

◆ КЛИНИЧЕСКАЯ ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2004

УДК 616.379-008.64-02:617.586-002.44]-008.9-074

О. Н. Бондаренко¹, Г. Р. Галстян¹, Т. В. Кузнецова², А. Г. Кобылянский², М. Б. Анциферов³**МЕТАБОЛИЗМ L-АРГИНИНА У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ С ДИАБЕТИЧЕСКОЙ ПОЛИНЕЙРОПАТИЕЙ И ЯЗВЕННЫМИ ДЕФЕКТАМИ СТОП**Эндокринологический научный центр РАМН¹, Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава России², Диабетологический центр Департамента здравоохранения Москвы³

Цель работы заключалась в изучении влияния метаболизма аминокислоты L-аргинина на развитие и заживление язвенных дефектов стоп у больных сахарным диабетом (СД) с нейропатической формой синдрома диабетической стопы.

Обследовано 70 пациентов: больные СД с клиническими признаками диабетической полинейропатии (25 человек); больные СД с нейропатическими язвенными дефектами стоп (25 человек); контрольная группа — 20 здоровых лиц. Определение уровня нитритов и нитратов плазмы крови проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Пациентам контрольной группы и больным СД без язвенных дефектов стоп с целью изучения активности ферментов, регулирующих превращение L-аргинина, выполнена биопсия кожи с тыльной поверхности стопы, больным с трофическими язвами — участка кожи с края язвенного дефекта и грануляционной ткани соответственно. Активность NO-синтазы (индуцибельной и эндотелиальной) расценивали как способность тканевых ферментов превращать 3H-L-аргинин в 3H-L-цитруллин. Активность аргиназы в биоптатах определяли по ее способности превращать L-аргинин в мочевины. Концентрацию трансформирующего фактора роста β_1 (ТФР- β_1) определяли с помощью набора BIOTRAK фирмы "Amersham" (Великобритания) после предварительной специальной обработки образцов.

У больных СД с нейропатическими язвенными дефектами стоп уровень NO₂ плазмы был более чем в 2 раза выше, чем в группе сравнения, и почти в 4 раза превышал значения данного показателя у больных СД без язвенных поражений (79,68 (55,41; 95,08), 39,03 (28,04; 41,32) и 20,98 (13,46; 29,79) мкмоль/л соответственно; $p < 0,05$). В биоптатах выявлена выраженная экспрессия iNO-синтазы у больных с трофическими язвами относительно контрольной группы и больных без язвенных дефектов (5,92 (4,63; 7,97), 3,36 (2,71; 3,9) и 1,59 (1,05; 2,74) В/Т/мг белка соответственно; $p < 0,05$). Отмечено снижение активности eNO-синтазы в биопсийном материале у больных СД с периферической нейропатией по сравнению со здоровыми обследуемыми и больными с язвенными дефектами стоп (1,22 (1,04; 2,14), 3,41 (2,36; 4,07) и 3,17 (2,9; 4,34) В/Т/мг белка соответственно; $p < 0,05$). Содержание аргиназы в биоптатах кожи и грануляционной ткани, взятых с края язвенных дефектов, было значительно выше, чем в контрольной группе, а у больных без язв достоверно не отличалось от такового у здоровых (1,96 (1,63; 2,65), 0,28 (0,14; 0,37) и 0,52 (0,35; 0,59) мкг/мг белка соответственно; $p < 0,05$). Выявлена достаточно низкая концентрация ТФР- β_1 в тканях больных СД с трофическими язвами по сравнению с контрольной группой (0,88 (0,58; 1,33) нг/мг белка против 2,48 (2,21; 3,17) нг/мг белка; $p < 0,01$).

Таким образом, метаболизм аминокислоты L-аргинина и его регуляция, в частности ТФР- β_1 , играет важную роль в процессе заживления ран.

Ключевые слова: оксид азота, синтаза оксида азота, трансформирующий фактор роста β_1 , синдром диабетической стопы.

The purpose of the study was to investigate the effect of L-arginine metabolism on the development and healing of ulcerative foot defects in patients with diabetes mellitus (DM) concurrent with polyneuropathy of the diabetic foot syndrome.

Seventy patients were examined. These included 25 patients with DM and clinical signs of diabetic polyneuropathy (Group 1), 25 patients with DM and neuropathic ulcerative foot defects (Group 2), and 20 healthy individuals (a control group). High performance liquid chromatography was used to determine plasma nitrites and nitrates. To study the activity of enzymes controlling L-arginine conversion, biopsy was performed from the skin of the dorsum of the foot in control individuals and Group 1 patients and from a portion of the skin from the edges of ulcerative defect and from granulation tissue in Group 2 patients. The activity (inducible and endothelial) of NO synthases was regarded as the capacity of tissue enzymes to convert 3H-L-arginine into 3H-L-citrullin. The activity of arginase in the biopsy specimens was determined by its ability to convert L-arginine into urea. The concentration of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) was measured by using a BIOTRAK kit (Amersham, UK) after special pretreatment of the specimens. In Group 2 patients, the plasma level of NO was more than twice higher than that in the control group and almost 4 times than that in Group 1 [79.68 (55.41; 95.08), 39.03 (28.04; 41.32), and 20.98 (13.46; 29.79) $\mu\text{mol/l}$, respectively; $p < 0.05$]. There was a marked expression of iNO-synthase in the biopsy specimens from patients with trophic ulcers as compared with the controls and in patients without ulcerative defects of foot defects [5.92 (4.63; 7.97), 3.36 (2.71; 3.9), and 1.59 (1.05; 2.74) V/T/mg of protein, respectively; $p < 0.05$]. There was a reduction in the activity of eNO-synthase in the biopsy specimens from patients with peripheral neuropathy as compared with the controls and in patients without ulcerative defects of foot defects [1.22 (1.04; 2.14), 3.41 (2.36; 4.07), and 3.17 (2.9; 4.34) V/T/mg protein, respectively; $p < 0.05$]. The content of arginase in the skin and granulation tissue biopsy specimens taken from the edge of ulcerative defects was much higher than that in the control group and its level in patients without ulcers did not differ from that in healthy individuals [1.96 (1.63; 2.65), 0.28 (0.14; 0.37), and 0.52 (0.35; 0.59) $\mu\text{g/mg}$ of protein, respectively; $p < 0.05$]. A rather low concentration of TGF- β_1 was found in the tissues of DM patients with trophic ulcers than in the control group [0.88 (0.58; 1.33) ng/mg of protein versus 2.48 (2.21; 3.17) ng/mg of protein, $p < 0.01$].

Thus, metabolism of the amino acid L-arginine and its regulation, TGF- β_1 , in particular, play an important role during wound healing.

Key words: nitric oxide, nitric oxide synthase, transforming growth factor- β_1 , diabetic foot syndrome.

Синдром диабетической стопы (СДС) является тяжелым осложнением сахарного диабета (СД) и представляет собой серьезную медико-социальную проблему, так как приводит к образованию длительно незаживающих и рецидивирующих язв на стопе и высокой частоте ампутаций нижних конечностей. Вопросы, связанные с изучением патофизиологических механизмов, влияющих на процесс

заживления ран, являются актуальными. Целью настоящего исследования было изучение влияния метаболизма аминокислоты L-аргинина на развитие и заживление язвенных дефектов стоп у больных сахарным диабетом (СД) с нейропатической формой синдрома диабетической стопы.

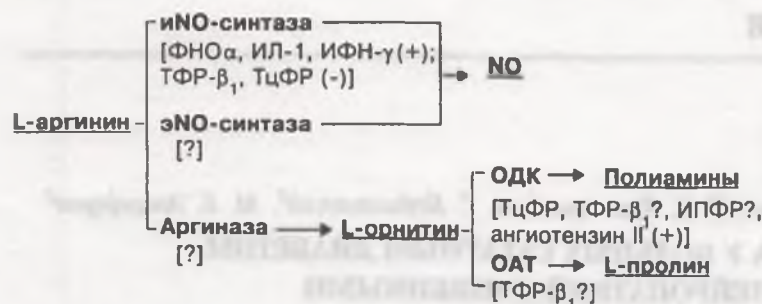


Рис. 1. Схематическое изображение метаболизма L-аргинина. Влияние цитокинов на активность ферментов.

иNO-синтаза — индуцибельная синтаза NO; эNO-синтаза — эндотелиальная синтаза NO; ОДК — орнитиндекарбоксилаза; ОАТ — орнитинаминотрансфераза; ФНО α — фактор некроза опухоли α ; ИЛ-1 — интерлейкин-1; ИФН- γ — интерферон γ ; ТФР- β_1 — трансформирующий фактор роста β_1 ; ТцФР — тромбоцитарный фактор роста; ИПФР — инсулиноподобный фактор роста.

формирования и скорость репаративных процессов в области раневого дефекта, являются наименее изученными. К настоящему времени определена важная роль метаболизма L-аргинина в процессе нормального заживления повреждений кожи у лиц без нарушения углеводного обмена. Установлено влияние различных цитокинов, регулирующих

превращение аргинина, на фазы раневого процесса. Выяснена роль оксида азота (NO), синтезируемого в результате распада L-аргинина, в развитии диабетической нейропатии. Вместе с этим остается неясным значение метаболизма L-аргинина в формировании СДС.

Метаболизм L-аргинина является уникальным относительно других аминокислот, содержащихся в ране. Это единственная аминокислота, концентрация которой убывает с течением времени в отделяемом раны. Как известно, конверсия L-аргинина в организме происходит под влиянием двух основных ферментных систем, включающих синтазы NO (NO-синтазы) и аргиназу (рис. 1). J. Hibbs и соавт. [9] предположили, что пути превращения L-аргинина под действием

NO-синтазы и аргиназы имеют различные биологические эффекты. Синтезируемый из аргинина NO при участии NO-синтазы обладает бактерицидными, противоопухолевыми свойствами. Другой способ превращения L-аргинина предполагает взаимодействие аминокислоты с ферментом L-ар-

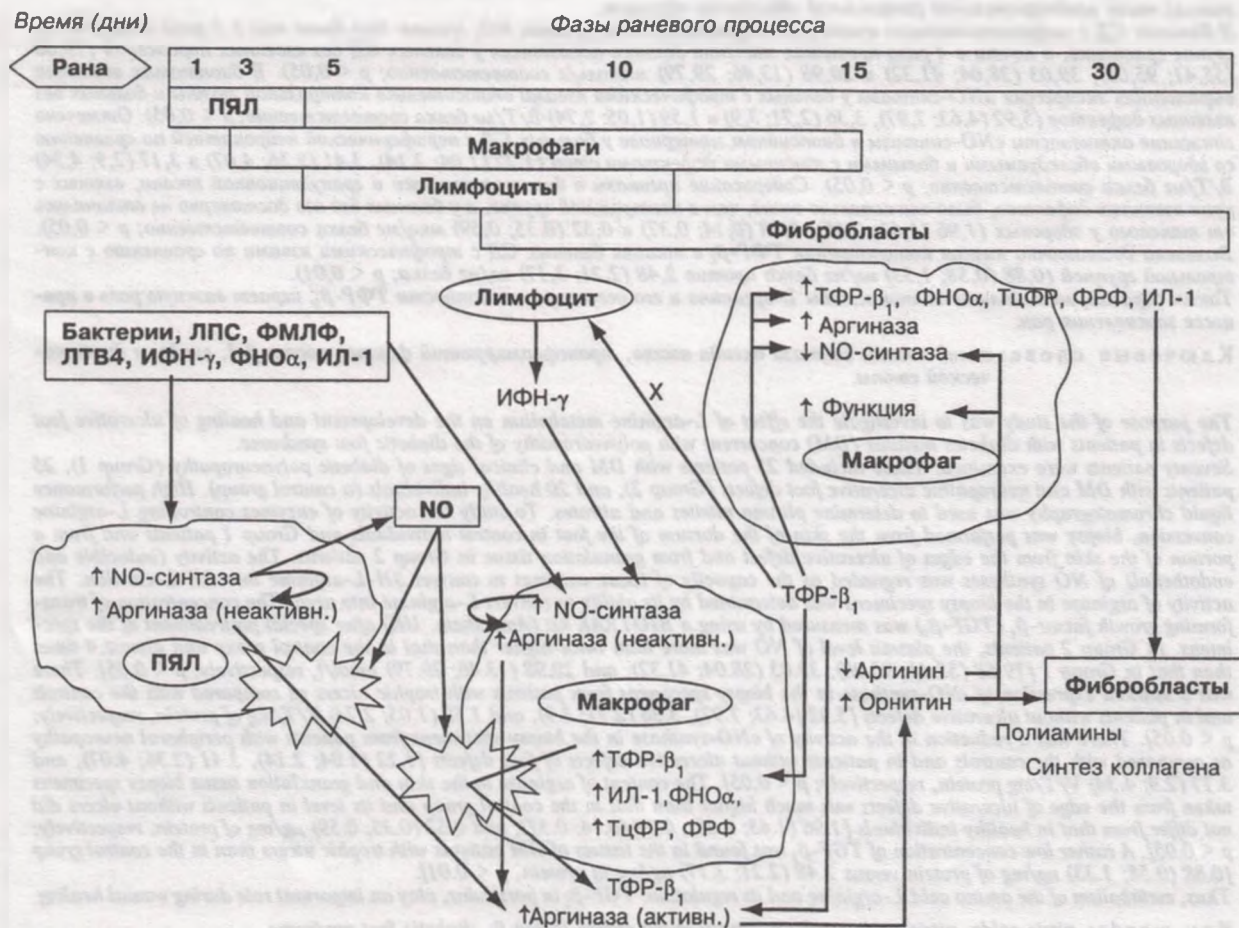


Рис. 2. Схема регуляции метаболизма L-аргинина в процессе заживления раны, реципрокная связь NO-синтазы и аргиназы.

Форменные элементы крови, представленные в фазу воспаления в ране, опосредуют превращение L-аргинина посредством NO-синтазы, обеспечивая цитотоксическое действие клеток воспаления (макрофагов, нейтрофилов). По мере очищения раны от микроорганизмов и некротических масс происходит лизис клеток воспаления и метаболизм L-аргинина осуществляется посредством фермента аргиназы фибробластами. Снижение внеклеточной концентрации L-аргинина и увеличение содержания орнитина в ране сопровождается активацией синтетической функции фибробластов и регенерацией поврежденных тканей. ТФР- β_1 выполняет важную координирующую роль в ходе заживления раны. ЛПС — липополисахариды; ЛТВ4 — лейкотриен В4; NO-синтаза — синтаза NO; пял — полиморфноядерные лейкоциты; ФМЛФ — формил-метил-лейцин-фенил; ФРФ — фактор роста фибробластов.

гиназой и образование L-пролина, являющегося субстратом для синтеза коллагена в тканях, и полиаминов, таких как путресцин, спермидин и спермин, играющих важную роль в регуляции роста и дифференцировки клеток, синтеза ДНК и РНК, что необходимо для регенерации тканей [2, 10].

Физиологическая обусловленность различных путей метаболизма L-аргинина была изучена в экспериментальных моделях заживления раны [3, 4, 14, 22]. Активация NO-синтазы и аргиназы происходит на разных этапах заживления раны (рис. 2). Повышенное образование реактивных азотистых оснований, в том числе и NO, полиморфноядерными лейкоцитами может опосредовать некоторые характерные для начального периода воспаления реакции, такие как микробный стаз, вазодилатация и подавление агрегации тромбоцитов. Стимуляция провоспалительными цитокинами и бактериальными липополисахаридами макрофагов также приводит к активации иNO-синтазы и гиперпродукции NO, играющего бактерицидную роль в ране. В дальнейшем, при отсутствии активации иNO-синтазы (например, персистенция инфекции) происходит снижение выработки NO лейкоцитами и макрофагами. Механизмы ограничения синтеза NO в ране и переключения метаболизма L-аргинина точно не установлены. Полагают, что факторы, угнетающие активность иNO-синтазы, включают в себя истощение запасов L-аргинина в ране; ингибирующее влияние ТФР- β_1 , ИЛ-4, ИЛ-10, глюкокортикоидов и фактора деактивации опухолевых макрофагов на иNO-синтазу [17]; снижение влияния факторов, усиливающих индукцию NO-синтазы. Однако наибольшее значение в ограничении активности NO J. Shearer и соавт. [22] приписывают ТФР- β_1 . Кроме того, V. Boutard и соавт. [5] показали, что ТФР- β_1 является важным индуктором аргиназы в ране, а также снижает цитотоксичность макрофагов.

Цель данной работы заключалась в изучении влияния метаболизма аминокислоты L-аргинина на развитие и заживление язвенных дефектов стоп у больных СД с нейропатической формой СДС.

Материалы и методы

Для решения поставленных задач было обследовано 70 пациентов (табл. 1): 27 больных СД типа 1, 23 — СД типа 2, из которых 8 получали пероральные сахароснижающие препараты (ПССП), 10 находились на комбинированном лечении инсулином и таблетированными препаратами, 32 человека получали инсулинотерапию; 20 лиц без нарушения углеводного обмена. Возраст обследуемых составлял от 27 лет до 61 года (52 (45,5; 58) года — Ме (25-й процентиль; 75-й процентиль), среди них было 35 мужчин и 35 женщин. Длительность заболевания колебалась от 5 лет до 31 года (11,5 (8; 20) лет). Больные СД были разделены на 2 основные группы: больные СД с клиническими признаками диабетической полинейропатии ($n = 25$) и больные СД с нейропатическими язвенными дефектами стоп ($n = 25$). У 13 пациентов отмечено рецидивирование трофических язв, которые у 6 больных развивались на фоне диабетической остеоартропатии

Таблица 1

Основные клинические показатели обследуемых пациентов

Показатель	Больные СД без язвенных дефектов стоп ($n = 25$)	Больные СД с язвенными дефектами стоп ($n = 25$)	Контрольная группа ($n = 20$)
Пол (м/ж)	13/12	12/13	10/10
Возраст, годы	53 (47; 58)	52 (45; 57)	52,5 (44,5; 57,25)
Тип СД (1/2)	13/12	14/11	—
Длительность СД, годы	12 (8; 20)	11 (8; 20)	—
Лечение:			
инсулин	15	17	—
ПССП	5	3	—
инсулин + ПССП	5	5	—
Полинейропатия (есть/нет)	25/0	25/0	Нет
ЛПИ	> 0,9	> 0,9	> 0,9
Диабетическая остеоартропатия (есть/нет)	0/25	6/19	—
Рецидивирование язв (есть/нет)	—	13/12	—
Hb A _{1c} , %	8,2 $\pm$ 0,91	8,5 $\pm$ 0,67	—
ОХС, ммоль/л	5,8 (4,8; 6,9)	5,92 (4,8; 7,63)	—
ТГ, ммоль/л	3 (1,8; 4,8)	2,7 (2; 4,5)	—

Примечание. Здесь и в табл. 2 данные представлены как Ме (25-й процентиль; 75-й процентиль), где Ме — медиана. $M \pm \sigma$, где μ — среднее по совокупности, σ — стандартное отклонение.

(стопы Шарко). Язвенные дефекты I степени тяжести (по классификации F. Wagner, 1979) наблюдались у 18 больных, II степени — у 7. Магистральный кровоток по данным ультразвуковой доплерографии (аппарат "Smartdop 30" фирма "Hideco") был сохранен у всех пациентов. Всем пациентам проводили оценку степени компенсации углеводного обмена (Hb A_{1c}), уровня общего холестерина (ОХС) и триглицеридов (ТГ) плазмы крови. Определение содержания Hb A_{1c} проводили иммуноферментным методом на анализаторе АМХ (фирма "Abbott", Швеция). Уровень липидов сыворотки крови определяли ферментативным методом с помощью наборов "Boehringer-Mannheim". Вибрационную чувствительность оценивали с помощью градуированного камертона "Riedel-Siefert" (фирма "Kircher + Wilhelm", Германия). Степень тяжести периферической нейропатии оценивали в соответствии со шкалой неврологических нарушений (Neuropathy Disability Score, NDS), разработанной R. Yang в 1986 г. и рекомендованной исследовательской группой Neurodiab при Европейской ассоциации по изучению диабета (EASD). Степень нарушения порога вибрационной чувствительности сопоставляли с наличием других форм сенсорной чувствительности (болевой, тактильной, температурной). Исследование коленных и ахилловых рефлексов проводили стандартным методом. Исследование всех видов чувствительности проводили в положении лежа на спине с закрытыми глазами.

Критериями исключения больных из исследования являлись ишемическая форма СДС

(ЛПИ < 0,9); тяжелые сочетанные заболевания других органов и систем; прием лекарственных препаратов, оказывающих влияние на репарацию тканей; отсутствие комплаентности.

Определение уровня нитритов и нитратов плазмы крови проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (прибор фирмы "Shimadzu", Япония). Из локтевой вены обследуемых брали по 10 мл крови в утренние часы (8–9 ч), что, по данным литературы, соответствует "базальному" уровню NO [24]. Полученную после центрифугирования плазму крови хранили в парах жидкого азота до момента проведения анализов. Перед исследованием образцы плазмы размораживали при комнатной температуре, разводили эквивалентным количеством элюирующего буфера и подвергали депротенинизации с помощью ультрафильтрации через фильтры Ultrafree-MC, 10000 NMWL Filter Units ("Sigma", США) центрифугированием при 5000 об/мин в течение 15 мин. Затем 20 мл пробы ультрафильтрата вносили на анионообменную колонку Multospher SAX-5 мкм и элюировали буфером 5 мМ K_2HPO_4 , 25 мМ KH_2PO_4 pH 3,5. Количественный анализ проводили сравнением с внешним стандартом (KNO_2 , KNO_3) при длине волны 214 нм.

Пациентам контрольной группы и больным СД без язвенных дефектов стоп выполняли биопсию кожи с тыльной поверхности стопы, больным с трофическими язвами — участка кожи с края язвенного дефекта и грануляционной ткани соответственно. Площадь среза составляла примерно 7–10 mm^2 . Образцы ткани помещали в пробирки и замораживали в растворе жидкого азота, где хранили до момента исследования.

Активность NO-синтаз (индуцибельной и эндотелиальной) расценивали как способность тканевых ферментов превращать 3H-L-аргинин в 3H-L-цитруллин. Активность аргиназы в биоптатах определяли по ее способности превращать L-аргинин в мочевины. Концентрацию ТФР- β_1 определяли с помощью набора BIOTRAK фирмы "Amersham" (Великобритания) после предварительной специальной обработки образцов.

При статистической обработке материала в вариационных рядах с нормальным или близким к нормальному распределению для выявления достоверности полученных различий вычисляли *t*-критерий Стьюдента. Для сравнения совокупностей, не подчиняющихся нормальному распределению, были использованы непараметрические критерии: критерий Манна—Уитни с поправкой Йейтса для сравнения двух выборок, критерий Крускала—Уоллиса и критерий Данна для сравнения нескольких групп. В случае сравнения качественных признаков использовали метод χ^2 .

Для вычисления наличия и силы связи между факторами вычисляли коэффициент ранговой корреляции Спирмена (*rs*). При всех методах обобщения различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты

При изучении продукции NO у больных СД с диабетической нейропатией без язвенных поражений получено снижение уровня NO_x ($NO_2 + NO$) плазмы по сравнению с лицами контрольной группы (рис. 3).

Достоверных различий синтеза NO в зависимости от типа СД и показателей углеводного обмена в данной когорте обследуемых не найдено. Выявлена зависимость изучаемого показателя от длительности диабета и степени выраженности диабетической полинейропатии. Так, у пациентов без язвенных дефектов выявлена обратная корреляционная связь между уровнем NO_x плазмы и длительностью СД ($rs = -0,721$; $p < 0,001$). У 12 больных со стажем СД более 16 лет значение NO_x плазмы было достоверно ниже, чем у больных с меньшей длительностью заболевания: 13,27 (12,67; 15,45) мкмоль/л против 29,79 (25,74; 31,53) мкмоль/л соответственно ($p < 0,001$). Отмечена зависимость уровня NO_x плазмы от степени выраженности неврологических расстройств ($rs = -0,63$; $p < 0,001$). У 10 пациентов без трофических язв с выраженной и тяжелой нейропатией (сумма баллов > 7) содержание NO_x плазмы было значительно ниже, чем у больных с умеренной нейропатией: 12,96 (12,52; 14,03) мкмоль/л против 28,54 (22,91; 31,25) мкмоль/л ($p < 0,001$).

Кроме того, в группе больных без язвенных поражений стоп выявлена обратная зависимость между уровнем NO_x и показателями липидов крови (ОХС и ТГ): $rs = -0,559$ и $rs = -0,541$ соответственно ($p < 0,05$).

В группе больных СД с язвенными дефектами стоп корреляционная связь между указанными выше показателями отсутствовала.

У больных СД с язвенными дефектами стоп уровень NO_x плазмы был более чем в 2 раза выше, чем в группе сравнения, и почти в 4 раза превышал значения данного показателя у больных СД без язвенных поражений (см. рис. 3). Продукция NO у больных с диабетической остеоартропатией достоверно не отличалась от таковой у пациентов с рецидивирующими язвами без стопы Шарко ($p > 0,05$). Вы-

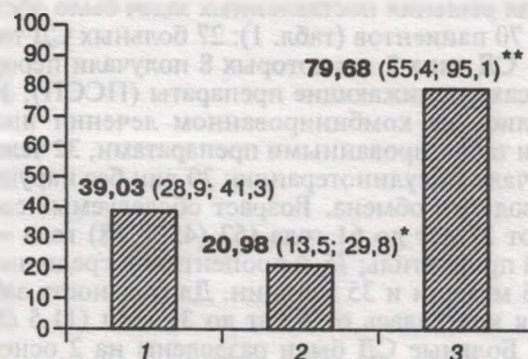


Рис. 3. Уровень нитритов и нитратов плазмы (NO_x ; в мкмоль/л) у обследуемых пациентов.

1 — контрольная группа; 2 — больные СД с диабетической нейропатией без язвенных дефектов стоп (ДНБ-); 3 — больные СД с нейропатическими язвенными дефектами стоп (ДНБ+). * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ относительно контрольной группы; значения ДНБ+ и ДНБ- достоверно различаются при $p < 0,01$ (критерий Крускала—Уоллиса и Данна).

Таблица 2

Результаты специальных методов исследования

Группа больных	NO _x , мкмоль/л	иNO-синтаза, В/Т/мг белка	эNO-синтаза, В/Т/мг белка	Аргиназа, мкг/мг белка	ТФР-β ₁ , нг/мг белка
Больные СД с нейропатическими язвенными дефектами стоп	79,68 (55,41; 95,08)	5,92 (4,63; 7,97)	3,17 (2,9; 4,34)	1,96 (1,63; 2,65)	0,88 (0,58; 1,33)
<i>p</i> ₁	< 0,01	< 0,01	< 0,05	< 0,01	< 0,01
<i>p</i> ₂	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	н.д.
Больные СД с диабетической полинейропатией без язвенных дефектов стоп	20,98 (13,46; 29,79)	1,59 (1,05; 2,74)	1,22 (1,04; 2,14)	0,52 (0,35; 0,59)	1,99 (1,78; 2,82)
<i>p</i> ₁	< 0,05	< 0,01	< 0,01	н.д.	н.д.
Контрольная группа	39,03 (28,04; 41,32)	3,36 (2,71; 3,9)	3,41 (2,36; 4,07)	0,28 (0,14; 0,37)	2,48 (2,21; 3,17)

Примечание. *p*₁ — сравнение с контрольной группой; *p*₂ — сравнение между группами; н.д. — различия недостоверны.

явлена зависимость рецидивирования язвенных дефектов стоп от концентрации NO_x плазмы: более высокие значения метаболитов NO у пациентов с хроническим рецидивирующим течением язвенных дефектов в отличие от больных с нерезицидивирующими язвами в анамнезе (95,08 (86,16; 98,75) мкмоль/л против 54,83 (47,9; 59,87) мкмоль/л; *p* < 0,001).

При изучении активности ферментов, регулирующих превращение L-аргинина, в биоптатах выявлена выраженная экспрессия иNO-синтазы у больных с трофическими язвами по сравнению с лицами контрольной группы и больными без язвенных дефектов (табл. 2). Отмечено снижение активности эNO-синтазы в биопсийном материале у больных СД с периферической нейропатией по сравнению со здоровыми обследуемыми и больными с язвенными дефектами стоп. Содержание аргиназы в биоптатах кожи и грануляционной ткани, взятых с края язвенных дефектов, было значительно выше, чем в контрольной группе, а у больных без язв достоверно не отличалось от такового у здоровых. Выявлена достаточно низкая концентрация ТФР-β₁ в тканях больных СД с трофическими язвами по сравнению с таковой у лиц контрольной группы. Содержание данного цитокина в группе больных без язв по сравнению со здоровыми достоверно не отличалось.

Полученные в ходе исследования данные указывают на сильную корреляцию между уровнем NO_x плазмы и активностью NO-синтаз как в группе больных СД с нейропатическими язвенными дефектами, так и в группе больных диабетом без яз-

венных поражений стоп (табл. 3). Так, снижение концентрации NO_x плазмы у больных без язв сопровождалось низкой активностью эндотелиальной и индуцибельной NO-синтаз.

У больных с трофическими язвами стоп выраженная гиперпродукция NO сопровождалась значительным повышением экспрессии iNOS в биоптатах, высокой активностью аргиназы, а также резко сниженным содержанием ТФР-β₁.

Обсуждение

Выявленное снижение базального уровня NO у пациентов без язвенных поражений стоп по сравнению со здоровыми лицами предполагает определенные патологические изменения, характерные для СД. Так, длительная гипергликемия может приводить к снижению синтеза и(или) повышению утилизации NO посредством нескольких механизмов. Один из них связан с активацией полиолового пути обмена глюкозы, в ходе которого происходит истощение содержания в эндотелиальных клетках глутатиона и NADPH. Последний является облигатным кофактором как эндотелиальной NO-синтазы, так и глутатиона (мощный тканевый антиоксидант). Инактивация NO происходит при участии реактивных кислородных радикалов, образующихся в большом количестве в результате окислительного стресса, наблюдаемого при СД [19, 27]. Отдельные исследования свидетельствуют о заметном снижении активности ферментов антиоксидантной защиты при диабете, что может приводить к повышенной чувствительности эндотелия к повре-

Таблица 3

Корреляционный анализ между уровнем нитрата плазмы и показателями активности ферментов иNO-синтазы, эNO-синтазы, аргиназы и ТФР-β₁ в биоптатах кожи у больных с язвенными дефектами стоп, больных СД и лиц контрольной группы

Группа больных	иNO-синтаза, В/Т/мг белка	эNO-синтаза, В/Т/мг белка	Аргиназа, мкг/мг белка	ТФР-β ₁ , нг/мг белка
Больные СД с нейропатическими язвенными дефектами стоп	0,818*	0,636*	0,782*	-0,876*
Больные СД с диабетической полинейропатией без язвенных дефектов стоп	0,791*	0,804*	0,073 (н.д.)	-0,169 (н.д.)
Контрольная группа	0,58**	0,684*	0,349 (н.д.)	0,143 (н.д.)

Примечание. Достоверность коэффициента ранговой корреляции Спирмена (rs) при: * — *p* < 0,001; ** — *p* < 0,01, н.д. — отсутствие статистической значимости коэффициента корреляции.

ждающему действию свободных радикалов и уменьшать выделение NO [16, 18, 25]. Увеличение активности диацилглицерина и протеинкиназы C, ингибируя эндотелиальную NO-синтазу, также препятствует синтезу NO [25]. Конечные продукты гликирования, снижая доступность или "гася" активность NO, являются дополнительным фактором снижения уровня NO и дисфункции эндотелия [6].

Обобщая имеющиеся в литературе данные и сопоставляя их с полученными результатами, можно сделать предварительный вывод о связи длительности заболевания со степенью повреждения эндотелиальной продукции NO.

При изучении продукции NO у пациентов с дислипидемией также отмечено снижение его содержания в плазме крови по сравнению с больными СД без нарушений показателей жирового обмена. Согласно современным представлениям, гипергликемия и повышение уровня ХС в крови, особенно его наиболее атерогенной фракции — ХС ЛПНП, являются важными факторами риска развития атеросклероза. Известно, что гиперхолестеринемия повышает образование супероксидных радикалов сосудистой стенкой, а окислительные ЛПНП вызывают снижение активности эНО-синтазы [7, 13] и уменьшают количество L-аргинина — субстрата для синтеза NO [8]. Нарушение эндотелийзависимой вазодилатации при гиперхолестеринемии, с одной стороны, обусловлено пониженным синтезом NO, с другой — инактивацией NO свободными радикалами кислорода, гиперпродукция которых также имеет место при СД.

При анализе взаимосвязи величин секреции метаболитов NO плазмы крови и активности эНО-синтазы у больных без язвенных поражений обнаружено, что наиболее низкие значения данных показателей имели пациенты с выраженным нарушением периферической чувствительности. Полученные нами данные согласуются с результатами зарубежных исследователей. Так, D. Pitei и S. Kilo и соавт., используя лазерную доплеровскую флоурометрию, оценивали вазодилатацию сосудов микроциркуляторного русла тыла стопы у пациентов с диабетической нейропатией в ответ на нагревание и ионофорез ацетилхолина [11, 20]. Эти авторы получили снижение NO-опосредованного сосудорасширяющего эффекта. Интересные данные получены в исследовании A. Veves и соавт. по изучению эндотелиальной дисфункции у больных СД с диабетической нейропатией с использованием иммуногистохимического метода [26]. Отмечено уменьшение интенсивности окрашивания биоптатов кожи с тыла стопы антисывороткой к эНО-синтазе человека, что указывало на снижение синтеза NO эндотелием капилляров.

Снижение активности иНО-синтазы в биоптатах кожи у больных СД без язвенных дефектов относительно контрольной группы может вносить вклад в нарушение регуляции ангиогенеза и снижение синтетической функции фибробластов. Имеющиеся в литературе сведения подтверждают это предположение. Так, установлено, что NO обладает способностью стимулировать миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток, способствуя образованию новых сосудов [15, 23], и играет

важную роль в синтезе и отложении коллагена [3, 12]. M. Schaeffer и соавт. [21] в опыте над экспериментальными мышами продемонстрировали, что системное введение конкурентных ингибиторов иНО-синтазы, таких как метилизотиомочевина и аминогуанидин, приводило к уменьшению отложения коллагена и ухудшению стягивания кожной раны у экспериментальных животных.

Таким образом, принимая во внимание представленные здесь данные, с большой долей вероятности мы можем полагать, что снижение продукции NO в сочетании с другими факторами риска (сенсомоторные расстройства, гиперхолестеринемия, длительность СД) может предрасполагать к развитию язвенных дефектов у больных СД с периферической нейропатией.

Чрезмерная продукция NO у обследованных нами больных с нейропатическими язвенными дефектами стоп является одним из важных механизмов их образования и ответственно за снижение скорости репаративных процессов в области раневого дефекта. С одной стороны, индукция синтеза NO тесным образом связана с высоким уровнем неспецифической защиты организма человека в отношении как патогенных, так и условно-патогенных микроорганизмов, с другой — длительная гиперпродукция NO приводит к нежелательным последствиям, связанным, в частности, с нарушением заживления ран, поскольку цитотоксичность данного соединения может проявляться в отношении собственных тканей [1]. Кроме того, в работах M. Schaeffer и соавт. [21] было показано, что резко повышенное содержание NO в тканях угнетает синтез белка и коллагеногенез. Высокая способность к образованию NO у больных с рецидивирующими язвами, вероятно, поддерживает нарушенное заживление тканей, способствует формированию незрелых коллагеновых волокон в силу повреждающего действия NO на кожу и грануляционную ткань, что требует дальнейшего подтверждения с использованием морфологического и электронно-микроскопического методов исследования.

Повышенная активность аргиназы, выявленная у больных с нейропатическими язвенными дефектами, возможно, объясняет интенсивное образование гиперкератоза, окружающего язвенный дефект, и препятствует заживлению ран.

Гипотеза о вероятной модулирующей роли ТФР- β в метаболизме L-аргинина находит свое отражение в снижении его концентрации в биоптатах кожи и грануляционной ткани больных с трофическими язвами. Повреждения в системе регуляции активности иНО-синтазы могут приводить к изменению синтеза NO в ране с нарушением последовательных фаз заживления. Ослабление ингибиторного влияния ТФР- β на экспрессию иНО-синтазы способствует неконтролируемой гиперпродукции NO макрофагами и фибробластами области раневого дефекта. Важно отметить, что ТФР- β , является наиболее активным и разносторонним медиатором фибро- и ангиогенеза, и уменьшение его синтеза также может способствовать нормальному заживлению язвенных дефектов стоп.

Таким образом, очевидно, что метаболизм аминокислоты L-аргинина и его регуляция, в частности ТФР- β , играет важную роль в процессе заживления ран. Нарушение последовательной активации ферментов иNO-синтазы и аргиназы, участвующих в катаболизме аргинина, в результате стойкой активации клеток воспаления и изменения продукции цитокинов и факторов роста может приводить к хроническому воспалению, замедленному заживлению ран и их рецидивированию у больных СД.

Выводы

1. Снижение продукции NO у больных СД в сочетании с другими факторами риска, такими как степень тяжести периферической нейропатии, длительность заболевания, дислипидемия, может predispose к развитию язвенных дефектов стоп у больных СД типов 1 и 2.

2. Избыточный синтез NO у больных СД с нейропатическими язвами обусловлен повышенной экспрессией индуцибельной формы NO-синтазы, что приводит к нарушению процесса заживления трофических язв.

3. Гиперпродукция NO наиболее выражена у больных с рецидивирующими нейропатическими язвенными дефектами по сравнению с больными, имеющими первичные язвы.

4. Замедленное заживление нейропатических язвенных дефектов стоп во многом обусловлено интенсивным образованием участков гиперкератоза, окружающих язвы, что может объясняться повышенной активностью фермента аргиназы, участвующего в процессе синтеза белков, коллагенов.

5. Изменение цитокинового фона у больных СД находит свое отражение в снижении локальной экспрессии ТФР- β , у больных с нейропатическими язвенными дефектами, играющего важную роль в процессах синтеза и отложения коллагена, ангиогенезе и регулирующего временную последовательность фаз заживления кожных ран в физиологических условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко В. М., Виноградов Н. А., Малеев В. В. // Журн. микробиол. — 1999. — № 5. — С. 67–72.

2. Голубев А. Г. // Бюл. exper. биол. — 1994. — Т. 117, № 2. — С. 201.
3. Albina J. E., Mills C. D., Barbul A. et al. // Am. J. Physiol. — 1987. — Vol. 254 (Endocrinol. Metab. 17). — P. E459–E467.
4. Albina J. E., Mills C. D., Henry W. L. et al. // J. Immunol. — 1990. — Vol. 144. — P. 3877–3880.
5. Boutard V., Havouis R., Fouqueray B. et al. // Ibid. — 1995. — Vol. 155. — P. 2077–2084.
6. Bucala R., Traccey K., Cerami A. // J. Clin. Invest. — 1991. — Vol. 87. — P. 432–438.
7. Chen L. Y., Mehta P., Mehta J. I. // Circulation. — 1996. — Vol. 93. — P. 1740–1746.
8. Drexler H., Zeiher A. M., Meinzer K. et al. // Lancet. — 1991. — Vol. 338. — P. 1546–1550.
9. Hibbs J. B., Taintor R. R., Vavrin Z., Rachlin E. M. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1988. — Vol. 157. — P. 87–94.
10. Ketteler M., Border W. A., Noble N. A. // Am. J. Physiol. — 1994. — Vol. 267. — P. F197–F207.
11. Kilo S., Berghoff M., Hilz M. et al. // Neurology. — 2000. — Vol. 54, N 6. — P. 1246–1252.
12. Kirk S. J., Regan M. G., Palmer R. M. J. et al. // Surg. Forum. — 1993. — Vol. 44. — P. 706–708.
13. Liao Y. K., Shin W. S., Lee W. Y. et al. // J. Biol. Chem. — 1995. — Vol. 270. — P. 319–324.
14. Mills C. D., Pricolo V. E., Albins J. E. et al. // Clinical and Experimental Approaches to Dermal and Epidermal Repair: Normal and Chronic Wounds / Ed. A. Barbul. — New York, 1990. — P. 193–203.
15. Morbidelli L., Chang J. G., Douglas J. G. et al. // Am. J. Physiol. — 1996. — Vol. 270. — P. H411–H415.
16. Mugge A., Elwell J. H., Peterson T. E. et al. // Am. J. Physiol. — 1991. — Vol. 260. — P. C219–C225.
17. Nathan C. // FASEB J. — 1992. — Vol. 6. — P. 3051–3064.
18. Omar H. A., Cherry P. D., Mortelliti M. P. et al. // Circ. Res. — 1991. — Vol. 69. — P. 601–608.
19. Pieper G. M., Langenstroer P., Siebeneich W. // Cardiovasc. Res. — 1997. — Vol. 34, N 1. — P. 145–156.
20. Pitei D. L., Watkins P. Y., Edmonds M. E. // Diabet. Med. — 1997. — Vol. 14, N 4. — P. 284–290.
21. Schaeffer M. R., Tantry U., Thornton F. J. et al. // Eur. J. Surg. — 1999. — Vol. 165, N 3. — P. 262–267.
22. Shearer J. D., Richards J. R., Mills C. D. et al. // Am. J. Physiol. — 1997. — Vol. 272 (Endocrinol. Metab. 35). — P. E181–E190.
23. Stallmeyer B., Kampfer H., Kolb N. et al. // J. Invest. Dermatol. — 1999. — Vol. 113, N 6. — P. 1090–1098.
24. Tanaka S., Yashiro A., Nakashima Y. et al. // Clin. Cardiol. — 1997. — Vol. 20, N 4. — P. 361–365.
25. Tesfamariam B. // Free Rad. Biol. Med. — 1994. — Vol. 16, N3. — P. 383–391.
26. Veves A., Akbari C. M., Primavera J. et al. // Diabetes. — 1998. — Vol. 47, N 3. — P. 457–463.
27. Zalba G., Beaumont J., San Jose G. et al. // J. Physiol. Biochem. — 2000. — Vol. 56, N 1. — P. 57–64.

Поступила 07.06.02

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2004

УДК 616.833-02:616.379-008.64]-07

Т. Р. Бурса¹, И. А. Строков², М. В. Новосадова¹, О. И. Дрена¹, А. С. Аметов¹

КРИТЕРИИ ДИАГНОСТИКИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ ПОЛИНЕЙРОПАТИИ ПРИ ПОПУЛЯЦИОННОМ ИССЛЕДОВАНИИ

Кафедра эндокринологии и диабетологии (зав. — проф. А. С. Аметов) Российской медицинской академии последипломного образования¹, центр ВОЗ по обучению и информатике в области диабета¹, кафедра нервных болезней ММА им. И. М. Сеченова (зав. — проф. Н. Н. Яхно)²

Популяционные исследования обладают высокой информативностью и отражают реальную распространенность заболевания в обществе. Цель настоящего исследования — изучение распространенности диабетической полинейропатии (ДПН) среди пациентов с сахарным диабетом (СД) типа 1 и оценка диагностической значимости применяемых методов диагностики. Обследовано 346 пациентов с СД типа 1 (100 детей и подростков и 246 взрослых), проживающих в Москве и Московской области. Для диагностики ДПН были использованы критерии, принятые на конференции по стандартизации