

Оксид азота при поражении почек у детей с инсулинзависимым сахарным диабетом

**Е.В. Мелехина, И.М. Османов, Е.В. Неудахин, В.А. Таболин,
И.Э. Волков, И.А. Сумакова, В.В. Длин**
РГМУ кафедра детских болезней № 2

Ключевые слова: инсулинозависимый сахарный диабет, диабетическая нефропатия, циклический гуанозинмонофосфат, оксалатно-кальциевая кристаллурия.

Известно, что одним из наиболее тяжелых поздних осложнений инсулинзависимого сахарного диабета (ИЗСД) является диабетическая нефропатия (ДНП). По данным Эндокринологического научного центра РАМН у 30–40% больных, страдающих ИЗСД на протяжении 25–30 лет, развиваются различные стадии ДНП [3]. Среди детей и подростков, страдающих диабетом более 5 лет, начальная стадия ДНП выявляется у каждого десятого больного [4, 10].

Поражение органов мочевой системы при ИЗСД у детей встречается с частотой от 17,5% до 50% [4, 7]. Условно все заболевания почек при этом можно разделить на специфические и неспецифические. В структуре неспецифических поражений почек у детей с ИЗСД наиболее часто встречаются пиелонефрит (15,2%), дисметаболическая нефропатия (10,1%), нейрогенная дисфункция мочевого пузыря (6,7%) [7]. Установлено, что поражения почек при ИЗСД непосредственно связаны с длительностью заболевания [1, 2, 11, 12, 15]. Так, морфологические и функциональные изменения в почечной ткани при манифестном (длительность менее 1 года) диабете вызваны токсическим действием глюкозы, кетоновых тел, различных цитокинов на эпителий проксимальных канальцев, эндотелий капилляров клубочков и интерстициальную ткань почек. Клинически это проявляется в увеличении скорости клубочковой фильтрации (СКФ), микроальбуминурией (МАУ) транзиторного характера, оксалатной и фосфатно-кальциевой кристаллурией.

Различные исследования показали, что сахарный диабет сопровождается дисфункцией эндотелия сосудов, что приводит к нарушению адекватного синтеза вазодилататоров. Наряду со снижением концентрации вазодилататоров отмечается достоверное увеличение вазоконстрикторов и прокоагулянтов [1, 3, 8]. В настоящее время установлено, что нарушение функции сосудистого эндотелия связаны с изменением содержания эндотелинов, фактора Виллебранда, тканевого активатора плазминогена и оксида азота (NO) [14, 16, 17, 21, 22]. Особую важность представляют исследования роли NO, который американский журнал «Science» в 1992 году провозгласил «молекулой года», что в свою очередь стимулировало появление огромного количества исследований, касающихся роли NO в биологических процессах и развитии различных патологических состояний.

Установлено, что NO в организме эукариот образуется из L-аргинина под действием синтетазы NO

(NOS) с образованием L-цитруллина. На современном этапе выделяют две основные формы NOS по способу их активации: конститутивная (или эндотелиальная, э-NOS) и индуцибельная (и-NOS). Эндотелиальная NOS способствует образованию небольших количеств NO, который участвует в регуляции тонуса сосудистой стенки в нормальных условиях жизнедеятельности организма. Индуцибельная NOS локализована преимущественно в макрофагах и активируется цитокинами при патологических процессах, что сопровождается наработкой больших количеств NO.

Регуляторный вазодилатирующий эффект NO связан с активацией растворимой гуанилатциклазы по гемзависимому механизму и увеличением концентрации циклического гуанозин монофосфата (цГМФ). Накапливающийся цГМФ активирует цГМФ-зависимую протеинкиназу, а также Ca^{2+} -АТФазу, которая в свою очередь участвует в дефосфорилировании легких цепей миозина, что приводит к выходу Ca^{2+} из мышечных клеток, гиперполяризации наружной мембраны клеток и в конечном итоге – к вазодилатации [6, 9].

Отмечено изменение продукции оксида азота в зависимости от длительности течения сахарного диабета. На начальных этапах он участвует в клеточном эффекторном механизме аутоиммунного лизиса β -клеток поджелудочной железы, выступая как повреждающий агент [13]. Накопление NO в этом периоде происходит за счет активации и-NOS. Результатом является возникновение гиперперфузии почек и установление высокого градиента внутриклубочкового гидростатического давления (внутриклубочковой гипертензии), что сопровождается выраженным повышением СКФ (гиперфильтрацией) на ранних стадиях ИЗСД и в начальной (микроальбуминурической) стадии ДНП [3, 5, 8, 12, 19, 20]. Однако ряд других исследователей доказывает, что с течением диабета происходит истощение продукции NO в результате накопления продуктов конечной гликолиза. Последние способны подавлять активность не только и-NOS, но и э-NOS [2, 11, 15, 16].

До настоящего времени нет четких критериев-маркеров раннего поражения почечной ткани у детей при ИЗСД, которые позволили бы диагностировать ДНП на самой ранней стадии, еще до ее клинической манифестации. С этой целью нами было изучено содержание цГМФ в плазме и суточной моче (косвенно отражающие активность системы NO в организме) при различной почечной патологии у детей с ИЗСД.

Характеристика обследованных детей и методы исследования

Нами обследовано 88 детей (43 девочки, 45 мальчиков). В основную группу было включено 67 детей (30 девочек, 37 мальчиков), страдающих ИЗСД. Группу сравнения составили 19 детей с оксалатно-кальциевой кристаллурией, наблюдавшихся в отделении нефрологии по поводу дисметаболической нефропатии (ДН) (13 де-вочек и 8 мальчиков). Основная группа и группа сравнения были сопоставимы по возрасту (средний возраст 10,7 лет).

Все дети с ИЗСД были разделены на следующие группы. В I группу вошли 29 детей, у которых ни в анамнезе, ни на момент исследования каких-либо изменений в анализах мочи зафиксировано не было. Во II группу – 31 ребенок, у которых на момент обследования наблюдалась оксалатно-фосфатно-кальциевая кристаллурия. Группу III составили 28 детей с диабетической нефропатией в стадии микроальбуминурии (МАУ). Диагноз диабетической нефропатии ставился при обнаружении экскреции альбумина с мочой более 300 мг в сутки как минимум в двух анализах, проведенных в течение 1 недели. Группы были сопоставимы по длительности течения ИЗСД ($4,7 \pm 1,5$ лет), уровню гликозилированного гемоглобина (HbA1c) (в среднем $10,67 \pm 0,2\%$), суточной дозе инсулина ($0,93 \pm 0,12$ ЕД/кг/сут).

Анализ частоты поздних осложнений ИЗСД показал, что ангиопатия сетчатки была выявлена у троих детей группы 1 (9,6%) и группы 2 (10,3%), а также у 6 детей из группы 3 (21%). У троих из них ангиопатия сочеталась с диабетической катарактой (10,5%). Полинейропатия наблюдалась у 2 детей из I-й группы (6,8%) и у 5 детей с МАУ (17,8%). Хейроартропатия была выявлена у 3 детей без патологии почек (9,6%) и у 8 детей ДНП (27,5%). Другие осложнения, такие как некробиоз голеней и стоп, синдром Мориака, встречались лишь у детей с диабетической нефропатией (10% и 17,8%, соответственно).

У всех детей, больных сахарным диабетом, среди сопутствующей патологии следует отметить преобладание заболеваний желудочно-кишечного тракта (дискинезия желчевыводящих путей, хронический гастродуоденит), аутоиммунного тиреоидита Хашимото, а также высокую частоту вегетососудистой дистонии и патологии лимфоглоточного кольца.

В качестве группы сравнения были отобраны 19 детей, наблюдавшихся в отделении нефрологии по поводу дисметаболической нефропатии. Критериями отбора детей являлись: отсутствие в анамнезе указаний на иммунно-воспалительные и наследственные заболевания почек, исключение микробно-воспалительных заболеваний почек и мочевыводящих путей на момент исследования, увеличение экскреции с мочой уратов, фосфатов и оксалатов Са, а также наличие оксалатно-фосфатно-кальциевой кристаллурии.

Исследования проводились на базе отделений диабетологии и нефрологии Российской детской клинической больницы, а также отделения нефрологии Московского НИИ педиатрии и детской хирургии МЗ РФ.

Помимо общеклинических методов для оценки тяжести заболевания детей использовались следующие специальные методы: уровень HbA1c, динамика средне-суточной гликемии, определение кетоновых тел в моче, базальная экскреция С-пептида, суточная экскреция альбуминов с мочой методом лазерной нефлометрии на анализаторе «Beckman». Оценка функционального состояния почек проводилась по пробе Зимницкого, клиренсу эндогенного креатинина за 3 часа. Всем детям проводилось ультразвуковое исследование почек.

Ввиду того, что прямое измерение содержания NO фактически невозможно из-за быстрой конверсии этого радикала в нитраты и нитриты под действием активного O_2 , продукцию NO оценивали косвенным методом по накоплению циклического гуанозин монофосфата (цГМФ) в плазме и суточной моче методом иммуноферментного анализа.

Уровень цГМФ плазмы был измерен у 16 детей из группы сравнения, 15 детей I группы, 10 детей из II группы и 10 детей с ДНП. Уровень цГМФ в суточной моче был определен у всех обследованных нами детей.

Результаты

Результаты исследования уровня цГМФ (косвенно отражающего активность системы NO) в плазме крови и суточной моче у детей с ДН и поражением почек при ИЗСД представлены в табл. 1. По литературным данным, содержание цГМФ в плазме здоровых людей составляет 3,0–7,5 рМ/мл, в моче – 200–450 нМ/л.

Как видно из представленной таблицы, при дисметаболических нефропатиях у детей без ИЗСД характерен нормальный уровень цГМФ (отражающий активность системы NO) в крови и повышение его в суточной моче. Возможно, это связано с повышением продукции NO *in situ* за счет активации и-NOS в результате асептического воспаления интерстициальной ткани.

В группе детей с ИЗСД наблюдались несколько повышенные значения плазменного уровня цГМФ (чуть выше верхней границы нормы) по сравнению с детьми без диабета ($p < 0,01$). Эти результаты согласуются с имеющимися в литературе данными [3, 5, 8, 13] об увеличении активности системы оксида азота при развитии сахарного диабета I-го типа. Установлено, что стимуляция и-NOS цитокинами при ИЗСД способствует образованию больших количеств NO, который принимает участие в аутоиммунном лизисе β -клеток островков Лангерганса. В то же время, статистический анализ не выявил достоверных различий уровня цГМФ в плазме крови у детей с ДНП, по сравнению с детьми, страдающими ИЗСД, но без признаков ДНП.

Таблица 1

Уровень цГМФ в плазме и моче у детей с ДН и поражением почек при ИЗСД

Показатели	СКФ, мл/мин на 1,73 м ² поверхности тела		Уровень в плазме цГМФ, нМ/л		Уровень цГМФ в суточной моче, рМ/мл	
	n	M ± m	n	M ± m	n	M ± m
Группы						
Группа сравнения	9	105,31 ± 13,61	16	5,81 ± 0,37	21	755,81 ± 53,23
I группа	32	93,92 ± 4,66	15	8,47 ± 0,61	32	548,5 ± 26,09
II группа	36	107,24 ± 6,57	10	7,63 ± 0,85	36	477,39 ± 33,32
III группа	38	109,1 ± 5,46	10	8,1 ± 0,98	38	317 ± 28,7

Уровни цГМФ в суточной моче достоверно различались среди детей, страдающих диабетом. Так, у детей 1-й и 2-й группы уровень цГМФ в моче колебался в пределах нормы. Однако у детей с диабетической нефропатией он был достоверно низкий ($p < 0,001$). Возможно, уровень экскреции цГМФ в суточной моче отражает угнетение ферментных систем синтеза NO, гуанилатциклазы и фосфодиэстеразы-цГМФ под действием конечных продуктов гликолиза. Данный механизм может лежать в основе развития сначала функциональных, а потом и структурных изменений, приводящих к развитию микроангиопатии почек.

В группе сравнения детей средние значения цГМФ в суточной моче были достоверно выше, чем в группах детей с ИЗСД ($p < 0,001$).

Как показано в табл. 2, распределение уровней цГМФ в плазме и в суточной моче относительно нормальных значений в группе детей с ДНП (III группа) достоверно отличалось не только от группы сравнения ($p < 0,01$), но и от других детей с ИЗСД ($p < 0,01$).

Так, у детей с поражением почек при ИЗСД зарегистрирован достоверно более высокий уровень цГМФ в плазме крови ($p < 0,05$) и значительно более низкие значения суточной экскреции цГМФ в суточной моче ($p < 0,001$), чем в группе сравнения. Дети с ДНП в стадии микроальбуминурии имеют наиболее низкие значения цГМФ в суточной моче относительно других групп детей ($p < 0,001$). Такая разнонаправленность изменения уровней цГМФ в плазме крови и суточной моче может быть объяснена различными источниками NO в организме. Концентрация цГМФ в плазме крови определяется огромным количеством факторов (состояние симпатико-адреналовой системы, хронические очаги инфекции, течение аутоиммунных процессов, вегетативной реактивностью организма), исключить которые в нашем исследовании не представлялось возможным. В связи с этим достоверность различий среди выделенных групп по уровню цГМФ в плазме крови была ниже, чем достоверность различий, определяемая по

уровню суточной экскреции цГМФ с мочой. Уровень же суточной экскреции цГМФ с мочой дает возможность судить о состоянии системы NO в почечной ткани, где источником NO служит не только эндотелий сосудов, но и другие структурные элементы, такие как клубочковая капсула, сам клубочек, эпителиальные клетки канальцев и собирательных трубок, а также мезангиальные клетки. В этой связи исследование суточной экскреции цГМФ с мочой приобретает важное значение.

Для подтверждения патогенетической роли цГМФ в формировании ДНП нами было изучено его содержание в плазме крови и суточной моче у детей с поражением почек при ИЗСД в зависимости от длительности течения последнего и уровня гликозилированного гемоглобина (табл. 3).

Как видно в представленной таблице, с увеличением длительности ИЗСД и уровня гликозилированного гемоглобина (HbA1c) плазменный уровень цГМФ имеет тенденцию к нарастанию. Кроме того, среди детей, страдающих ИЗСД, наиболее высокие значения цГМФ наблюдались у детей I и II групп с манифестным диабетом ($p < 0,05$). С увеличением длительности ИЗСД и уровня HbA1c экскреция цГМФ с мочой снижалась.

Выявленное повышение уровней цГМФ в плазме и суточной моче в начальном периоде ИЗСД очевидно связано с активацией индуцибельной NOS и выработкой больших количеств NO, который вносит свой вклад в аутоиммунный лизис β -клеток островков Лангерганса и повреждение почечной ткани. Выявленное достоверное снижение значений цГМФ в суточной моче по мере увеличения длительности течения сахарного диабета, по-видимому, связано с нейтрализующим действием продуктов гликолиза (HbA1c) на систему NO. Данный процесс может лежать в основе развития поздних осложнений ИЗСД, таких как ДНП.

Заключение

Разработка новых клинико-лабораторных маркеров поражения почек у детей с ИЗСД, позволяющих выявлять диабетическую нефропатию на ранних стадиях и назначать патогенетическую терапию, продолжает оставаться одной из наиболее актуальных проблем в педиатрии и эндокринологии. В ходе проведенного нами исследования показано, что активность системы оксида азота изменяется не только в зависимости от длительности течения ИЗСД и степени метаболической компенсации, но и при различных вариантах патологии почек. Уровень цГМФ в плазме крови (косвенно отражающего активность системы NO в организме) повышен относительно нормальных значений в начальном периоде ИЗСД. После 1 года течения диабета, когда наблюдается относительная стабилизация метаболического контроля, значения цГМФ в крови несколько снижаются, хотя и не достигают нормальных значений. У детей с длительностью заболевания более 5 лет, у которых вы-

Распределение уровней цГМФ относительно нормальных значений по группам

Группы	Уровень цГМФ в плазме			Уровень цГМФ в суточной моче		
	Ниже нормы	Норма	Выше нормы	Ниже нормы	Норма	Выше нормы
Группа сравнения	0%	100%	0%	0%	0%	100%
I группа	0%	80%	20%	6%	47%	47%
II группа	10%	80%	10%	22%	42%	36%
III группа	0%	60%	40%	61%	29%	11%

Плазменные уровни цГМФ и HbA1c в зависимости от длительности течения ИЗСД

Длительность течения ИЗСД в годах	HbA1c, %		Уровень цГМФ в плазме, pM/мл		Уровень цГМФ в суточной моче, нмоль/л	
	n	M \pm m	n	M \pm m	n	M \pm m
Дети без ИЗСД	23	7,05 \pm 0,56	16	5,81 \pm 0,37	23	720,09 \pm 55,48
Менее 1 года	14	9,35 \pm 0,68	5	8,5 \pm 1,59	14	574,29 \pm 47,67
От 2 до 5 лет	54	10,81 \pm 0,25	15	8,2 \pm 0,6	54	450,29 \pm 27,53
От 6 до 10 лет	36	11,03 \pm 0,57	15	9,82 \pm 0,69	36	372,85 \pm 8,8

являются поздние осложнения ИЗСД, уровень цГМФ в плазме наиболее высокий. Суточная экскреция цГМФ с мочой с увеличением длительности течения ИЗСД претерпевает обратные изменения относительно плазменного уровня цГМФ. Такие различия в изменении уровней цГМФ в плазме крови и суточной моче могут быть объяснены различными источниками NO в организме. Изменения суточной экскреции цГМФ с мочой оказались более достоверными, чем изменения его уровня в плазме крови. Начальная (микроальбуминурическая) стадия ДНП у детей характеризуется снижением суточной экскреции цГМФ с мочой и незначительным повышением уровня цГМФ в плазме крови. Исследование уровня суточной экскреции цГМФ с мочой более информативно для ранней диагностики диабетической нефропатии у детей с ИЗСД, чем исследование цГМФ плазмы. Таким образом, полученные данные позволяют предполагать, что снижение суточной экскреции цГМФ с мочой (косвенно отражающей состояние системы NO в почечной ткани) можно рассматривать как маркер раннего поражения почечной ткани у детей с ИЗСД.

Литература

1. Балаболкин МИ, Клебанова ЕМ, Креминская ВМ. Патогенез ангиопатий при сахарном диабете // Сахарный диабет. 1999; 1: 2–8.
2. Вербовская НИ, Лебедева ЕА. Роль гликозилированных продуктов метаболизма в формировании сосудистых осложнений сахарного диабета // Проблемы эндокринологии. 1997; 43; 1: 43–45.
3. Дедов ИИ, Шестакова МВ. Диабетическая нефропатия. М., 2000.
4. Касаткина ЭП. Сахарный диабет у детей и подростков. М.: Медицина, 1996.
5. Климонтов ВВ, Куроедов АО. Эндотелиальный фактор релаксации у больных с сахарным диабетом. Новые методы диагностики, лечения заболеваний и управления в медицине: материалы научно-практической конференции ГОКБ, 12.03.99.
6. Марков ХМ. Окись азота в физиологии и патологии почек // Вестник РАМН. 1996; 7: 73–78.
7. Нежданова МВ, Качан МН, Самошкина ЕС. Состояние почек у детей, страдающих сахарным диабетом. Современные аспекты хирургической эндокринологии. Материалы 8-го российского симпозиума по хирургической эндокринологии. Саранск, 1997; 189–190.
8. Рагозин АК. Роль вазоактивных факторов эндотелия сосудов и тромбоцитов в развитии диабетической нефропатии у больных ИЗСД. Дисс. ... канд. мед. наук. М., 1999.
9. Северина ИС. Растворимая гуанилатциклаза в молекулярном механизме физиологических эффектов оксида азота // Биохимия. 1998; 62; 7: 929–947.
10. Сивоус ГИ, Касаткина ЭП, Соколовская ВН. Клинико-эпидемиологическая характеристика диабетической нефропатии у детей и подростков Москвы с ИЗСД // Проблемы эндокринологии. 1998; 44; 2: 3–6.
11. Amore A, Cirina P, Mitola S, Peruzzi L, Gianoglio B, Rabbone I, Sacchetti C, Cerutti F, Grillo C, Coppo R. Nonenzymatically glycosylated albumin (Amadori adducts) enhances nitric oxide synthase activity and gene expression in endothelial cells. *Kidney Int* 1997; 51(1): 27–35.
12. Choi K.C., Lee S.C., Kim S.W., Kim N.H., Lee J.U., Kang Y.J. Role of nitric oxide in the pathogenesis of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Intern Med* 1999; 14(1): 32–41.
13. Corbet J, McDaniel M. Does Nitric Oxide mediate autoimmune destruction of β -cells? *Diabetes* 1992; 41(1): 897–903.
14. Derubertis F.R., Craven P.A. Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes. Mechanisms and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Diabetes* 1994; 43(1): 1–8.
15. Feld L.G., Cachero S., Ellis E.N., Dedeoglu O., Ueda Y., Leonard C., Letizia R., Mallon V., Van Liew J.B. Resistance to glomerular injury in the diabetic biobreeding rat. *Exp Physiol* 1995; 80(6): 991–1000.
16. Kawagishi T., Matsuyoshi M., Emoto M., Taniwaki H., Kanda H., Okuno Y., Inaba M., Ishimura E., Nishizawa Y., Morii H. Impaired endothelium-dependent vascular responses of retinal and intrarenal arteries in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(10): 2509–16.
17. Kessler L., Wiesel M.L., Attali P., Mossard J.M., Cazenave J.P., Pinget M. Von Willebrand factor in diabetic angiopathy. *Diabetes Metab* 1998; 24(4): 327–36.
18. Klabr S. Can L-arginine manipulation reduce renal disease? *Semin Nephrol* 1999; 19(3): 304–9.
19. Soulis T., Cooper M.E., Sastra S., Thallas V., Panagiotopoulos S., Bjerrum O.J., Jerums G. Relative contributions of advanced glycation and nitric oxide synthase inhibition to aminoguanidine-mediated renoprotection in diabetic rats. *Diabetologia* 1997; 24(8): 1024–36.
20. Sugimoto H., Shikata K., Wada J., Horiuchi S., Makino H. Advanced glycation end products-cytokine-nitric oxide sequence pathway in the development of diabetic nephropathy: aminoguanidine ameliorates the overexpression of tumour necrosis factor- α and inducible nitric oxide synthase in diabetic rat glomeruli. *Diabetologia* 1999; 42(7): 878–86.
21. Trachtman H., Futterweit S., Crimmmins D.L. High glucose inhibits nitric oxide production in cultured rat mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8(8): 1276–82.
22. Trachtman H., Koss I., Bogart M., Abramowitz J., Futterweit S., Franki N., Singhal P.C. High glucose enhances growth factor-stimulated nitric oxide production by cultured rat mesangial cells. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1998; 100(2): 213–25.