

*М. А. Машкова¹, Т. В. Мохорт¹, В. А. Горанов¹, Е. И. Шишко¹,
Л. А. Хватова¹, О. Ю. Сыманович¹, И. С. Пукита²*

МЕСТНЫЙ И СИСТЕМНЫЙ ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ С ХРОНИЧЕСКИМИ ЯЗВАМИ СТОП

*УО «Белорусский государственный медицинский университет¹»,
УЗ «Городской эндокринологический диспансер» г. Минска²*

Цель исследования: изучить взаимосвязь между уровнем про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови и раневом отделяемом у пациентов с синдромом диабетической стопы (СДС), скоростью заживления язвенных дефектов стоп и степенью компенсации сахарного диабета (СД). Результаты: выявлена положительная корреляционная связь между

уровнем ИЛ-6 и ИЛ-1 в сыворотке крови и ИЛ-8 в раневом отделяемом у пациентов с СДС и уровнем HbA1c; а также уровнем ИЛ-4 в раневом экссудате и скоростью заживления язв ($r = 0,645$; $p = 0,002$). Заключение: определение местного цитокинового статуса (экссудат раневого отделяемого) является не менее информативным, чем определение цитокинов в сыворотке крови, так как цитокины при иммунном ответе не всегда поступают в системный кровоток, а выделяются и реализуют свое действие непосредственно в очаге воспаления.

Ключевые слова: синдром диабетической стопы, язвы стоп, интерлейкины, местный и системный цитокиновый статус, HbA1c.

**M. A. Mashkova, T. V. Mokhort, V. A. Goranov, A. I. Shyshko,
L. A. Chvatova, O. Y. Symanovich, I. S. Pukita**

LOCAL AND SYSTEMIC CYTOKINE STATUS IN PATIENTS WITH DIABETIC FOOT SYNDROME WITH CHRONIC FOOT ULCERS

Objective: to study the relationship of cytokines level in patients with diabetic foot syndrome (DFS) with ulcers healing rate and diabetes compensation. Results: the correlation analysis revealed positive correlation between HbA1c and serum IL-1 and IL-6 level and IL-8 level in ulcers exudate in the DFS group. Significant positive correlation was also revealed between IL-4 in ulcer exudate and wound healing rate ($r = 0,645$, $p = 0,002$). Conclusion: thus, estimation of the local cytokine status is as informative as evaluation of cytokines level in the blood flow, since cytokines do not always enter the systemic circulation, but are released and act directly at the site of inflammation.

Key words: diabetic foot syndrome, foot ulcer, interleukins, local and systemic cytokine status, HbA1c.

Синдром диабетической стопы (СДС) – одно из поздних осложнений СД. Наиболее распространенной формой СДС является язвенное поражение стоп. Причём, первичная заболеваемость составляет 2–4% в год в развитых странах и, вероятно, ещё выше в развивающихся, а риск рецидива у пациентов с язвой стопы в анамнезе доходит до 30–40% в течение первого года после заживления язвенного дефекта [3]. Распространенность язвенных поражений стоп колеблется от 1% по данным европейских и североамериканских исследований до более чем 11% по данным некоторых африканских стран. В развитых странах СД является основной причиной нетравматических ампутаций, и около 1% всех пациентов с СД в будущем угрожает ампутация нижней конечности [2].

СДС имеет сложный многофакторный патогенез. Общепринятыми в развитии и персистенции язвенных дефектов стоп являются диабетическая полинейропатия, деформации и перераспределение давления в области стопы, уменьшение подвижности суставов, травмы (в том числе и микротравмы) и заболевание периферических артерий [9].

Широко обсуждается роль иммунологических факторов в нарушении репаративных процессов при СДС. В течении любого раневого процесса в норме выделяют 4 фазы: гемостаза, воспаления, фазу пролиферации и ремоделирования, которые плавно перетекают друг в друга [1]. Однако при СД наблюдается нарушение стадийности раневого процесса, что приводит к персистенции язвенных дефектов и их неспособности к нормальному заживлению. Язвы стоп при СД имеют характеристики «хронической раны», отмечается выраженный дисбаланс экспрессии множества про- и противовоспалительных цито-

кинов, как на системном, так и локальном уровнях [1]. Поэтому важным представляется изучение и выделение группы иммунологических маркеров, определяющих формирование и лимитирующих заживление язвенных дефектов, что позволит прогнозировать течение раневого процесса и проводить целенаправленную коррекцию терапии.

Цель исследования – провести оценку взаимосвязи между уровнем цитокинов (интерлейкинов 1, 4, 6, 8) в сыворотке крови и отделяемом трофических язв у пациентов СДС со скоростью заживления язвенных дефектов и степенью компенсации СД.

Материалы и методы. Исследование проводилось на базе отделения диабетической стопы УЗ «Городской эндокринологический диспансер» г. Минска. В исследование включено 20 пациентов с нейроишемической формой СДС и 20 пациентов с сахарным диабетом без СДС в возрасте от 35 до 70 лет. Все пациенты с СДС имели хронические язвенные дефекты стоп с давностью появления более 2 месяцев и отсутствием признаков активной инфекции (оценивалось согласно классификационной системе для определения наличия и тяжести инфекции стопы, разработанной Американским обществом инфекционистов, и инфекционной части классификации PEDIS). У всех пациентов определялась пульсация на *a. dorsalis pedis* и *a. tibialis posterior*, лодыжечно-плечевой индекс (ЛПИ) был не менее 0,7. Пациенты с СДС использовали только ортопедическую обувь и стельки.

Критериями исключения являлись: наличие критической ишемии пораженной конечности, раны стоп Wagner 3-4, суммарная площадь всех язв, превышающая 5 см², острая и подострая стадии диабетической остеоартропатии, наличие в анамнезе или в настоящий

момент онкологических заболеваний, аутоиммунных заболеваний, поливалентной аллергии, острого нарушения мозгового кровообращения, тяжелой сердечной недостаточности (Н2Б-Н3), острого инфаркта миокарда, хронической болезни почек стадии 3б и выше, приём в настоящий момент или в анамнезе химиотерапевтических препаратов/иммуносупрессантов, иммуномодуляторов, глюкокортикостероидов, лучевая терапия; для женщин – беременность и кормление грудью; наличие психических заболеваний, в том числе злоупотребление алкоголем или наркотическими веществами; отказ пациента подписать информированное согласие на участие в исследовании.

Всем пациентам проводилось общеклиническое обследование и осмотр стоп, определение выраженности симптомов и признаков диабетической дистальной полинейропатии (шкалы Нейропатического симптоматического счета и Нейропатического дисфункционального счета (НДС)), определение HbA1c (методом жидкостной ионообменной хроматографии, анализатор D-10, «BIO-RAD», США), определение интерлейкинов-1, 4, 6, 8 в сыворотке крови и отделяемом из язв (методом иммуноферментного анализа лабораторными наборами «Вектор-Бест», РФ), общелабораторные обследования; определение площади поверхности раны проводилось с использованием программы «Wound Analyzer» (Lohmann & Rauscher, Австрия).

На первом визите проводилось общеклиническое обследование, забор отделяемого из язвы стопы, забор крови для определения цитокинов и определение площади язвенного дефекта. Повторный забор материала (кровь и отделяемое из язвы в группе СДС), а также повторное определение площади поверхности язвенного дефекта проводилось через 8 недель на фоне стандартной терапии.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета SPSS (версия 12.0). Использовались следующие методы: методы описательной статистики (результаты представлены в виде медианы (Me), нижних и верхних квартилей [25;75]); для сравнения двух выборок непараметрический критерий Вилкоксона; корреляционный анализ (Spearman rank correlation). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В таблицах 1 и 2 приведены основные клинические характеристики включенных в исследование пациентов и поражений стоп.

Таблица 1. Характеристика обследованных пациентов

Показатель	Группа СДС	Контроль	
Пол, n	Муж.	16 (80%)	14 (70%)
	Жен.	4 (20%)	6 (30%)
Возраст, годы*	58,40[54,36–64,23]**	59,34[52,11–63,54]	
Стаж диабета, годы*	9,0[5,0–20,0]**	8,8[4,0–20,0]	
ИМТ, кг/м ² *	31,70[25,35–36,57]**	30,21[23,96–35,89]	
HbA1c, %*	8,7[7,85–9,3]**	8,4[7,5–9,2]	
Глюкоза венозной плазмы натощак, ммоль/л*	9,05[7,0–10,25]**	8,6[6,5–10,85]	

* Данные представлены в формате Me [25–75].

** Нет достоверного различия по сравнению с группой контроля ($p > 0,05$).

Таблица 2. Характеристики поражения стоп в группе исследования

Показатель	Значение*
Длительность существования язвенного дефекта, месяцы	9,0 [2,13–12,0]
Площадь язвенного дефекта, мм ²	166,89 [99,88–329,40]
ЛПИ	0,9 [0,8–1,1]
Число баллов по шкале НДС	17,5 [13,13–19,63]

* Данные представлены в формате Me [25–75].

Как видно из таблицы 1, группа исследования и контрольная группа были сопоставимы по основным характеристикам – возрасту, ИМТ, уровню гликированного гемоглобина, стажу диабета. Все пациенты имели смешанную форму СДС без выраженной ишемии, что подтверждалось пальпируемой пульсацией на артериях стопы, ЛПИ не ниже 0,7, данными ультразвукового исследования артерий нижних конечностей.

В таблице 3 представлены полученные уровни цитокинов в сыворотке крови пациентов и отделяемом из язв. Как и ожидалось, медиана концентрации ИЛ-8 в раневом экссудате у пациентов с СДС составила 35,76 [33,94–37,84] пг/мл, что значительно превышало концентрацию данного цитокина у этих же пациентов в сыворотке крови 10,03 [7,87–11,47] ($p < 0,01$). Достоверных различий между уровнем ИЛ-8 в сыворотке у пациентов с СДС и группе контроля выявлено не было. Полученные результаты подтверждают данные о том, что ИЛ-8 действует в основном на локальном уровне. Однако при проведении корреляционного анализа достоверной связи между уровнем ИЛ-8 и скоростью заживления язвенных дефектов выявлено не было. Это может объясняться небольшим объемом выборки, недостаточным периодом наблюдения (8 недель). ИЛ-8 обладает провоспалительными свойствами, выраженными преимущественно на локальном уровне; основными биологическими эффектами его являются индукция хемотаксиса нейтрофилов, субпопуляций Т-лимфоцитов и базофилов, активация нейтрофилов к выбросу ферментов лизосом, «дыхательному взрыву» и дегрануляции, и, как следствие, усиление и пролонгация воспалительного процесса. В ряде исследований показано, что хроническая гипергликемия связана с базальной гиперэкспрессией гена ИЛ-8 и гиперпродукцией самого белка, что в свою очередь, приводит к нарушению заживления раневых дефектов [4]. В нашем исследовании была выявлена положительная корреляционная связь между уровнем HbA1c ИЛ-8 в отделяемом трофической язвы ($r = 0,664$; $p < 0,05$). Несмотря на хроническую базальную гиперэкспрессию ИЛ-8 при СД наблюдается недостаточный прирост его концентрации в ответ на повреждение [6]. Таким образом, при СД хроническое воспаление в коже ингибирует «острый воспалительный ответ», необходимый для заживления раневого дефекта.

Концентрация ИЛ-1 и ИЛ-6 в сыворотке, как молекул обладающих выраженным системным провоспалительным действием, была достоверно выше в группе пациентов с СДС, чем в группе контроля 94,68 [93,44–96,92] пг/мл против 34,95[34,50–35,61] пг/мл и 16,29[15,41–17,20] пг/мл против 9,19[9,08–9,50] пг/мл ($p < 0,05$), соответственно. При изучении связи между уровнями данных цитокинов

Таблица 3. Уровни цитокинов у пациентов с СД и группе контроля

Показатель	Группа	Сыворотка крови		Отделяемое из язвы
		Контрольная группа	Группа СД	Группа СД
ИЛ-1, пг/мл*		34,95[34,50–35,61]	94,68 [93,44–96,92]**	15,1 [12,89–17,12]
ИЛ-4, пг/мл*		8,13 [7,92–9,27]	6,41 [4,95–8,01]	6,49[5,95–7,01]
ИЛ-6, пг/мл*		9,19[9,08–9,50]	16,29[15,41–17,20]**	9,02 [8,12–10,03]
ИЛ-8, пг/мл*		9,41 [8,12–11,23]	10,03 [7,87–11,47]	35,76[33,94–37,84]

* Данные представлены в формате Ме [25–75].

** Достоверное различие по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

и степенью компенсации СД была выявлена положительная корреляционная связь между уровнем HbA1c и ИЛ-1 ($r = 0,673$; $p < 0,01$) и ИЛ-6 ($r = 0,670$; $p < 0,05$). Выявленная корреляция подтверждает, что неудовлетворительная компенсация СД с длительной гипергликемией приводит к индукции системного воспалительного процесса. Также выявлена зависимость между концентрацией ИЛ-1 и ИЛ-6 в сыворотке и концентрацией данных цитокинов в раневом экссудате – $r = 0,872$ и $r = 0,798$, $p < 0,05$, соответственно. Но, как и для ИЛ-8, достоверной связи между уровнем ИЛ-1 в экссудате и скоростью заживления язв не было выявлено. В литературе опубликованы данные, что, кроме хорошо изученного системного провоспалительного действия ИЛ-1, на локальном уровне повышение концентрации данного цитокина при СД подавляет экспрессию рецептора PPAR γ , который необходим для «переключения» провоспалительного M1 фенотипа макрофагов на противовоспалительный M2 [7]. Эти же авторы ранее продемонстрировали, что блокирование ИЛ1 β способствует процессу заживления раневых дефектов при СД [8].

При анализе влияния цитокинового статуса на скорость заживления язвенных дефектов, было выявлено, что медленное заживление сопровождалось снижением уровня ИЛ-4 в отделяемом из язв ($r = 0,645$; $p = 0,002$) (рисунок). Данная зависимость не определялась между

скоростью заживления язвенных дефектов и уровнем HbA1c. Связь между уровнем ИЛ4 и скоростью заживления язвенных дефектов при СД вполне логична, так как известно, что ИЛ-4 – цитокин с иммуномодулирующими свойствами; противовоспалительный цитокин, который при нормальном течении раневого процесса активирует M2 макрофаги и ограничивает воспаление. На сегодняшний день описана роль ИЛ 4 в развитии ревматических заболеваний, аутоиммунитета при СД 1 типа, его влияние на липидный, углеводный обмен, инсулинорезистентность, определена значимость в развитии ретино- и нефропатии, влияние на скорость заживления при раневых процессах различной этиологии у пациентов без нарушений углеводного обмена [10]. Однако данные о роли ИЛ-4 в заживлении язвенных дефектов стоп при СД практически отсутствуют. Группой бразильских авторов в 2016 году были опубликованы результаты исследования, в котором на фоне терапии глутамином наблюдалось увеличение концентрации ИЛ-4 и ряда других цитокинов в сыворотке крови, что клинически сопровождалось улучшением чувствительности на стопах; однако какие-либо данные о взаимосвязи между уровнем ИЛ-4 и скоростью заживления язв не представлены [5].

В заключение хотелось бы отметить, что во многих случаях определение местного цитокинового статуса био-

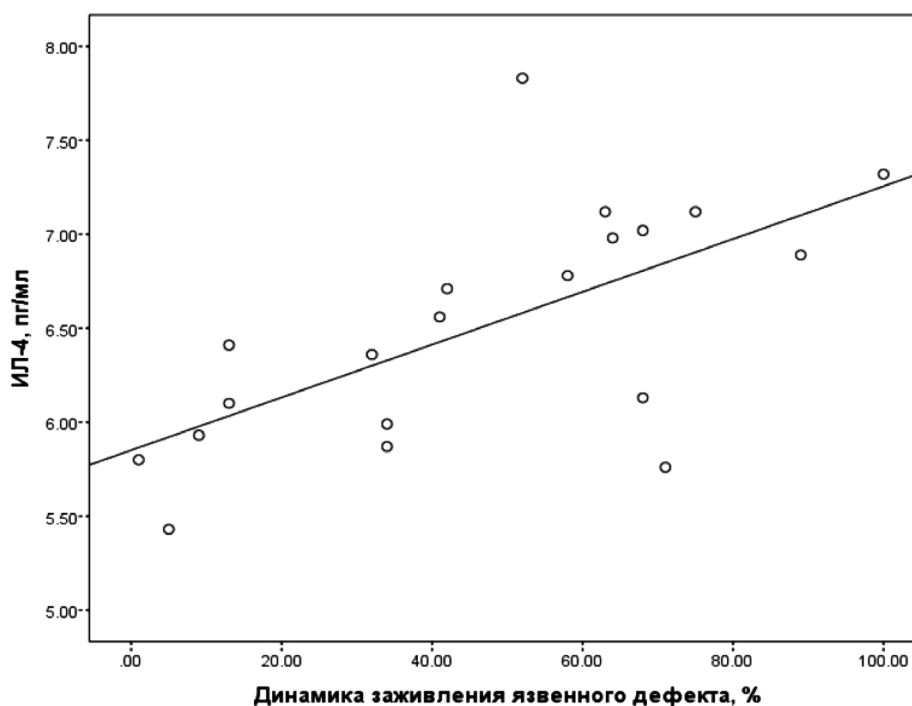


Рисунок. Динамика заживления язвенных дефектов в зависимости от уровня ИЛ4 в отделяемом из язв

□ Оригинальные научные публикации

логических жидкостей (экссудат раневого отделяемого) является не менее информативным, чем его системное определение в сыворотке крови, так как цитокины, как молекулы короткодистантного действия, при иммунном ответе не всегда поступают в системный кровоток, а выделяются и реализуют своё действие непосредственно в очаге воспаления. Кроме того, вероятно, имеет значение не только изменение абсолютных концентраций цитокинов как в сыворотке крови, так и на местном уровне, но и их дисбаланс. В связи с этим, перспективным представляется изучение именно локального содержания цитокинов в тканях организма. Подробное изучение механизмов взаимодействия между цитокинами и эффекторными клетками поможет выявить наиболее эффективные пути воздействия на течение репаративных процессов.

Литература

1. Baltzís, D., Eleftheriadou I., Veves A. Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights // *Adv Ther.* – 2014 Aug;31(8):817–36.
2. *IDF Clinical Practice Recommendations on the Diabetic Foot. A guide for healthcare professionals.* – 2017.
3. *IWGDF Guidance on the prevention of foot ulcers in at risk patients with diabetes.* IWGDF, 2015/<http://iwgdf.org/guidelines/guidance-for-prevention-2015>.

4. *Kanhaiya Singh, Neeraj K. Agrawal, Sanjeev K. Gupta, Pratima Sinha, Kiran Singh.* Increased expression of TLR9 associated with pro-inflammatory S100A8 and IL-8 in diabetic wounds could lead to unresolved inflammation in type 2 diabetes mellitus (T2DM) cases with impaired wound healing // *J. Diabetes Complications.* – 2016 Jan-Feb;30(1):99–108.

5. *Krupek, T. et al.* Glutamine dipeptide supplementation improves clinical responses in patients with diabetic foot syndrome // *Braz. J. Pharm. Sci.* [online]. – 2016. – Vol. 52, № 3 [cited 2018-04-23]. – P. 567–574.

6. *Pradhan, L., Cai X., Wu S., Andersen N.D., Martin M., Malek J., Guthrie P., Veves A., Logerfo F. W.* Gene Expression of Pro-Inflammatory Cytokines and Neuropeptides in Diabetic Wound Healing // *J. Surg. Res.* – 2011 May 15;167(2):336–42.

7. *Rita, E. Mirza, Milie M. Fang, Margaret L. Novak, Norifumi Urao, Audrey Sui, William J. Ennis, Timothy J. Koh.* Macrophage PPAR γ and impaired wound healing in type 2 diabetes // *J. Pathol.* – 2015 August ; 236(4): 433–444.

8. *Rita E. Mirza, Milie M. Fang, William J. Ennis, Timothy J. Koh.* Blocking Interleukin-1 β Induces a Healing-Associated Wound Macrophage Phenotype and Improves Healing in Type 2 Diabetes // *Diabetes.* – 2013 Jul; 62(7): 2579–2587.

9. *Tuttolomondo, A., Maida C., Pinto A.* Diabetic foot syndrome: Immune-inflammatory features as possible cardiovascular markers in diabetes // *World J. Orthop.* – 2015 Jan 18;6(1):62–76.

10. *Wynn, T. A.* Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies // *Nat Rev Immunol.* – 2015 May;15(5):271–82.