

СПОНТАННАЯ И ИНДУЦИРОВАННАЯ СЕКРЕЦИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И ПРОТИВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА И СИНДРОМОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ



© Е.В. Ших¹, Н.А. Петунина¹, Л.В. Недосугова¹, К.О. Галстян^{1*}, К.И. Колмычкова², Т.В. Кириченко², А.А. Махова¹, Г.И. Городецкая^{1,3}

¹Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва, Россия

²Национальный медицинский научно-исследовательский центр кардиологии и медицинской генетики, Москва

³Научный центр экспертизы средств медицинского применения, Москва

ОБОСНОВАНИЕ. Распространенность сахарного диабета (СД) и его хронических осложнений возрастает до масштабов эпидемии. СД связывают с хроническим воспалительным состоянием, которое приводит к дисбалансу и нарушению регуляции иммунной функции кожи. У 25% пациентов с СД возникает дистальная симметричная полиневропатия (ДСПН), осложняющаяся у ряда пациентов развитием синдрома диабетической стопы (СДС).

ЦЕЛЬ. Исследовать спонтанную и индуцированную секрецию провоспалительного цитокина фактора некроза опухоли- α (TNF- α) и противовоспалительного хемокина C-C Motif Chemokine Ligand 18 (CCL18) моноцитами, выделенными из крови пациентов с ДСПН как с СДС, так и без него, а также изучить влияние курсового применения комбинированного метаболического препарата Кокарнит в составе комплексной терапии на динамику выраженности симптомов ДСПН и цитокиновый фенотип у пациентов с длительно незаживающими язвами нижних конечностей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В исследование включен 121 пациент с СД 2 типа (СД2) с различной длительностью заболевания. В 1-ю группу вошли 28 пациентов с впервые выявленным СД2, во 2-ю – 51 пациент с СД2 с ДСПН без СДС, в 3-ю – 42 пациента с СДС. У пациентов с ДСПН выраженность симптомов по шкале TSS (Total Symptom Score) составила 9,32 балла. Пациенты случайным образом были разделены на 2 группы: 57 человек составили основную группу и получали сахароснижающую комплексную терапию, к которой был добавлен Кокарнит, пациенты контрольной группы – только сахароснижающую терапию. До начала приема Кокарнита у всех обследованных определяли про- и противовоспалительную активацию моноцитов. Моноциты CD14⁺ выделяли из крови пациентов и стимулировали интерфероном- γ (IFN- γ) и интерлейкином-4 (IL-4) для индукции активации про- и противовоспалительных моноцитов соответственно. Концентрации TNF- α и CCL18 в культуральной среде измеряли с помощью ELISA на 1-й и 6-й день после клеточной стимуляции. После 9-дневного курса применения Кокарнита оценивали динамику показателей по шкале TSS. Оценку цитокинового статуса проводили у 18 человек с длительно незаживающими язвенными дефектами нижних конечностей в 1-й и 9-й день лечения.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Выявлена корреляция между гликогемоглобином HbA_{1c} и уровнями стимулированной секреции TNF α ($r=0,726$; $p=0,027$), CCL18 ($r=-0,949$; $p=0,051$) у пациентов с ДСПН. У всех пациентов с разной продолжительностью СДС наблюдалось увеличение секреции TNF- α и CCL18 ($p<0,05$). Однако стимуляции противовоспалительной активации не отмечалось у пациентов с язвенными дефектами продолжительностью более 6 мес ($p=0,033$). Применение Кокарнита у этих пациентов приводило к снижению стимулированной секреции TNF α и повышению CCL18. На протяжении всего периода наблюдения за пациентами на фоне проводимой терапии балльная оценка симптомов полинейропатии по шкале TSS у пациентов контрольной группы статистически значимо превышала таковую у пациентов основной группы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. На фоне терапии у пациентов основной группы установлена статистически значимо выраженная динамика показателей по шкале TSS. Выявлена цитокинмодулирующая способность Кокарнита переключать цитокиновый статус в разряд противовоспалительных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сахарный диабет 2 типа; синдром диабетической стопы; провоспалительная поляризация моноцитов; противовоспалительная поляризация моноцитов; Кокарнит

SPONTANEOUS AND INDUCED SECRETION OF THE PRO-INFLAMMATORY AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS AND DIABETIC FOOT SYNDROME

© Evgenia V. Shikh¹, Nina A. Petunina¹, Ludmila V. Nedosugova¹, Karine O. Galstyan^{1*}, Kira I. Kolmychkova², Tatyana V. Kirichenko², Anna A. Makhova¹, Galina I. Gorodetskaya^{1,3}

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

²National Medical Research Center for Cardiology and Medical Genetics, Moscow, Russia

³Scientific Center for Expertise of Medical Devices, Moscow, Russia

AIMS: Investigation of spontaneous and induced secretion of the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α (TNF- α) and the anti-inflammatory chemokine C-C Motif Chemokine Ligand 18 (CCL18) by monocytes isolated from blood of patients with long-term type 2 diabetes mellitus (T2DM), both with or without foot ulcers and the effect of the course use of the combined metabolic drug Kokarnit as part of complex therapy on the dynamics of the severity of symptoms of DSPN and the cytokine phenotype in patients with long-term non-healing ulcers of the lower extremities

MATERIALS AND METHODS: 121 patients with T2DM, 79 without diabetic foot syndrome (DFS) and 42 patients with DFS were included. CD14+ monocytes were isolated from patients' blood and stimulated by interferon- γ (IFN- γ) and interleukine-4 (IL-4) for induction of pro- and anti-inflammatory monocyte activation, respectively. The concentrations of TNF- α and CCL18 in the culture medium were measured using ELISA on day 1 and day 6 after cell stimulation in all patients before taking the combined metabolic drug Kokarnit. Then they were randomly allocated either to the control group (57 people), to whom Kokarnit was added to standard treatment, or to the comparison group. After a 9-day course of application of Kokarnit, the dynamics of indicators was evaluated on a TSS scale. Assessment of cytokine status was carried out in 18 people with long-term non-healing ulcerative defects of the lower extremities, on the first and ninth day of treatment.

RESULTS: A correlation was found between HbA_{1c} and levels of stimulated secretion of TNF α ($r=0.726$, $p=0.027$), CCL18 ($r=-0.949$, $p=0.051$) in patients with DSPN. In all patients with different duration of VDS, an increase in secretion of TNF- α and CCL18 was observed ($p<0.05$). However, stimulation of anti-inflammatory activation was not observed in patients with ulcerative defects lasting more than 6 months ($p=0.033$). The use of cocarnit in these patients had a decrease in stimulated secretion of TNF α and an increase in CCL18. Throughout the entire observation period with the therapy, the score for the symptoms of polyneuropathy on the TSS scale in patients of the control group was statistically significantly higher.

CONCLUSION: Against the background of therapy in patients of the main group, a statistically significant dynamics of indicators on the TSS scale was established. The cytokine modulating ability of Kokarnit to switch the cytokine status into the category of anti-inflammatory.

KEYWORDS: type 2 diabetes mellitus; diabetic foot syndrome (DFS); pro-inflammatory monocyte polarization; anti-inflammatory monocyte polarization; Kokarnite

Сахарный диабет 2 типа (СД2) в настоящее время является актуальной проблемой общественного здравоохранения во всем мире. Согласно прогнозам, к 2035 г. количество пациентов с СД возрастет до 471 млн [1], а к 2045 г. увеличится до 629 млн человек [2].

Число пациентов с поздними осложнениями СД ожидается увеличивается. К многочисленным осложнениям СД, развивающимся в условиях гипергликемии, относятся и дистальная симметричная полинейропатия (ДСПН) [3]. Наиболее частой причиной неблагоприятного воздействия на нервную систему является длительный метаболический дисбаланс. Различные клинические исследования подтверждают этот факт. Диабетические невропатии и ангиопатии также вызывают клеточную дисфункцию и нарушение гомеостаза тканей и целых органов. В случаях дефицита инсулина потребность в глюкозе в нервной ткани активирует полиоловый путь, что приводит к развитию окислительного стресса (ОС) через чрезмерную выработку свободных радикалов [4]. В условиях гипергликемии атеросклероз прогрессирует в результате окислительной модификации липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) с последующим усилением поглощения моноцитами, которые превращаются в пенистые клетки, участвующие в доатерогенной липидной инфильтрации сосудистой стенки [5]. Модифицированные частицы ЛПНП начинают самопроизвольно агрегировать после изменения поверхностного заряда [6]. Наличие медиаторов воспаления, таких как фактор некроза опухоли- α (TNF- α) и интерлейкины (IL) в атеросклеротической бляшке, поддерживает хроническое воспаление. Признаки локальных и системных неспецифических воспалительных процессов при атеросклерозе появляются на начальных стадиях поражения в стенке артерии [7]. Клетки крови, такие как моноциты, играют ключевую роль в процессе атеросклеротического воспаления.

Моноциты, мигрируя в субэндотелиальное пространство, дифференцируются в макрофаги с участием многих транскрипционных факторов, причем основным фактором является фактор ядерной транскрипции каппа В (NF- κ B). Цитокины и медиаторы воспаления активируют NF- κ B в нейронах и нейроглии, способствуя пролиферации нервов [8]. Активированный NF- κ B во время ОС отвечает за экспрессию 500 различных генов, ферментов, и про- и противовоспалительных медиаторов. Экспрессия NF- κ B наиболее выражена у пациентов с хроническими заболеваниями, включая пациентов с диабетом. Активация NF- κ B при СД связана с самоокислением глюкозы и избыточным образованием активных форм кислорода (АФК), что приводит к активации протеинкиназы С (ПКС) [9]. Моноциты, которые проникают в интиму, частично проходят дифференцировку и пролиферацию, превращаясь в макрофаги под воздействием колониестимулирующих факторов (макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и др. факторы, секретируемые эндотелиальными клетками). Они экспрессируют рецепторы ацептора, а затем трансформируются в пенистые клетки. Пластичность макрофагов связана с их трансформацией в провоспалительные и противовоспалительные фенотипы. M-CSF индуцирует образование фенотипа моноцитов, который не трансформируется в пенистые клетки и дополнительно секретирует провоспалительные цитокины, такие как IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 и TNF- α . Этот путь трансформации моноцитов определяется как классический (M1) путь провоспалительной активации [10]. GM-CSF активирует противовоспалительный (M2) путь. Модифицированные по этому пути моноциты приобретают способность секретировать противовоспалительные цитокины и хемокины, т.е. IL-4, IL-10, IL-13, трансформирующий фактор роста бета

(TGF- β), С-С мотив-хемокиновый лиганд 18 (CCL18) и др. Этот альтернативный путь трансформации обеспечивает контроль над всеми хроническими воспалительными процессами. В нормальных условиях моноциты неактивны. Провоспалительный фенотип активируется в присутствии внутриклеточных патогенов или под влиянием интерферона- γ (IFN- γ), тогда как противовоспалительный фенотип стимулируется внеклеточными паразитами или IL-4. Их способность к активации оценивается по уровням секретируемого цитокина и хемокина. Моноциты могут активироваться в воспалительной среде, и этот процесс зависит от микросреды. Дисрегулированные моноциты контролируют развитие воспалительных заболеваний [11]. С развитием регенеративной медицины и тканевой инженерии роль моноцитов, цитокинов и хемокинов, выделяемых ими, приобрела важное значение. Дисфункция моноцитов связана с возникновением и развитием аутоиммунных заболеваний, новообразований и других хронических воспалительных состояний. Недавние исследования показали роль молекулярных механизмов в развитии СД. Они включают регуляцию и транспорт пептидов, а также контроль за тенденцией и интенсивностью иммунной атаки [12]. СД ассоциируется с хроническим воспалительным состоянием, которое в конечном итоге приводит к дисбалансу и нарушению регуляции иммунной функции кожи. Нарушение регуляции образования АФК, реактивного азота и протеаз приводит к сохранению воспаления. Диабетическая раневая среда характеризуется чрезмерным и длительным воспалением, что связано с плохим заживлением, а у человека приводит к развитию диабетических язв на стопе. Тем не менее основные механизмы, которые способствуют чрезмерному воспалению, остаются неизвестными.

Состояние иммунной системы также может способствовать развитию хронических ран нижних конечностей. В нормально заживающих ранах воспалительные клетки первоначально проявляют как M1-, так и M2-активацию фенотипов во время воспалительной фазы (первые несколько дней), затем переходят к преимущественному фенотипу активации M2 при пролиферативной/неоваскуляризации фазе заживления (к 7-му дню). Влияние диабетической среды на активацию воспалительных клеток также было недавно изучено [13]. Однако в этих исследованиях не учитывался ответ отдельных воспалительных клеток *in situ*. Имеются лишь ограниченные данные относительно регуляции активации про- и противовоспалительных моноцитов и их эффективности *in vivo*. Открытым остается вопрос о том, предопределяются ли про- и противовоспалительные ответы моноцитов в процессе регенерации ткани или их дифференциация зависит от местной среды. Поскольку про- и противовоспалительные процессы имеют решающее значение в различных фазах заживления ран, можно предположить, что нарушения иммунной системы могут мешать тканевому гомеостазу и заживлению ран после появления язв и привести к развитию хронических незаживающих ран, которые характерны для синдрома диабетической стопы (СДС).

В связи с этим, помимо борьбы с гипергликемией, открываются новые перспективы в лечении ДСПН, которые заключаются в проведении терапии, направленной на улучшение метаболизма нервной ткани и восстановление макрофагального баланса – снижение провоспа-

лительной активности макрофагов. Клинически перспективным является подход с применением нейротропных витаминов группы В и их производных, которые воздействуют непосредственно на поврежденные ткани [14].

ЦЕЛЬ

Изучение спонтанной и индуцированной секреции провоспалительного цитокина TNF- α и противовоспалительного хемокина CCL18 моноцитами-макрофагами в культуральной среде пациентов, длительно страдающих СД2, как на фоне язвенных поражений стоп, так и без них, а также влияния курсового применения препарата Кокарнит в составе комплексной симптоматической терапии на динамику выраженности симптомов ДСПН и цитокиновый фенотип в подгруппе пациентов с длительно незаживающими язвами нижних конечностей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Проведено наблюдательное проспективное контролируемое нерандомизированное исследование.

Критерии соответствия

В исследование включали пациентов:

1. подписавших датированное информированное согласие;
2. мужчин и женщин в возрасте ≥ 35 лет;
3. с впервые выявленным СД2, не получавших ранее сахароснижающую терапию, или
4. длительно страдающих СД2 с ДСПН без СДС, получающих комбинированную сахароснижающую терапию, или
5. длительно страдающих СД2 с СДС, получающих терапию инсулином.

Основными критериями исключения были:

1. текущее воспалительное состояние (одонтогенное, легочное, тазовое и т. д.) и/или хроническое заболевание;
2. злоупотребление алкоголем;
3. табакокурение;
4. стадия хронической болезни почек $\geq 3b$, включая диализ при острой почечной недостаточности в течение 12 месяцев до включения в исследование;
5. острая ВИЧ-инфекция, гепатит С/В, цирроз печени;
6. анамнез инфаркта миокарда и/или инсульта в течение 2 мес до включения в исследование;
7. беременность или кормление грудью;
8. декомпенсированный гипотиреоз;
9. острая травма, хирургическое или другое состояние;
10. язва стопы с признаками системной воспалительной реакции.

Условия проведения

Исследование проводилось на базе ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет) в рамках научно-исследовательской темы «Разработка и совершенствование клиничко-фармакологических технологий персонализированной медицины для повышения эффективности и безопасности фармакотерапии социально-значимых

заболеваний» совместно кафедрами клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней и эндокринологии Института клинической медицины. Набор пациентов проводился на клинических базах кафедр: ГБУЗ ГКБ №4 ДЗМ, ГБУЗ ГКБ №70 им. Е.О. Мухина ДЗМ, ГБУЗ ГКБ №67 им. Л.А. Ворохобова ДЗМ, филиал №1 ГП №67 ДЗМ.

Продолжительность исследования

Исследование проводилось в течение 2014–2018 гг.

Описание медицинского вмешательства

В исследование был включен 121 пациент с СД2 с различной длительностью заболевания. Уровень гликемии в сыворотке крови определяли гексокиназным методом. Определение гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) проводили с помощью автоматизированной системы капиллярного электрофореза Capillarys 2 (SebiaSA, Франция), липидного спектра крови – на автоматическом биохимическом анализаторе AU 680 (BeckmanCoulter, США). Неврологическое обследование нижних конечностей проводили с помощью количественных тестов. Оценка клинической эффективности проводимой терапии осуществлялась по шкале TSS (Total Symptom Score – общая оценка симптомов невропатии). Нами проведено исследование по изучению эффективности применения препарата Кокарнит в составе комплексной терапии ДСПН, а также оценка цитокинового статуса пациентов при применении Кокарнита у пациентов с длительными незаживающими язвенными дефектами стоп. Кокарнит представляет собой комплекс метаболически активных соединений: трифосаденина динатрия тригидрат 10 мг, кокарбоксилаза 50 мг, цианокобаламин 0,5 мг, никотинамид 20 мг. Препарат выпускается в виде лиофилизата для приготовления раствора. Рекомендованная продолжительность курсового применения препарата в соответствии с инструкцией к медицинскому применению составляет 9 дней, препарат вводят 1 раз в сутки внутримышечно в дозе 2 мл. Пациенты наблюдались в течение 12 нед. Проведено 4 визита: 0 визит – базовый (подписание формы информированного согласия, оценка критериев включения, невключения, назначение препарата); 1-й визит – через 9 дней от начала терапии; 2-й визит – через 4 нед от начала терапии; 3-й визит – через 12 нед от начала терапии. Во время всех визитов у пациентов для количественной оценки выраженности симптомов использовалась шкала TSS. На 0 визите у всех пациентов определен цитокиновый статус; на 1-м визите в подгруппе пациентов с длительно незаживающими язвами нижних конечностей повторно определен цитокиновый статус. На визитах 0, 1 и 2 проведены стандартные общий и биохимический анализ крови. На визите 3 исследователем сделано общее заключение об эффективности лечения, оценка наличия/отсутствия побочных эффектов от лечения.

При включении в исследование ни у одного из пациентов не отмечалось клинических симптомов системного воспаления. Пациенты с длительным анамнезом СД получали инсулиновую терапию для достижения целевого уровня HbA_{1c} . Пациенты не получали гиполлипидемические препараты, а также другие препараты, влияющие на воспаление.

Процедура выделения моноцитов/макрофагов крови человека и стимуляция клеток по провоспалительному (M1) и противовоспалительному (M2) фенотипам.

Кровь в количестве 20 мл забирали натошак в стерильных условиях из локтевой вены в стерильную пластиковую пробирку объемом 20 мл, содержащую 2 мл стерильного 3,8% цитрата натрия в изотоническом фосфатном буфере (ИФБ) в качестве антикоагулянта. Полученные образцы крови транспортировали в лабораторию медицинской генетики НМИЦ кардиологии (руководитель лаборатории профессор д.м.н. И.А. Собенин) в день забора крови. Из образцов крови отбирали плазму и добавляли в кровь раствор ИФБ до первоначального объема. Для получения чистой популяции моноцитов проводили магнитную сепарацию положительных к кластеру дифференцировки 14 ($CD14^+$) клеток с использованием парамагнитных наночастиц, конъюгированных с антителами к $CD14$. Раствор парамагнитных наночастиц добавляли непосредственно к образцу крови в количестве 50 мкл на 10 мл крови и инкубировали в течение 30 мин. Далее образец наносили на колонку для магнитной сепарации, после чего оставшиеся в колонке $CD14^+$ моноциты вымывали из колонки и переносили в культуру. Этот подход позволял получать клеточную популяцию, содержащую не менее 95% моноцитов. Полученные клетки ресуспендировали в концентрации 10^6 клеток/мл в среде «X-vivo 10». Полученную суспензию клеток распределяли в 24-луночный планшет из расчета 1×10^6 клеток на лунку. Клетки культивировали при 37°C и 5% CO_2 в CO_2 -инкубаторе.

Функциональный анализ активации моноцитов заключался в измерении концентраций цитокинов, секретируемых клетками в стандартных условиях в ответ на провоспалительную стимуляцию интерфероном-гамма (ИФН- γ) в концентрации 100 нг/мл или противовоспалительную стимуляцию интерлейкином-4 (ИЛ-4) в концентрации 10 нг/мл. Секреция фактора некроза опухолей альфа (ФНО- α) рассматривалась как маркер провоспалительной активации моноцитов, а секреция CCL18 – как маркер противовоспалительной активации. Концентрации ФНО- α и CCL18 в культуральной среде измерялись твердофазным иммуоферментным анализом через 1 и 6 дней после стимуляции моноцитов соответственно. Полученные результаты уровней цитокинов выражены в пг/мл. Из пациентов основной группы была выделена подгруппа с длительно незаживающими язвенными дефектами стоп ($n=18$). В данной группе пациентов дополнительно было проведено определение базального и стимулированного уровней цитокина TNF- α и хемокина CCL18 в 1-й и 9-й день применения препарата Кокарнит.

Основной исход исследования

За первичную суррогатную точку принимали показатель про- и противовоспалительной поляризации моноцитов/макрофагов у больных СД2 с ДСПН без СДС и с СДС, за вторичную суррогатную точку принимали секрецию про- и противовоспалительных цитокинов на фоне применения метаболического препарата у больных с длительно незаживающим язвенным дефектом при СДС.

Этическая экспертиза

Проведение данного исследования было одобрено комитетом по этике Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (выписка из протокола №11–13 от 13.11.2013 г.). Получено информированное согласие на участие в исследовании у всех пациентов.

Статистический анализ

Математико-статистическая обработка полученных результатов проведена на персональном компьютере с помощью полнофункциональной статистической системы IBM SPSS Statistics 18 и программы для работы с электронными таблицами MS Excel 2013 с определением медианы [Me] и перцентилей Q [25; 75]. Различия между группами выявляли по U-критерию Манна–Уитни, Z-критерию Колмогорова–Смирнова. Парный частотный анализ между группами проводили с помощью достоверности различий хи-квадрата и точного решения Фишера. Корреляционную зависимость определяли с помощью ранговой корреляции Спирмена (ρ) и линейного коэффициента Пирсона (r). Статистически значимым считали до 5% уровня значимости ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследование был включены 121 пациент с СД2 с различной длительностью заболевания. В 1-ю группу вошли 28 пациентов с впервые выявленным СД2, во 2-ю – 51 пациент с СД2 с ДСПН без поражений стоп (длительность анамнеза СД2 10 [5; 15] лет), в 3-ю – 42 пациента с язвенными дефектами (длительность анамнеза СД2 12 [6; 20] лет). 14 пациентов с СДС (7 м/7 ж) страдали нейропатической формой СДС; 38 пациентов (22 м/6 ж) – нейроишемической формой. В зависимости от фазы раневого процесса местно применялись антисептические атрауматические повязки, суперпоглошители, альгинаты кальция и др. Клинико-лабораторные показатели обследуемых представлены в таблице 1. Пациенты с СД2 с различной длительностью течения заболевания СД2 значительно не различались между собой.

До начала терапии у пациентов с ДСПН суммарная балльная оценка выраженности симптомов по шкале TSS (Total Symptom Score) составила 9,32 балла; выраженность болевого синдрома в баллах по шкале TSS составила у пациентов основной группы $2,82 \pm 0,21$, у пациентов контрольной группы – $2,78 \pm 0,24$ (табл. 2). На фоне проводимой терапии через 9 дней лечения у пациентов как контрольной, так и основной группы выявлена статистически значимая регрессия болевого синдрома. Выраженность интенсивности болевого синдрома соответственно составила у пациентов

основной группы $2,05 \pm 0,12$ баллов; у пациентов контрольной группы – $2,3 \pm 0,11$ баллов ($p < 0,05$) (табл. 2). У пациентов основной группы, получавших дополнительно к стандартной терапии инъекции препаратом Кокарнит, динамика регрессии болевого синдрома в дельта процентах в 1,7 раза превысила динамику регрессии у пациентов контрольной группы. Через 4 нед (основная группа $1,9 \pm 0,17$; контрольная группа $2,4 \pm 0,18$ баллов) и 12 нед (основная группа $2,0 \pm 0,18$; контрольная группа $2,5 \pm 0,17$ баллов) после начала терапии у пациентов основной группы болевой синдром был статистически значимо менее выражен по сравнению с пациентами контрольной группы ($p < 0,05$).

Балльная оценка выраженности симптома онемения по шкале TSS на фоне проводимого лечения за первые 9 дней наблюдения статистически значимо уменьшалась как в основной (с $2,71 \pm 0,12$ до $1,9 \pm 0,09$ баллов, $p < 0,05$), так и в контрольной группах (с $2,65 \pm 0,11$ до $2,2 \pm 0,10$ баллов, $p < 0,05$) (см. табл. 2).

При этом в основной группе динамика снижения симптома в 1,76 раза превысила динамику в контрольной группе. Через 4 и 12 недель после начала терапии у пациентов основной группы синдром онемения был менее выражен по сравнению с пациентами контрольной группы, однако разница не явилась статистически значимой.

Из оцениваемых симптомов ДСПН у пациентов, включенных в исследование, жжение было наименее выражено. В течение первых девяти дней наблюдения некоторая положительная динамика в регрессии данного симптома выявлена в обеих группах пациентов. Через 4 и 12 недель наблюдения выраженность симптома клинически значимых изменений не претерпела.

На фоне проводимой терапии выраженность парестезий по шкале TSS у пациентов основной группы ($1,8 \pm 0,11$ баллов) была статистически значимо ниже ($p < 0,05$) по сравнению с пациентами контрольной группы ($2,2 \pm 0,10$ баллов). Через 4 и 12 нед после начала терапии у пациентов основной группы парестезии были также менее выражены по сравнению с пациентами контрольной группы, однако разница не явилась статистически значимой.

Динамика регрессии суммарной балльной оценки симптомов ДСПН по шкале TSS ($p < 0,05$) за период наблюдения была более выражена у пациентов основной

Таблица 1. Характеристика обследованных пациентов с сахарным диабетом 2 типа

Показатель, ед.	1	2	3
	СД2 впервые выявленный (n=28)	без СДС (n=50)	СДС (n=42)
Пол, м/ж (%)	11 (39,3)/ 17 (60,7)	27 (52,9)/ 24 (47,1)	29 (69,0)/ 13 (31,0)
Возраст, лет	$59,1 \pm 6,0$	$62,7 \pm 8,2$	$62,0 \pm 8,6$
ИМТ, кг/м ²	$31,5 \pm 4,6$	$32 \pm 5,0$	$30,8 \pm 5,6$
HbA _{1c} , %	$9,9 \pm 2,3$	$9,0 \pm 1,4$	$8,8 \pm 1,8$
ХС, ммоль/л	$5,0 \pm 1,1$	$4,9 \pm 1,6$	$5,1 \pm 1,4$
ТГ, ммоль/л	$2,1 \pm 1,4$	$1,7 \pm 0,9$	$2,1 \pm 1,1$
ЛПВП, ммоль/л	$1,4 \pm 0,6$	$1,3 \pm 0,5$	$1,4 \pm 0,9$
ЛПНП, ммоль/л	$3,0 \pm 1,5$	$3,0 \pm 1,2$	$2,9 \pm 1,5$

Примечания: параметрические данные представлены с помощью средних величин [m] и среднеквадратического отклонения [σ], непараметрические – в виде медиан (me) и перцентилей (q) [q25; q75]. Различия между группами выявляли с помощью t-критерия Стьюдента, u-критерия Манна–Уитни и z-критерия Колмогорова–Смирнова, $p < 0,001^{**}$; $p < 0,05^{*}$. СД2 – сахарный диабет 2 типа; СДС – синдром диабетической стопы; ИМТ – индекс массы тела; ХС – холестерин; ТГ – триглицериды; ЛПВП – липопротеины высокой плотности; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; HbA_{1c} – гликированный гемоглобин.

группы, получавших инъекции препаратом Кокарнит в течение первых 9 дней лечения. На протяжении всего периода наблюдения за пациентами на фоне проводимой терапии балльная оценка симптомов полинейропатии у пациентов контрольной группы статистически значимо превышала балльную оценку симптомов нейропатии у пациентов основной группы ($p < 0,05$).

Состояние фенотипов M1/M2 у больных с различной длительностью сахарного диабета 2 типа

Базальная секреция TNF- α культивируемыми моноцитами-макрофагами из крови больных с впервые выявленным СД2 составила 650 пг/мл культуральной среды. Стимулированная INF- γ секреция TNF- α моноцитами-макрофагами достигала 1679,5 пг/мл культуральной среды, ($p < 0,001$). У пациентов с СД2 и длительностью заболевания 10 [5; 15] лет с ДСПН без поражений стоп базальная секреция TNF α была заметно выше и составила 924,1 пг/мл. В ответ на стимуляцию INF- γ мы получили 1,31-кратное повышение провоспалительного ответа ($p < 0,001$). У пациентов с длительностью СД2 12 [6; 20] лет и с язвенными дефектами стоп базальная секреция провоспалительного цитокина была ниже, чем у больных ДСПН без СДС и составила 674,3 пг/мл. Стимуляционный выброс дал 1,88-кратное повышение ($p < 0,001$), при этом между группами мы не получили значимых различий. При анализе противовоспалительной активности моноцитов-макрофагов периферической крови уровень секреции базального и стимулированного противовоспалительного

хемокина (CCL18) у пациентов с впервые выявленным СД2 был значимо выше, чем у длительно страдающих диабетом пациентов, и составил 27,5 пг/мл. После стимуляции IL-4 мы получили повышение до 1123 пг/мл ($p < 0,001$). Базальная секреция CCL18 культивируемыми моноцитами-макрофагами у пациентов с длительным течением СД2 без СДС была значительно ниже – 3,0 пг/мл, чем у больных с СДС – 9,38 пг/мл. У больных без СДС стимуляция IL-4 превысила 2,23-кратно исходный уровень, ($p < 0,05$). Индуцированная секреция CCL18 у больных с СДС показала лишь 1,36-кратное повышение ($p = 0,069$), (табл. 3).

Таким образом, у больных с различной длительностью заболевания получена поляризация по провоспалительному фенотипу. И напротив, у пациентов с впервые выявленным СД2 сохранена поляризация по противовоспалительному фенотипу и прослеживается тенденция снижения поляризации при длительности диабета более 10 лет. Различия по способности клеток к стимулированному M2 ответу моноцитов-макрофагов периферической крови также были значимыми ($p < 0,001$).

Состояние углеводного обмена и фенотипов M1/M2 поляризации макрофагов

У пациентов с длительным течением СД2 без СДС средний уровень HbA_{1c} составил $9,0 \pm 1,5\%$, у пациентов с СДС – $8,8 \pm 1,8\%$, $p_{1,2} = 0,529$. Различия в показателях между группами не имели статистической значимости. Для анализа состояния углеводного обмена в соответствии с клиническими рекомендациями в качестве целевого

Таблица 2. Динамика регрессии суммарной балльной оценки симптомов диабетической полинейропатии по шкале TSS ($p < 0,05$) за период наблюдения

	Визит 0 (включение и начало терапии)				Визит 1 (9 дней после начала терапии)				Визит 2 (4 недели после начала терапии)				Визит 3 (12 недель после начала терапии)			
	баллы по шкале TSS		V_{0-1}	$\Delta\%$	P_{1vs0}	баллы по шкале TSS		V_{1-2}	$\Delta\%$	P_{2vs1}	баллы по шкале TSS		V_{2-3}	$\Delta\%$	P_{3vs2}	P_{3vs1}
Онемение																
Основная группа	2,71 \pm 0,12		1,9 \pm 0,09	29,8	0,04	1,9 \pm 0,11		29,8	н/д	2,1 \pm 0,11		22,5	н/д	0,04		
Контрольная группа	2,65 \pm 0,11		2,2 \pm 0,10	16,9	0,04	2,2 \pm 0,10		16,9	н/д	2,4 \pm 0,09		9,43	н/д	н/д		
Жжение																
Основная группа	1,2 \pm 0,15		1,9 \pm 0,12	25,0	н/д	0,9 \pm 0,2		25,0	н/д	0,9 \pm 0,18		25	н/д	н/д		
Контрольная группа	1,1 \pm 0,17		0,9 \pm 0,14	18,2	н/д	0,9 \pm 0,18		18,2	н/д	0,9 \pm 0,15		18,2	н/д	н/д		
Парестезии																
Основная группа	2,55 \pm 0,12		1,8 \pm 0,11*	29,4	0,04	1,6 \pm 0,11		37,25	н/д	1,8 \pm 0,12		29,41	н/д	0,04		
Контрольная группа	2,51 \pm 0,09		2,2 \pm 0,10	12,35	н/д	2,0 \pm 0,12		20,31	н/д	2,1 \pm 0,11		16,33	н/д	н/д		
Боль в конечностях																
Основная группа	2,82 \pm 0,11		2,05 \pm 0,12	27,3	0,03	1,9 \pm 0,17*		32,6	н/д	2,0 \pm 0,18*		21,9	н/д	0,04		
Контрольная группа	2,78 \pm 0,14		2,3 \pm 0,11	17,26	0,04	2,4 \pm 0,18		13,7	н/д	2,5 \pm 0,17		10,07	н/д	н/д		
Суммарное значение																
Основная группа	9,31 \pm 0,14		6,65 \pm 0,12*	28,6	0,04	6,3 \pm 0,08*		32,3	н/д	6,8 \pm 0,11*		26,9	н/д	0,04		
Контрольная группа	9,14 \pm 0,11		7,6 \pm 0,10	16,84	0,04	7,5 \pm 0,10		17,9	н/д	7,9 \pm 0,12		13,56	н/д	н/д		

Примечания: * – статистически достоверно по сравнению с контрольной группой: $p < 0,05$

Таблица 3. Статистические параметры распределений величин маркеров

Группы (n)	TNF- α , пг/мл		CCL18, пг/мл	
	Базальный	Стимулированный	Базальный	Стимулированный
1. СД2 впервые выявленный (n=28)	650,0 [436,75; 922,25]	1679,5 ** [1127,5; 2021,5]	27,5 [14,5; 43,5]	1123,0** [963,2; 1435,2]
2. СД2 10 [5; 15] лет без СДС (n=51)	924,1 [133,8; 1610]	1216,0** [279,0; 2309,91]	3,0 [0; 9,6]	6,7** [1,1; 28,6]
3. СД2 12 [6; 20] лет с СДС (n=42)	674,3 [269,3; 1281,07]	1271,5** [611,9; 2857,46]	9,38 [3,1; 40,1]	12,8* [4,1; 67,6]
	($p_{1vs2}=0,050$)* ($p_{1vs3}=0,606$) ($p_{2vs3}=0,118$)	($p_{1vs2}=0,930$) ($p_{1vs3}=0,624$) ($p_{2vs3}=0,640$)	($p_{1vs2}<0,001$)** ($p_{1vs3}<0,001$)** ($p_{2vs3}=0,645$)	($p_{1vs2}<0,001$)** ($p_{1vs3}<0,001$)** ($p_{2vs3}=0,065$)

Примечания: данные представлены в виде медианы и 25;75 квартилей (** $p<0,001$; * $p<0,05$). СД2 – сахарный диабет 2 типа.

уровня был выбран $HbA_{1c} \leq 7,5\%$, так как средний возраст исследуемых составил 62 года. При сравнении пациентов с $HbA_{1c} \leq 7,5\%$ и $HbA_{1c} > 7,5\%$ отмечались различия по базальному и стимулированному противовоспалительному фенотипу ($p<0,05$) (табл. 4).

Обнаружено, что у пациентов с язвенными дефектами при $HbA_{1c} \leq 7,5\%$ нет стимуляции поляризации моноцитов-макрофагов по провоспалительному фенотипу и снижена способность к стимуляции противовоспалительного ответа, тогда как при декомпенсации углеводного обмена ($HbA_{1c} > 7,5\%$) значительно повышается стимуляция провоспалительной поляризации и незначительно – противовоспалительной. У пациентов без язвенных дефектов при $HbA_{1c} > 7,5\%$ при отсутствии стимулированной провоспалительной поляризации мы получили корреляционную зависимость ($r=0,574$, $p=0,010$) между базальным уровнем TNF α и уровнем HbA_{1c} (рис. 1).

В том числе выявлены корреляционные взаимосвязи у пациентов с язвенными дефектами между уровнем HbA_{1c} и стимулированными медиаторами воспаления TNF α , пг/мл ($r=0,726$; $p=0,027$), CCL18 ($r=-0,949$; $p=0,051$). Таким образом, независимо от наличия язвенных дефектов, пациенты, достигшие на момент обследования целевых показателей углеводного обмена, не имеют активации провоспалительного фенотипа, тогда как, напротив, при $HbA_{1c} > 7,5\%$ активируется поляризация по M1 фенотипу.

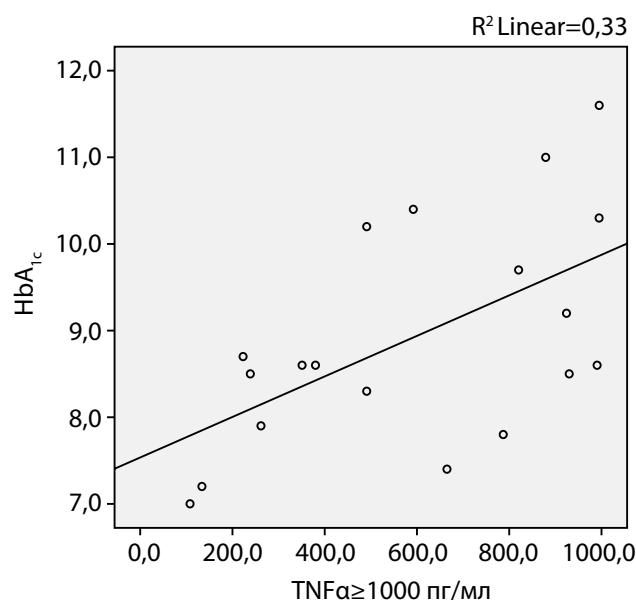


Рис. 1. Зависимость уровня базального TNF α от уровня гликированного гемоглобина.

Состояние фенотипов M1/M2 поляризации макрофагов в зависимости от длительности язвенного дефекта

Нами также рассмотрены фенотипы поляризации при длительно незаживающих язвенных дефектах у больных с СД2. Выявлено, что на протяжении всего воспалительного процесса сохраняются высокие уровни провоспа-

Таблица 4. Статистические параметры распределений величин базального и стимулированного TNF α /CCL18 у пациентов с длительным течением сахарного диабета 2 типа в зависимости от уровня гликированного гемоглобина

Показатель, пг/мл	СД2 без СДС		$P_{1,2}$	СД2 с СДС		$P_{1,2}$
	1	2		1	2	
	$HbA_{1c} \leq 7,5\%$			$HbA_{1c} > 7,5\%$		
TNF α базальный	1610,0 [399,4; 1989,0]	648,0 [261,28; 766,0]	0,258	849,65 [90,2; 1490,5]	828,0 [280,8; 1317,1]	0,790
TNF α стимулированный	1683,0 [536,3; 2737,0] $p=0,051$	755,0 [526,0; 1053,27] $p=0,011^*$	0,161	1069,56 [192,0; 2258,9] $p<0,001^{**}$	1499,0 [598,9; 3117,5] $p<0,001^{**}$	0,135
CCL18 базальный	1,9 [0,1; 5,35]	50,0 [2,9; 71,0]	0,014*	3,52 [0,0; 10,92]	8,0 [3,38; 23,30]	0,013*
CCL18 стимулированный	20,0 [2,7; 115,06] $p=0,017^*$	8,67 [2,3; 51,4] $p=0,594$	0,489	2,85 [1,0; 18,35] $p=0,024^*$	13,14 [4,74; 74,45] $p=0,008^*$	0,033*

Примечания: данные представлены в виде медианы и 25;75 квартилей (** $p<0,001$, * $p<0,05$). СДС – синдром диабетической стопы; СД2 – сахарный диабет 2 типа.

лительного фенотипа с активным стимуляционным ответом, $p < 0,05$, тогда как при длительном процессе, более 6 мес, стимуляционный противовоспалительный ответ отсутствует, $p = 0,033$, (рис. 2).

При пролонгации воспалительного процесса отмечается избыточная продукция TNF- α как отражение провоспалительного фенотипа и ослабление противовоспалительного ответа. По-видимому, нарушение равновесия M1 и M2 является одной из причин ингибирования стадии пролиферации и ремоделирования тканей, что может приводить к рецидивированию дефекта, не достигнув его закрытия. С этой целью мы попытались воздействовать на патогенетическое звено с помощью

метаболической терапии, поскольку результаты нашего исследования показали неблагоприятную картину состояния фенотипов именно у больных с нейропатической формой СДС. На 9-й день лечения отмечено снижение базальной секреции TNF- α на 25% ($p < 0,05$) и CCL18 – на 20% ($p < 0,05$) по сравнению с исходными значениями (см. рис. 2). При стимуляции моноцитов на 9-й день лечения отмечено снижение на 17% стимулированной секреции TNF- α ($p < 0,05$) по сравнению с исходным. Противовоспалительный маркер в ответ на стимуляцию IL-4 показал высокий потенциал к стимулированию, а именно 2,5-кратное повышение по сравнению с исходными значениями ($p < 0,05$) (рис. 3 А, В).

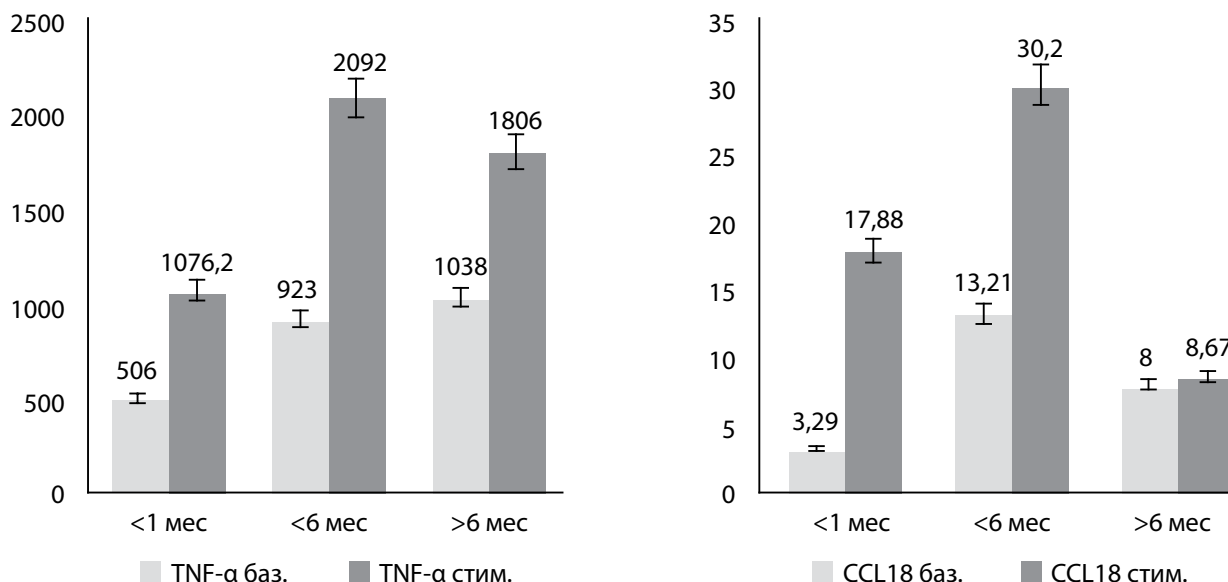


Рис. 2. Провоспалительная активация цитокина TNF- α и противовоспалительная активация хемокина CCL18 у пациентов с синдромом диабетической стопы ($n=42$) с различной продолжительностью язвенного процесса (от <1 до ≥ 6 мес). Двенадцать пациентов с продолжительностью менее 1 мес, 17 пациентов с продолжительностью от 1 до менее 6 мес и 13 пациентов с длительностью продолжительностью язвы более 6 мес. Гистограммы отображают срединные значения, а усы отражают IQR [Q25; Q75]. Уровень значимости рассчитан с использованием тестов Колмогорова–Смирнова и Манна–Уитни, * $p < 0,05$.

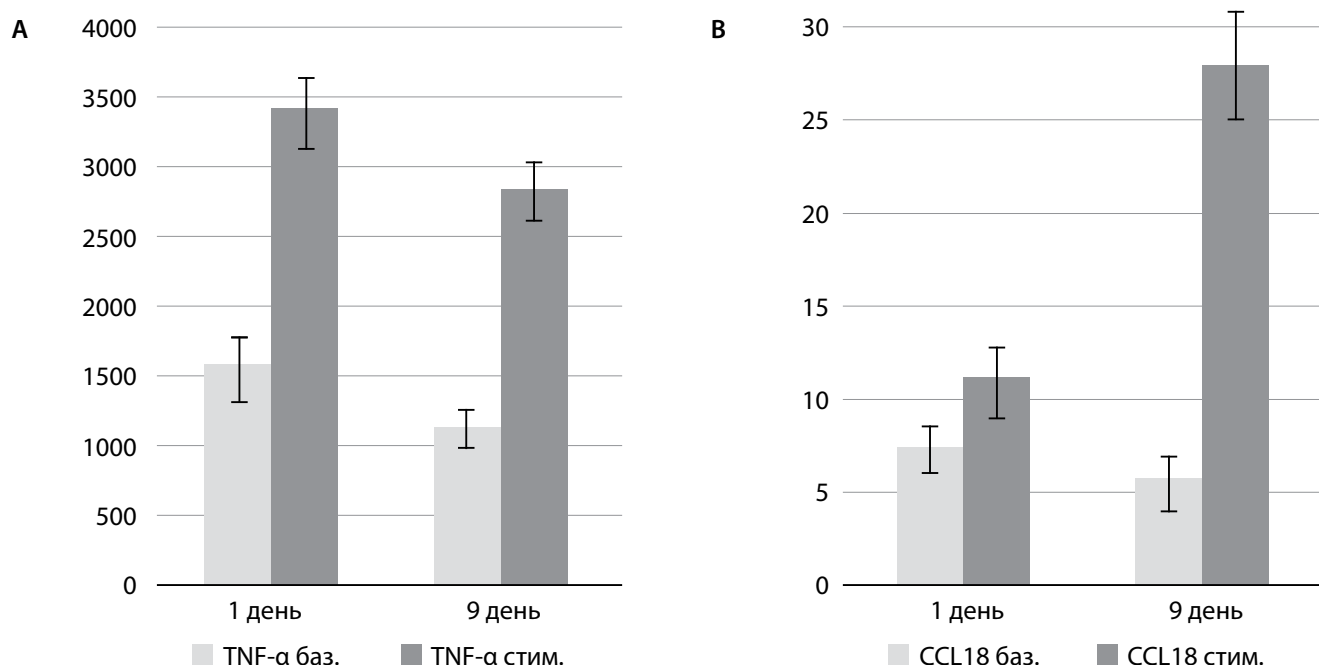


Рис. 3. Провоспалительная активация цитокина TNF- α и противовоспалительная активация хемокина CCL18 у пациентов с длительным течением язвенного процесса синдрома диабетической стопы ($n=18$). Гистограммы отображают срединные значения, а усы отражают IQR [Q25; Q75]. Уровень значимости рассчитан с использованием тестов Колмогорова–Смирнова и Манна–Уитни, * $p < 0,05$.

Таким образом, метаболическая терапия оказывает противовоспалительное действие на макрофагальное звено за счет подавления провоспалительного фенотипа и активации противовоспалительного ответа. Безусловно, для регулирования пропорционального механизма своевременного переключения с фенотипа M1 на M2 необходимо не только устранение дисбаланса в системе «оксиданты-антиоксиданты», но и применение иммунокорректирующей терапии, особенно у пациентов с длительным язвенным дефектом – более 6 мес.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно нашим предыдущим исследованиям, у пациентов с впервые выявленным СД2, которые не получали гипогликемическую терапию, отмечалось значительное усиление стимулированной провоспалительной и противовоспалительной активации моноцитов по сравнению со здоровыми донорами [15]. Оценивая активацию моноцитов у этих пациентов с СД2, мы обнаружили более выраженный стимулированный про- и противовоспалительный ответ по сравнению с пациентами с длительным анамнезом заболевания. Это может быть связано с влиянием более высокой гликемии ($HbA_{1c}=9,9\%$) и, как результат, глюкоотоксичности на поляризацию моноцитов по провоспалительному пути из-за более высокого ОС у нелеченых пациентов, что включает в себя значительное образование свободных радикалов, продуктов неферментного гликирования, приводя к активации NF- κ B, который запускает секрецию провоспалительных цитокинов [8].

Разница в базальной секреции провоспалительного цитокина между пациентами с ДСПН без СДС и с СДС не достигла статистической значимости ($p=0,118$). Однако тенденция к повышению базального уровня секреции TNF моноцитами у пациентов с СД2 без СДС может отражать повышенную провоспалительную активность моноцитов, что может способствовать постепенному образованию язвенного повреждения стоп. В результате язвенный дефект, в свою очередь, может больше не требовать высокой активности врожденного иммунитета, что выражается в относительном снижении секреции базального ФНО моноцитами.

По нашим данным, у пациентов с нелеченым СД2 выявлены высокий уровень базального противовоспалительного ответа и его значительная (примерно в 40 раз) активация при стимуляции IL-4. Пациенты с длительным анамнезом заболевания показали чрезвычайно низкую активацию моноцитов на противовоспалительный ответ, что определяется секрецией CCL18 культивируемыми моноцитами. Кроме того, базальный уровень CCL18 у пациентов ДСПН без СДС составлял всего 3,0 пг/мл, но демонстрировал умеренную активацию (в 2,23 раза) при стимуляции IL-4, что является косвенным свидетельством отсутствия периферического воспаления и потенциальной способности к M2 активации к поляризации у этих пациентов. В отличие от этого, у пациентов с СДС наблюдалась более высокая базальная секреция CCL18 по сравнению с пациентами без СДС, которая, однако, не превышала уровень противовоспалительных цитокинов у пациентов с впервые выявленным СД2, что указывает на наличие воспалительного процесса.

Однако стимуляция противовоспалительной активности IL-4 не вызывала ожидаемой адекватной активации моноцитов по отношению к моноцитам с противовоспалительным ответом у этой категории пациентов и была даже ниже (только в 1,36 раза), чем у пациентов без СДС (см. табл. 2). У пациентов с длительным анамнезом СД2 наблюдалось снижение секреции CCL18 моноцитами, стимулированными IL-4, по сравнению с впервые выявленного СД2. Учитывая такое снижение способности индуцированной противовоспалительной активации моноцитов во время длительного течения заболевания, мы рассматриваем это как результат истощения способности моноцитов формировать противовоспалительный ответ на фоне хронического воспаления. Однако конкретные механизмы, ответственные за такое снижение, остаются неясными.

Таким образом, наши результаты *ex vivo* согласуются с данными литературы о повышении провоспалительной активности и снижении противовоспалительной активности при диабетических ранах *in situ* у мышей и людей [16]. В попытке приблизиться к ответу на вопрос, с чем связана такая дисрегуляция в поляризации моноцитов-макрофагов у пациентов с язвенными дефектами при СД2, мы оценивали влияние степени компенсации углеводного обмена на дифференцировку фенотипов моноцитов. В качестве целевого уровня компенсации углеводного обмена в соответствии с международными рекомендациями для пациентов старше 60 лет был выбран уровень $HbA_{1c} \leq 7,5\%$. По нашим данным, у пациентов с язвенными дефектами при $HbA_{1c} \leq 7,5\%$ нет стимуляции к пролиферации по провоспалительному фенотипу и падает противовоспалительный (M2) ответ при стимуляции IL-4. В условиях декомпенсации углеводного обмена провоспалительная поляризация моноцитов-макрофагов у пациентов с язвенными дефектами при стимуляции значительно повышается ($p < 0,001$), в то время как поляризация по M2-фенотипу стимулируется незначительно. У пациентов с ДСПН без язвенных дефектов мы не выявили стимуляции провоспалительного ответа при $HbA_{1c} \leq 7,5\%$, но отмечался активный стимуляционный противовоспалительный (M2) ответ. При декомпенсации углеводного обмена ($HbA_{1c} \geq 7,5\%$) у этих пациентов не отмечалось выраженной провоспалительной поляризации и, соответственно, отсутствовал противовоспалительный ответ. При этом у пациентов без язвенных дефектов при $HbA_{1c} \geq 7,5\%$ отмечена корреляционная зависимость ($r=0,574$; $p=0,010$) между базальным уровнем TNF α и HbA_{1c} , а при наличии язвенных дефектов – прямая корреляция между уровнем HbA_{1c} и стимулированным маркером воспаления TNF α , пг/мл ($r=0,726$; $p=0,027$) и обратная – между HbA_{1c} и противовоспалительным маркером CCL18 ($r=-0,949$, $p=0,051$). Таким образом, наши результаты показывают несомненную связь декомпенсации углеводного обмена и индукции хронического воспаления у больных с язвенными дефектами стопы. Современные данные связывают этот феномен с активацией продукции свободных радикалов, индукцией ОС, запускающего цепочку последовательных событий, которые в конечном итоге приводят к дисбалансу и нарушению регуляции иммунной функции и пролонгации воспаления [17].

Развитие диабетической язвы стопы характеризуется чрезмерным и длительным воспалением, что обуславливает плохое заживление диабетических язв. Тем не менее основные механизмы, способствующие чрезмерному воспалению, остаются плохо изученными. Процесс заживления ран также связан с пластичностью макрофагов, так как они участвуют в гомеостазе и ремоделировании тканей [18], поскольку регенеративная способность сопряжена с секретируемыми M2 макрофагами факторами роста, которые стимулируют пролиферацию фибробластов. Дисрегуляция поляризации макрофагов является одной из основных причин замедленного заживления ран [19]. Мы изучали поляризацию макрофагов в крови пациентов с различной длительностью раневого процесса. Наши результаты показали значительное снижение противовоспалительного ответа по мере прогрессирования длительности язвенного дефекта, что, безусловно, свидетельствует о роли иммунной системы в процессе заживления диабетических язв и может быть обусловлено влиянием гипергликемии с развитием ОС, что приводит к изменению поляризации макрофагов и подавлению процесса заживления язвы. Фазы процесса заживления у больных СД также подавляются и другими факторами, в том числе специфическими метаболическими нарушениями и нарушенными физиологическими реакциями, такими как гипоксия из-за гликирования гемоглобина, изменения мембраны эритроцитов и сужения кровеносных сосудов.

Витамины группы В в монотерапии или в виде комплексных препаратов используются для лечения повреждений центральной и периферической нервной системы: уменьшают симптомы нейропатической боли [20] и улучшают регенеративную способность нервной ткани [21]. Экспериментальное доклиническое изучение на крысах со стрептозотоцин-индуцированной диабетической полинейропатией подтвердило роль витаминов группы В в восстановлении проведения нервного импульса по большеберцовым нервам (SI и SII) к иннервируемым мышцам. Показано, что лечение комплексом витаминов группы В уменьшает экспрессию провоспалительных и повышает экспрессию противовоспалительных цитокинов, тем самым способствуя разрешению невровоспаления. Параллельно витамины группы В снижали количество макрофагов M1 и увеличивали количество противовоспалительных M2-клеток [22]. Авторы этих экспериментальных работ определили цитокинмодулирующее влияние витаминов группы В как положительное патогенетическое воздействие на поврежденную нервную ткань. В этом ряду применение метаболической терапии, включающей витаминотерапию (бенфотиамины, цианокобаламин), давно и хорошо себя зарекомендовавшей, а также кофакторов ферментов, участвующих в энергетических обменных процессах (кокарбоксилаза, карнитин, гамма-линоленовая кислота), является вполне обоснованным. Недавно в России появился новый комбинированный метаболический препарат этого ряда – Кокарнит (*WorldMedicine*). Препарат состоит из 20 мг никотинамида, 50 мг кокарбоксилазы, 0,5 мг цианокобаламина, 10 мг динатрия аденозинтрифосфата тригидрата.

Никотинамид (витамин В₃) – водорастворимый витамин, который, благодаря своим антиоксидантным свой-

ствам [23], является мягким ингибитором поли-АДФ-рибозы-полимераза (ПАРП) и предшественником НАД⁺. Таким образом, никотинамид активизирует окисление глюкозы по гликолитическому и пентозофосфатному путям, препятствуя прогрессированию дислипидемии и глюконеогенезу. Положительное влияние никотинамида на нарушения чувствительности и нервной проводимости, а также на эндотелиальную дисфункцию согласуется с ключевой ролью активации ПАРП ОС в развитии ДСПН. Подтверждением этого факта являются многочисленные исследования, выявившие положительный эффект никотинамида в эксперименте на нервную проводимость и кровоток в нервах крыс со стрептозотоциновым СД, снижение перекисного окисления липидов (ПОЛ) и образование свободных радикалов и вторичных продуктов ПОЛ в культуре шванновских клеток человека, инкубируемых в среде с высоким содержанием глюкозы [24]. Как препарат с множественными эффектами, который может использоваться у человека в высоких дозах ввиду малой токсичности, никотинамид может рассматриваться в качестве кандидата для лечения ДСПН.

Кокарбоксилаза (тиаминдифосфат) является готовой формой кофермента, образующегося из тиамин (витамина В₁) в процессе его превращения в организме. Витамин В₁, или тиамин, широко используется многие десятилетия для лечения различных неврологических заболеваний периферической нервной системы. При СД оказывает влияние на процессы ОС путем увеличения активности транскетолазы – фермента, регулирующего углеводный обмен, что нормализует содержание промежуточных продуктов обмена глюкозы за счет активации пентозофосфатного шунта. При этом уменьшается активность ПКС, снижается транскрипция NF-κB, уменьшается продукция эндотелиальной синтазы оксида азота и эндотелина-1, снижается содержание метилглиоксала в цитоплазме клеток [25].

Тиамин также уменьшает изменения, связанные с активацией полиолового пути утилизации глюкозы, в первую очередь обусловленные истощением содержания антиоксидантного фермента восстановленного глутатиона и накоплением сорбитола. Известно, что тиамин, локализуясь в мембранах нервных клеток, оказывает существенное влияние на процессы регенерации поврежденных нервных окончаний, а также участвует в обеспечении энергетических процессов в нервных клетках, в том числе аксоплазматического тока.

Дефицит витамина В₁₂ (кобаламина) связывают с развитием анемии, нарушением когнитивных функций и прогрессированием нейропатии, связанной с нарушением миелинизации нервных волокон. Положительный эффект применения препаратов кобаламина на эти патологические изменения выявлен в целом ряде клинических исследований при СД. Снижение концентрации витамина В₁₂ при СД связывают с ОС. Были продемонстрированы и антиоксидантные свойства витамина В₁₂ *in vitro* [26], показавшие, что его производные ингибируют продукцию внутриклеточного пероксида, поддерживают внутриклеточный уровень глутатиона и предотвращают апоптоз и некротическую гибель клеток. Поэтому назначение В₁₂ при ДСПН является патогенетически обоснованным.

Аденозинтрифосфат (АТФ) – нуклеозидтрифосфат, играющий исключительно важную роль в обмене энергии и веществ. АТФ относится к так называемым макроэргическим соединениям, то есть к химическим соединениям, содержащим связи, при гидролизе которых происходит освобождение значительного количества энергии. АТФ служит непосредственным источником энергии для множества энергозатратных биохимических и физиологических процессов. Известна роль АТФ в качестве медиатора в синапсах и сигнального вещества в других межклеточных взаимодействиях. Без учета физиологической роли внеклеточной АТФ трудно сейчас представить механизмы таких процессов, как восприятие болевых раздражителей, межклеточная передача возбуждения в центральной и периферической нервной системе, нейропротекторное действие эндогенных веществ, регуляция кровообращения и многое другое [27].

Кокарнит – комплексный метаболический препарат, составляющие которого известны как эффективные средства в лечении диабетической полинейропатии, был изучен в нескольких клинических исследованиях, показавших его положительное влияние данного осложнения, а также кардиальной автономной нейропатии.

В ранее проведенных клинических исследованиях проведено изучение эффективности комплексного метаболического препарата Кокарнит у пациентов с ДСПН при применении в виде монотерапии в дозе 2 мл ежедневно в течение 9 дней. В результате проведенного лечения наблюдалось улучшение показателей по PainDetect на 44,3% ($p < 0,05$), NSS на 41,9% ($p < 0,05$) и TSS на 103,9% ($p < 0,05$) [28].

В другом сравнительном исследовании также наблюдалась статистически значимая положительная динамика по шкалам VAS ($p = 0,0001$), TSS ($p = 0,0001$), NSS ($p = 0,001$), NDS ($p = 0,0431$), SF-36 ($p = 0,0008$); результатам электронейромиографических обследований и определению уровня гликированного гемоглобина в группе пациентов, получавших метаболическую терапию комплексом Кокарнит [29].

Оценка неврологического статуса с помощью стимулирующей электронейромиографии волокон малоберцового нерва (*n. peroneus*) продемонстрировала, помимо значительного улучшения состояния по шкалам NSS, TSS, NDS, уменьшение латентного периода, увеличение амплитуды М-ответа и скорости распространения возбуждения по *n. peroneus* [30].

Ограничения исследования

Ограничением настоящего исследования является отсутствие параллельного анализа про- и противовоспалительной активации моноцитов при ДСПН *in vitro*, *in vivo* и *in situ*, что могло бы расширить наше понимание регуляции воспалительных изменений в организме в развитии СДС и расширить возможности терапевтических подходов к контролю воспаления при таких ранах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, анализ полученных результатов свидетельствует о явном повышении провоспалительной поляризации моноцитов-макрофагов и снижении противовоспалительной активности у пациентов с СД2, зависящих от длительности анамнеза заболевания и степени компенсации углеводного обмена, что, возможно, является причиной развития вялотекущего, длительно незаживающего хронического течения раневого процесса. Метаболическая терапия препаратом Кокарнит способна воздействовать на этот процесс, оказывая противовоспалительное действие за счет подавления провоспалительной поляризации и активации противовоспалительного ответа моноцитов-макрофагов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Реактивы закупались за счет средств авторского коллектива.

Конфликт интересов. Рукопись не находится на рассмотрении в другом издании, не была ранее опубликована, содержит полное раскрытие конфликта интересов, все авторы ее читали и одобрили, авторы несут ответственность за достоверность представленных в рукописи материалов. Рукопись является частью диссертационной работы Галстян К.О.

Участие авторов. Ших Е.В., Недосугова Л.В., Махова А.А., Петунина Н.А. – концепция и дизайн исследования, редактирование текста, интерпретация результатов, написание и утверждение итогового варианта текста рукописи; Галстян К.О. – сбор и обработка материала, статистическая обработка результатов исследования, анализ данных, написание текста; Кириченко Т.В. – дизайн исследования, административная, экспериментальная; Городецкая Г.И. – контроль комплаентности назначения препарата; Колмычкова К.И. – методология, эксперименты. Все авторы внесли значимый вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas 9th edition*. Brussels; Belgium; 2019.
- Feldman EL, Callaghan BC, Pop-Busui R, et al. Diabetic neuropathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):41. doi: 10.1038/s41572-019-0092-1
- Гурьева И.В., Светлова О.В., Хлопина Х.М. Болевая диабетическая нейропатия: влияние «гипергликемической памяти» на патогенетические подходы к лечению // *Русский медицинский журнал*. — 2013. — №0. Специальный выпуск. Болевой синдром. — С. 27. [Gur'yeva IV, Svetlova OV, Khlolina KhM. Bolevaya diabeticheskaya neyropatiya: vliyaniye «giperqlikemicheskoy pamyati» na patogeneticheskiye podkhody k lecheniyu. *Russkii meditsinskii zhurnal*. 2013;(0; Special issue):27. (In Russ.)]
- Lotfy M, Adeghate J, Kalasz H, et al. Chronic complications of diabetes mellitus: A mini review. *Curr Diabetes Rev*. 2017;13(1):3–10. doi: <https://doi.org/10.2174/1573399812666151016101622>
- Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Свободно-радикальные процессы при заболеваниях сердечно-сосудистой системы // *Кардиология*. — 2000. — Т. 40. — №7. — С. 48–61. [Lankin VZ, Tikhaze AK, Belenkov YuN. Free radical processes in diseases of the cardiovascular system. *Cardiology*. 2000;40(7):48–61. (In Russ.)]
- Собенин И.А. Принципы патогенетической терапии атеросклероза. Использование клеточных моделей: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. — М., 2006. — 48 с. [Sobenin IA. Printsipy patogeneticheskoy terapii ateroskleroza. Ispol'zovaniye kletochnykh modeley. [dissertation abstract] Moscow; 2006. 48 p. (In Russ.)] Доступно по: <https://search.rsl.ru/ru/record/01003261829>. Ссылка активна на 14.03.2020.

7. Ley K, Miller YI, Hedrick CC. Monocyte and macrophage dynamics during atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(7):1506–1516. doi: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.221127>
8. Shin RH, Wang CY, Yang CM. NF-kappaB signaling pathways in neurological inflammation: a mini review. *Front Mol Neurosci.* 2015;8:77. doi: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00077>
9. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of Type 2 Diabetes. *Endocr Rev.* 2002;23(5):599–622. doi: <https://doi.org/10.1210/er.2001-0039>
10. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 2010;32(5):593–604. doi: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007>
11. Jain N, Moeller J, Vogel V. Mechanobiology of macrophages: how physical factors coregulate macrophage plasticity and phagocytosis. *Ann Rev Biomed Eng.* 2019;21:267–297. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-062117-121224>
12. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1111–1119. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI200525102>
13. Miao M, Niu Y, Xie T, et al. Diabetes-impaired wound healing and altered macrophage activation: a possible pathophysiological correlation. *Wound Repair Regen.* 2012;20(2):203–213. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2012.00772.x>
14. Negi G, Kumar A, Joshi RP, et al. Oxidative stress and diabetic neuropathy: current status of antioxidants. *IJAOB Journal.* 2011;2(6):71–78.
15. Nikiforov NG, Galstyan KO, Nedosugova LV, et al. Proinflammatory monocyte polarization in type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease. *Vessel Plus* 2017;1:192–195. <https://doi.org/10.20517/2574-1209.2017.21>
16. Mirza RE, Fang MM, Weinheimer-Haus EM, et al. Sustained inflammasome activity in macrophages impairs wound healing in Type 2 diabetic humans and mice. *Diabetes.* 2014;63(3):1103–1114. doi: <https://doi.org/10.2337/db13-0927>
17. MacLeod AS, Mansbridge JN. The innate immune system in acute and chronic wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2016;5(2):65–78. doi: <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0608>
18. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodeling. *Journal Pathol.* 2013;229(2):176–185. doi: <https://doi.org/10.1002/path.4133>
19. Mallik SB, Jayashree BS, Shenoy RR. Epigenetic modulation of macrophage activation-perspectives in diabetic wounds. *J Diabetes Complicat.* 2018;32(5):524–530. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2018.01.015>
20. Nedeljković P, Zmijanac D, Drašković P, Pavlović B, et al. Vitamin B complex treatment improves motor nerve regeneration and recovery of muscle function in a rodent model of peripheral nerve injury. *Arch Biol Sci.* 2017;69(2):361–368. doi: <https://doi.org/10.2298/abs160320114n>
21. Altun I, Kurutas EB. Vitamin B complex and vitamin B12 levels after peripheral nerve injury. *Neural Regen Res.* 2016;11(5):842–845. doi: <https://doi.org/10.4103/1673-5374.177150>
22. Ehmedah A, Nedeljkovic P, Dacic S, et al. Vitamin B complex treatment attenuates local inflammation after peripheral nerve injury. *Molecules.* 2019;24(24):4615. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules24244615>
23. Shen C-C, Huang H-M, Ou H-C, et al. Protective effect of nicotinamide on neuronal cells under oxygen and glucose deprivation and hypoxia/reoxygenation. *Biomed Sci.* 2004; 11(4):472–481. doi: <https://doi.org/10.1007/BF02256096>
24. Stevens MJ, Li F, Drel VR, et al. Nicotinamide reverses neurological and neurovascular deficits in streptozotocin diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;320(1):458–464. doi: <https://doi.org/10.1124/jpet.106.109702>
25. Raj V, Ojha S, Howarth FC, et al. Therapeutic potential of benfotiamine and its molecular targets. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018;22(10):3261–3273. doi: https://doi.org/10.26355/eurrev_201805_15089
26. Birch CS, Brasch NE, McCaddon A, Williams JH. A novel role for vitamin B(12): Cobalamins are intracellular antioxidants in vitro. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(2):184–188. doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.04.023>
27. Burnstock G, Khakh BS. The double life of ATP. *Sci Am.* 2009;301(6):84–92. doi: <https://doi.org/10.1038/scientificamerican1209-84>
28. Котов С.В., Исакова Е.В., Лиждвой В.Ю., и др. Эффективность препарата кокарнит при диабетической нейропатии // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* — 2018. — Т. 118. — №1. — С. 37–42. [Kotov SV, Isakova EV, Leidvoll VYu, et al. The efficacy of cocarnit in diabetic neuropathy. *J.S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry.* 2018;118(1):37–42. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.17116/jnevro20181181137-42>
29. Гацких И.В., Брикман И.Н., Газенкамф К.А., и др. Динамика неврологических нарушений на фоне комбинированной терапии у больных сахарным диабетом 2-го типа // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* — 2018. — Т. 118. — №6. — С. 31–36. [Gatskikh IV, Brickman IN, Gazenkampf KA, et al. Dynamics of neurological disorders during combination therapy in patients with type 2 diabetes. *J.S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry.* 2018;118(6):31–36. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.17116/jnevro20181186131>
30. Gensel JC, Zhang B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Res.* 2015;1619:1–11. doi: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.12.045>

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ [AUTHORS INFO]

*Галстян Карине Оганесовна, эндокринолог [Karina O. Galstyan, MD]; адрес: Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2 [address: 8/2 Trubetskaya, 119991 Moscow, Russia]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8059-0490>; eLibrary SPIN: 3724-2611; e-mail: karin_777@mail.ru

Петунина Нина Александровна, д.м.н., профессор, член-корр. РАН [Nina A. Petunina, MD, PhD, Professor]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9390-1200>; eLibrary SPIN 9784-3616; e-mail: napetunina@mail.ru

Недосугова Людмила Викторовна, д.м.н., профессор [Ludmila V. Nedosugova, MD, PhD, Professor]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6823-2487>; eLibrary SPIN: 1853-0215; e-mail: profmila@mail.ru

Ших Евгения Валерьевна, д.м.н., профессор [Evgenia V. Shikh, MD, PhD, Professor]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6589-7654>; eLibrary SPIN: 2397-8414; e-mail: chih@mail.ru

Кириченко Татьяна Владимировна, к.м.н., м.н.с. [Tatiana V. Kirichenko, MD, PhD, junior research associate]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2899-9202>; eLibrary SPIN: 4332-9045; e-mail: t-gorchakova@mail.ru

Колмычкова Кира Ивановна, старший лаборант [Kira I. Kolmychkova, senior assistant]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2953-5901>; eLibrary SPIN: 6813-329; e-mail: kirruccha@rambler.ru

Махова Анна Александровна, д.м.н., доцент [Anna A. Makhova, MD, PhD, associate professor]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9817-9886>; eLibrary SPIN: 9962-0676; e-mail: annabramova@gmail.com

Городецкая Галина Ивановна, старший аналитик, ассистент [Galina I. Gorodetskaya, senior analyst, assistant]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7322-33231>, eLibrary SPIN: 8346-3293; e-mail: ggorodetskaya@bk.ru

ЦИТИРОВАТЬ:

Ших Е.В., Петунина Н.А., Недосугова Л.В., Кириченко Т.В., Галстян К.О., Колмычкова К.И., Махова А.А., Городецкая Г.И. Спонтанная и индуцированная секреция провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у пациентов с сахарным диабетом 2 типа и синдромом диабетической стопы // *Сахарный диабет*. — 2020. — Т. 23. — №3. — С. 210-222. doi: <https://doi.org/10.14341/DM12343>

TO CITE THIS ARTICLE:

Shikh EV, Petunina NA, Nedosugova LV, Kirichenko TV, Galstyan KO, Kolmychkova KI, Makhova AA, Gorodetskaya GI. Spontaneous and induced secretion of the pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in patients with type 2 diabetes mellitus and diabetic foot syndrome. *Diabetes Mellitus*. 2020;23(3):210-222. doi: <https://doi.org/10.14341/DM12343>