

На правах рукописи

**СПИРИНА
ЛЮДМИЛА ВИКТОРОВНА**

**РОЛЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ В ФОРМИРОВАНИИ
СОСУДИСТЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА У
ДЕТЕЙ**

14.00.16 – патологическая физиология
14.00.09 - педиатрия

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Томск – 2003

Работа выполнена в Сибирском государственном медицинском университете МЗ РФ

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

Суханова Галина Алексеевна

Научный консультант:

доктор медицинских наук

Кондратьева Елена Ивановна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
профессор, член-корреспондент РАМН

Дыгай Александр Михайлович

доктор медицинских наук,
профессор

Колосова Марина Владимировна

Ведущая организация: Новосибирская государственная медицинская академия
(г.Новосибирск)

Защита состоится « ____ » _____ 2003г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 206.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (634050, г.Томск, пр.Ленина, 107)

Автореферат разослан « ____ » _____ 2003г.

Ученый секретарь диссертационного совета:

Бражникова Н.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Изучение метаболических процессов при сахарном диабете 1 типа является одной из важных медико-биологических проблем. Ранняя инвалидизация, высокая смертность определили сахарный диабет в качестве первых приоритетов национальных систем здравоохранения [Cryer P.E., 1995; Cardner S.G. et al., 1996; Балаболкин М.И., 1997, 1998, 2000; Dawson K. et al., 1998; Касаткина Э.П., 1999; Nordt T.K. et al., 2000]. Основное внимание в последние годы уделяется разработке методов ранней диагностики нарушений углеводного, липидного обмена, связанных с ними осложнений сахарного диабета 1 типа [Green A. et al., 1996; Harris M.I., 1996; Robinson N. et al., 1996; Дедов И.И., 1998; Касаткина Э.П. и др., 1999].

Нарушения общего и регионального кровообращения имеют значение в патогенезе многих заболеваний, таких как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца и артериальная гипертензия [Шестакова М.В. и др., 1995; Drexler H., 1998; Margolius H.S., 1998; Arosio E. et al., 1999; Dogra G. et al., 2001]. В регуляции кровообращения принимают участие калликреин-кининовая, ренин-ангиотензиновая системы. Установлено, что взаимосвязь этих систем осуществляется посредством калликреина и ангиотензин-превращающего фермента [Пасхина Т.С., 1976; Насонов Е.Л. и др., 1998; Альтшулер Б.Ю. и др., 2001; Яровая Г.А., 2001; Vader M., 2001]. В регуляции активности систем протеолиза принимают участие ингибиторы протеолитических ферментов, к которым прежде всего относятся α_1 -протеиназный ингибитор и α_2 -макро-глобулин [Проценко В.А. и др., 1988; Shahid A., et al., 1996; Stasisaitis D. et al., 2001]. Известно, что баланс между ферментами и ингибиторами протеолиза определяет состояние эндотелия и развитие микроангиопатий [Nolly H. et al., 1997; Drexler H., 1998; Pepinne C.J., 1999; Беленков Ю.Н., 2000; Коломоец Н.М., 2001]. Роль калликреин-кининовой, ренин-ангиотензиновой систем и ингибиторов протеолиза на разных этапах заболевания и в развитии диабетической нефропатии у детей не изучена.

В настоящее время широко обсуждается вклад генетических и средовых факторов в нарушения гемодинамики при диабете 1 и 2 типа [Ringel G. et al., 1997; Stenvinkel P. et al., 1997; Tarnow L. et al., 2000; Шестакова М.В. и др., 2002]. Большое значение придается I/D полиморфизму гена ангиотензин-превращающего фермента и T174M рестрикционному полиморфизму гена ангиотензиногена. Показана ассоциация I/D полиморфизма гена ангиотензин-превращающего фермента с диабетической

нефропатией [Кондратьев Я.Ю. и др., 1998; Fujisawa T. et al., 1998; Чистяков Д.А. и др., 2000; Балаболкин М.И., 2000; Кондратьева Е.И., 2001; Елисеева Ю.Е., 2001]. М аллель гена ангиотензиногена многие авторы считают независимым фактором развития гипертензии при сахарном диабете 2 типа [Gulmann C. et al., 1999; Сергеева Т.В., 2000].

Большое внимание уделяется также проблемам регуляции протеолиза при сахарном диабете. Известно, что в патогенезе микроангиопатий при сахарном диабете 1 типа ключевую роль играют гипергликемия на фоне абсолютного дефицита инсулина [Ангельский А.Н., 1995; Балаболкин М.И., 1998, 2000; Дедов И.И., 2002]. Однако влияние инсулина и глюкозы на состояние протеолиза при сахарном диабете 1 типа не изучено. В лечении диабетической нефропатии используют ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, их действие связывают со снижением содержания ангиотензина II и восстановлением нарушенной гемодинамики [Ruschitzka F. et al., 1999; Bader M., 2001; Gilbert R.E. et al., 2000; Hogeboom van Buggenum I. M. et al., 2002; Белова Л.А., 2002]. К наиболее известным пероральным ингибиторам относится каптоприл [Преображенский Ц.В. и др., 2001; Альтшулер Б.Ю. и др., 2001]. Использование ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента в педиатрической практике до сих пор является одной из дискуссионных проблем.

Изучение состояния протеолитических систем позволит выявить группы риска по развитию сосудистых осложнений для своевременной их профилактики у больных сахарным диабетом 1 типа. Полученные результаты могут быть использованы для формирования новых подходов в поиске препаратов, препятствующих прогрессированию осложнений заболевания.

Цель работы: установить роль калликреин-кининовой и ренин-ангиотензиновой систем в развитии сахарного диабета 1 типа и его осложнений с учетом наследственных и средовых факторов.

Задачи исследования:

1. Изучить активность калликреина, калликреиногена, ангиотензин-превращающего фермента, α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина плазмы крови здоровых детей и больных сахарным диабетом в зависимости от длительности заболевания и развития диабетической нефропатии.

2. Исследовать влияние инсулина, глюкозы и каптоприла в условиях *in vitro* на активность калликреина, ангиотензин-превращающего фермента и ингибиторов протеолиза плазмы крови.
3. Изучить влияние I/D полиморфизма гена ангиотензин-превращающего фермента и T174M рестрикционного полиморфизма гена ангиотензиногена на состояние протеолиза при сахарном диабете 1 типа у детей.
4. Установить взаимосвязь показателей протеолиза в патогенезе сахарного диабета и исследовать их диагностическую ценность при развитии сосудистых осложнений.

Научная новизна

Впервые показано, что у больных сахарным диабетом 1 типа наблюдаются нарушения протеолитических процессов с повышением активности калликреина на фоне недостаточности α_1 -протеиназного ингибитора, прогрессирующие при увеличении длительности заболевания, декомпенсации диабета и при наличии осложнений. Активность калликреина повышена на ранних этапах заболевания, с увеличением длительности и при развитии нефропатии возрастает активность ангиотензин-превращающего фермента. Установлено, что активность калликреина, ангиотензин-превращающего фермента и α_1 -протеиназного ингибитора могут служить дополнительными критериями в прогнозировании осложнений сахарного диабета 1 типа.

Получены новые данные о влиянии глюкозы, инсулина и каптоприла на показатели протеолиза плазмы крови больных сахарным диабетом 1 типа в условиях *in vitro*. Глюкоза повышает активность калликреина и ангиотензин-превращающего фермента плазмы крови больных в условиях *in vitro*. Инсулин и каптоприл стимулируют ингибиторную активность плазмы крови больных.

Обнаружено влияние I/D полиморфизма гена ангиотензин-превращающего фермента на активность показателей протеолиза при развитии нефропатии. DD генотип и высокая активность ангиотензин-превращающего фермента являются факторами прогрессирования диабетической нефропатии.

Практическая значимость работы

Выявлены биохимические маркеры развития диабетической нефропатии при сахарном диабете 1 типа у детей. Исследование активности калликреина, ангиотензин-превращающего фермента и ингибиторов протеолиза рекомендуется для оценки риска развития ретино- и нефропатии. При назначении ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента необходимо ориентироваться на исходный уровень фермента.

Применение ингибиторов целесообразно при высоких значениях активности ангиотензин-превращающего фермента у больного. Установлено, что группу риска по развитию диабетической нефропатии составляют больные с DD генотипом I/D полиморфизма гена ангиотензин-превращающего фермента.

Внедрение

Исследуемый подход к профилактике осложнений заболевания у детей с сахарным диабетом 1 типа внедрен на базе эндокринологического отделения детской больницы №1 г. Томска и генетической клиники НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН. Результаты исследования используются в лекционных курсах на кафедрах эндокринологии и диабетологии, биохимии и молекулярной биологии Сибирского государственного медицинского университета. Профилактическая работа, направленная на повышение информированности больных о заболевании, проводится на базе образовательной программы «Школа управления диабетом», в классе «Диабетическая нефропатия».

Публикации

По теме диссертации опубликовано 14 работ.

Апробация работы

Основные результаты представлены на заседаниях кафедр патологической физиологии, биохимии и молекулярной биологии, эндокринологии и диабетологии СГМУ, педиатрии факультета повышения квалификации и постдипломной подготовки специалистов; региональных и российских конференциях: второй научно-практической конференции педиатров «Здоровье детей – наше будущее» (Томск, 2002); третьем конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2002); втором российском диабетологическом конгрессе «Сахарный диабет и сердечно-сосудистые осложнения» (Москва, 2002); второй межрегиональной конференции молодых исследователей (Самара, 2002); региональной конференции «Сахарный диабет и сердечно-сосудистая патология» (Томск, 2002); третьей научной конференции с международным участием «Эндокринная регуляция физиологических функций в норме и при патологии» (Новосибирск, 2002); третьей научно-практической конференции «Санкт-Петербургский научный форум-2003» (Санкт-Петербург, 2003); Пироговской научной конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2003); четвертом конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2003); Всероссийской научно-практической конференции «Клиническая эндокринология – достижения и

перспективы» (Санкт-Петербург, 2003); I Всероссийской школе-семинаре детского эндокринолога «Новые возможности диагностики и терапии болезней эндокринной системы у детей» (Томск, 2003); IV международной научно-практической конференции «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 2003).

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РГНФ № 03-06-00457а «Программа поиска маркеров сосудистых осложнений у детей и подростков с сахарным диабетом I типа и членов их семей. Стратегия реабилитации».

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 140 страницах, иллюстрирована 46 таблицами и 13 рисунками. Библиография включает 265 литературных источников, из которых 155 отечественных и 110 иностранных.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Сахарный диабет 1 типа у детей характеризуется активацией калликреин-кининовой системы, при диабетической нефропатии повышается активность ангиотензин-превращающего фермента. Состояние протеолиза зависит от I/D полиморфизма гена ангиотензин-превращающего фермента. DD генотип ассоциирован с высокой активностью ангиотензин-превращающего фермента при нефропатии.
2. Добавление глюкозы к плазме крови больных сахарным диабетом 1 типа в условиях *in vitro* способствует увеличению активности калликреина и ангиотензин-превращающего фермента. Инсулин и каптоприл повышают ингибиторную активность плазмы крови больных в условиях *in vitro*.
3. Проведение адекватной инсулинотерапии, достижение удовлетворительной компенсации углеводного обмена и применение ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента при диабетической нефропатии являются профилактическими и терапевтическими мероприятиями по восстановлению баланса протеолитических систем.

Материал и методы исследования

Клинический материал. Обследовано 119 детей с сахарным диабетом 1 типа (СД1). Подробная характеристика обследованных детей и подростков представлена в табл. 1. Контрольную группу составили 32 практически здоровых ребенка, средний возраст $12,8 \pm 0,1$ лет.

Характеристика групп больных сахарным диабетом 1 типа

Здоровые дети, n=32, средний возраст – 12,8±0,1 лет			Сахарный диабет 1 типа, n=119, средний возраст – 13,1±0,3 лет		
Пол					
Мальчики, n=59, средний возраст – 12,8±0,4 лет			Девочки, n=60, средний возраст – 13,4±0,4 лет		
Длительность заболевания					
Впервые выявленный, n=26	От 1 до 3 лет, n=18	От 3 до 5 лет, n=27	От 5 до 7 лет, n=14	От 7 до 10 лет, n=26	Более 10 лет, n=8
Потребность в инсулине (ЕД на кг массы тела в сутки)					
До 0,7 ЕД/кг, n=52			Более 0,7 ЕД/кг, n=67		
Наличие осложнений СД 1 типа					
Без осложнений, n=54		Ретинопатия, n=13		Нефропатия, n=26	
				Стадия микроальбуминурии, n=15	Стадия протеинурии, n=11
Степень компенсации заболевания (по уровню HbA _{1c} , %)					
От 8 до 11%, n=11		От 11 до 15%, n=21		Более 15%, n=9	

Для коррекции гемодинамических нарушений у больных с диабетической нефропатией использовали препарат ЭНАП (KRKA, Slovenia). Дети получали препарат в дозе 5 мг в сутки в течение 4 месяцев. У 12 больных этой группы на фоне проводимой терапии дополнительно определяли активность ангиотензин-превращающего фермента.

Экспериментальные исследования. В условиях *in vitro* проводили 3 серии экспериментов с добавлением инсулина, глюкозы и каптоприла к плазме крови 50 больных СД 1 типа (из них 12 с диабетической нефропатией) и 15 здоровых детей. Инсулин добавляли в дозах 7,5; 15,0 и 30,0 мкЕд/мл, глюкозу в дозах 2,0; 5,0; 15,0 ммоль/л и каптоприл в дозах 0,075; 0,15 и 0,30 мкг/мл.

Молекулярно-генетические исследования. В генетической клинике НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН (директор – академик РАМН, проф., д.м.н. В.П. Пузырев) обследовано 70 больных СД 1 типа и определен I/D полиморфизм гена ангиотензин-превращающего фермента (ACE) и T174M рестрикционный полиморфизм гена ангиотензиногена (AGT). Было выявлено 15 детей с генотипом II, 37 больных - с

генотипом ID и 18 – с генотипом DD. T174M рестрикционный полиморфизм гена AGT был определен только у 61 ребенка, из них 50 детей имели TT генотип гена AGT, 10 детей - TM генотип и 1 ребенок – MM генотип. Генотипирование проводили методом полимеразной цепной реакции с помощью специфических праймеров. Молекулярно-генетические исследования выполнены совместно с аспирантами Е.В. Юрченко и Н.В. Тарасенко под руководством д.м.н. Е.И. Кондратьевой.

Методы исследования. Активность калликреина (КК) и его предшественника калликреиногена (ККГ) плазмы крови оценивали по скорости гидролиза N- α -бензоил-L-аргининэтилового эфира (Reanal, Венгрия), выражали в миллиединицах (мЕ/мл) [Пасхина Т.С. и др., 1974]. Активность α_1 -протеиназного ингибитора (α_1 -ПИ) и α_2 -макроглобулина (α_2 -МГ) плазмы крови определяли по методу Нартиковой В.Ф. и Пасхиной Т.С. (1977). Активность ингибиторов выражали в ингибиторных единицах (ИЕ/мл). Активность ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) сыворотки крови определяли по кинетике гидролиза фурилакрилоилфенилаланилглицилглицина (FAPGG, Sigma, США) в мкмоль/мин·л [Голиков П.П. и др., 1998]. Содержание альбумина в моче определяли с помощью наборов фирмы «RANDOX» (Великобритания), уровень гликозилированного гемоглобина - с помощью наборов фирмы «Биомед» (Россия).

Статистический анализ был проведен с применением программ STATISTICA 5.0, Microsoft Excel-97. При отклонении распределения от нормального использовали непараметрический критерий Манна-Уитней. В работе также использовали корреляционный, регрессионный и дисперсионный методы анализа. Определяли диагностическую ценность изучения активности АПФ и α_1 -ПИ при развитии диабетической нефропатии [Флетчер Р. и др., 1998].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

К основным показателям ККС и РАС плазмы крови относятся КК, его предшественник ККГ, АПФ, α_1 -ПИ и α_2 -МГ. Калликреин является мощным вазодилататором, АПФ способствует сужению просвета сосудов, α_1 -ПИ и α_2 -МГ контролируют активность ферментов протеолиза. Показатели практически здоровых детей представлены в табл.2, различий между показателями лиц женского и мужского пола не выявлено. В дальнейшем дети объединены в общую группу.

Активность протеиназ и ингибиторов плазмы крови здоровых детей ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Здоровые дети		
	Общая группа, n=32	Мальчики, n=23	Девочки, n=9
Калликреин, мЕ/мл	62,1±6,4	60,8±8,6 p1>0,05	65,8±10,0 p1>0,05 p2>0,05
Калликреиноген, мЕ/мл	373,2±22,6	358,2±19,6 p1>0,05	383,2±28,6 p1>0,05 p2>0,05
Ангиотензин- превращающий фермент, мкмоль/мин·л	33,2±2,5	34,2±3,3 p1>0,05	31,5±3,6 p1>0,05 p2>0,05
α_1 -Протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	29,5±1,8	28,0±2,2 p1>0,05	30,0±2,5 p1>0,05 p2>0,05
α_2 -Макроглобулин, ИЕ/мл	5,1±0,5	5,2±0,3 p1>0,05	4,9±0,9 p1>0,05 p2>0,05

Примечание:

p1 – достоверность различий показателей по сравнению с общей группой здоровых детей;

p2 – достоверность различий показателей по сравнению с мальчиками.

При СД 1 типа у детей наблюдается увеличение активности КК плазмы крови на фоне снижения активности его предшественника – ККГ. В дебюте СД 1 типа активация КК более выражена. Повышенная активность КК сохраняется у больных без осложнений заболевания (рис. 1).

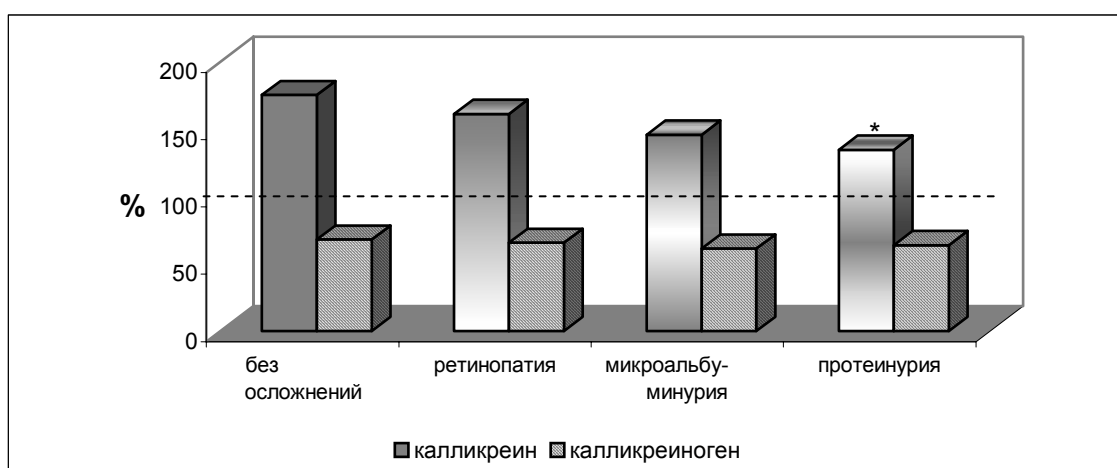


Рис.1. Активность калликреина и калликреиногена плазмы крови больных сахарным диабетом 1 типа при сосудистых осложнениях (за 100% приняты показатели здоровых детей)

* - достоверность различий по сравнению с группой детей без осложнений ($p < 0,05$)

С развитием ретинопатии и нефропатии на стадии микроальбуминурии (МАУ) и протеинурии активность КК и ККГ снижается, но остается выше показателей здоровых детей. Снижение активности КК и ККГ, наблюдаемое с увеличением длительности заболевания и развитием сосудистых осложнений, приводит к истощению кининовой системы [Суровкина М.П., 1995].

Ангиотензин-превращающий фермент является важным гемодинамическим фактором, способствующим поддержанию артериального давления [Fujisawa T. et al., 1998; Дедов И.И., 1999; Чистяков Д.А. и др., 2000; Елисеева Ю.Е., 2001]. Активность АПФ сыворотки крови в общей группе больных СД 1 типа практически не отличается от показателей здоровых детей. Установлено, что у 51% детей активность АПФ не выходит за пределы референтных значений, у 25% - при СД 1 типа обнаружено увеличение активности АПФ до 80 мкмоль/мин·л, а 24%- имеют низкие показатели ($18,3 \pm 2,3$) (при норме от 20-50 мкмоль/мин·л). У больных без осложнений и с диабетической ретинопатией активность АПФ не изменяется по сравнению со здоровыми детьми. Повышение активности фермента обнаружено при развитии нефропатии на стадии микроальбуминурии и протеинурии (рис. 2).

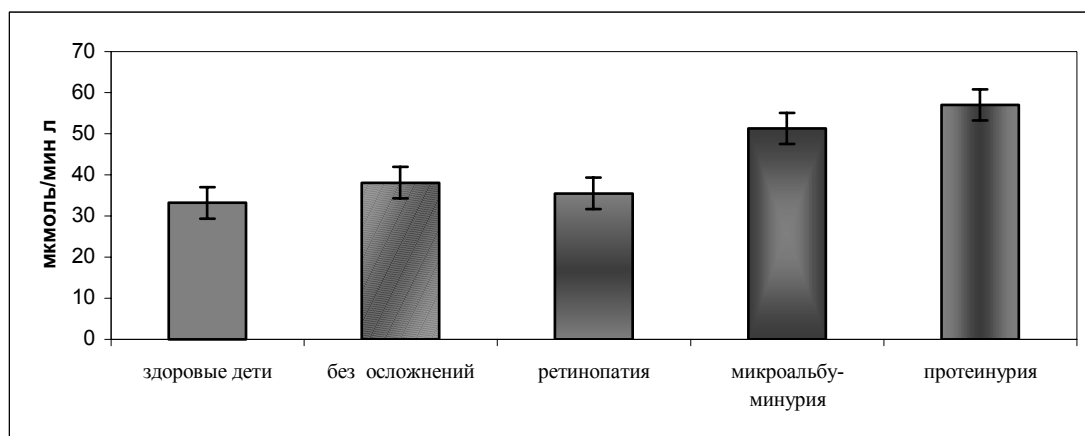


Рис. 2. Активность ангиотензин-превращающего фермента сыворотки крови больных при сосудистых осложнениях сахарного диабета 1 типа

Активность АПФ сыворотки крови также повышена у больных с неудовлетворительной компенсацией диабета (до $43,8 \pm 2,6$ мкмоль/мин·л при содержании HbA_{1c} более 15%). Данный факт подтверждает роль гипергликемии в развитии дисбаланса между вазоактивными факторами [Шестакова М.В., 1997, 2001, 2002; Mc Lennan S.V. et al., 2002; Микаелян Н.П. и др., 2002].

При исследовании активности АПФ у 12 больных с диабетической нефропатией на фоне применения эналаприла отмечено снижение активности фермента. Однако у трех из них наблюдается прогрессирование заболевания с увеличением содержания альбумина в моче. При этом активность АПФ сыворотки крови этой группы больных до лечения эналаприлом была невысокой и не превышала нормальных значений (не более 50 мкмоль/мин·л). Следовательно, применение ингибиторов при диабетической нефропатии эффективно при высокой активности АПФ. Установлена взаимосвязь ККС и РАС при диабетической нефропатии у детей. Показано, что отношение активности КК к АПФ сыворотки крови является одним из критериев оценки степени тяжести больного.

Таким образом, нарушение баланса между вазоактивными факторами сопровождает все этапы развития СД 1 типа. В дебюте и в первые годы заболевания происходит активация ККС, в более поздние периоды на первый план выступает повышение активности АПФ. Коэффициент КК/АПФ характеризует нарушение баланса между РАС и ККС в ранние и отдаленные сроки заболевания, а также при осложнениях СД 1 типа.

В регуляции протеолиза принимают участие также специфические белки-ингибиторы. α_1 -ПИ связывает до 90% всех сериновых протеиназ плазмы крови человека. α_2 -МГ обладает высоким сродством к калликреину и трипсину [Проценко А.В. 1984; Котова Т.С. и др., 1986]. Известно, что увеличение активности α_2 -МГ наблюдается при сахарном диабете 2 типа [Веремеенко К.Н. и др., 1969; Яровая Г.А. и др. 1994], при этом активность α_1 -ПИ находится в пределах нормы или снижена [Карнаух В.И., 1989; Bristow C.L. et al., 1996].

В результате наших исследований установлено снижение активности α_1 -ПИ плазмы крови больных СД 1 типа. С увеличением длительности заболевания и при развитии ретинопатии и нефропатии (на стадиях микроальбуминурии и протеинурии) наблюдается снижение активности α_1 -ПИ и α_2 -МГ (рис.3).

Исследование связи активности ингибиторов протеолиза и степени компенсации СД 1 типа показывает, что самая низкая активность α_1 -ПИ и α_2 -МГ обнаружена при содержании HbA_{1c} более 15%. Дефицит ингибиторов, вероятно, приобретенного характера, усиливает неконтролируемый протеолиз, создает дополнительные условия для развития микроангиопатий.

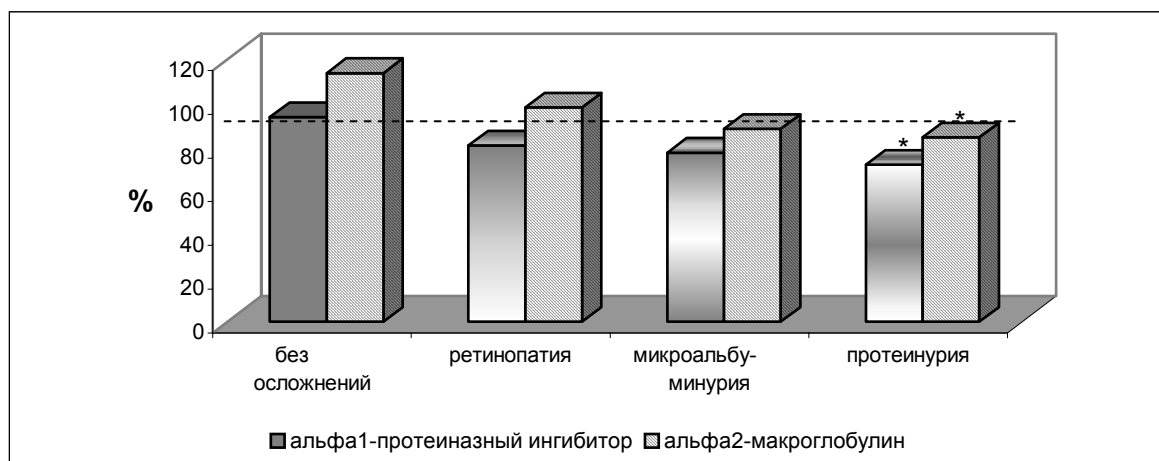


Рис. 3. Активность α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина больных сахарным диабетом 1 типа при сосудистых осложнениях сахарного диабета 1 типа (за 100% приняты показатели здоровых детей)

* - достоверность различий по сравнению с группой детей без осложнений ($p < 0,05$)

Для решения вопроса о вкладе генетических факторов в нарушения состояния систем протеолиза исследовано значение I/D полиморфизма гена ACE и T174M рестрикционного полиморфизма гена AGT. Изучение роли этих генетических маркеров является перспективным для оценки предрасположенности к нарушению функции почек при СД 1 типа. Установлено, что имеется ассоциация D аллеля гена ACE с развитием нефропатии у детей с СД 1 типа [Кондратьев Я.Ю. 1998; Barnas U. et al., 1997; Freire M.V. et al., 1998; Чистяков Д.А и др., 1999; Кондратьева Е.И., 2001]. Выраженность нарушений липидного обмена больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями и при сахарном диабете также зависит от I/D полиморфизма гена ACE [Степанов В.А. и др., 1998; Кондратьева Е.И. и др., 2000].

Учитывая связь АПФ с другими показателями протеолиза, также была исследована их зависимость от I/D полиморфизма гена ACE. Высокая активность АПФ обнаружена у больных с DD генотипом в общей группе по сравнению с II генотипом ACE.

Наличие M аллеля T174M рестрикционного полиморфизма гена AGT многие авторы относят к факторам быстрого прогрессирования гипертензии при сахарном диабете 2 типа [Tarnow L. et al., 2000; Шестакова М.В. и др., 2002]. T174M рестрикционный полиморфизм гена AGT изучен у 61 больного СД 1 типа. Связи этого гена с активностью показателей протеолиза не выявлено, что, возможно, обусловлено низкой встречаемостью генотипа MM в популяции (в нашем исследовании – 1 ребенок) и редким повышением артериального давления у детей при СД 1 типа. Непостоянное

повышение артериального давления наблюдается у 11 детей из 119 больных (9%). Эти пациенты составляют группу больных с ДН на стадии протеинурии.

Значительный интерес представляют результаты изучения активности ферментов кининогенолиза, АПФ, α_1 -ПИ и α_2 -МГ у больных с II, ID и DD генотипами ACE при развитии диабетической нефропатии. На ранних этапах заболевания в отсутствие клинических признаков патологии почек выявлена тенденция к повышению активности АПФ у больных с генотипом DD. Диабетическая нефропатия характеризуется повышением активности фермента у больных СД 1 типа не только при наличии DD, но и у детей с ID генотипом ACE. Кроме того, у детей с DD генотипом наблюдается значимое снижение активности КК, ККГ и α_1 -ПИ. Полученные данные свидетельствуют о существенном влиянии D аллеля гена ACE на повышение активности АПФ и развитие сосудистых осложнений при СД 1 типа.

В результате регрессионного анализа установлено отсутствие связи АПФ с другими показателями протеолиза в общей группе больных. Однако при нефропатии появляется значимая отрицательная связь между активностью АПФ и α_1 -ПИ ($r=-0,6$, $p<0,01$). Вклад показателей протеолиза в развитие нефропатии составляет 48%, в отличие от общей группы больных, где на долю показателей протеолиза приходится лишь 2%. Эти результаты позволяют выделить АПФ и α_1 -ПИ в качестве существенных критериев прогрессирования патологии почек при СД 1 типа у детей.

Цель дисперсионного анализа заключается в изучении влияния основных факторов развития сахарного диабета и его осложнений, таких как I/D полиморфизм гена ACE, T174M рестрикционный полиморфизм гена AGT, компенсация заболевания, потребность в инсулине на показатели протеолиза. Установлено, что активность КК зависит от длительности заболевания и потребности в инсулине. Активность α_1 -ПИ, согласно полученным данным, связана с уровнем гликозилированного гемоглобина и может быть использована как дополнительный критерий компенсации сахарного диабета. Активность АПФ в большей степени чем другие показатели связана с наличием сосудистых осложнений.

Таким образом, при изучении показателей протеолиза при СД 1 типа выявлено, что КК является пусковым фактором развития дисбаланса протеолитических систем. Большое значение имеют длительность заболевания, наличие осложнений, степень

компенсации диабета. Прогрессирование заболевания и развитие сосудистых осложнений сопровождается более выраженными нарушениями в системах протеолиза.

Регуляция протеолитических процессов при СД 1 типа исследована недостаточно. Известно, что инсулин *in vivo* способен увеличивать просвет сосудов [Sobrevia L. et al., 1997; Nahser P.J. et al., 1995], однако механизм этого действия не изучен. Влияние глюкозы на протеолитические процессы также не известно. При добавлении к плазме крови здоровых детей инсулина, глюкозы и каптоприла в условиях *in vitro* достоверных изменений активности изучаемых показателей не обнаружено. Добавление глюкозы в дозах от 2,0 до 15,0 ммоль/л к плазме крови больных приводит к повышению активности КК и АПФ. Инсулин в концентрации от 7,5 до 30,0 мкЕд/мл оказывает значимое влияние на повышение активности α_1 -ПИ и АПФ плазмы крови больных СД 1 типа. Каптоприл в дозе 0,075 мкг/мл ингибирует активность АПФ, обладает стимулирующим действием на α_1 -ПИ и α_2 -МГ. По результатам однофакторного дисперсионного анализа представлена схема влияния инсулина, глюкозы и каптоприла на ферменты и ингибиторы протеолиза в условиях *in vitro* (рис. 4).

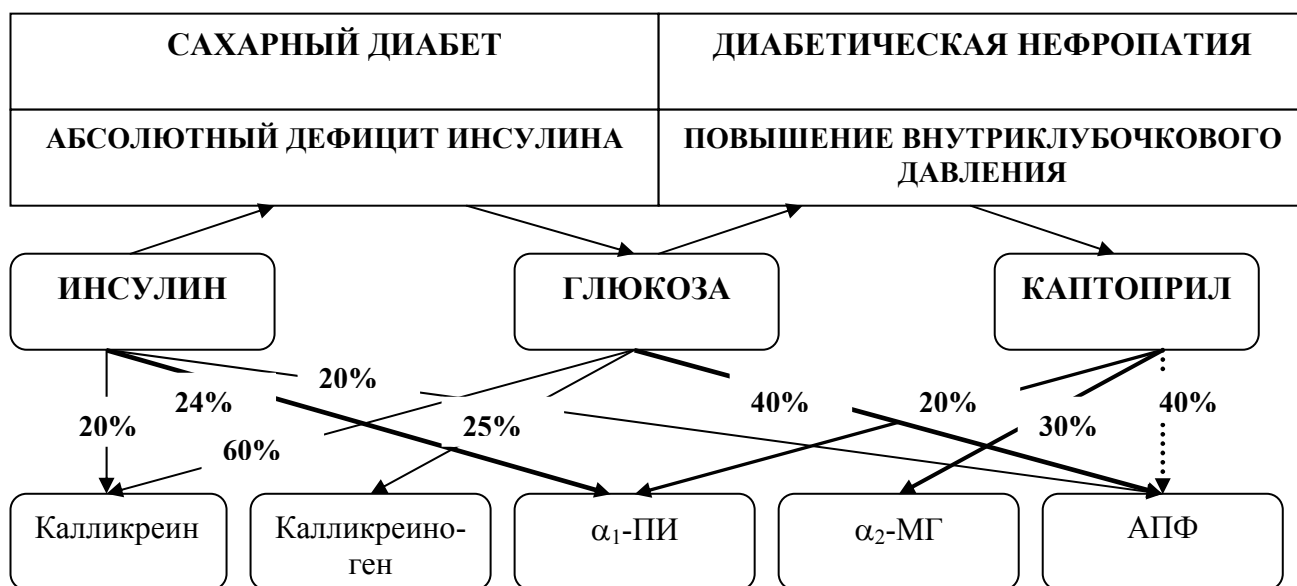


Рис. 4. Влияние инсулина, глюкозы и каптоприла на активность калликреина, ангиотензин-превращающего фермента и ингибиторов протеолиза в условиях *in vitro*

Примечание: — повышение активности, снижение активности

Очевидно, глюкоза является одним из важных факторов дисбаланса протеолитических систем при СД 1 типа. Инсулин и каптоприл в основном воздействуют на регуляторное звено протеолиза. В связи с этим становятся понятными их новые функции при лечении диабетической нефропатии: усиление контроля протеолиза, предупреждение сосудистых осложнений.

Проблема прогнозирования сосудистых осложнений СД 1 типа у детей тесно связана не только с поиском новых методов диагностики, но и с оценкой их эффективности. Определение диагностической ценности показателей протеолиза в характеристике СД 1 типа и диабетической нефропатии (ДН) позволяет сделать вывод о целесообразности их применения в клинической практике. Чувствительность методов определения активности АПФ и α_1 -ПИ при развитии нефропатии составила 65%. Следует отметить высокую прогностичность отрицательного результата для обоих методов (89% и 86%, соответственно). Дефицит α_1 -протеиназного ингибитора плазмы крови имеет значение для выявления предрасположенности к активации протеолиза и развитию необратимых изменений, связанных с ДН. Изучение чувствительности и прогностичности дают возможность использовать изучаемые показатели для формирования групп риска развития нефропатии.

Результаты исследования включены в схему патогенеза диабетической нефропатии с участием ККС и РАС (рис. 5).



Рис. 5. Роль калликреин-кининовой и ренин-ангиотензиновой систем в патогенезе диабетической нефропатии

Мы полагаем, что увеличение активности КК происходит на ранних этапах развития сахарного диабета. Известно, что под влиянием гипергликемии тонус

приносящей артериолы почечного клубочка снижается, она «зияет» [Шестакова М.В., 2000], а стимуляция ККС приводит к еще большему расширению ее просвета. Это способствует усилению образования первичной мочи и полиурии (1 и 2 стадии диабетической нефропатии по С. Mogensen). В более поздние сроки заболевания с развитием нефропатии (стадии микроальбуминурии и протеинурии) повышается активность АПФ сыворотки крови, накапливается ангиотензин II, в результате чего происходит сужение выносящего почечного сосуда [Bader M., 2001; Дедов И.И., 2002;]. На этом же этапе наблюдается угнетение ККС на фоне выраженного дефицита ингибиторов протеолиза. Дисбаланс вазоактивных факторов, приводящий к изменению тонуса выносящей и приносящей артериол почечного клубочка и повышению внутриклубочкового давления, ускоряет развитие диабетической нефропатии у детей.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что ККС и РАС участвуют в развитии диабетической нефропатии при сахарном диабете 1 типа у детей. При впервые выявленном диабете обнаружена высокая активность калликреина плазмы крови, который играет ключевую роль в нарушении состояния протеолиза. С увеличением длительности заболевания и при развитии сосудистых осложнений активность калликреина снижается, но возрастает активность ангиотензин-превращающего фермента сыворотки крови больных. Существенные нарушения в системе протеолиза выявлены при диабетической нефропатии. При увеличении уровня HbA_{1c} более 15% отмечается наиболее высокая активность ангиотензин-превращающего фермента. Коэффициент КК/АПФ, характеризующий преобладание ККС или РАС на разных этапах заболевания, может быть использован в клинической практике для прогнозирования течения заболевания. Применение эналаприла в лечении больных с нефропатией способствует снижению активности АПФ сыворотки крови. Активность ингибиторов протеолиза значительно связана с уровнем гликозилированного гемоглобина. При увеличении длительности заболевания и при сосудистых осложнениях снижается активность α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина плазмы крови больных СД 1 типа, контролирующих активацию протеолиза.

На основании данных регрессионного анализа активность ангиотензин-превращающего фермента и α_1 -протеиназного ингибитора является наиболее ранним признаком развития нефропатии при сахарном диабете 1 типа. Определение этих

показателей позволяет прогнозировать развитие осложнения еще при отсутствии клинических признаков патологии почек.

При изучении влияния генетических факторов на основные показатели протеолиза выявлена зависимость активности ангиотензин-превращающего фермента от I/D полиморфизма гена ACE. Больные с DD генотипом ACE характеризуются низкой активностью калликреина и ингибиторов протеолиза при нефропатии.

Результаты экспериментального исследования в условиях *in vitro* позволяют выделить глюкозу в качестве основного фактора развития дисбаланса протеолитических систем при сахарном диабете. Инсулин и каптоприл имеют значительное влияние на регуляцию процессов протеолиза при СД 1 типа.

ВЫВОДЫ

1. При сахарном диабете 1 типа происходит увеличение активности калликреина на фоне снижения активности калликреиногена, что приводит к активации систем протеолиза плазмы крови. Декомпенсация заболевания характеризуется низкой активностью α_1 -протеиназного ингибитора плазмы крови. Развитие диабетической ретино- и нефропатии сопровождается угнетением активности калликреина и α_1 -протеиназного ингибитора.
2. Диабетическая нефропатия характеризуется увеличением активности ангиотензин-превращающего фермента и снижением отношения КК/АПФ, отражающем состояние систем протеолиза. Применение ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента у больных с диабетической нефропатией способствует снижению активности ангиотензин-превращающего фермента.
3. Активность ферментов и ингибиторов протеолиза плазмы крови больных сахарным диабетом 1 типа зависит от I/D полиморфизма гена ангиотензин-превращающего фермента. DD-генотип характеризуется высокой активностью ангиотензин-превращающего фермента.
4. Инсулин, глюкоза и каптоприл не влияют на показатели протеолиза плазмы крови здоровых детей в условиях *in vitro*. Добавление глюкозы к плазме крови больных сахарным диабетом 1 типа способствует увеличению активности калликреина и ангиотензин-превращающего фермента. Инсулин повышает активность α_1 -протеиназного ингибитора. Каптоприл снижает активность ангиотензин-

превращающего фермента и стимулирует ингибиторную активность плазмы крови больных в условиях *in vitro*.

5. Вклад показателей протеолиза в развитие диабетической нефропатии составляет 48%. Определение активности ангиотензин-превращающего фермента и α_1 -протеиназного ингибитора плазмы крови рекомендуются в качестве критериев риска развития нефропатии при сахарном диабете 1 типа у детей.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Роль калликреин-кининовой системы при осложнениях сахарного диабета 1 типа у детей // Сб. статей по материалам третьего конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке», Томск.- 2002.-С.98-99. (в соавт. с Дюковой Е.В., Савиных А.П., Лебедевой И.Ю.)
2. Прогностическое значение изменения активности ингибиторов протеолиза при развитии диабетической нефропатии у детей / Сб. статей по материалам второй научно-практической конференции педиатров «Здоровье детей – наше будущее».- Томск.- 2002.- С.113-114. (в соавт. с Савиных А.П., Лебедевой И.Ю.)
3. Нефропатия и ретинопатия при сахарном диабете 1 типа у детей // Тезисы докладов Второго российского диабетологического конгресса «Сахарный диабет и сердечно-сосудистые осложнения».- Москва.- 2002.- С.270. (в соавт. с Кондратьевой Е.И., Пузыревым В.П., Кравец Е.Б., Косянковой.В., Тарасенко Н.В., Вагановой Т.В.)
4. Ферменты и ингибиторы протеолиза при сосудистых осложнениях сахарного диабета 1 типа у детей // Материалы межрегиональной конференции молодых исследователей.- Самара.- 2002.- С.160-161.
5. Генетический анализ факторов риска развития сахарного диабета 1 типа и его осложнений // Материалы II научной конференции с международным участием «Эндокринная регуляция физиологических функций в норме и при патологии», посвященной 80-летию со дня рождения М.Г. Колпакова.- Новосибирск.- 2002.- С.70. (в соавт. с Кондратьевой Е.И., Пузыревым В.П., Кравец Е.Б., Косянковой Т.В., Тарасенко Н.В., Вагановой Т.В.)
6. Состояние протеолиза при диабетической нефропатии у детей // Материалы региональной конференции «Сахарный диабет и сердечно-сосудистая патология».- Томск.- 2002.- С.68-69. (в соавт. с Сухановой Г.А., Кондратьевой Е.И.)

7. Активность ангиотензин-превращающего фермента и калликреина при сахарном диабете 1 типа у детей // Вопросы медицинской химии.-2002.- № 4.- С. 408. (в соавт. с Сухановой Г.А., Кондратьевой Е.И.)
8. Системы протеолиза при сосудистых осложнениях сахарного диабета 1 типа у детей // Материалы III научно-практической конференции «Санкт-Петербургский научный форум-2003».- Санкт-Петербург.- 2003.- С.90-91. (в соавт. с Жданкиной А.А., Овчинниковой А.П.)
9. Активность систем протеолиза и I/D полиморфизм гена ACE при сосудистых осложнениях сахарного диабета 1 типа у детей // Вестник РГМУ.- 2003.- №3 (28).- С.210. (в соавт. с Жданкиной А.А., Юрченко Е.В., Овчинниковой А.П.)
10. Влияние инсулина, глюкозы и каптоприла на состояние протеолиза при сахарном диабете 1 типа у детей // Вестник РГМУ.- 2003.- №3 (28).- С.166-167. (в соавт. с Жданкиной А.А.)
11. Влияние полиморфизма гена ACE на активность ферментов и ингибиторов протеолиза при сахарном диабете 1 типа у детей // тезисы Всероссийской научно-практической конференции «Клиническая эндокринология – достижения и перспективы, посвященная 80-летию со дня рождения проф. Д.Я. Шурыгина».- Санкт-Петербург.- 2003.- С.53-54. (в соавт. с Кондратьевой Е.И., Сухановой Г.А., Юрченко Е.В.)
12. Диагностическая ценность определения активности ангиотензин-превращающего фермента, α_1 -протеиназного ингибитора и микроальбуминурии при диабетической нефропатии у детей // Сб. статей по материалам четвертого конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке».- Томск.- 2003.- С.179-180. (в соавт. с Жданкиной А.А.)
13. Влияние инсулина, глюкозы и каптоприла на активность калликреина и ангиотензин-превращающего фермента при сахарном диабете 1 типа у детей // Сб. статей по материалам четвертого конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке».- Томск.- 2003.- С.152-153. (в соавт. с Жданкиной А.А.)
14. Роль глюкозы, инсулина, каптоприла в регуляции протеолитических ферментов при сахарном диабете 1 типа у детей // Материалы IV международной научно-практической конференции «Здоровье и образование в XXI веке».- Москва.- 2003.- С. 236-237. (в соавт. с Жданкиной А.А.)

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АПФ – ангиотензин-превращающий фермент
АТ II – ангиотензин II
ДН - диабетическая нефропатия
ДР - диабетическая ретинопатия
КК – калликреин
ККГ – калликреиноген
 α_2 -МГ - α_2 -макроглобулин
МАУ - микроальбуминурия
ККС – калликреин-кининовая система
РАС – ренин-ангиотензиновая система
 α_1 -ПИ - α_1 -протеиназный ингибитор
СД 1 – сахарный диабет 1 типа
АСЕ – ген ангиотензин-превращающего фермента
AGT – ген ангиотензиногена
HbA_{1c} – гликозилированный гемоглобин

Отпечано: Копировальный центр «Вайар»
Подписано в печать 03.11.2003 г.
Заказ № 040 Тираж 100 экз.