

Метаболизм коллагена и коллагенолитическая активность сыворотки крови у больных сахарным диабетом 1 типа с нефропатией

И.А. Бондарь¹, В.В. Климонтов¹, Л.Б. Ким², Г.А. Березовская², О.А. Коржавина²

*Кафедра эндокринологии (зав. - проф. И.А. Бондарь)
Новосибирской государственной медицинской академии¹,
Лаборатория клинической биофизики (зав. - докт. мед. наук Л.Б. Ким)
научного центра клинической экспериментальной медицины СО РАМН²*

Диабетическая нефропатия (ДН) — одно из наиболее тяжелых и прогностически неблагоприятных осложнений сахарного диабета (СД). По данным Российского государственного регистра СД, уремия является причиной гибели 18% больных СД 1 типа [7]. Это определяет актуальность и клиническую значимость изучения механизмов развития ДН и выявления ее ранних маркеров.

По современным представлениям, ведущим фактором в развитии диабетического поражения почек являются гипергликемия и связанные с ней метаболические нарушения [2]. Последние затрагивают обмен макромолекул соединительной ткани, прежде всего коллагена. Морфологическими методами установлено, что накопление коллагена в базальных мембранах, мезангии клубочков и в интерстиции почек наблюдается уже на ранних стадиях ДН [14, 18, 19]. Причину этого пытаются найти в изменениях активности ферментных систем, вовлеченных в синтез и катаболизм коллагена [4, 15, 21]. Имеющиеся данные противоречивы. В одних экспериментальных исследованиях обнаружено повышение активности коллагенрасщепляющих ферментов в гомогенатах почек при СД [4], в других обнаружено ее снижение [15, 21].

Изменения обмена коллагена у пациентов с СД изучены недостаточно. Лишь единичные работы посвящены метаболизму коллагена на разных стадиях ДН [3, 20]. Нет данных о коллагенолитической активности (КЛА) крови и ее взаимосвязи с экскрецией метаболитов коллагена и выраженностью поражения почек у больных СД. Целью работы стало изучение интенсивности метаболизма коллагена и общей КЛА сыворотки крови у больных СД 1 типа с различными стадиями нефропатии.

Объем и методы исследования

Обследовано 62 больных СД типа 1 (28 мужчин и 34 женщины) в возрасте от 16 до 53 лет (средний возраст 30,6±9,6 лет). Длительность СД варьировала от 2 мес. до 28 лет, (в среднем 7,1±6,0 года). В исследование не включались больные с

заболеваниями почек недиабетического генеза, патологией костной системы, кетоацидозом.

В зависимости от наличия и выраженности ДН больные распределены на 3 группы: в 1-ю (ДН₀) вошли 20 больных с нормальной экскрецией белка с мочой, во 2-ю — 24 пациента с микроальбуминурией (ДН₁), в 3-ю — 18 больных с клинически выраженной ДН (ДН₂). Выделенные группы сопоставимы по половому, возрастному составу и степени компенсации СД. Пациенты с ДН отличались большей длительностью заболевания. У больных с протеинурией отмечена тенденция к снижению скорости клубочковой фильтрации. Нарушение клиренса креатинина выявлено у 6 больных группы ДН₂ (табл. 1). Контрольную группу составили 29 здоровых лиц от 18 до 48 лет (15 мужчин и 13 женщин).

Обследование включало определение гликемии, гликированного гемоглобина (HbA1c) хроматографическим методом на автоанализаторе «DiaSTAT» фирмы «BioRad» (США), клубочковой фильтрации по клиренсу эндогенного креатинина, протеинурии стандартным методом. У больных без явной протеинурии исследовалась альбуминурия иммунохимическим полуколичественным методом с помощью тест-полосок «Микраль-Тест» фирмы «Boehringer Mannheim» (Австрия).

Для оценки метаболизма коллагена в утренней порции мочи определяли содержание пептидосвязанного и свободного гидроксипролина по методу П.Н. Шараева и соавт. [6]. Сумму свободного и пептидосвязанного гидроксипролина обозначали как общий гидроксипролин. Результаты приводили к величине экскре-

Таблица 1

Показатель	Характеристика групп больных СД типа 1 с различными стадиями нефропатии.		
	Группа обследованных		
	ДН ₀ (n=20)	ДН ₁ (n=24)	ДН ₂ (n=18)
Пол, м/ж	9/11	11/13	8/10
Возраст, годы	30,1±6,8	29,2±11,3	33,1±9,9
Длительность СД, годы	3,2±2,9	6,7±5,1*	12,1±6,5**
HbA1c, %	13,2±2,5	14,3±3,1	11,9±3,3
Среднесуточная гликемия, ммоль/л	9,2±3,2	9,5±2,2	8,5±2,5
Скорость клубочковой фильтрации, мл/мин	102,4±21,9	106,6±17,8	96,5±24,0

Примечание: звездочки - достоверные (p<0,05) различия: одна - с группой ДН₀, две - с группой ДН₀ и ДН₁.

тируемого креатинина. КЛА сыворотки крови определяли путем 4-часовой инкубации образцов сыворотки с нативным коллагеном с последующим определением продуктов его распада по гидроксипролину [5]. В качестве субстрата использовали коллаген фирмы «Технология-Стандарт» (Барнаул, Россия).

Статистическая обработка проведена с использованием пакета STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001) и программы BIOSTATISTICA 4.03 (S. A. Glantz, McGraw Hill, перевод на русский язык – «Практика», 1998). Применяли дисперсионный анализ (ANOVA), корреляционный анализ по Пирсону, многофакторный регрессионный пошаговый анализ. Нормальность распределения проверяли по критерию Шапиро-Уилкса, различия количественных данных оценивали по критерию Стьюдента. В случае множественных сравнений применяли поправку Бонферрони. Данные представлены как средние и стандартные отклонения ($M \pm SD$).

Результаты

У больных СД выявлено достоверное увеличение содержания общего гидроксипролина в моче в сравнении с контрольной группой ($6,62 \pm 4,75$ мг/ммоль креатинина, в контроле – $4,49 \pm 2,34$; $p=0,03$). Наиболее выраженным было повышение экскреции пептидно-связанного гидроксипролина ($5,27 \pm 4,12$ и $3,37 \pm 1,84$ мг/ммоль креатинина соответственно, $p=0,02$). Тенденция к повышению экскреции свободного гидроксипролина не достигала степени статистической значимости ($p>0,05$).

Экскреция пептидносвязанного гидроксипролина зависела от стадии нефропатии (табл. 2). У пациентов с нормоальбуминурией показатель достоверно не отличался от контроля, у больных с микроальбуминурией его величина превышала контроль в среднем в 1,8 раза ($p=0,01$), а у больных с протеинурией – в 2 раза ($p=0,03$). По мере увеличения тяжести нефропатии повышалось

Таблица 2

Экскреция гидроксипролина с мочой (мг/ммоль креатинина) у больных СД 1 типа с различными стадиями нефропатии.				
Показатель	Группы обследованных			
	контроль (n=29)	ДН ₀ (n=24)	ДН ₁ (n=20)	ДН ₂ (n=18)
Общий гидроксипролин	$4,49 \pm 2,34$	$4,88 \pm 4,03$	$7,41 \pm 3,86^*$	$8,05 \pm 5,94^*$
Пептидно-связанный гидроксипролин	$3,37 \pm 1,84$	$3,71 \pm 3,18$	$5,92 \pm 3,42^*$	$6,64 \pm 5,30^*$
Свободный гидроксипролин	$1,12 \pm 0,86$	$1,17 \pm 1,21$	$1,49 \pm 1,06$	$1,40 \pm 0,92$
Отношение пептидно-связанный/свободный гидроксипролин	$3,00 \pm 1,37$	$3,17 \pm 1,44$	$3,98 \pm 1,35^*$	$4,75 \pm 1,85^*$

Примечание: звездочка – достоверное ($p<0,05$) различие с контролем.

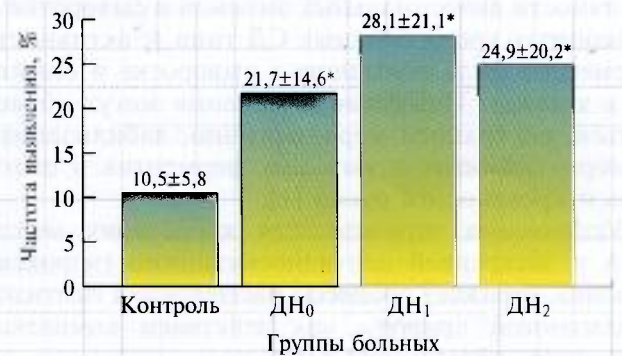
отношение пептидносвязанного гидроксипролина к свободному.

Среднее значение КЛА сыворотки крови у обследованных больных СД оказалось в 2,4 раза выше, чем у здоровых лиц ($25,7 \pm 18,1$ и $10,5 \pm 5,8$ мкмоль/л·ч соответственно, $p<0,001$). Достоверное повышение КЛА обнаружено у больных с нормальной экскрецией альбумина, наиболее высокие значения – у пациентов с начинающейся ДН (см. рисунок). В группе больных с выраженной нефропатией среднее значение КЛА оказалось несколько ниже, чем у пациентов с микроальбуминурией. При анализе индивидуальных показателей установлено, что величина КЛА в этой группе варьировала в широком диапазоне от низких до очень высоких величин ($7-63,5$ мкмоль/л·ч), низкие и нормальные показатели наблюдались у больных с нефротическим синдромом и массивной протеинурией.

С помощью многофакторного регрессионного анализа нами изучена зависимость экскреции пептидносвязанного ГП и КЛА от пола, возраста пациентов, длительности СД, стадии ретинопатии и нефропатии, показателей среднесуточной гликемии и уровня HbA1c. Установлено независимое влияние на экскрецию ГП длительности заболевания и уровня HbA1c ($\beta=0,48$ и $\beta=0,39$ соответственно; скорректированный коэффициент детерминации $R^2=0,33$, $F=4,06$, $p=0,01$). Факторами, значимо ассоциированными с КЛА, оказались выраженность ДН и уровень гликемии ($\beta=0,51$ и $\beta=0,49$; скорректированный коэффициент детерминации $R^2=0,38$, $F=3,41$, $p=0,04$).

При корреляционном анализе выявлена отрицательная взаимосвязь между величиной КЛА и экскрецией пептидно-связанного ГП ($r=-0,49$, $p<0,05$). Значимой корреляции между КЛА и экскрецией свободного ГП не установлено ($p>0,05$).

Обсуждение



КЛА сыворотки крови (мкмоль/л·ч) у больных СД 1 типа с различной выраженностью ДН. Примечание: звездочка – достоверное ($p<0,05$) различие с контролем.

Полученные данные свидетельствуют об интенсификации метаболизма коллагена при СД типа 1; на это указывает повышение экскреции пептидновязанного гидроксипролина с мочой. Считается, что уровень пептидновязанного гидроксипролина отражает одновременно степень распада и скорость биосинтеза коллагена [3]. Увеличение экскреции этой фракции гидроксипролина наблюдалось нами уже на начальных стадиях поражения почек. Это соответствует результатам исследований, показавших увеличение экскреции коллагена IV типа (коллаген базальных мембран) у больных СД с ранними стадиями нефропатии [13, 18]. Очевидно, гиперэкскреция с мочой гидроксипролинсодержащих пептидов отражает процессы избыточного синтеза и частичного распада коллагена в клубочках и интерстиции почек при СД.

Нами впервые зафиксировано повышение КЛА сыворотки крови у больных с ДН. Известно, что суммарная КЛА складывается из активности ферментов лизосомального и нелизосомального происхождения, прежде всего матричных металлопротеиназ (коллагеназ, желатиназ) и катепсинов. Имеются сообщения об увеличении активности некоторых ферментов этой группы при СД, однако сведения о ее взаимосвязи с ДН неоднозначны. I. Ebihara и соавт. [12] выявили, что повышение активности в плазме крови металлопротеиназы 9-го типа является предиктором развития ДН у больных СД типа 2. Маркером ДН при СД 1 типа оказалась активность металлопротеиназ 2-го и 9-го типа в моче [10].

Очевидно, повышение сывороточной КЛА связано с выходом ферментов из тканей в кровяное русло в результате изменения проницаемости клеточных мембран. Выраженность этих изменений, по-видимому, зависит от степени компенсации СД, чем объясняется положительная корреляция между среднесуточной гликемией и КЛА. Ранее нами обнаружены разнонаправленные изменения активности лизосомальных энзимов в сыворотке и лейкоцитах крови больных СД типа 1: активность ферментов была повышена в сыворотке и снижена в клетках. Подобные изменения могут объясняться, по крайней мере частично, лабилизацией мембран лизосом и выходом ферментов в цитозоль и кровеносное русло [1].

Установлена отрицательная корреляция между КЛА и экскрецией пептидновязанного гидроксипролина, отражает процессы расщепления пептидов коллагеновой природы под действием комплекса ферментов, обладающих КЛА.

Обнаруженная нами взаимосвязь КЛА с выраженностью ДН позволяет предполагать вклад изменений активности коллагенрасщепляющих

энзимов в формирование данного осложнения. Увеличение КЛА при ДН осуществляется на фоне значительного усиления синтеза коллагена в почках. Пусковым фактором гиперпродукции коллагена является гипергликемия. Эпителиальные, эндотелиальные и мезангиальные клетки почечных клубочков усиливают синтез коллагена IV типа в условиях повышенного уровня глюкозы [10]. В качестве медиаторов активации синтеза коллагена выступают некоторые цитокины и ростовые факторы, в частности, фактор роста β [9]. Об усилении синтеза коллагена у больных СД свидетельствует увеличение уровня коллагена IV типа [22], пептидновязанного гидроксипролина и белковосвязанного гидроксипролина [3] в сыворотке крови. Установлен факт накопления коллагена III, IV [19] и VI типа [17] в почечных клубочках при СД. Эти изменения являются звеном развития диабетического гломерулосклероза.

При активации синтеза коллагена повышение КЛА могло бы стать своеобразным противовесом, направленным на предотвращение избыточной аккумуляции коллагена в тканях. Однако при СД коллагенолитическим ферментам «приходится иметь дело» с коллагеном с измененной структурой и физико-химическими свойствами. Хроническая гипергликемия интенсифицирует процессы неферментативного гликирования коллагена, что приводит к накоплению в тканях, в том числе в почках, промежуточных и поздних продуктов его гликации; последние обладают меньшей растворимостью и повышенной устойчивостью к действию коллагеназ [16]. Повышение экскреции гидроксипролина с мочой отражает интенсивный катаболизм вновь синтезированного коллагена. Гликация коллагена может также изменять продукцию и/или активность коллагенолитических ферментов *in situ*. В культуре клеток установлено, что гликированный коллаген модифицирует функцию мезангиоцитов, снижая продукцию ими металлопротеиназы типа 2, расщепляющей коллаген IV типа, и повышая продукцию ингибиторов металлопротеиназы 1 типа [8]. Следовательно, можно говорить об относительной недостаточности активности коллагенолитических ферментов в почках при СД, о чем свидетельствует отсутствие достоверного роста экскреции свободного гидроксипролина при одновременном значительном увеличении экскреции пептидновязанного гидроксипролина и соотношения пептидновязанный/свободный гидроксипролин у пациентов с ДН.

Обнаруженное нами снижение КЛА у больных с массивной протеинурией, по-видимому, объясняется потерей коллагенолитических ферментов с

мочой. Это может усугублять дефицит коллагенрасщепляющих ферментов и в условиях активного синтеза коллагена приводить к быстрому прогрессированию гломерулосклероза.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о значительной интенсификации обмена коллагена у больных СД I типа и позволяют предполагать вклад этих нарушений в развитие нефропатии.

Определение экскреции пептидносвязанного гидроксипролина с мочой и общей КЛА сыворотки крови можно использовать для оценки метаболизма коллагена у пациентов с СД.

Изменения метаболизма коллагена при СД появляются еще на доклинических стадиях нефропатии, что указывает на необходимость раннего назначения препаратов, препятствующих накоплению коллагена в почках.

Литература

1. Бондарь И. А., Пупышев А. Б., Климентов В. В. // Пробл. эндокринологии. – 2000. – Т. 46, № 5. – С. 3-6.
2. Дедов И. И., Шестакова М. В. Диабетическая нефропатия. – М., 2000. – 239 с.
3. Казакова И. А., Трусов В. В., Черемискина И. Б. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2003. – № 10. – С. 19-22.
4. Трофимова С. Р., Бутолин Е. Г. // Патол. физиол. эксп. тер. – 1998. – № 4. – С. 27-28.
5. Шараев П. Н., Пишков В. Н., Зворыгина Н. Г. и др. // Лаб. дело. – 1987. – № 1. – С. 60-62.
6. Шараев П. Н., Ботникова Е. А., Иванов В. М. и др. // Лаб. дело. – 1990. – № 12. – С. 23-25.
7. Шестакова М. В., Сунцов Ю. И., Дедов И. И. // Сахарный диабет. – 2001. – № 3. – С. 2-4.
8. Anderson S. S., Wu K., Nagase H. et al. // Cell Adhes. Commun. – 1996. – Vol. 4, N 2. – P. 89-101.
9. Chen S., Jim B., Ziyadeh F. N. // Semin. Nephrol. – 2003. – Vol. 23, N 6. – P. 532-543.
10. Danne T., Spiro M. J., Spiro R. G. // Diabetes. – 1993. – Vol. 42, N 1. – P. 170-177.
11. Diamant M., Hanemaaijer R., Verheijen J. H. et al. // Diabet. Med. – 2001. – Vol. 18, N 5. – P. 423-424.
12. Ebihara I., Nakamura T., Shimada N., Koide H. // Am. J. Kidney Dis. – 1998. – Vol. 32, N 4. – P. 544-550.
13. Ellis D., Forrest K. Y., Erbey J., Orchard T. J. // Clin. Chem. – 1998. – Vol. 44, N 5. – P. 950-956.
14. Gilbert R. E., Cox A., Wu L. L. et al. // Diabetes. – 1998. – Vol. 47, N 3. – P. 414-422.
15. McLennan S. V., Kelly D. J., Cox A. J. et al. // Diabetologia. – 2002. – Vol. 45, N 2. – P. 268-275.
16. Monnier V. M., Glomb M., Elgawish A., Sell D. R. // Diabetes. – 1996. – Vol. 45, Suppl. 3. – P. S67-S72.
17. Nerlich A. G., Schleicher E. D., Wiest I. et al. // Kidney Int. – 1994. – Vol. 45, N 6. – P. 1648-1656.
18. Okonogi H., Nishimura M., Utsunomiya Y. et al. // Clin. Nephrol. – 2001. – Vol. 55, N 5. – P. 357-364.
19. Razzaque M. S., Koji T., Taguchi T. et al. // J. Pathol. – 1994. – Vol. 174, N 2. – P. 131-138.
20. Selby P. L., Shearing P. A., Marshall S. M. // Diabet. Med. – 1995. – Vol. 12, N 3. – P. 240-243.
21. Song R. H., Singh A. K., Leehey D. J. // Am. J. Nephrol. – 1999. – Vol. 19, N 3. – P. 441-446.
22. Xu X., Wu Z., Zhou Q. et al. // Ren. Fail. – 2002. – Vol. 24, N 6. – P. 747-753.