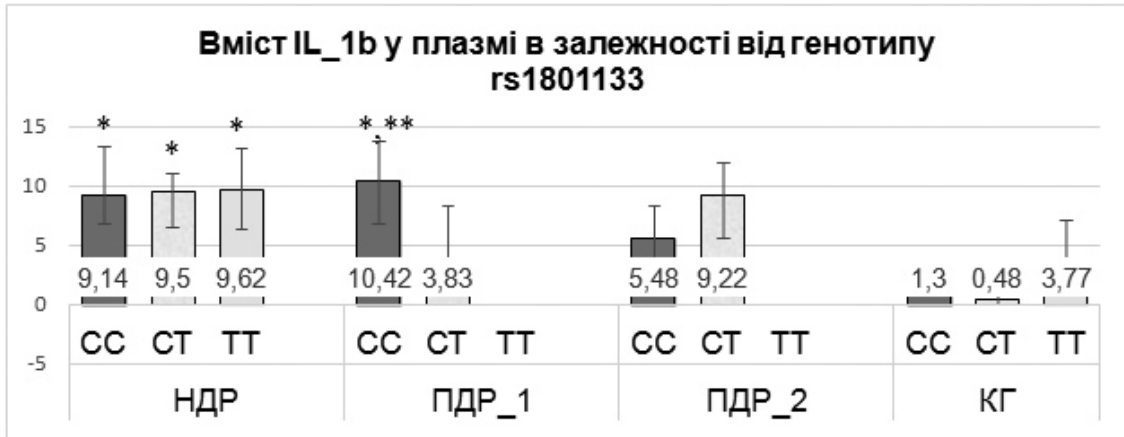


Рис. 3. Рівень цитокіну IL-1b (пг/мл) у плазмі крові пацієнтів дослідних груп: непроліферативна діабетична ретинопатія (НДР), проліферативна діабетична ретинопатія₁ (ПДР₁), проліферативна діабетична ретинопатія₂ (ПДР₂), порівнюючи з особами контрольної групи (КГ), розрахований відповідно до генотипів генів rs1801133 (CC, CT, TT), rs1805087 (AA,AG,GG), rs1801131 (AA, AC, CC). Значення медіани та довірчого інтервалу – ДІ 95%. p – рівень статистичної значущості різниці між показниками. * – відмінність від аналогічного показника КГ (p < 0,05), ** – відмінність від показника в групі з різними генотипами.

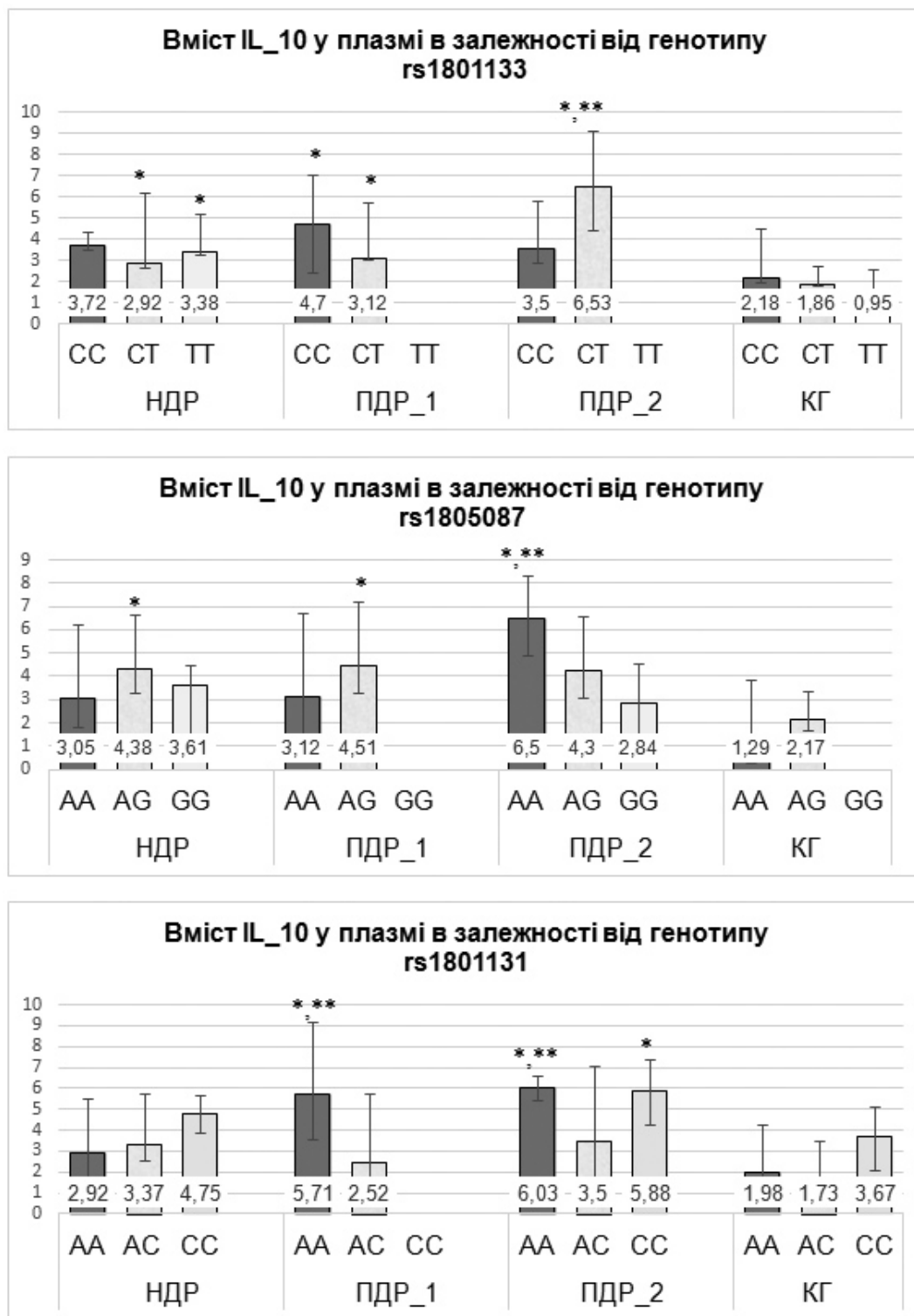


Рис. 4. Рівень цитокіну IL-10 (пг/мл) у плазмі крові пацієнтів дослідних груп: непроліферативна діабетична ретинопатія (НДР), проліферативна діабетична ретинопатія_1 (ПДР_1), проліферативна діабетична ретинопатія (ПДР_2), порівнюючи з особами контрольної групи (КГ), розрахований відповідно до генотипів генів rs1801133 (CC, CT, TT), rs1805087 (AA,AG,GG), rs1801131 (AA, AC, CC). Значення медіани та ДІ 95%. * – відмінність від аналогічного показника КГ (p < 0,05), ** – відмінність від показника в групі з різними генотипами.

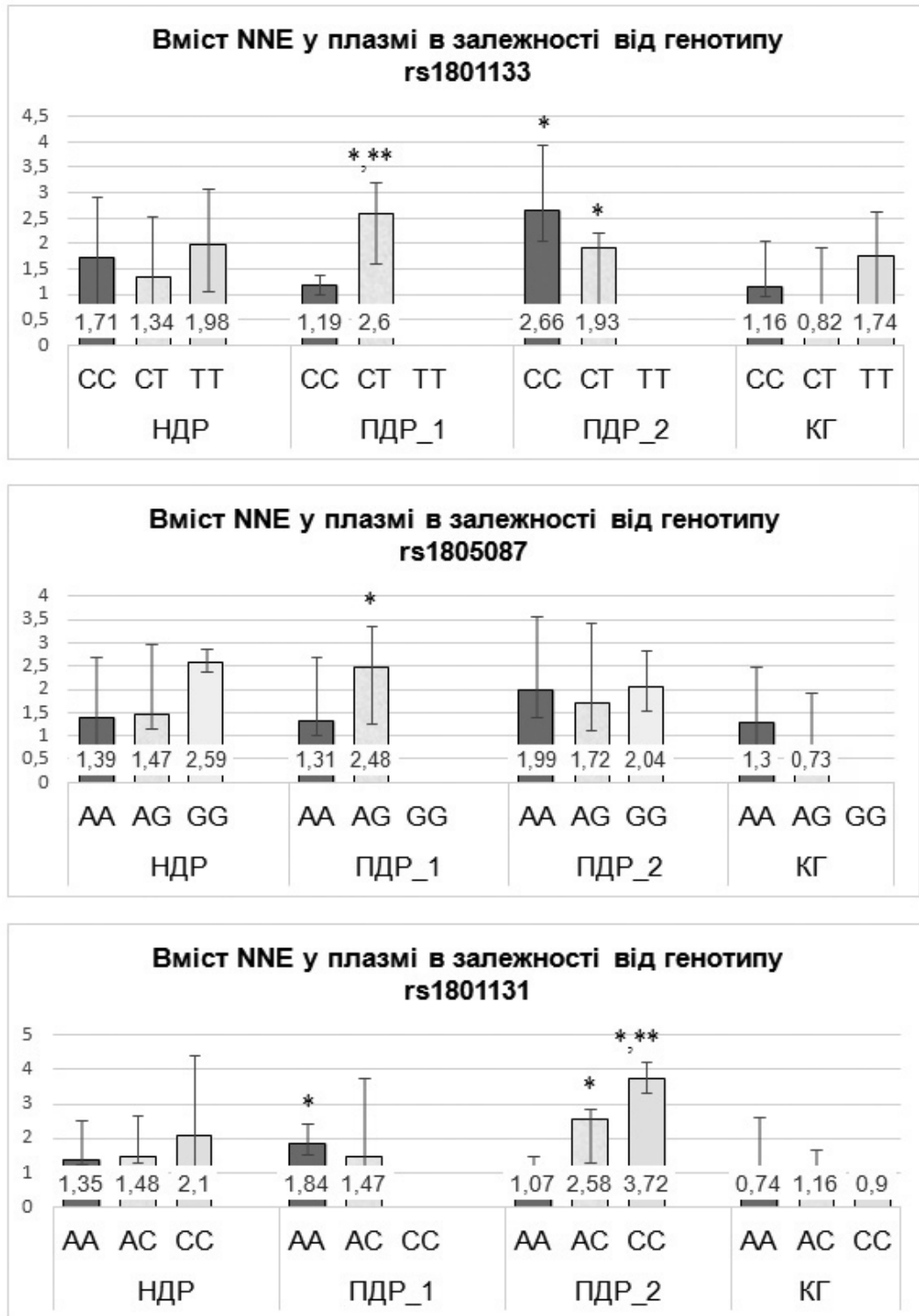


Рис. 5. Рівень протеїну ненейрональної енолази (NNE) (пг/мл) у плазмі крові пацієнтів дослідних груп: непроліферативна діабетична ретинопатія (НДР), проліферативна діабетична ретинопатія_1 (ПДР_1), проліферативна діабетична ретинопатія_2 (ПДР_2), якщо порівнювати з особами контрольної групи (КГ), розрахований відповідно до генотипів генів rs1801133 (CC, CT, TT), rs1805087 (AA,AG,GG), rs1801131 (AA, AC, CC). Значення медіани та ДІ 95%. * –відмінність від аналогічного показника КГ ($p < 0,05$), ** – відмінність від показника в групі з різними генотипами.

гляд на ДР викликає потребу в кращому фенотипуванні та стратифікації пацієнтів з ретинопатією у визначенні патогенетичних ланок, пов'язаних з хронічною нейродисфункцією, оцінкою доцільності призначення нейропротекторних препаратів, виявленням біомаркерів для оцінки результатів терапії, тощо.

Виявлені нами значний кореляційний зв'язок між гіпергомоцистеїнемією, запальним цитокином IL-1b та маркером глікозу – ненейрональною енолазою – свідчить про щільно пов'язані механізми ушкодження, які формують загрозу сітківці. Кореляція вказаних показників з концентрацією в плазмі протизапального IL-10 демонструє системний механізм формування імунної відповіді, що також є характерним для низькоінтенсивного (низькопорогового) хронічного процесу, перебіг якого рахується роками.

Виявлення в пацієнтів з ЦД2 характерних комбінацій поліморфізмів генів, що кодують синтез ферментів фолатного циклу, є підставою обговорювати роль генетично детермінованої гіпергомоцистеїнемії в патогенезі ДР на фоні ЦД2. І ми виявили певні закономірності у носіїв різних генотипів, які пов'язані із маркерами низькоінтенсивного нейрозапалення, що може розглядатися як фактори ризику появи ретинопатії або поглиблення її стадії. І хоча ми не встановили асоціації різноманітних варіантів генів з розвитком захворювання, проте охарактеризували фенотипічні ознаки, які можуть розглядатися як потенційні фактори ризику. Вважаємо, що цим ми внесли свій вклад у скарбничку знань про особливості перебігу захворювань у пацієнтів з різними генотипами, що збільшує потенційну успішність інструментів персоналізованої медицини.

Таким чином, отримані результати свідчать про ушкодження нервової тканини у хворих з ДР на фоні ЦД2, що проявляється більш інтенсивним синтезом прозапальних цитокинів та нейроенолази. Так, концентрація IL-1b у плазмі пацієнтів з ДР на фоні ЦД2 була в 9 разів ($p < 0,05$) більша, ніж в осіб КГ і в 1,7 раза більше у пацієнтів з ДР, у яких ЦД2 триває менше за 15 років, ніж у пацієнтів з більшою тривалістю основного захворювання. Виявлена кореляція вмісту L-гомоцистеїну з IL-10 на рівні ($R = 0,357$, $p < 0,01$), із IL-1b ($R = 0,320$, $p < 0,01$) та із NNE ($R = 0,286$, $p < 0,01$), також виявлений кореляційний зв'язок NNE з цитокинами на рівні: ($R = 0,279$, $p < 0,01$) з IL-10 та ($R = 0,368$, $p < 0,01$) з IL-1b, що свідчить про патогенетичний зв'язок гіпергомоцистеїнемії з маркерами системного та нейрозапалення в пацієнтів з ДР на фоні ЦД2. Вивчення рівня цитокинів та маркерів нейрозапалення в залежності від генотипів генів, що кодують ферменти фолатного циклу, дає підґрунтя вважати генотипи CC гену rs1801133, генотипу GG гену rs1805087 та генотипу CC гену rs1801131 кандидатами у фактори ризику розвитку ДР на фоні ЦД2 через підвищення рівня прозапальних цитокинів порівняно із носіями інших генотипів у групі пацієнтів.

Література

1. **Mikheyteva IM.** Current View On Pathogenic Mechanisms Of Diabetic Retinopathy. *Fiziol. Zh.* 2023; 69(3): 106-114.
2. **Gardner TW, Davila JR.** The neurovascular unit and the pathophysiologic basis of diabetic retinopathy. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2017; 255: 1–6.
3. **Nian S, Lo ACY, Mi Y, Ren K, Yang D.** Neurovascular unit in diabetic retinopathy: Pathophysiological roles and potential therapeutic targets. *Eye Vis.* 2021; 8:15.
4. **Bianco L, Arrigo A, Aragona E, Antropoli A, Berni A, Saladino A, et al.** Neuroinflammation and neurodegeneration in diabetic retinopathy. *Front Aging Neurosci.* 2022; Aug 16;14:937999.
5. **Solomon SD, Chew E, Duh EJ, Sobrin L, Sun JK, VanderBeek B., et al.** Diabetic retinopathy: A position statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 2017; 40: 412–418.
6. **Hawkins BT, Davis TP.** The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev.* 2005; 57: 173–185.
7. **Antonetti DA, Klein R, Gardner TW.** Diabetic retinopathy. *N. Engl. J. Med.* 2012; 366: 1227–1239.
8. **Luzzi S, Cherubini V, Falsetti L, Viticchi G, Silvestrini M, Toraldo A.** Homocysteine, Cognitive Functions, and Degenerative Dementias: State of the Art. *Biomedicines.* 2022; Oct 28;10(11):2741.
9. **Ansari R, Mahta A, Mallack E, Luo JJ.** Hyperhomocysteinemia and neurologic disorders: a review. *J Clin Neurol.* 2014 Oct; 10(4):281-8.
10. **Quan Y, Xu J, Xu Q, Guo Z, Ou R, Shang H, Wei Q.** Association between the risk and severity of Parkinson's disease and plasma homocysteine, vitamin B12 and folate levels: a systematic review and meta-analysis. *Front Aging Neurosci.* 2023 Oct 24;15:1254824.
11. **Kowluru RA, Mohammad G, Sahajpal N.** Faulty homocysteine recycling in diabetic retinopathy. *Eye and vision (London, England).* 2020;7:4.
12. **Gu J, Lei C, Zhang M.** Folate and retinal vascular diseases. *BMC Ophthalmol.* 2023 Oct 13;23(1):413.
13. **Rykov SO, Prokopenko IuV, Natrus LV, Panchenko IuO.** Role of polymorphisms of folate-cycle enzymes in diabetic retinopathy progression in patients with type 2 diabetic mellitus. *Oftalmologicheskii Zhurnal,* 2022; 5:3-11.
14. **Malaguarnera G, Gagliano C, Salomone S, Giordano M, Bucolo C, Pappalardo A, et al.** Folate status in type 2 diabetic patients with and without retinopathy. *Clin Ophthalmol.* 2015 Aug 7;9:1437-42.
15. **Maltsev D, Kurchenko A, Marushko Y, Yuriev S.** Biochemical profile of children with autism spectrum disorders associated with genetic deficiency of the folate cycle. *Biochimica Clinica.* 2023; 47(2): 132–140.
16. **Marangos PJ, Schmechel D, Zis AP, Goodwin FK.** The existence and neurobiological significance of neuronal and glial forms of the glycolytic enzyme enolase. *Biol Psychiatry.* 1979, Aug;14(4):563-79.
17. **Davis M, Fisher M, Gangnon R, et al.** Risk factors for high-risk proliferative diabetic retinopathy and severe visual loss: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report 18. *Invest ophthalmol & vis sci.* 1998; 39: 233-52.

Відомості про авторів та розкриття інформації

Автор листування: Натрус Лариса Валентинівна
– lnatrus777@gmail.com

Внесок кожного автора в роботу. Усі автори відповідають критеріям авторства, засвідчують, що кожен автор брав значну участь у написанні роботи, включаючи участь в опрацюванні концепції, проектування, аналізу, написання та ревізії статті, та кожен автор відповідає за її зміст. Усі автори схвалили остаточний варіант рукопису.

Заява про етичні норми. Дослідження проводили з участю людей. Дослідження схвалено місцевим комітетом з біоетики. Усі пацієнти дали інформативну згоду на участь у дослідженні. Було передбачено заходи щодо забезпечення дотримання прав людини, людської гідності та морально-етичних норм відповідно до принципів Гельсінської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицини та відповідних законів України.

Відмови від відповідальності: висловлені у поданій статті думки є власними думками авторів, а не офіційними позиціями установи.

Джерела підтримки: відсутні.

Конфлікт інтересів. Автори свідчать про відсутність конфліктів інтересів, які б могли вплинути на їх думку стосовно предмету чи матеріалів, описаних та обговорених в даному рукописі.

Список скорочень. ЦД2 – цукровий діабет 2-го типу, ДР – діабетична ретинопатія, NSE – нейроспецифічна енолаза, NNE – ненеурональна енолаза, ДГ – дослідна група, КГ – контрольна група, ОКТ – оптична когерентна томографія, НППДР – непроліферативна діабетична ретинопатія, ПДР – проліферативна діабетична ретинопатія.

Надійшла 18.04.2024