

## ДИСБАЛАНС В СИСТЕМЕ ЦИТОКИНОВ И НЕЙРОПЕПТИДОВ У ПАЦИЕНТОВ С НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЕЙ СЕТЧАТКИ ПРИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ

Ручкин М.П.<sup>1,2</sup>, Маркелова Е.В.<sup>1</sup>, Федяшев Г.А.<sup>1,2</sup>, Бутанаева М.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Владивосток, e-mail: michaelr-n@mail.ru;

<sup>2</sup>ООО «Приморский центр микрохирургии глаза», Владивосток

Цель исследования – определить уровень интерлейкина-1 бета (IL-1 $\beta$ ), фактора некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ), интерлейкина-10 (IL-10), белка S100B, фактора роста нервов (NGF) и мозгового нейротрофического фактора (BDNF) в сыворотке крови у пациентов с нейродегенерацией сетчатки на фоне сахарного диабета 2-го типа. В основную группу исследования включены 80 пациентов с СД 2-го типа. При помощи оптической когерентной томографии (ОКТ) была выделена группа без нейродегенерации сетчатки (группа 1) и группа с нейродегенерацией сетчатки (группа 2). Уровень исследуемых параметров в сыворотке крови определяли методом сэндвич-варианта твердофазного иммуоферментного анализа. В группе 2 выявлены достоверно ( $p < 0,05$ ) высокие уровни IL-1 $\beta$ , S100B, NGF и дефицит IL-10 и BDNF в сравнении с контролем и группой 1. TNF- $\alpha$  был повышен в группах 1 и 2 в сравнении с контролем. Получены корреляции между цитокинами и нейропептидами, а также выявлена их взаимосвязь с морфологическими признаками нейродегенерации сетчатки. Настоящее исследование показало, что у пациентов с СД 2-го типа и признаками нейродегенерации сетчатки имеется дисбаланс в системе цитокинов и нейропептидов, что свидетельствует о роли нейровоспаления в гибели нейронов.

Ключевые слова: диабетическая ретинопатия, сахарный диабет, нейровоспаление, нейродегенерация, цитокины.

## IMBALANCE IN CYTOKINE SYSTEM AND NEUROPEPTIDES IN PATIENTS WITH RETINA NEURODEGENERATION IN DIBETIC RETINOPATHY

Ruchkin M.P.<sup>1,2</sup>, Markelova E.V.<sup>1</sup>, Fedyashev G.A.<sup>1,2</sup>, Butanaeva M.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pacific State Medical University, Vladivostok, e-mail: michaelr-n@mail.ru;

<sup>2</sup>Primorskii center of eye microsurgery, Vladivostok

The aim of the study is to determine the level of interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-10 (IL-10), protein S100B, nerve growth factor (NGF) and brain neurotrophic factor (BDNF) in serum in patients with retinal neurodegeneration against the background of type 2 diabetes mellitus. The main group of the study included 80 patients with type 2 diabetes. With the help of optic coherence tomography (OCT), a group without retinal neurodegeneration (group 1) and a group with retinal neurodegeneration (group 2) were isolated. The level of the studied parameters in the blood serum was determined by enzyme immunoassay. In group 2, high levels of IL-1 $\beta$ , S 100 B, NGF and a deficiency of IL-10 and BDNF were reliably detected ( $p < 0.05$ ) compared with the control and group 1. TNF- $\alpha$  was elevated in groups 1 and 2 compared to controls. Correlations between cytokines and neuropeptides were obtained, and their relationship with morphological signs of retinal neurodegeneration was revealed. The present study showed that patients with type 2 diabetes and signs of retinal neurodegeneration have an imbalance in the system of cytokines and neuropeptides, which shows the role of neuroinflammation in the death of neurons.

Keywords: diabetic retinopathy, diabetes mellitus, neuroinflammation, neurodegeneration, cytokines.

Высокий уровень заболеваемости и распространенности диабетической ретинопатии (ДР), а также риск снижения и потери зрения у таких больных определяют актуальность исследования данной патологии не только с клинической стороны, но и со стороны вклада различных факторов в механизм ее развития [1]. В наших прошлых работах мы показали, что ДР можно рассматривать не только как сосудистое заболевание, но и как состояние, в котором нейродегенеративные изменения сетчатки играют важную роль [2, 3]. Нейродегенерация при ДР отрицательно влияет на зрительные функции и может увеличить риск потери зрения [4].

Патогенез повреждения нейронов сетчатки при СД является многофакторным, и хроническое нейровоспаление играет в нем одну из ключевых ролей.

Перманентное повышение уровня глюкозы крови при СД вызывает изменение гомеостаза в сетчатке, что приводит к изменению функционирования клеток микроглии и их трансформацию из нейропротекторного (M2) в провоспалительный (M1) фенотип [5]. Это приводит к излишней продукции различных цитокинов, в первую очередь IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , которые обладают мощным провоспалительным действием и приводят к развитию длительного неинфекционного нейровоспаления [6].

Нейровоспаление может поддерживаться дисбалансом между про- и противовоспалительными цитокинами, что вызывает изменение выработки нейроспецифических белков, необходимых для поддержания жизнедеятельности нейронов [6]. К основным нейропептидам, которым отводят большую роль в развитии различных нейродегенеративных заболеваний, относят белок S100B, фактор роста нервов (NGF) и мозговой нейротрофический фактор (BDNF). Белок S100B используется как маркер повреждения нервной ткани, а также при высоких концентрациях может непосредственно вызывать гибель нервных клеток [7]. NGF и BDNF, напротив, относят к нейротрофическим факторам, которые обеспечивают адаптацию нейронов к повреждающим агентам [8, 9].

Изучение взаимосвязи между системой цитокинов и нейропептидами и их влияния на морфологические признаки нейродегенерации сетчатки при диабетической ретинопатии позволит раскрыть роль нейровоспаления в этом процессе. Также исследование поможет выявить потенциальные диагностические маркеры риска развития и прогрессирования нейродегенерации сетчатки у пациентов с сахарным диабетом.

Цель исследования – определить уровень интерлейкина-1 бета (IL-1 $\beta$ ), фактора некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ), интерлейкина-10 (IL-10), белка S100B, фактора роста нервов (NGF) и мозгового нейротрофического фактора (BDNF) в сыворотке крови у пациентов с нейродегенерацией сетчатки на фоне сахарного диабета 2-го типа.

#### **Материал и методы исследования**

В настоящем исследовании приняли участие 80 пациентов с подтвержденным у эндокринолога диагнозом СД 2-го типа, из них 46 женщин и 34 мужчины в возрасте от 44 до 74 лет. Средняя длительность СД составила 7,5 года, всем пациентам в качестве терапии были назначены пероральные сахароснижающие препараты. С целью получения более достоверных результатов были разработаны критерии исключения: заболевания сетчатки, зрительного нерва и зрительного пути, глаукома, непрозрачность оптических сред глаза, острые общие и глазные инфекционные заболевания, аутоимунные заболевания, обострение хронических заболеваний, психические расстройства, беременность и период лактации. Для

характеристики офтальмологического статуса всем пациентам была проведено стандартное обследование, которое включало: визометрию, тонометрию, биомикроскопию и офтальмоскопию в условиях медикаментозного мидриаза. Для диагностики нейродегенеративных изменений всем пациентам провели оптическую когерентную томографию (ОКТ) на аппарате RTVue-100 (Optovue, США). При помощи протокола GCC определили объем фокальных потерь ганглиозных клеток сетчатки (FLV), и на основании его результатов пациенты были разделены на 2 группы. В первую группу вошли 22 пациента без ОКТ-признаков нейродегенерации сетчатки (объем FLV был в пределах значений нормативной базы прибора), во вторую вошли 58 пациентов с наличием ОКТ-признаков нейродегенерации сетчатки (объем FLV превышал значения нормативной базы прибора). В группу контроля были отобраны 30 практически здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту с основной группой. У всех лиц, участвующих в исследовании, получено информированное согласие. Проведение исследования одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет».

Забор крови проводился процедурной медсестрой в утренние часы натощак путем венопункции кубитальной вены. Полученную кровь центрифугировали для получения сыворотки, которую затем замораживали и хранили в морозильной камере. Уровень IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , S100B, NGF, BDNF в сыворотке крови определяли с помощью специфических реактивов фирмы R&D Diagnostics Inc. (США) методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа согласно прилагаемым инструкциям. Учет результатов производили с помощью иммуноферментного анализатора «Multiscan» (Финляндия). Количественную оценку измеряемых параметров выражали в пг/мл. Обследование пациентов основных групп проводили при первичном обращении и через 6 месяцев. Лиц контрольной группы обследовали однократно.

После получения результатов обследования все исследуемые параметры были внесены в электронную таблицу и сформирована база данных. Статистический анализ проводился при помощи программы SPSS Statistics 23 (IBM, США). Показатели представлены в виде медиан (Me), нижнего и верхнего квартилей (Q<sub>25</sub>;Q<sub>75</sub>), так как распределение данных отличалось от нормального. Сравнение количественных величин в несвязанных выборках осуществлялось с использованием U-критерия Манна–Уитни, для корреляционного анализа применяли ранговый коэффициент Спирмена. Различия считались достоверными при  $p \leq 0,05$ .

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Выявлено достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение уровня IL-1 $\beta$  в сыворотке крови пациентов группы 2 в сравнении с группой 1 и контролем. Данная тенденция сохранялась на протяжении всего исследования (табл. 1).

Таблица 1

Сывороточный уровень про- и противовоспалительных цитокинов у обследуемых лиц

Показатель Me (Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub> )	Группа 1 (n=22)	Группа 2 (n=58)	Контрольная группа (n=30)
IL-1 $\beta$ пг/мл первично	1,42 (1,23–1,75)	3,46 (2,2–4,89) <sup>*#</sup>	1,61 (1,37–2,18)
IL-1 $\beta$ пг/мл через 6 месяцев	1,46 (1,21–1,75)	3,35 (2,31–4,83) <sup>*#</sup>	
TNF- $\alpha$ пг/мл первично	3,84 (3,34–4,97) <sup>*</sup>	3,65 (3,21–5,48) <sup>*</sup>	2,48 (1,37–3,47)
TNF- $\alpha$ пг/мл через 6 месяцев	4,02 (3,3–5,12) <sup>*</sup>	3,85 (3,32–5,01) <sup>*</sup>	
IL-10 пг/мл первично	14,98 (12,55– 19,36)	13,64 (11,34– 17,87) <sup>*#</sup>	17,28 (13,68–22,95)
IL-10 пг/мл через 6 месяцев	15,25 (12,63– 20,01)	13,46 (11,31– 17,86) <sup>*#</sup>	

Примечание: \* – достоверная разница с контролем ( $p < 0,05$ ) # – достоверная разница между группами 1 и 2 ( $p < 0,05$ )

Анализ содержания TNF- $\alpha$  в сыворотке крови показал достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение этого параметра у лиц с сахарным диабетом 2-го типа. Однако разница между группами 1 и 2 при этом отсутствовала. Через 6 месяцев были получены схожие результаты (табл. 1).

Зафиксирован достоверный ( $p < 0,05$ ) дефицит сывороточной концентрации IL-10 в группе 2 по сравнению с группой 1 и контролем как при первичном осмотре, так и через 6 месяцев (табл. 1).

В группе пациентов с ОКТ-признаками нейродегенерации сетчатки выявлен достоверно ( $p < 0,05$ ) высокий уровень белка S100B в сравнении с группой 1 и группой контроля на протяжении всего наблюдения (табл. 2).

Таблица 2

Сывороточный уровень нейропептидов у обследуемых лиц

Показатель Me (Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub> )	Группа 1 (n=22)	Группа 2 (n=58)	Контрольная группа (n=30)

S100B первично	пг/мл	43,84 53,05)	(37,52–	56,83 75,8)*#	(45,43–	41,19 (35,27–49,79)
S100B	пг/мл через 6 месяцев	44,31 52,14)	(37,19–	59,11 77,37)*#	(43,26–	
NGF	пг/мл первично	10,56 12,99)	(8,53–	14,77 15,48)*#	(11,23–	10,96 (8,66–13,13)
NGF	пг/мл через 6 месяцев	10,77 12,74)	(8,19–	14,92 15,96)*#	(11,21–	
BDNF	пг/мл первично	28,99 31,82)	(27,18–	26,35 29,22)*#	(24,51–	30,19 (27,38–32,14)
BDNF	пг/мл через 6 месяцев	32,13 33,23)	(27,11–	26,57 29,19)*#	(24,31–	

Примечание: \* – достоверная разница с контрольной группой ( $p < 0,05$ ) # – достоверная разница между группами 1 и 2 ( $p < 0,05$ )

Определено значимое ( $p < 0,05$ ) повышение уровня NGF в сыворотке крови пациентов группы 2 в сравнении с группой 1 и контрольной группой. Динамика сохранялась и через 6 месяцев (табл. 2).

Уровень BDNF был достоверно ( $p < 0,05$ ) понижен в группе с морфологическими признаками нейродегенерации сетчатки в сравнении с группой, где данные изменения отсутствовали, и группой контроля. Через 6 месяцев были получены схожие данные (табл. 2).

Корреляционный анализ показал следующие взаимосвязи между лабораторными и инструментальными показателями. Получена положительная корреляция между уровнем IL-1 $\beta$  в сыворотке крови и объемом фокальных потерь ГКС ( $r = 0,574$ ,  $p = 0,003$ ). Отрицательно коррелируют между собой уровень IL-10 в сыворотке и объем фокальных потерь ГКС ( $r = -0,321$ ,  $p = 0,02$ ). FLV также положительно коррелировал с уровнем S100B ( $r = 0,442$ ,  $p = 0,003$ ), с уровнем NGF ( $r = 0,396$ ,  $p = 0,01$ ).

Анализ взаимосвязи между показателями системы цитокинов и нейропептидами показал следующие закономерности (табл. 3). Получена прямая связь между IL-1 $\beta$  и белком S100B ( $r = 0,543$ ,  $p = 0,001$ ). Положительно коррелируют IL-1 $\beta$  и NGF ( $r = 0,379$ ,  $p = 0,03$ ). Отрицательно коррелируют про- и противовоспалительные цитокины IL-1 $\beta$  и IL-10 ( $r = -0,357$ ,  $p = 0,02$ ). Выявлена положительная взаимосвязь между NGF и S100B ( $r = 0,371$ ,  $p = 0,01$ ).

Таблица 3

Корреляции между лабораторными показателями в группе 2

Корреляция	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$	IL-10	S100B	NGF	BDNF
IL-1 $\beta$	1,0	0,132	<b>-0,357</b>	<b>0,543</b>	<b>0,379</b>	-0,221

TNF- $\alpha$	0,132	1,0	0,161	0,176	0,061	0,092
IL-10	<b>-0,357</b>	0,161	1,0	0,119	0,156	0,218
S100B	<b>0,543</b>	0,176	0,119	1,0	<b>0,371</b>	-0,077
NGF	<b>0,379</b>	0,061	0,156	<b>0,371</b>	1,0	0,023
BDNF	-0,221	0,092	0,218	-0,077	0,023	1,0

Примечание: жирным шрифтом выделены значимые корреляции

Зарегистрирован дисбаланс между про- и противовоспалительными цитокинами у пациентов с нейродегенерацией сетчатки на фоне сахарного диабета 2-го типа. Высокий уровень TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и дефицит IL-10 у больных СД 2-го типа были выявлены во многих исследованиях, что может свидетельствовать о системной активации вялотекущего воспаления [10]. Возможно, такой провоспалительный фон стимулирует переход микроглии в M1 фенотип и запускает нейровоспаление, однако нельзя исключать стимулирующую роль рецепторов к конечным продуктам гликозилирования (RAGE), которые в большом количестве образуются при хронической гипергликемии [5]. Более выраженный дисбаланс в системе цитокинов у пациентов с нейродегенерацией сетчатки в сравнении с пациентами, у которых она отсутствовала, может подтверждать роль нейровоспаления в развитии нейродегенерации. Наличие отрицательной корреляции между IL-1 $\beta$  и IL-10 показывает недостаток компенсаторной противовоспалительной реакции.

Повышение уровня белка S100B у пациентов группы 2 может быть как маркером повреждения нервной ткани, так и медиатором, непосредственно участвующим в гибели нейронов. Это предположение связано с тем, что высокие концентрации S100B были обнаружены при многих нейродегенеративных заболеваниях и были связаны со степенью выраженности клинических проявлений [7]. Высокая концентрация NGF, возможно, является реакцией компенсации с целью повысить адаптацию нейронов в ответ на измененный гомеостаз. Однако положительная роль такой компенсации дискуссионна, так как большое количество NGF может стимулировать p75NTR-рецептор и вызывать апоптоз нейронов [9]. Дефицит BDNF в группе с ОКТ-признаками нейродегенерации сетчатки может снижать выживаемость нейронов, так как эффекты данного нейротрофина дозозависимы и низкие концентрации не могут в достаточной мере стимулировать Trk рецепторы [8]. Наличие положительной корреляции между провоспалительными цитокинами и нейробелками показывает сопряженность нейроиммунного взаимодействия и подтверждает роль нейровоспаления в процессах нейродегенерации сетчатки.

### Заключение

Настоящее исследование показало, что у пациентов с СД 2-го типа и признаками нейродегенерации сетчатки имеется перманентный дисбаланс сывороточного уровня цитокинов и нейробелков. Выявленная взаимосвязь между исследуемыми параметрами, а

также их корреляция с морфологическими признаками нейродегенерации сетчатки показывают связь между нейровоспалением и гибелью нейронов. Требуется дальнейшее изучение данного процесса с целью выявления иммунологических маркеров ранней диагностики и возможных точек приложения нейротрофической терапии.

### Список литературы

1. Демидова Т.Ю., Кожевников А.А. Диабетическая ретинопатия: история, современные подходы к ведению, перспективные взгляды на профилактику и лечение // Сахарный диабет. 2020. Т. 23. № 1. С. 95-105. DOI: 10.14341/DM10273.
2. Ручкин М.П., Кувшинова Е.Р., Федяшев Г.А., Маркелова Е.В. Нейродегенерация сетчатки у пациентов с сахарным диабетом 2 типа // Тихоокеанский медицинский журнал. 2020. № 3. С. 62-64. DOI: 10.34215/1609-1175-2020-3-62-64.
3. Ручкин М.П., Еремеева Л.В., Маркелова Е.В., Федяшев Г.А. Роль дисбаланса системы матриксных металлопротеиназ в индукции нейродегенерации сетчатки при диабетической ретинопатии // Современные проблемы науки и образования. 2022. № 1. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/article/view?id=31427> (дата обращения: 01.09.2022).
4. Soni D., Sagar P., Takkar B. Diabetic retinal neurodegeneration as form of diabetic retinopathy. *International Ophthalmology*. 2021. vol. 41. no. 9. P. 3223-3248. DOI: 10.1007/s10792-021-01864-4.
5. Li X., Yu Z.W., Li H.Y., Yuan Y., Gao X.Y., Kuang H.Y. Retinal microglia polarization in diabetic retinopathy. *Visual Neuroscience*. 2021. vol. 38. E006. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.cambridge.org/core/journals/visual-neuroscience/article/abs/retinal-microglia-polarization-in-diabetic-retinopathy/7ADD02890CEB6B09F3AB01E0397E7E16> (дата обращения: 01.09.2022). DOI: 10.1017/S0952523821000031.
6. Nichols M., St-Pierre A., Wendeln A. Inflammatory mechanisms in neurodegeneration. *Journal of neurochemistry*. 2019. vol. 149. no. 5. P. 562-581. DOI: 10.1111/jnc.14674.
7. Michetti F., D'Ambrosi N., Toesca A. The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury. *Journal of neurochemistry*. 2019. vol. 148. no. 2. P. 168-187. DOI: 10.1111/jnc.14574.
8. Afarid M., Namvar E., Sanie-Jahromi F. Diabetic retinopathy and BDNF: a review on its molecular basis and clinical applications. *Journal of ophthalmology*. 2020. vol. 2020. P. 1602739. DOI: 10.1155/2020/1602739.
9. Mysona B.A., Matragoon S., Stephens M., Mohamed I.N., Farooq A., Bartasis M.L., Fauda A.Y., Shahab A.Y., Espinosa-Heidmann D.G., El-Remessy M.L. Imbalance of the nerve growth factor and its precursor as a potential biomarker for diabetic retinopathy. *BioMed research*

international. 2015. vol. 2015. P. 1-12. DOI: 10.1155/2015/571456.

10. Pfeiler S., Winkels H., Kelm M. IL-1 family cytokines in cardiovascular disease. *Cytokine*. 2019. vol. 122. P. 154215. DOI: 10.1016/j.cyto.2017.11.009.