Предикторы развития хронических раневых дефектов мягких тканей нижних конечностей у пациентов с сахарным диабетом 1-го типа и липоидным некробиозом

Д.А. СЕМЕНОВА[1]*, к.м.н. Е.А. РЕПИНА[1], С.М. СТЕПАНОВА[1], к.м.н. С.А. ПРОКОФЬЕВ, проф. Е.В. МАТУШЕВСКАЯ[2], д.м.н. А.Ю. ТОКМАКОВА[1]

Predictors of the development of chronic wound defects in the soft tissues of the lower extremities in the patients with type 1 diabetes mellitus and lipoid necrobiosis

D.A. SEMENOVA, E.A. REPINA, S.M. STEPANOVA, S.A. PROKOFIEV, E.V. MATUSHEVSKAYA, A.YU. TOKMAKOVA

[1]ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ РФ; [2]ФГОУ Институт повышения квалификации Федерального медико-биологического агентства РФ, Москва

Клинико-иммунологическое обследование проведено 50 пациентам с сахарным диабетом 1-го типа (СД1). Пациенты были разделены на две группы: 25 пациентов с СД1 и липоидным некробиозом (ЛН) и 25 пациентов с СД1 без ЛН. Экспрессию Толл-подобных рецепторов — TLR2 , TLR3, TLR4 определяли на моноцитах и нейтрофилах периферической крови. Оценивали периферический кровоток и иннервацию нижних конечностей. Установлено, что снижение экспрессии и интенсивности флюоресценции TLR2 и TLR4 на моноцитах и TLR3 на нейтрофилах ассоциировано с выраженностью поражения кожи у пациентов с ЛН и СД1. Таким образом, определение TLR у пациентов с СД1 и ЛН может быть использовано для прогнозирования течения дерматоза.

Ключевые слова: липоидный некробиоз, сахарный диабет, Толл-подобные рецепторы.

A total of 50 patients presenting with type 1 diabetes mellitus (DM1) were available for the clinical and immunological examination. They were allocated to two groups, one comprised of 25 patients with DM1 and lipoid necrobiosis (LN), the other consisting of 25 patients with DM1 without LN. Expression of Toll-like receptors (TLR2, TLR3, and TLR4) was evaluated in monocytes and neutrophils obtained from peripheral blood. In addition, the state of peripheral circulation and innervation of the lower extremities was evaluated. It was shown that the impairment of expression and fluorescence of TLR2 and TLR4 in monocytes as well as TLR3 in neutrophils was associated with the manifestations of skin lesions in the patients with DM1 and LN. It is concluded that the measurement of Toll-like receptors in the patient presenting with type 1 diabetes mellitus and lipoid necrobiosis can be used in clinical practice for the prediction of the development of dermatosis.

Key words: lipoid necrobiosis, diabetes mellitus, Toll-like receptors.

Липоидный некробиоз (ЛН) — воспалительный дерматоз, для которого характерна дегенерация коллагена [1]. При сахарном диабете 1-го типа (СД1) ЛН наблюдается в 0,3—6,5% случаев.

Этиология и патогенез ЛН недостаточно изучены. Факторами, способствующими его развитию, являются нарушения углеводного и липидного обмена, изменения нервной трофики на фоне автономной нейропатии, патология микроциркуляции [2]. В связи с тем, что в литературе обсуждается роль инфекции [3] и иммунных нарушений [4] в патогенезе заболевания, значительный интерес представляет изучение Толл-подобных рецепторов (TLR) при ЛН.

TLR являются главными компонентами системы врожденного иммунитета, которые опосредуют специфическое распознавание эволюционно консервативных молекулярных структур патогенов (PAMP — pathogen associated molecular patterns). TLR способны распознавать липиды, протеины, нуклеиновые кислоты как экзогенного происхождения (фрагменты микроорганизмов), так и образующиеся в организме. Активация TLR ведет к продукции цитокинов и хемокинов, запускает каскад реакций и активизирует антимикробную защиту. Мутации генов TLR и дефицит TLR являются причиной повышенной восприимчивости организма к инфекции и ее хронизации [5].

Наиболее изучен TLR2, способный распознавать большое количество паттернов за счет формирования гетеродимерных комплексов с другими рецепторами [6, 7]. Лигандами TLR2 служат структуры грамположительных бактерий, включая липопротеины, липопептиды, пептидогликаны и липотейхоевые кислоты, а также грибковый зимозан, стафилококковый модулин и гликозилфосфатидилинозитол. Компоненты некротических клеток активируют фибробласты через TLR2, что может играть значимую роль при бактериальных инфекциях и аутоиммунных заболеваниях.

Рецептор TLR4 распознает липополи сахариды (ЛПС), но, как и TLR2, TLR4 способен распознавать и другие молекулы, в частности растительного происхождения. TLR3 экспрессируется, в основном, в миелоидных дендритных клетках [8]. Хотя он

© Коллектив авторов, 2012

*e-mail: dsmirnoff@list.ru

является внутриклеточным рецептором, эпителиальные клетки и макрофаги могут экспрессировать его и на своей поверхности [9]. Рецептор распознает различные нуклеотидные последовательности и обеспечивает противовирусную защиту [10]. Появляется все больше доказательств того, что РНК, высвобождающаяся из некротизированных тканей, является эндогенным лигандом для TLR3 [11].

В последнее время в литературе появляются сведения об участии TLR в развитии патологических состояний, этиология которых не связана с инфекцией. Показаны варианты экспрессии TLR при системной красной волчанке (СКВ), псориазе, аутоиммунном увеите. Наблюдается ассоциация изменения функции рецепторов и неблагоприятного течения заболеваний [12—15].

Таким образом, изучение экспрессии TLR представляет значительный интерес для понимания иммунологических механизмов развития ЛН и может иметь значение для мониторинга его течения.

Мы изучили ценности исследования TLR для прогнозирования течения ЛН у пациентов с СД1.

Материал и методы

На две группы были разделены 50 пациентов с СД1: 25 — без ЛН и 25 — с ЛН. В соответствии с Российскими и международными рекомендациями [16, 17], диагноз ЛН ставился на основании характерной клинической картины. Основные элементы были представлены четко ограниченными бляшками и пятнами от желтовато-красного до бурого цвета, незначительно возвышающимися по периферии. Поверхность элемента гладкая, блестящая, иногда наблюдалось легкое шелушение; пальпаторно определялась небольшая инфильтрация. Для центральной части элемента ЛН характерна атрофия с наличием множественных телеангиэктазий [18]. Типичный элемент ЛН представлен на **рис. 1**. В сомнительных случаях проводилось гистологическое исследование биоптата кожи.

Пациенты обеих групп были сопоставимы по полу, возрасту и длительности СД **(табл. 1)**.

Клинический анализ крови проводили на гематологическом анализаторе Coulter Him с автоматическим загрузчиком образцов, а биохимический анализ — на автоматическом биохимическом анализаторе Hitachi-912 («Boehringer Mannheim», Германия) энзиматическим методом по стандартным методикам с использованием реагентов производителя. Уровень гликированного гемоглобина определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления на аппарате D-20 («Bio-Rad») по стандартной методике производителя.

Таблица 1. **Клиническая характеристика пациентов**

Показатель	СД1	СД1+ЛН
Количество больных	25	25
М/Ж	6/19	5/20
Возраст, Me [Q25; Q75], годы	28 (24; 45)	26 (21; 33)
Длительность СД, Me [Q25; Q75], годы	14 (11; 20)	13 (10,5; 18)

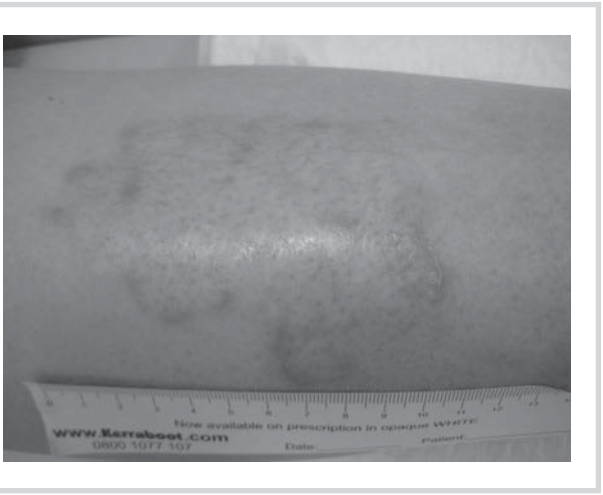


Рис. 1. **Пациентка *Г.*, 22 года. СД1 на протяжении 10 лет. Очаг появился 3 года назад, постепенно увеличиваясь в диаметре. Крупная восковидная бляшка с четкими границами. Сквозь атрофированный эпидермис видны множественные телеангиоэктазии.**

Диагностика диабетической нефропатии проводилась согласно алгоритмам специализированной медицинской помощи больным СД [19]. Микроальбуминурию (МАУ) определяли в утренней порции мочи на автоматическом биохимическом анализаторе Hitachi-912 («Boehringer Mannheim», Германия) иммунным турбодиаметрическим методом по стандартным методикам с использованием реагентов Roche. Оценивали протеинурию (в общем клиническом анализе мочи), исследовали уровень креатинина, мочевины и калия в сыворотке. Скорость клубочковой фильтрации (СКФ) рассчитывали по формуле Кокрофта—Голта. Исследования проводились на базе лаборатории клинической биохимии ЭНЦ (зав. отд. — А.В. Ильин).

Исследование TLR2 и TLR3 выполнялось по стандартной методике с использованием моноклональных антител к TLR2-F фирмы «Hycult biotech». Для определения TLR3-F использовали пермебилизированные клетки крови. Измерения проводили на проточном цитометре FACScalibur с использованием программы CellQuest ver.7.1 for Macintosh. Определяли процент флюоресцирующих клеток и логарифмический показатель интенсивности флюоресценции. Данные исследования (30 пациентов) выполнены в лаборатории генетики и клинической иммунологии ЭНЦ. Дуплексное сканирование артерий и вен нижних конечностей проводили на аппарате Voluson 730 («General Electric GE») высокочастотным линейным датчиком.

Тактильную чувствительность определяли с помощью монофиламента (масса 10 г), температурную — Тип-Термом, вибрационную — градуированным камертоном (128 Гц) на латеральной поверхности головки 1-й плюсневой кости. Измеряли размеры очагов ЛН. Состояние глазного дна оценивали путем прямой офтальмоскопии.

Работа выполнена в дизайне простого рандомизированного сравнительного контролируемого исследования в параллельных группах. Рандомизация контрольной группы осуществлялась с помощью таблицы случайных чисел со стратификацией по полу. Статистический анализ проведен с использованием ПП Статистика 6.0 (StatSoft). Для сравнения количественных признаков применяли критерий Манна—Уитни. Для описания признаков использовали медиану и квартили Me [Q25; Q75]. Коррекцию признаков оценивали по Спирмену. Нулевая гипотеза отвергалась при $p \leqslant 0{,}05$.

Результаты и обсуждение

Все пациенты были обследованы для выявления поздних осложнений диабета **(табл. 2)**.

При анализе полученных данных было установлено, что пациенты с СД1 и ЛН по сравнению с пациентами с СД1 без ЛН имели более выраженные диабетическую ретинопатию (p=0,023) и диабетическую нефропатию (p=0,019), что согласуется с данными литературы [21]. Оценка состояния периферической иннервации подтвердила наличие диабетической нейропатии у всех больных СД1 и ЛН, что статистически значимо превышало частоту выявления данного осложнения у пациентов СД1 без ЛН (p=0,005). Отмечено выраженное снижение тактильной и температурной чувствительности в очагах ЛН. Гипестезия может приводить к позднему распознаванию травм в очагах и образованию хронических раневых дефектов. Признаков гемодинамически значимых стенозов и окклюзий артериального отдела сосудистой системы и нарушений венозного оттока, по данным дуплексного сканирования сосудов нижних конечностей, выявлено не было.

Уровень HbA_{1c} у пациентов СД1 без ЛН в среднем составил 9,3% [9, 10], а у пациентов с СД1 и ЛН — 9,4% [10, 18]. Таким образом, все больные находились в состоянии декомпенсации СД. Уровни общего холестерина (ХС), холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП) и триглицеридов (ТГ) в сыворотке представлены в **табл. 3.**

Таблица 2. **Поздние осложнения СД, выявленные у пациентов, включенных в исследование**

Осложнения СД	СД1 без ЛН	СД1 + ЛН
Диабетическая ретинопатия:		
непролиферативная	3 (12%)	8 (32%)
препролиферативная	2 (8%)	2 (8%)
пролиферативная	0	5 (20%)
Диабетическая нефропатия:		
стадия микроальбуминурии	3 (12%)	7 (28%)
стадия протеинурии	2 (8%)	4 (16%)
ХПН	1 (4%)	3 (12%)
Диабетическая нейропатия	12 (48%)	25 (100%)

Медиана уровней ХС и ХС ЛПНП в обеих группах была выше нормальных значений, что характерно для плохо контролируемого СД. Статистически значимые различия в уровнях ХС, ХС ЛПНП и ТГ между группами отсутствовали. Полученные данные отличаются от приведенных в работе Ю.С. Бутова и соавт. [20], где был отмечен более высокий уровень общего ОХ у пациентов с ЛН. Однако в этой работе группой сравнения служили пациенты без СД.

Среднее количество очагов ЛН у обследованных составляло 3,3 (от 1 до 7); у 18 пациентов ЛН локализовался на голенях, у 7 отмечалось мультифокальное поражение (бедра, голени, стопы, плечо, кисти). Хронические раневые дефекты имели различную площадь и глубину. У 40% обследованных наблюдались поверхностные эрозии кожи (I стадия по Wagner), у 40% — раны, проникающие через все слои кожи (II стадия), и у 20% — более глубокие поражения (III стадия). Медиана длительности существования хронических раневых дефектов составила 5 мес [3, 7].

Все пациенты были ранжированы в зависимости от выраженности изменений кожи: пациенты с СД1 без ЛН — 0, с СД1 и ЛН без язвенных дефектов — 1, с СД1 и ЛН с язвенными дефектами в анамнезе — 2, с СД1 и ЛН с хроническими язвенными дефектами на момент обследования — 3. Обнаружена отрицательная корреляция между степенью поражения кожи и интенсивностью флюоресценции и экспрессией TLR2 и TLR4 на моноцитах, TLR3 на нейтрофилах **(рис. 2—6)**.

Экспрессия TLR при аутоиммунных заболеваниях остается недостаточно изученной. Японские

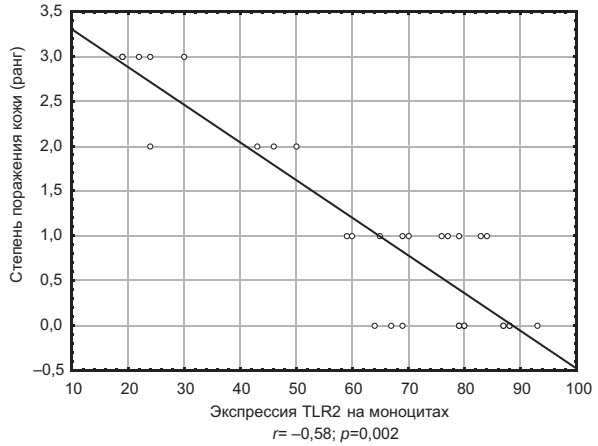


Рис. 2. **Зависимость степени поражения кожи при ЛН от уровня экспрессии TLR2 на моноцитах.**

Таблица 3. **Показатели липидного спектра пациентов с хроническими раневыми дефектами нижних конечностей**

Показатель	СД1 без ЛН	СД1+ЛН	Норма
ХС Me [Q25; Q75], ммоль/л	5,5 (4,6; 6,3)	5,25 (4,6; 5,7)	3,3—5,2
ХС ЛПНП ($M\pm\sigma$), ммоль/л	3,0 (2,7; 3,7)	3,0 (2,6; 3,6)	1,15—2,6
ТГ($M\pm\sigma$), ммоль/л	1,3 (0,7; 1,6)	1,0 (0,9; 1,0)	0,05—2,26

авторы нашли снижение экспрессии TLR2 на моноцитах у больных СКВ по сравнению со здоровыми добровольцами [12, 13]. При псориазе продемонстрировано повышение экспрессии TLR2 на моноцитах периферической крови, что, предположительно, указывает на роль грамположительных бактерий в развитии воспалительного ответа при данном заболевании [14]. Значимое снижение экспрессии TLR2 на моноцитах и нейтрофилах периферической крови было отмечено при остром аутоиммунном увеите [15]. Эти изменения связывают с интернализацией TLR2 после их активации в процессе иммунного ответа. В эксперименте показано, что после клеточной активации цитоплазматическая мембрана реструктуризируется, поверхностные TLR интернализируются, а впоследствии вновь экспрессируются на поверхности клетки [22]. Возможно, сходный процесс имеет место и при ЛН.

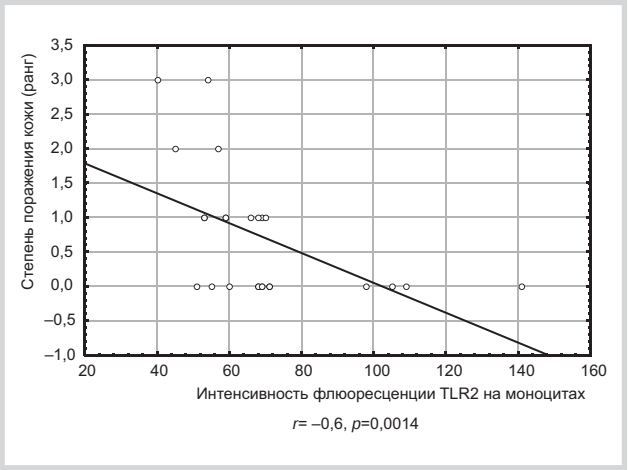


Рис. 3. **Зависимость степени поражения кожи при ЛН от интенсивности флюоресценции LR2 на моноцитах.**

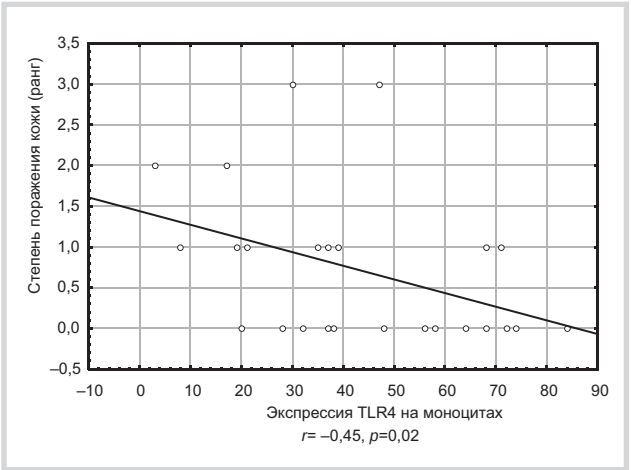


Рис. 5. Зависимость степени поражения кожи при ЛН от уровня экспрессии TLR4 на моноцитах.

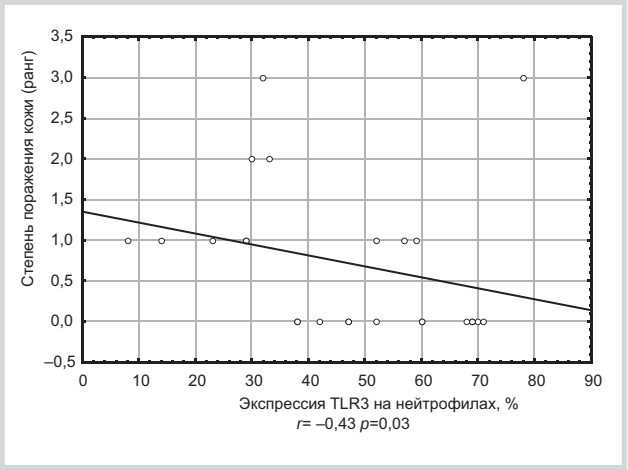


Рис. 4. **Зависимость степени поражения кожи при ЛН от уровня экспрессии TLR3 на нейтрофилах.**

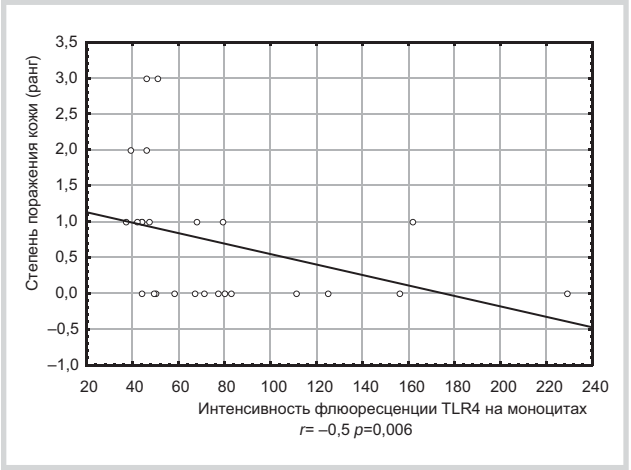


Рис. 6. **Завершенность степени поражения кожи при ЛН от интенсивности флюоресценции TLR4 на моноцитах.**

Значительный интерес представляет роль TLR в заживлении ран кожи. При повреждении кожи для восстановления целостности ткани происходит активация как врожденного, так и адаптивного иммунитета [23]. Заживление раны, образовавшейся в результате травмы, микробной инвазии или попадания инородных частиц, представляет собой сложно организованный процесс. В большинстве органов повреждение активирует коагуляцию, формирование сгустка крови и высвобождение провоспалительных медиаторов, что приводит к лейкоцитарной инфильтрации. При заживлении ран лейкоциты не только регулируют иммунный ответ, но также участвуют в деградации и ремоделировании тканей, синтезируя протеазы, активные формы кислорода и факторы роста [24]. Показано, что активация TLR3 приводит к развитию воспалительного ответа [25]. У мышей, дефицитных по TLR3, наблюдался более слабый воспалительный процесс со сниженным уровнем ИЛ-6 и ФНО-α в краях раны. У TLR3$^{-/-}$ мышей наблюдается более длительное заживление ран с нарушением неоваскуляризации, снижением миграции нейтрофилов и макрофагов, снижением экспрессии хемокинов в ране. Эти данные свидетельствуют об участии TLR3 в регуляции воспалительного ответа при заживлении ран кожи [26]. Обнаруженная нами корреляция между снижением TLR3 на нейтрофилах и возникновением язвенных дефектов может быть связана с нарушением репаративных процессов при врожденном дефекте TLR.

Таким образом, иммунные нарушения могут играть значимую роль в генезе поражений кожи при ЛН в сочетании с нарушенным углеводным обменом.

Выводы

1. Пациенты с СД1 и ЛН характеризуются большей частотой поздних микрососудистых осложнений (ретинопатия, нефропатия) по сравнению с группой СД1 без ЛН.

2. У пациентов с СД1 и ЛН снижена температурная и тактильная чувствительность. Нарушение нервной трофики может иметь значение в генезе кожных поражений.

3. Снижение экспрессии и флюоресценции TLR2, TLR4 на моноцитах и TLR3 на нейтрофилах периферической крови ассоциируется со степенью выраженности поражений кожи при СД1 и ЛН, что может быть использовано в практике для прогнозирования течения заболевания.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — Д.А. Семенова, А.Ю. Токмакова, Е.А. Репина, Е.В. Матушевская

Сбор и обработка материала — Д.А. Семенова, Е.А. Репина, С.М. Степанова, С.А. Прокофьев, Е.В. Матушевская

Статистическая обработка данных — Д.А. Семенова

Написание текста — Д.А. Семенова

Редактирование — А.Ю. Токмакова, Е.А. Репина

Конфликт интересов и финансовая заинтересованность авторов отсутствуют.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Хэбиф Т.П.* Кожные болезни. Диагностика и лечение. Под общ. ред. А.А. Кубановой. Пер. с англ. 3-е изд. М: МЕД-пресс-информ 2006; 578.
2. *Лезвинская Е.М., Шалаева И.В., Ломовцева О.Б.* Клинические и диагностические особенности липоидного некробиоза. Рос журн кож и вен бол 2000; 4: 22—27.
3. *Eisendle K., Zelger B.* The expanding spectrum of cutaneous borreliosis. G Ital Dermatol Venereol 2009; 144: 2: 157—171.
4. *Peyrí J., Moreno A., Marcoval J.* Necrobiosis lipoidica. Semin Cutan Med Surg 2007; 26: 2: 87—89.
5. *Lai Y., Gallo R.L.* Toll-like receptors in skin infections and inflammatory disease. Infect Dis Drug Targ 2008; 8: 3:144—155.
6. *Hirschfeld M., Kirschning C.J., Schwandner R., Wesche H., Weis J.H., Wooten R.M., Weis J.J.* Cutting edge: inflammatory signalling by Borrelia burgdorferi lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. J Immunol 1999; 163: 2382—2386.
7. *Takeuchi O., Hoshino K., Kawai T., Sanjo H., Takada H., Ogawa T., Takeda K., Akira S.* Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. Immunity 1999; 11: 443—451.
8. Muzio M., Bosisio D., Polentarutti N., D'amico G., Stoppacciaro A., Mancinelli R., van't Veer C., Penton-Rol G., Ruco L.P., Allavena P., Mantovani A. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. J Immunol 2000; 164: 5998—6004.
9. *Uehara A., Fujimoto Y., Fukase K., Takada H.* Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. Mol Immunol 2007; 44: 12: 3100—3111.
10. *Alexopoulou L., Holt A.C., Medzhitov R., Flavell R.A.* Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature 2001; 413: 732—738.
11. *Cavassani K.A., Ishii M., Wen H., Schaller M.A., Lincoln P.M., Lukacs N.W., Hogaboam C.M., Kunkel S.L.* TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. J Exp Med 2008; 205: 11: 2609—2621.
12. *Migita K., Miyashita T., Maeda Y., Nakamura M., Yatsuhashi H., Kimura H., Ishibashi H., Eguchi K.* Toll-like receptor expression in lupus peripheral blood mononuclear cells. J Rheumatol 2007; 34: 3: 493—500.
13. *Orihara K., Nagata K., Hamasaki S., Oba R., Hirai H., Ishida S., Kataoka T., Oketani N., Ogawa M., Mizoguchi E., Ichiki H., Tei C.*

Time-course of Toll-like receptor 2 expression, as a predictor of recurrence in patients with bacterial infectious diseases. Clin Exp Immunol 2007; 148: 2: 260—270.

14. *Carrasco S., Neves F.S., Fonseca M.H., Gonçalves C.R., Saad C.G., Sampaio-Barros P.D., Goldenstein-Schainberg C.* Toll-like receptor (TLR) 2 is upregulated on peripheral blood monocytes of patients with psoriatic arthritis: a role for a grampositive inflammatory trigger? Clin Exp Rheumatol 2011; 29: 6: 958—962.
15. *Chang J.H., Hampartzoumian T., Everett B., Lloyd A., McCluskey P.J., Wakefield D.* Changes in Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4 expression and function but not polymorphisms are associated with acute anterior uveitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 2007; 48: 4: 1711—1717.
16. *Patsatsi A., Kyriakou A., Sotiriadis D.* Necrobiosis lipoidica: early diagnosis and treatment with tacrolimus. Case Rep Dermatol 2011; 3: 1: 89—93.
17. Кожные и венерические болезни: Руководство для врачей. 2 т. Под ред. Ю.К. Скрипкина, В.Н. Мордовцева. М: Медицина 1999; 317—326.
18. *Hawryluk E.B., Izikson L., English J.C.3rd.* Non-infectious granulomatous diseases of the skin and their associated systemic diseases: an evidence-based update to important clinical questions. Am J Clin Dermatol 2010; 11: 3: 171—181.
19. *Дедов И.И., Шестакова М.В.* (ред.) Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. 5-е изд. М 2011.
20. *Бутов Ю.С., Васенова В.Ю., Ильина Т.А., Хрусталева Е.А.* Фосфоглив в терапии ряда дерматозов. Русс мед журн 2006; 14: 5: 353—356.
21. *Verrotti A., Chiarelli F., Amerio P., Morgese G.* Necrobiosis lipoidica diabeticorum in children and adolescents: a clue for underlying renal and retinal disease. Pediat Dermatol 1995; 12: 3: 220—223.
22. Triantafilou M., Manukyan M., Mackie A. et al. Lipoteichoic acid and toll-like receptor 2 internalization and targeting to the Golgi are lipid raft-dependent. J Biol Chem 2004; 279: 40882—40889.
23. *Martin P.* Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. Science 1997;276: 75—81.
24. *McKay I.A., Leigh I.M.* Epidermal cytokines and their roles in cutaneous wound healing. Br J Dermatol 1991; 124: 513—518.
25. *Lai Y., Di Nardo A., Nakatsuji T., Leichtle A., Yang Y., Cogen A.L., Wu Z.R., Hooper L.V., Schmidt R.R., von Aulock S.* Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury. Nat Med 2009; 15: 1377—1382.
26. *Lin Q., Fang D., Fang J., Ren X., Yang X., Wen F., Su S.B.* Impaired wound healing with defective expression of chemokines and recruitment of myeloid cells in TLR3-deficient mice. J Immunol 2011; 186: 6: 3710—3717.