DOI: https://doi.org/10.32345/2664-4738.3.2025.04
УДК 617.735-06:616.379-008.64]-037-074:577.112.8

ВМІСТ У КРОВІ ОКСИДУ АЗОТУ ТА ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ NO-СИНТАЗИ ЯК ПРОГНОСТИЧНІ МАРКЕРИ ПРОГРЕСІЇ ДІАБЕТИЧНОЇ РЕТИНОПАТІЇ ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ 2 ТИПУ

Сердюк А.В. *https://orcid.org/0000-0003-4909-8662*

Дніпровський державний медичний університет МОЗ України,
Дніпро, Україна

Актуальність. Оксиду азоту (NO) належить ключова патофізіологічна роль у розвитку діабетичної ретинопатії (ДР), оскільки він визначає стан ендотеліальної дисфункції і обумовлює численні пошкоджуючи механізми.

Ціль: визначити вміст NO та ендотеліальної NO-синтази (eNOS) при ДР та можливість їх використання у якості діагностичних та прогностичних маркерів її прогресії.

Матеріали та методи. Обстежено 136 пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу, яких розподілили на групи: 1-а – з непроліферативною (НПДР, 60 очей), 2-а – з препроліферативною ДР (ППДР; 42 ока) та 3-я – з проліферативною ДР (ПДР; 34 ока). Проведено обстеження та лікування пацієнтів протягом 2 років. Вміст у крові NO визначали біохімічним методом за кінцевими продуктами його метаболізму (NOx) із застосуванням реактиву Гріса. У плазмі крові імуноферментним методом визначали вміст eNOS. Аналіз результатів проводився в пакеті EZR v.1.54 (Австрія).

Результати. У пацієнтів з ДР встановлено збільшення вмісту у крові NOx (у 1,3-1,4 раза; $p<0,001$) порівняно з контрольною групою без діабету. Вміст NOx при різних стадіях ДР не відрізнявся ($p>0,05$). Вміст у крові eNOS за стадіями ДР суттєво і прогресивно знижувався, при НПДР він був менше контрольного рівню у 1,5 раза, при ППДР – у 1,6 раза і при ПДР – у 3,7 раза ($p<0,001$). Вміст eNOS при НПДР і ППДР статистично значуще не відрізнявся між собою ($p>0,05$), але був вищим за такий у пацієнтів з ПДР (у 2,3-2,4 раза; $p<0,05$). Вміст NOx був пов'язаний з систолічним ($r=-0,632$) та діастолічним ($r=-0,506$) тиском, вмістом глікованого гемоглобіну ($r=0,216$;), холестерину і ліпопротеїдів. Вміст eNOS був пов'язаний з глікемією натще ($r=-0,257$), центральними товщиною ($r=-0,401$) та об'ємом сітківки ($r=-0,391$), вмістом глікованого гемоглобіну ($r=-0,683$), холестерину і ліпопротеїдів. Визначено межовий рівень NOx для ДР при ЦД 2 типу, який становив 4,88 мкмоль/л (чутливість прогнозу – 89,7%, специфічність – 100%). Межовий рівень eNOS для НПДР/ППДР становив менше 300 пг/мл, для ПДР – менше 104,5 пг/мл (точність пронозу – 90,1%). Ризик прогресування ДР через 2 роки зворотно залежав від вмісту у крові eNOS ($p<0,001$; ВШ=0,16; 95% ВІ 0,08-0,31).

Висновок. Таким чином встановлено, що збільшення вмісту в крові NOx можна вважати біомаркером ДР при ЦД 2 типу, а вміст у крові eNOS – біомаркером стадій ДР та її прогресування.

Ключові слова (MeSH): цукровий діабет 2 типу, діабетична ретинопатія, прогноз, оксид азоту, NO, ендотеліальна NO-синтаза, eNOS, біомаркери.

Актуальність. Діабетична ретинопатія (ДР) є одним з основних мікросудинних ускладнень цукрового діабету (ЦД) та лишається основною причиною втрати зору серед дорослого населення працездатного віку, особливо в регіонах з низьким та середнім рівнем доходу [1]. Згідно з останнім Атласом діабету IDF (2025) 11,1% дорослого населення світу (20-79 років) – 590 мільйонів або кожен дев'ятий, живе з діабетом, причому понад 4 з 10 не знають про наявність цього захворювання [2]. За прогнозами IDF, до 2050 року кожен восьмий дорослий, приблизно 853 мільйони, житиме з діабетом, що на 46% більше.

Фізіологічна роль оксиду азоту (NO) полягає у тонкій регуляції ретинального кровообігу та оксигенації тканин шляхом активації розчинної гуанілатциклази та контролю утилізації мітохондріального кисню шляхом інгібування цитохром-С-оксидази [3]. Розчинна гуанілатциклаза перетворює гуанозинтрифосфат на циклічний гуанозинмонофосфат (цГМФ), який є критичним компонентом цього сигнального шляху [4, 5]. Сигнальна трансдукція NO бере участь у низці важливих фізіологічних процесів, включаючи розслаблення гладких м'язів та нейротрансмісію. Також помірні рівні NO мають протективний ефект на нейроваскулярну одиницю сітківки, пригнічуючи сигналізацію інфламасоми TXNIP/NLRP3 та утворення прозапальних чинників [6].

NO переважно генерується NO-синтазами (NOS; EC 1.14.13.39) з L-аргініну, а за умов гіпоксії – через додатковий шлях ферментативного відновлення нітратів [7]. Нейрональна NOS конститутивно експресується в нейронах та регулює синаптичну пластичність, центральну регуляцію артеріального тиску, розслаблення гладких м'язів та вазодилатацію через периферичні нітрергічні нерви [8]. Індуцибельна NOS експресується в багатьох типах клітин у відповідь на ліпополісахарид, цитокіни або інші прозапальні агенти та генерує велику кількість NO, який має цитостатичну дію на клітини-мішені. Ендотеліальна NOS (eNOS) експресується в ендотеліальних клітинах та підтримує розширення кровоносних судин, контролює артеріальний тиск, має численні вазопротекторні та антиатеросклеротичні ефекти [8]. Всі три ізоформи NOS були ідентифіковані в кровоносних судинах сітківки з найбільшим поширенням eNOS, і мають своє значення при ДР [9].

Порушення утворення NO в судинах сітківки пов'язане з очною патологією, в тому числі, – ДР [10]. При ЦД розвивається ендотеліальна дисфункція, що погіршує очну гемодинаміку, знижуючи біодоступність NO та збільшуючи продукцію активних форм кисню (АФК). Надлишок NO, що утворюється індуцибельною NOS під впливом медіаторів запалення, викликає нейродегенерацію та апоптоз клітин сітківки. З іншого боку, при ЦД під впливом АФК і, як нещодавно з'ясовано, підвищеного споживання L-аргініну аргіназою, виникає дисфункція eNOS, що спричиняє порушення ендотелій-опосередкованих вазодилатаційних реакцій [11].

При ДР нітрооксидативний стрес та гіперглікемія виступають як ключові патогенетичні фактори, що призводять до аномальних структурних змін мікросудин у сітківці [12]. Зниження біодоступності NO та утворення пероксинітриту призводять до нітрації тирозину з інактивацією білків та пошкодженням ДНК [13]. Продукти, що утворюються з NO (триоксид азоту та пероксинітрит) мають сильний руйнівний вплив [14]. Вони реагують з біомолекулами (ліпідами, білками та ДНК), що призводить до загибелі клітин сітківки при ДР. Нітрооксидативний стрес корелює з утворенням кінцевих продуктів глікованих (AGE), що суттєво сприяє розвитку ДР і макулярного набряку [15, 16].

Таким чином, NO належить ключова патофізіологічна роль у розвитку ДР, він визначає стан ендотеліальної дисфункції і обумовлює численні пошкоджуючи механізми. Виходячи з цього логічним є припущення щодо можливості використання вмісту у крові NO та однієї з ключових його синтаз – eNOS, у якості діагностичних та прогностичних критеріїв ДР.

Ціль: визначити вміст оксиду азоту та ендотеліальної NO-синтази при діабетичній ретинопатії та можливість їх використання у якості діагностичних та прогностичних маркерів її прогресії.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Усі дослідження проведено з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину, Гельсінкської 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. На проведення дослідження було отримане дозвіл комісії з етики та академічної доброчесності Національного університету охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика. Всі пацієнти, залучені у дослідження, надали інформовану згоду на участь. За дизайном дослідження було когортним, проспективним та рандомізованим.

Було обстежено 136 пацієнтів з ЦД 2 типу та ДР, в яких враховували показники найгіршого за станом ДР ока. Пацієнтів згідно до стадії ДР було розподілено на групи: 1-а – з непроліферативною ДР (НПДР; 60 очей), 2-а – з препроліферативною ДР (ППДР; 42 ока) та 3-я – з проліферативною ДР (ПДР; 34 ока). Вік пацієнтів за стадіями ДР суттєво не відрізнявся і становив у 1-й групі 65 (59-72) років, у 2-й – 64,5 (59-71) років і у 3-й групі – 66 (61,75-71,25) років; різниця за критерієм Крускала-Уолліса не значуща (p=0,245).

Протягом 2 років спостереження пацієнтам було проведено лікування різними методами. Консервативне лікування призначалося пацієнтам 1-ї групи та включало цукрознижувальну терапію, відновлення гемостазу, ангіопротекцію, за необхідністю фібрати та статини, метаболічну терапію. Лазерне лікування призначалося у 2-й та 3-й групі пацієнтів і включало панретинальну (ПРЛК) та при необхідності фокальну лазеркоагуляцію. Анти-VEGF терапія призначалася переважно у пацієнтів 2-ї та 3-ї групах та включала інтравітреальне введення препаратів 1 раз на місяць. Курс лікування складав 5 ін'єкцій. Хірургічне лікування проводили переважно у пацієнтів 3-ї групи, яке включало трипортову закриту субтотальну вітректомію 25 Ga з етапом ПРЛК видаленням епіретинальних мембран та ендотампонадою 18% газоповітряною сумішшю C3F8 або силіконовою олією 5700 мПа, в залежності від стадії процесу. Комбіноване лікування призначалася переважно у пацієнтів 2-ї і 3-ї груп та включало комбінацію інтравітреального введення анти-VEGF препаратів, ПРЛК та трипортової закритої субтотальної вітректомії 25 Ga.

Відсутність прогресії ДР визначали при стабільності офтальмологічних показників, повільну прогресію визначали при погіршенні деяких показників, натомість швидку прогресію – при встановленні наступної стадії ДР та/або суттєвому погіршені більшості показників (для пацієнтів з ПДР).

Всім пацієнтам були виконані загальноприйняті офтальмологічні обстеження: візометрія на проекторі тестових знаків Huvitz CCP – 3100 та цифровому фороптері HDR 7000 Huvitz, статична периметрія на приладі Humphrey Field Analyzer model 740i фірми Carl Zeiss Meditec; рефрактометрія на авторефератометрі HRK-7000 Huvitz, тонометрія на автоматичному безконтактному тонометрі Huvitz HNT-7000, кератопахіметрія на приладі OculusPentacam AXL; біомікроскопія на щілинної лампі SLM-2ER Kanghua; гоніоскопія з використанням контактної тридзеркальної лінзи Гольдмана Ocular; офтальмоскопія за допомогою лінз Volk Digital wide field та контактної тридзеркальної лінзи Гольдмана Ocular; оптична когерентна томографія (ОКТ) на приладі Optoview RTVue RT-100, 100-2; при необхідності – фотографування очного дна за допомогою фундус-камери TOPCON TRS-NW7SF, за показаннями проводили флуоресцентну ангіографію. Визначали центральну товщину сітківки (ЦТС, мкм) та центральний об'єм сітківки (ЦОС, мм^3).

Вміст у крові оксиду азоту визначали

біохімічним методом за кінцевими продуктами його метаболізму (NOx) – нітритами (NO_{2}-) і нітратами (NO_{3}-) із застосуванням реактиву Гріса [17]. У плазмі крові імуноферментним методом визначали вміст eNOS (BCM Diagnostics, США).

Аналіз результатів дослідження проводили в пакеті EZR v.1.54 (графічний інтерфейс до R statistical software v.4.0.3, R Foundation for Statistical Computing, Австрія) [18]. Закон розподілу змінних відрізнявся від нормального, тому для представлення даних наведено медіану (Me) та міжквартильний інтервал (QI – QIII). При статистичному аналізі порівняння проведені за критерієм Крускала-Уолліса, постеріорні порівняння – за критерієм Данна, критичний рівень значущості прийнятий рівним 0,05 [19].

Для визначення межових порогів вмісту вч-СРП для стадії ДР використані методи багатокласової класифікації [20]. Кореляційний аналіз проведено з визначенням коефіцієнту рангової кореляції Спірмена. Для аналізу зв'язку з ризиком прогресії ДР використано метод побудови та аналізу моделей логістичної регресії [18]. Адекватність моделей оцінювали за площею під ROC-кривою моделі (AUC – Area under the ROC curve) [21]. Модель вважали адекватною при статистично значущій відмінності величини AUC від 0,5. Для кількісної оцінки ступеня впливу факторних ознак розраховували показники відношення шансів (ВШ) та їх 95% вірогідні інтервали (ВІ).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Вміст NOx (табл. 1) у сироватці крові пацієнтів з діабетом і ДР дещо зростав у порівнянні з контрольною групою без діабету (у 1,3-1,4 раза; p<0,001). Натомість за групами різниці виявлено не було (p>0,05). Вміст eNOS при ДР, навпаки, суттєво і прогресивно знижувався (див. табл. 1). Так, в 1-й групі (НПДР) він був менше контрольного рівню у 1,5 раза, у 2-й (ППДР) – у 1,6 раза і у 3-й (ПДР) – у 3,7 раза (p<0,001 для всіх порівнянь). При цьому вміст eNOS у пацієнтів з НПДР і ППДР статистично значуще не відрізнявся між собою (p>0,05), але був вищим за такий у пацієнтів з ПДР (у 2,3-2,4 раза; p<0,05). Таким чином прогресія ДР зазнавала два падіння – перше при розвитку НПДР/ППДР і друге супроводжувало подальшу прогресію ретинопатії до стадії ПДР.

Цю тенденцію наочно відображав рисунок 1. Відмічено зростання медіан та міжквартильних інтервалів вмісту NOx при ЦД 2 типу та ДР, а також двоступеневе зменшення вмісту eNOS.

Отримані результати потребували з'ясування можливості використання вмісту

Таблиця 1

Вміст метаболітів оксиду азоту (NOx) та ендотеліальної NO-синтази (eNOS) у сироватці крові пацієнтів за групами (Me; QI – QIII)

Показник	Група пацієнтів				
	Контроль	1-а (НПДР)	2-а (ППДР)	3-я (ПДР)	p
NOx, мкмоль/л	4,34 (3,938-4,557)^{1,2,3}	5,54 (5,215-5,705)^{0,2}	5,935 (5,14-6,55)^{0,1}	5,68 (5,170-6,56)^{0}	<0,001
eNOS, пг/мл	354 (322,5-374)^{1,2,3}	231,5 (183,5-272,5)^{0,3}	222 (149-263)^{0,3}	94,5 (71-146)^{0,1,2}	<0,001

Примітки: порівняння проведено за критерієм Крускала-Уолліса, постеріорні порівняння – за критерієм Данна:
0 – відмінність від контрольної групи статистично значуща, p<0,05;
1 – відмінність від 1-ї групи статистично значуща, p<0,05;
2 – відмінність від 2-ї групи статистично значуща, p<0,05;
3 – відмінність від 3-ї групи статистично значуща, p<0,05.

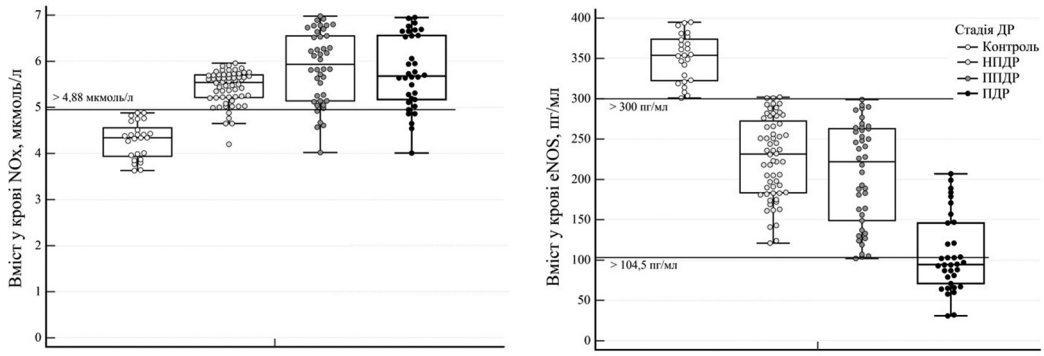

Рис. 1. Діаграма вмісту метаболітів оксиду азоту (NOx) та ендотеліальної NO-синтази (eNOS) у групах. Тоновані кружечки – вміст речовин у пацієнтів різних груп; горизонтальні рисочки у прямокутниках – медіани (Me); у прямокутниках – значення I і III квартилів (QI – QIII), вертикальні планки з рисками – мінімальні та максимальні значення; всі міжгрупові різниці статистично значущі при p<0,05; наведені межові значення вмісту речовин при різних стадіях ДР.

NOx і eNOS як діагностичних біомаркерів ДР. Для розрахунку оптимальних порогів класифікації був застосований метод One-vs-All [20]. Для вмісту NOx було виділено 2 класи відповідно до груп дослідження (див. рис. 1). Оптимальний поріг для кожного класу обирали за Youden Index: для 1-го класу (контроль) він склав 0 мкмоль/л, для 2-го (НПДР/ППДР/ПДР) – 4,88 мкмоль/л. На рисунку 2 наведено криву операційних характеристик прогнозу ДР за вмістом NO. Площа під ROC-кривою AUC=0,97 (95% ВІ 0,82-0,98), що свідчило про сильний зв'язок вмісту NO з ДР при ЦД 2 типу. Чутливість прогнозу становила 89,7% (95% ВІ 83,3-94,3%), специфічність – 100% (95% ВІ 86,3-100%).

Для вмісту eNOS було обрано 3 оптимальні пороги: для 1-го класу (контроль) він склав 0 пг/мл, для 2-го (НПДР/ППДР) – 300 пг/мл і для 3-го (ПДР) – 104,5 пг/мл. У таблиці 2 наведені прогностичні характеристики цього розподілу. Для вмісту eNOS значення чутливості коливалися від 67,7% до 100%, специфічності – від 81,4% до 98,4%. Загальна точність прогнозу становила 90,1% (95% ВІ 84,4-94,2%).

Наведені розрахунки дозволили визначити межові рівні NOx для діагностики діабету: значення більші 4,88 мкмоль/л відрізняли пацієнтів з ДР і ЦД 2 типу від осіб, що діабету не мали (чутливість – 89,7%, специфічність – 100%).

Вміст eNOS у діапазоні більше 104,5 пг/мл і менше 300 пг/мл був притаманним пацієнтам з НПДР і ППДР (чутливість – 95,1%, специфічність – 81,4%), вміст eNOS менше 104,5 пг/мл – пацієнтам з ПДР (чутливість – 67,7%, специфічність – 98,4%). Таким чином, статистично було підтверджено два порога падіння eNOS, які відповідали прогресії ДР спочатку до НПДР/ППДР (менше 300 пг/мл), а потім – прогресії ДР до ПДР (менше 104,5 пг/мл).

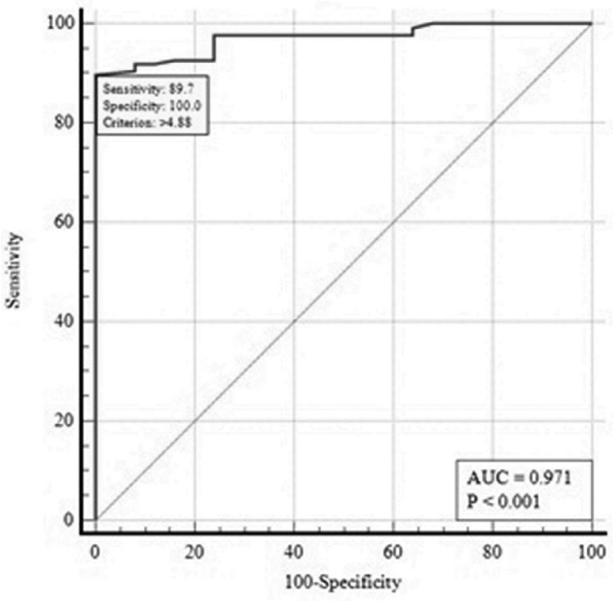

Рис. 2. ROC-крива прогностичних характеристик моделі прогнозу ДР при ЦД 2 типу за вмістом у крові NOx. Sensitivity – чутливість отриманої моделі; Specificity – специфічність отриманої моделі; Criterion – розрахований критерій Y моделі; AUC — Area under the ROC curve (площа під ROC-кривою); P – критерій статистичної значущості.

Таблиця 2

Розподіл кількості випадків по групам в залежності від вмісту ендотеліальної NO-синтази (eNOS) та аналітичні характеристики прогнозу

	Вміст eNOS, пг/мл		
	< 104,5	**104,5-300**	**> 300**
Група: Контроль, n=25	25	0	0
1-а (НПДР), n=60	3	97	2
2-а (ППДР), n=42			
3-я (ПДР), n=34	0	11	23
Прогностичні характеристики: Чутливість, %	100%	95,1%	67,7%
Специфічність, %	97,8%	81,4%	98,4%
Точність, %	98,9%	88,2%	83,0%

Кореляційний аналіз показав чисельні взаємозв'язки вмісту NOx і eNOS з клінічними, лабораторними та офтальмологічними показниками (рис. 3). Детальну характеристику цих показників у пацієнтів, що приймали участь у даному дослідженні, було опубліковано нами раніше [22, 23].

Вміст NOx був пов'язаний з систолічним (r=-0,632; p<0,0001) та діастолічним (r=-0,506; p<0,0001) тиском, вмістом глікованого гемоглобіну (r=0,216; p=0,012), загального холестерину (r=0,203 p=0,018), ліпопротеїдів низької (ЛПНЩ; r=0,169; p=0,049) та дуже низької щільності (ЛПДНЩ; (r=0,178; p=0,038), а також тригліцеридів (r=0,185; p=0,031). Максимальні значення були характерні для рівню систолічного та діастолічного тиску.

Вміст eNOS був пов'язаний з глікемією натще (r=-0,257; p=0,0025), центральними товщиною (ЦТС; r=-0,401; p<0,0001) та об'ємом сітківки (ЦОС; r=-0,391; p<0,0001), вмістом глікованого гемоглобіну (r=-0,683; p<0,0001), загального холестерину (r=-0,293; p=0,0005), ліпопротеїдів високої (ЛПВЩ; r=-0,25; p=0,0033), низької (ЛПНЩ; r=-0,235; p=0,006) та дуже низької щільності (ЛПДНЩ; (r=-0,342; p<0,0001), а також тригліцеридів (r=-0,279; p=0,001). Максимальні значення були характерні для вмісту у крові глікованого гемоглобіну, ЦТС і ЦОС.

Натомість кореляційного зв'язку між NOx та eNOS виявлено не було (r=-0,153; p=0,075). Порівняння зв'язків NOx та eNOS показало певні відмінності. По-перше, вміст NOx, на відміну від eNOS, був зворотне пов'язаний з артеріальним тиском та мав переважно слабкі прямі зв'язки з вмістом глікованого гемоглобіну, холестерину та його фракцій. Вміст eNOS мав більшу силу зворотних зв'язків зі всіма показниками вуглеводного та ліпідного обміну, а крім того, ще з показниками очних порушень (ЦТС і ЦОС). Таким чином, можна було припустити, що вміст NOx мав більшу взаємозалежність з рівнем артеріального тиску, тоді як вміст eNOS – з показниками тяжкості діабету та ДР. Отже, збільшення вмісту NOx, яке ми спостерігали у наших дослідженнях, можна було розглядати як реакцію судин на підвищення артеріального тиску, тоді як зменшення вмісту eNOS – було пов'язане з метаболічними порушеннями та прогресією ДР.

На наступному етапі дослідження була поставлена задача з'ясування зв'язку

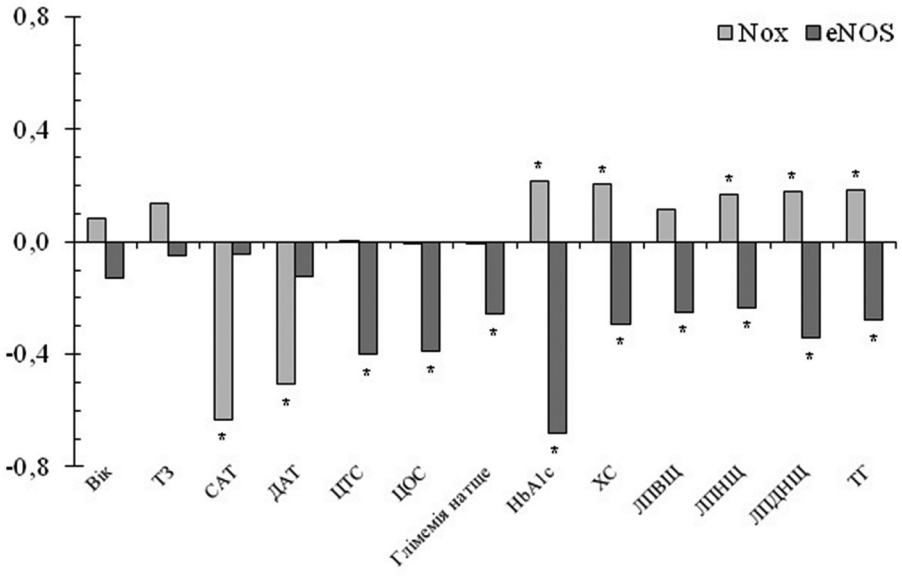

Рис. 3. Коефіцієнти рангової кореляції Спірмена вмісту у сироватці крові NOx та eNOS з віком (Вік), тривалістю захворювання на діабет (ТЗ), систолічним (САТ) та діастолічним тиском (ДАТ), центральними товщиною (ЦТС) та об'ємом сітківки (ЦОС), глікемією натще, вмістом у крові глікованого гемоглобіну (HbA1c), загального холестерину (ХС), ліпопротеїдів високої (ЛПВЩ), низької (ЛПНЩ) та дуже низької щільності (ЛПДНЩ), а також тригліцеридів (ТГ); * – p<0,05

показників з прогресією ДР протягом 2 років спостереження. У нашому попередньому дослідженні на великій когорті пацієнтів (358 очей) було показано, що швидка прогресія через 2 роки спостереження була відмічена у 41,6%, у решти пацієнтів було відмічено повільне прогресування або його відсутність [24]. Для вирішення цієї задачі було використано метод побудови моделей логістичної регресії [18]. Результуюча змінна Y=0 для пацієнтів, у яких через 2 роки було досягнуто відсутність прогресування або повільне прогресування ДР (57 пацієнтів), змінна Y=1 для пацієнтів, в яких спостерігалося швидке прогресування захворювання (79 пацієнтів). В таблиці 3 наведено результати однофакторного аналізу.

Для вмісту у крові NOx зв'язку з швидким прогресуванням ДР виявлено не було (p=0,061). Натомість для вмісту eNOS такий зв'язок був встановлений: ризик прогресування ДР збільшувався у 6,25 рази на кожні 100 пг/мл зменшення вмісту в крові eNOS (p<0,001; ВШ=0,16; 95% ВІ 0,08-0,31).

На рисунку 4 наведено криву операційних характеристик прогресії ДР через 2 роки спостереження за вмістом eNOS. Площа під кривою операційних характеристик прогнозу AUC=0,79 (95% ВІ 0,68-0,88), що свідчило про сильний зв'язок вмісту eNOS з прогресією ДР. Чутливість моделі становила 51,9% (95% ВІ 41,5%-63,7%), специфічність – 96,5% (95% ВІ 84,2%-98,7%).

Таким чином встановлено, що вміст у крові NOx вище 4,88 пг/мл можна вважати маркером ДР при ЦД 2 типу (чутливість прогнозу – 89,7%, специфічність – 100%). Вміст у крові eNOS можна вважати біомаркером ДР (точність прогнозу 90,1%) та її прогресування (чутливість моделі – 51,9%, специфічність – 96,5%. Були розроблені межові діапазони її вмісту у крові для НПДР/ППДР (менше 300 пг/мл) і ПДР (менше 104,5 пг/мл) та встановлений ризик прогресування ДР протягом 2 років спостереження, який збільшувався у 6,25 раза на кожні 100 пг/мл зменшення вмісту у крові eNOS.

ОБГОВОРЕННЯ

У нашому попередньому дослідженні було показано, що з прогресією ДР найбільшою мірою були пов'язані показники вмісту в

Таблиця 3

Аналіз однофакторної моделі логістичної регресії прогнозування ризику швидкого прогресування діабетичної ретинопатії за вмістом оксиду азоту (NOx) та ендотеліальної NO-синтази (eNOS)

Факторна ознака	Коефіцієнт моделі, b±m	Рівень значимості відмінності ВШ від 1, p	Показник відношення шансів моделі, ВШ (95% ВІ)	Площа під кривою операційних характеристик, AUC (95% ВІ)
NOx, на 1 мкмоль/л	0,52 ± 0,28	0,061	1,68 (0,98 – 2,89)	0,59 (0,50 – 0,67)
eNOS, на 100 пг/мл	-1,83 ± 0,85	<0,001	0,16 (0,08 – 0,31)	0,79 (0,71 – 0,85)

Примітки: ВШ — відношення шансів; ВІ — вірогідний інтервал; AUC — Area under the ROC curve (площа під ROC-кривою).

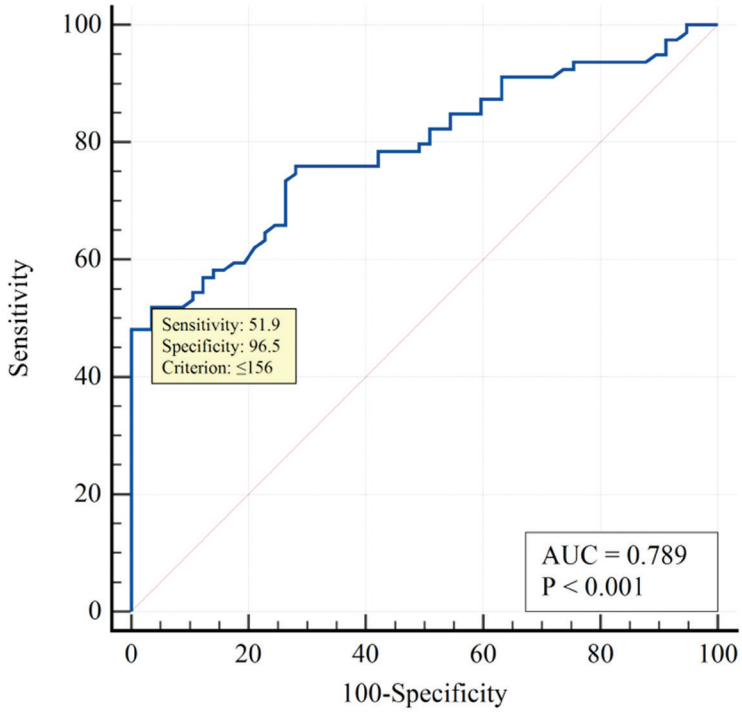

Рис. 4. ROC-крива операційних характеристик моделі прогнозування ризику швидкого прогресування діабетичної ретинопатії за вмістом у крові eNOS. Sensitivity – чутливість отриманої моделі; Specificity – специфічність отриманої моделі; Criterion – розрахований критерій Y моделі; AUC — Area under the ROC curve (площа під ROC-кривою); P – критерій статистичної значущості

крові глікованого гемоглобіну, ЦТС та ЦОС [25]. Крім того, мали значення вік та вміст у крові ліпопротеїдів низької та дуже низької щільності. В продовження пошуку значущих біомаркерів розвитку та прогресування ДР, у даній роботі нами досліджений вміст у сироватці крові NOx і eNOS та можливості їх застосування у якості біомаркерів ДР.

Зростання поширеності ЦД та ДР робить скринінг надзвичайно важливим [26]. Він необхідний для раннього виявлення осіб, які мають ознаки порушення зору, діагностики стадій ДР та прогнозу її прогресії. При цьому важлива роль належить біомаркерам – біологічно активним речовинам-індикаторам, які віддзеркалюють розвиток патологічних процесів [27]. Обґрунтованою є думка про те, що цінність біомаркера обумовлена чіткім розумінням його патофізіологічного зв'язку з певною клінічною кінцевою точкою [28]. В цьому плані NO виступає як потенційно важливий маркер пошкодження нейроваскулярної одиниці сітківки, оскільки одночасно впливає і на процеси нейродегенерації, і на розвиток судинних аномалій через збільшення кількості АФК [29, 30].

При експериментальному стрептозотоциновому діабеті у щурів виявлено значне збільшення рівня NO вже через 7 днів після початку діабету [31]. Однак рівні цГМФ не змінювалися, що свідчило про те, що NO не активував свій сигнальний каскад. Вестерн-блоттинг виявив прогресуюче збільшення нітротирозину у фоторецепторному шарі, шарі гангліозних клітин, внутрішньому ядерному шарі та відростках клітин Мюллера. Також збільшувався рівень окислених білків.

У клінічних дослідженнях ранньої ДР показано, що її прогресія була суттєво пов'язана зі збільшенням рівня NO у крові, що корелювало з порушенням еліпсоїдної смуги внутрішнього сегмента фоторецепторів та змінами пігментного епітелію сітківки за даними спектрально-доменної ОКТ [32]. Маркери, що пов'язані з гіпоксією, деградацією матриксу та патологічним ангіогенезом, в тому числі NO, за даними ROC-аналізу були тісно пов'язані з прогресією ДР при ЦД 2 типу [33]. Ці дані повністю відповідали тим, що було отримано у наших дослідженнях.

Також у дослідженні, за дизайном аналогічним нашому, були показані вищі рівні NO у крові пацієнтів з ЦД 2 типу та ДР [34]. Крім NO значення мали фактор некрозу пухлин-α (TNF-α) і високочутливий С-реактивний протеїн (вч-СРП). Модель поліноміальної логістичної регресії показала, що NO і TNF-α можуть передбачати наявність ДР у пацієнтів з ЦД 2 типу з урахуванням вч-СРП, HbA1c, загального холестерину, тригліцеридів, ЛПВЩ, ЛПНЩ, індексу маси тіла та віку. Показано, що рівень NO у сироватці крові 45,96 мкмоль/л може свідчити про наявність ретинопатії (чутливість 96,1% та специфічність 86%).

У пацієнтів з різними стадіями ДР, її тяжкість мала позитивний кореляційний зв'язок з вмістом у крові NO, а також каспази-3 і малонового діальдегіду [35]. Збільшення тяжкості ДР було пов'язане зі збільшенням рівнів NO, продуктів окислення ліпідів і HbA1c ($p<0,001$) [36]. Була виявлена позитивна кореляція вмісту NO з ЦТС, ЦОС та гостротою зору.

Таким чином, чисельні літературні дані підтверджували зростання вмісту NO при ЦД 2 типу та ДР. Натомість у наших дослідженнях не було встановлено його зв'язку зі стадіями ДР та її прогресуванням. Такий зв'язок був встановлений нами для вмісту у крові eNOS. Доведено, що саме eNOS, яка переважно розташована в ендотеліальних клітинах сітківки, є ключовою для опосередкування вазодилатації та регуляції кровотоку [3]. Патофізіологічне значення зниження вмісту eNOS при ДР показано у останньому систематичному огляді [37]. У даному дослідженні нами виявлена принципова можливість використання вмісту eNOS як біомаркера ДР, який добре співвідноситься з її розвитком, стадіями та прогресуванням.

ВИСНОВКИ

1. У пацієнтів з ЦД 2 типу та ДР встановлено збільшення вмісту у крові NOx (у 1,3-1,4 раза; $p<0,001$) порівняно з контрольною

групою без діабету. Вміст NOx при різних стадіях ДР не відрізнявся (p>0,05).
2. Вміст у крові eNOS у пацієнтів з ЦД 2 типу та ДР суттєво і прогресивно знижувався і при НПДР він був менше контрольного рівню у 1,5 раза, при ППДР – у 1,6 раза і при ПДР – у 3,7 раза (p<0,001 для всіх порівнянь). Вміст eNOS при НПДР і ППДР статистично значуще не відрізнявся між собою (p>0,05), але був вищим за такий у пацієнтів з ПДР (у 2,3-2,4 раза; p<0,05).
3. Визначено межовий рівень NOx для ДР при ЦД 2 типу, який становив 4,88 мкмоль/л (чутливість прогнозу – 89,7%, специфічність – 100%). Межовий рівень eNOS для НПДР/ППДР становив менше 300 пг/мл, для ППДР/ПДР – менше 104,5 пг/мл (точність пронозу – 92,5%).
4. Ризик прогресування ДР через 2 роки спостереження збільшувався при зменшенні вмісту у крові eNOS (p<0,001; ВШ=0,16; 95% ВІ 0,08-0,31).

Конфлікт інтересів. Автор заявляє про відсутність конфлікту інтересів

Джерела фінансування. Проведення дослідження не отримувало цільового фінансування з боку державних, комерційних або некомерційних організацій.

REFERENCES

1. Tan TE, Wong TY. Diabetic retinopathy: Looking forward to 2030. Front Endocrinol (Lausanne). 2023 Jan 9;13:1077669. doi: 10.3389/fendo.2022.1077669.
2. International Diabetes Federation International Diabetes Federation. — Facts & Figures. Idf.org. [(accessed on 27 July 2025)]. Available online: https://idf.org/about-diabetes/diabetes-facts-figures/
3. Gericke A, Buonfiglio F. Physiological and Pathophysiological Relevance of Nitric Oxide Synthases (NOS) in Retinal Blood Vessels. Front Biosci (Landmark Ed). 2024 May 16;29(5):190. doi: 10.31083/j.fbl2905190.
4. Denninger JW, Marletta MA. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. Biochim Biophys Acta. 1999 May 5;1411(2-3):334-50. doi: 10.1016/s0005-2728(99)00024-9.
5. Sarti P, Giuffré A, Forte E, Mastronicola D, Barone MC, Brunori M. Nitric oxide and cytochrome c oxidase: mechanisms of inhibition and NO degradation. Biochem Biophys Res Commun. 2000 Jul 21;274(1):183-7. doi: 10.1006/bbrc.2000.3117.
6. Yang L, Yao Y, Zheng W, Zheng X, Xie M, Huang L. Nitric oxide mediates negative feedback on the TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway to prevent retinal neurovascular unit dysfunction in early diabetic retinopathy. Free Radic Biol Med. 2025 Jun;233:279-291. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2025.03.050.
7. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. Nat Rev Drug Discov. 2008 Feb;7(2):156-67. doi: 10.1038/nrd2466.
8. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur Heart J. 2012 Apr;33(7):829-37, 837a-837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.
9. Gericke A, Goloborodko E, Sniatecki JJ, Steege A, Wojnowski L, Pfeiffer N. Contribution of nitric oxide synthase isoforms to cholinergic vasodilation in murine retinal arterioles. Exp Eye Res. 2013 Apr;109:60-6. doi: 10.1016/j.exer.2013.01.012.
10. Toda N, Nakanishi-Toda M. Nitric oxide: ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy. Prog Retin Eye Res. 2007 May;26(3):205-38. doi: 10.1016/j.preteyeres.2007.01.004.
11. Hein TW, Omae T, Xu W, Yoshida A, Kuo L. Role of Arginase in Selective Impairment of Endothelium-Dependent Nitric Oxide Synthase-Mediated Dilation of Retinal Arterioles during Early Diabetes. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2020 May 11;61(5):36. doi: 10.1167/iovs.61.5.36.
12. Opatrilova R, Kubatka P, Caprnda M, Büsselberg D, Krasnik V, Vesely P, Saxena S, Ruia S, Mozos I, Rodrigo L, Kruzliak P, Dos Santos KG. Nitric oxide in the pathophysiology of retinopathy: evidences from preclinical and clinical researches. Acta Ophthalmol. 2018 May;96(3):222-231. doi: 10.1111/aos.13384.
13. Zheng L, Kern TS. Role of nitric oxide, super-

oxide, peroxynitrite and PARP in diabetic retinopathy. Front Biosci (Landmark Ed). 2009 Jan 1;14(10):3974-87. doi: 10.2741/3505.
14. Cantó A, Olivar T, Romero FJ, Miranda M. Nitrosative Stress in Retinal Pathologies: Review. Antioxidants (Basel). 2019 Nov 11;8(11):543. doi: 10.3390/antiox8110543.
15. Cepas V, Collino M, Mayo JC, Sainz RM. Redox Signaling and Advanced Glycation Endproducts (AGEs) in Diet-Related Diseases. Antioxidants (Basel). 2020 Feb 6;9(2):142. doi: 10.3390/antiox9020142.
16. Petkova-Parlapanska K, Draganova V, Georgieva E, Goycheva P, Nikolova G, Karamalakova Y. Systematic Inflammation and Oxidative Stress Elevation in Diabetic Retinopathy and Diabetic Patients with Macular Edema. Int J Mol Sci. 2025 Apr 17;26(8):3810. doi: 10.3390/ijms26083810.
17. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. Nitric Oxide. 2001; 5(1): 62-71. DOI: 10.1006/niox.2000.0319.
18. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. Bone Marrow Transplant. 2013;48:452-8.
19. Gur'yanov VG, Lyakh YuE, Parii VD, Korotky OV, Chalyy OV, Chalyy KO, Tsekhmister YaV. Handbook of biostatistics. Analysis of the results of medical research in the EZR (R-statistics) package. Kyiv: Vistka. 2018:208 [Ukrainian].
20. Brownlee J. One-vs-Rest and One-vs-One for Multi-Class Classification [Internet]. Machine Learning Mastery; 2021 [cited 2025 May 28]. Available from: https://machinelearningmastery.com/one-vs-rest-and-one-vs-one-for-multi-class-classification.
21. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez J-C, Müller M. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. BMC Bioinformatics. 2011;12(77):1-8. https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-77.
22. Serdiuk AV. Glycated hemoglobin as a prognostic factor for the progression of non-proliferative diabetic retinopathy in type 2 diabetes. Archives of Ophthalmology of Ukraine. 2024;2(12):26-30. [Ukrainian] https://doi.org/10.22141/2309-8147.12.2.2024.377.
23. Mogilevskii SI, Serdiuk AV, Zyablitsev SV. Prognostic biomarkers of non-proliferative diabetic retinopathy progression in type 2 diabetes mellitus. J.ophthalmol. (Ukraine). 2024;(4):38-45. https://doi.org/10.31288/oftalmolzh202443845.
24. Serdiuk AV, Mogilevskyy SYu, Zyablitzev SV, Denisiuk OYu. Effectiveness of treatment for different stages of diabetic retinopathy in type 2 diabetes. Mìžnarodnij endokrinologìčnij žurnal. 2024;7(20):491-498. [Ukrainian] https://doi.org/10.22141/2224-0721.20.7.2024.1447.
25. Mogilevskii SI, Serdiuk AV, Zyablitsev SV. Prognostic biomarkers of non-proliferative diabetic retinopathy progression in type 2 diabetes mellitus. J.ophthalmol. (Ukraine). 2024;(4):38-45. https://doi.org/10.31288/oftalmolzh202443845.
26. Teo ZL, Tham YC, Yu M, Chee ML, Rim TH, Cheung N, Bikbov MM, Wang YX, Tang Y, Lu Y, Wong IY, Ting DSW, Tan GSW, Jonas JB, Sabanayagam C, Wong TY, Cheng CY. Global Prevalence of Diabetic Retinopathy and Projection of Burden through 2045: Systematic Review and Meta-analysis. Ophthalmology. 2021 Nov;128(11):1580-1591. doi: 10.1016/j.ophtha.2021.04.027.
27. Błaszkiewicz M, Walulik A, Florek K, Górecki I, Sławatyniec O, Gomułka K. Advances and Perspectives in Relation to the Molecular Basis of Diabetic Retinopathy-A Review. Biomedicines. 2023 Nov 1;11(11):2951. doi: 10.3390/biomedicines11112951.
28. Aronson JK, Ferner RE. Biomarkers-A General Review. Curr Protoc Pharmacol. 2017 Mar 17;76:9.23.1-9.23.17. doi: 10.1002/cpph.19.
29. Callan A, Jha S, Valdez L, Tsin A. Cellular and Molecular Mechanisms of Neuronal Degeneration in Early-Stage Diabetic Retinopathy. Curr Vasc Pharmacol. 2024;22(5):301-315. doi: 10.2174/0115701611272737240426050930.
30. Ahmad A, Ahsan H. Biomarkers of inflammation and oxidative stress in oph-

thalmic disorders. J Immunoassay Immunochem. 2020 May 3;41(3):257-271. doi: 10.1080/15321819.2020.1726774.
31. Hernández-Ramírez E, Sánchez-Chávez G, Estrella-Salazar LA, Salceda R. Nitrosative Stress in the Rat Retina at the Onset of Streptozotocin-Induced Diabetes. Cell Physiol Biochem. 2017;42(6):2353-2363. doi: 10.1159/000480007.
32. Sharma S, Saxena S, Srivastav K, Shukla RK, Mishra N, Meyer CH, Kruzliak P, Khanna VK. Nitric oxide and oxidative stress is associated with severity of diabetic retinopathy and retinal structural alterations. Clin Exp Ophthalmol. 2015 Jul;43(5):429-36. doi: 10.1111/ceo.12506.
33. Gaonkar B, Prabhu K, Rao P, Kamat A, Rao Addoor K, Varma M. Plasma angiogenesis and oxidative stress markers in patients with diabetic retinopathy. Biomarkers. 2020 Jul;25(5):397-401. doi: 10.1080/1354750X.2020.1774654.
34. Khaloo P, Qahremani R, Rabizadeh S, Omidi M, Rajab A, Heidari F, Farahmand G, Bitaraf M, Mirmiranpour H, Esteghamati A, Nakhjavani M. Nitric oxide and TNF-α are correlates of diabetic retinopathy independent of hs-CRP and HbA1c. Endocrine. 2020 Sep;69(3):536-541. doi: 10.1007/s12020-020-02353-x.
35. Tian M, Liu S, Liu L, Zhang EK, Wang HW, Deng Y, Yue YK. Correlations of the severity of diabetic retinopathy with EPO, Caspase-3 expression and oxidative stress. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2019 Nov;23(22):9707-9713. doi: 10.26355/eurrev_201911_19532.
36. Ruia S, Saxena S, Prasad S, Sharma SR, Akduman L, Khanna VK. Correlation of biomarkers thiobarbituric acid reactive substance, nitric oxide and central subfield and cube average thickness in diabetic retinopathy: a cross-sectional study. Int J Retina Vitreous. 2016 Mar 8;2:8. doi: 10.1186/s40942-016-0033-z.
37. Pushparani DS, Varalakshmi J, Roobini K, Hamshapriya P, Livitha A. Diabetic Retinopathy-A Review. Curr Diabetes Rev. 2025;21(7):43-55. doi: 10.2174/0115733998296228240521151050
.

Article history:
Received: 26.07.2025
Revision requested: 01.08.2025
Revision received: 19.08.2025
Accepted: 25.09.2025
Published: 30.09.2025

BLOOD CONTENT OF NITRIC OXIDE AND ENDOTHELIAL NO-SYNTHASE AS PROGNOTIC MARKERS OF DIABETIC RETINOPATHY PROGRESSION IN TYPE 2 DIABETES

Serdyuk A.V.

Dnipro State Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Dnipro, Ukraine

Background. Nitric oxide (NO) plays a key pathophysiological role in the development of diabetic retinopathy (DR), as it determines the state of endothelial dysfunction and causes numerous damaging mechanisms.

Aim: to determine the content of NO and endothelial NO-synthase (eNOS) in DR and the possibility of their use as diagnostic and prognostic markers of its progression.

Materials and methods. 136 patients with type 2 diabetes mellitus were examined, who were divided into groups: 1st – with non-proliferative (NPDR, 60 eyes), 2nd – with preproliferative DR (PPDR; 42 eyes) and 3rd – with proliferative DR (PDR; 34 eyes). Patients were examined and treated for 2 years. The blood NO content was determined by a biochemical method using the end products of its metabolism (NOx) using Griess reagent. The blood eNOS content was determined by an enzyme-linked immunosorbent assay. The analysis of the results was carried out in the EZR v.1.54 package (Austria).

Results. In patients with DR, an increase in the blood NOx content was found (1.3-1.4 times; $p<0.001$) compared to the control group without diabetes. The NOx content at different stages of DR did not differ ($p>0.05$). The blood eNOS content by stages of DR significantly and progressively decreased, in NPDR it was 1.5 times lower than the control level, in PPDR – 1.6 times and in PDR – 3.7 times ($p<0.001$). The content of eNOS in NPDR and PDR did not differ statistically significantly from each other ($p>0.05$), but was higher than that in patients with PDR (by 2.3-2.4 times; $p<0.05$). The NOx content was correlated with systolic ($r=-0.632$) and diastolic ($r=-0.506$) pressure, glycated hemoglobin ($r=0.216$;), cholesterol and lipoproteins levels. The eNOS content was correlated with fasting glycemia ($r=-0.257$), central retinal thickness ($r=-0.401$) and volume ($r=-0.391$), glycated hemoglobin ($r=-0.683$), cholesterol and lipoproteins levels. The NOx cut-off level for DR in type 2 diabetes was determined, which was 4.88 μmol/l (prognostic sensitivity – 89.7%, specificity – 100%). The cut-off level of eNOS for NPDR/PPDR was less than 300 pg/ml, for PDR – less than 104.5 pg/ml (prognostic accuracy – 90.1%). The risk of DR progression after 2 years was inversely related to the blood eNOS content ($p<0.001$; OR=0.16; 95% CI 0.08-0.31).

Conclusion. Thus, it was established that an increase in the NOx blood content can be considered a biomarker of DR in type 2 diabetes, and the eNOS blood content is a biomarker of DR and its progression.

Key words (MeSH): type 2 diabetes, diabetic retinopathy, prognosis, nitric oxide, NO, endothelial NO synthase, eNOS, biomarkers.