

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Спирина Людмила Викторовна
РОЛЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ В ФОРМИРОВАНИИ СОСУДИСТЫХ
ОСЛОЖНЕНИЙ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА У ДЕТЕЙ

14.00.16 - патологическая физиология

14.00.09 - педиатрия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Суханова Г.А.

Научный консультант:
доктор медицинских наук
Кондратьева Е.И.

ТОМСК -2003

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1. Роль протеолитических систем в норме и при патологии.....	11
1.1. Калликреин-кининовая система.....	11
1.2. Ренин-ангиотензиновая система.....	15
1.3. Ангиотензин-превращающий фермент.....	18
1.4. Ингибиторы протеолитических ферментов.....	20
2. Механизмы развития осложнений сахарного диабета 1 типа и его осложнений.....	25
2.1. Этиология и патогенез сахарного диабета 1 типа.....	25
2.2. Патогенез сосудистых осложнений при сахарном диабете.....	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	34
2.1. Объем исследования.....	34
2.2. Методы исследования.....	37
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	44
3.1. Состояние протеолитических систем у практически здоровых детей.....	44
3.2. Состояние протеолитических систем при сахарном диабете 1 типа у детей.....	45
3.2.1. Активность калликреина, калликреиногена при сахарном диабете 1 типа у детей.....	45
3.2.2. Активность ангиотензин-превращающего фермента при сахарном диабете 1 типа у детей.....	53
3.2.3. Взаимосвязь ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем при сахарном диабете 1 типа.....	59
3.2.4. Активность α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина при сахарном диабете 1 типа у детей.....	62
3.3. Связь биохимических показателей с генетическими маркерами при сахарном диабете 1 типа у детей.....	68
3.4. Состояние протеолитических систем при добавлении инсулина, глюкозы и каптоприла.....	73

3.4.1. Влияние инсулина на показатели протеолиза плазмы крови здоровых и больных сахарным диабетом 1 типа.....	73
3.4.2. Влияние глюкозы на показатели протеолиза плазмы крови здоровых и больных сахарным диабетом 1 типа.....	76
3.4.3. Влияние каптоприла на показатели протеолиза плазмы крови здоровых и больных сахарным диабетом 1 типа.....	81
3.5. Статистические методы исследования.....	85
3.5.1. Корреляционный анализ.....	85
3.5.2. Регрессионный анализ.....	88
3.5.3. Дисперсионный анализ.....	89
3.6. Диагностическая ценность определения активности ангиотензин-превращающего фермента и α_1 -протеиназного ингибитора при диабетической нефропатии у детей.....	94
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	98
ВЫВОДЫ.....	114
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	115
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	116

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АПФ – ангиотензин-превращающий фермент

АТ II – ангиотензин II

ДР – диабетическая ретинопатия

ДН – диабетическая нефропатия

ИО - истинноотрицательные

ИП - истинноположительные

КК – калликреин

ККГ – калликреиноген

α_2 -МГ - α_2 -макроглобулин

ЛО - ложноотрицательные

ЛП - ложноположительные

МАУ - микроальбуминурия

ККС – калликреин-кининовая система

РАС – ренин-ангиотензиновая система

α_1 -ПИ - α_1 -протеиназный ингибитор

СД 1 – сахарный диабет 1 типа

АСЕ – ген ангиотензин-превращающего фермента

AGT – ген ангиотензиногена

HbA_{1c} – гликозилированный гемоглобин

ВВЕДЕНИЕ

Изучение метаболических процессов при сахарном диабете 1 типа является одной из важных проблем современной эндокринологии. Ранняя инвалидизация, высокая смертность определили сахарный диабет в качестве первых приоритетов национальных систем здравоохранения [Cryer P.E., 1995; Cardner S.G. et al., 1996; Балаболкин М.И., 1997, 1998, 2000; Dawson K. et al., 1998; Касаткина Э.П., 1999; Nordt T.K. et al., 2000]. Основное внимание в последние годы уделяется разработке методов ранней диагностики нарушений углеводного, липидного обмена, связанных с ними осложнений сахарного диабета 1 типа [Green A. et al., 1996; Harris M.I., 1996; Robinson N. et al., 1996; Дедов И.И., 1998; Касаткина Э.П. и др., 1999].

Нарушения общего и регионального кровообращения имеют значение в патогенезе многих заболеваний, таких как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца и артериальная гипертензия [Шестакова М.В. и др., 1995; Drexler H., 1998; Margolius H.S., 1998; Arosio E. et al., 1999; Dogra G. et al., 2001]. В регуляции кровообращения принимают участие калликреин-кининовая, ренин-ангиотензиновая системы. Установлено, что взаимосвязь этих систем осуществляется посредством калликреина и ангиотензин-превращающего фермента [Пасхина Т.С., 1976; Насонов Е.Л. и др., 1998; Альтшулер Б.Ю. и др., 2001; Яровая Г.А., 2001; Bader M., 2001]. В регуляции активности систем протеолиза принимают участие ингибиторы протеолитических ферментов, к которым прежде всего относятся α_1 -протеиназный ингибитор и α_2 -макроглобулин [Проценко В.А. и др., 1988; Shahid A., et al., 1996; Stasisaitis D. et al., 2001]. Известно, что баланс между ферментами и ингибиторами протеолиза определяет состояние эндотелия и развитие микроангиопатий [Nolly H. et al., 1997; Drexler H., 1998; Perinne C.J., 1999; Беленков Ю.Н., 2000; Коломоец Н.М., 2001]. Роль калликреин-кининовой, ренин-ангиотензиновой систем и ингибиторов протеолиза на разных этапах заболевания и в развитии диабетической нефропатии у детей не изучена.

В настоящее время широко обсуждается вклад генетических и средовых факторов в нарушения гемодинамики при диабете 1 и 2 типа [Ringel G. et al., 1997; Stenvinkel P. et al., 1997; Tarnow L. et al., 2000; Шестакова М.В. и др., 2002]. Большое значение придается I/D полиморфизму гена ангиотензин-превращающего

фермента и T174M рестрикционному полиморфизму гена ангиотензиногена. Показана ассоциация I/D полиморфизма гена ангиотензин-превращающего фермента с диабетической нефропатией [Кондратьев Я.Ю. и др., 1998; Fujisawa T. et al., 1998; Чистяков Д.А. и др., 2000; Балаболкин М.И., 2000; Кондратьева Е.И., 2001; Елисеева Ю.Е., 2001]. М аллель гена ангиотензиногена многие авторы считают независимым фактором развития гипертензии при сахарном диабете 2 типа [Gulmann S. et al., 1999; Сергеева Т.В., 2000].

Большое внимание уделяется также проблемам регуляции протеолиза при сахарном диабете. Известно, что в патогенезе микроангиопатий при сахарном диабете 1 типа ключевую роль играют гипергликемия на фоне абсолютного дефицита инсулина [Ангельский А.Н., 1995; Балаболкин М.И., 1998, 2000; Дедов И.И., 2002]. Однако влияние инсулина и глюкозы на состояние протеолиза при сахарном диабете 1 типа не изучено. В лечении диабетической нефропатии используют ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, их действие связывают со снижением содержания ангиотензина II и восстановлением нарушенной гемодинамики [Ruschitzka F. et al., 1999; Bader M., 2001; Gilbert R.E. et al., 2000; Hogeboom van Buggenum I. M. et al., 2002; Белова Л.А., 2002]. К наиболее известным пероральным ингибиторам относится каптоприл [Преображенский Ц.В. и др., 2001; Альтшулер Б.Ю. и др., 2001]. Использование ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента в педиатрической практике до сих пор является одной из дискуссионных проблем.

Изучение состояния протеолитических систем позволит выявить группы риска по развитию сосудистых осложнений для своевременной их профилактики у больных сахарным диабетом 1 типа. Полученные результаты могут быть использованы для формирования новых подходов в поиске препаратов, препятствующих прогрессированию осложнений заболевания.

Цель работы: установить роль калликреин-кининовой и ренин-ангиотензиновой систем в развитии сахарного диабета 1 типа и его осложнений с учетом наследственных и средовых факторов.

Задачи исследования:

1. Изучить активность калликреина, калликреиногена, ангиотензин-превращающего фермента, α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина

плазмы крови здоровых детей и больных сахарным диабетом в зависимости от длительности заболевания и развития диабетической нефропатии.

2. Исследовать влияние инсулина, глюкозы и каптоприла в условиях *in vitro* на активность калликреина, ангиотензин-превращающего фермента и ингибиторов протеолиза плазмы крови.
3. Изучить влияние I/D полиморфизма гена ангиотензин-превращающего фермента и T174M рестрикционного полиморфизма гена ангиотензиногена на состояние протеолиза при сахарном диабете 1 типа у детей.
4. Установить взаимосвязь показателей протеолиза в патогенезе сахарного диабета и исследовать их диагностическую ценность при развитии сосудистых осложнений.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Сахарный диабет 1 типа у детей характеризуется активацией калликреин-кининовой системы, при диабетической нефропатии повышается активность ангиотензин-превращающего фермента. Состояние протеолиза зависит от I/D полиморфизма гена ангиотензин-превращающего фермента. DD генотип ассоциирован с высокой активностью ангиотензин-превращающего фермента при нефропатии.
2. Добавление глюкозы к плазме крови больных сахарным диабетом 1 типа в условиях *in vitro* способствует увеличению активности калликреина и ангиотензин-превращающего фермента. Инсулин и каптоприл повышают ингибиторную активность плазмы крови больных в условиях *in vitro*.
3. Проведение адекватной инсулинотерапии, достижение удовлетворительной компенсации углеводного обмена и применение ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента при диабетической нефропатии являются профилактическими и терапевтическими мероприятиями по восстановлению баланса протеолитических систем.

Научная новизна

Впервые показано, что у больных сахарным диабетом 1 типа наблюдаются нарушения протеолитических процессов с повышением активности калликреина на фоне недостаточности α_1 -протеиназного ингибитора, прогрессирующие при увеличении длительности заболевания, декомпенсации диабета и при наличии осложнений. Активность калликреина повышена на ранних этапах заболевания, с

увеличением длительности и при развитии нефропатии увеличивается активность ангиотензин-превращающего фермента. Установлено, что активность калликреина, ангиотензин-превращающего фермента и α_1 -протеиназного ингибитора могут служить дополнительными критериями в прогнозировании осложнений сахарного диабета 1 типа.

Получены новые данные о влиянии глюкозы, инсулина и каптоприла на показатели протеолиза плазмы крови больных сахарным диабетом 1 типа в условиях *in vitro*. Глюкоза повышает активность калликреина и ангиотензин-превращающего фермента плазмы крови больных в условиях *in vitro*. Инсулин и каптоприл стимулируют ингибиторную активность плазмы крови.

Обнаружено влияние I/D полиморфизма гена ангиотензин-превращающего фермента на активность показателей протеолиза при развитии нефропатии. DD генотип и высокая активность ангиотензин-превращающего фермента являются фактором прогрессирования диабетической нефропатии.

Практическая значимость работы

Выявлены биохимические маркеры развития диабетической нефропатии при сахарном диабете 1 типа у детей. Исследование активности калликреина, ангиотензин-превращающего фермента и ингибиторов протеолиза рекомендуется для оценки риска развития ретино- и нефропатии. При назначении ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента необходимо ориентироваться на исходный уровень фермента. Применение ингибиторов целесообразно при высоких значениях активности ангиотензин-превращающего фермента у больного. Установлено, что группу риска по развитию диабетической нефропатии составляют больные с DD генотипом I/D полиморфизма гена ангиотензин-превращающего фермента.

Внедрение

Исследуемый подход к профилактике осложнений заболевания у детей с сахарным диабетом 1 типа внедрен на базе эндокринологического отделения детской больницы №1 г. Томска и генетической клиники НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН. Результаты исследования используются в лекционном курсе на кафедрах эндокринологии и диабетологии, биохимии и молекулярной биологии Сибирского государственного медицинского университета. Профилактическая работа, направленная на повышение информированности

больных о заболевании, проводится на базе образовательной программы «Школа управления диабетом», в классе «Диабетическая нефропатия».

Публикации

По теме диссертации опубликовано 14 работ.

Апробация работы

Основные результаты представлены на заседаниях кафедр патологической физиологии, биохимии и молекулярной биологии, эндокринологии и диабетологии СГМУ, педиатрии факультета повышения квалификации и постдипломной подготовки специалистов; региональных и российских конференциях: второй научно-практической конференции педиатров «Здоровье детей – наше будущее» (Томск, 2002); третьем конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2002); втором российском диабетологическом конгрессе «Сахарный диабет и сердечно-сосудистые осложнения» (Москва, 2002); второй межрегиональной конференции молодых исследователей (Самара, 2002); региональной конференции «Сахарный диабет и сердечно-сосудистая патология» (Томск, 2002); третьей научной конференцией с международным участием «Эндокринная регуляция физиологических функций в норме и при патологии» (Новосибирск, 2002); третьей научно-практической конференцией «Санкт-Петербургский научный форум-2003» (Санкт-Петербург, 2003); Пироговской научной конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2003); четвертом конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2003); Всероссийской научно-практической конференции «Клиническая эндокринология – достижения и перспективы» (Санкт-Петербург, 2003); I Всероссийской школе-семинаре детского эндокринолога «Новые возможности диагностики и терапии болезней эндокринной системы у детей», г. (Томск, 2003); IV международной научно-практической конференции «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 2003).

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РГНФ № 03-06-00457а «Программа поиска маркеров сосудистых осложнений у детей и подростков с сахарным диабетом I типа и членов их семей. Стратегия реабилитации».

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 140 страницах, иллюстрирована 46 таблицами и 13 рисунками. Библиография включает 265 литературных источников, из которых 155 отечественных и 110 иностранных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. РОЛЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

1.1. КАЛЛИКРЕИН-КИНИНОВАЯ СИСТЕМА

Протеолитические системы широко распространены в организме. К ним относятся системы комплемента, калликреин-кининовая, ренин-ангиотензиновая, фибринолитическая, свертывания крови. Наиболее изученной является калликреин-кининовая плазмы крови, регулирующая гомеостаз и осуществляющая адаптивно-защитные реакции организма [Пасхина Т.С., 1976; Суханова Г.А., 1992; Шумилов С.П. и др., 1994; Удут В.В. и др., 1998; Katori M., 1998; Яровая Г.А., 2001]. Кинины крови и межтканевой жидкости выполняют роль медиаторов жизненно важных физиологических и биохимических процессов.

Кинины относятся к группе пептидных регуляторов. Предшественником активных кининов является кининоген. Существует высокомолекулярный кининоген и низкомолекулярный. В плазме крови они находятся в α_2 -глобулиновой фракции.

Освобождение кининов из кининогенов происходит под действием кининогеназ (КФ 3.4.21.8). Кининогеназы относятся к сериновым протеиназам, более распространенное название калликреины. Калликреины локализованы в плазме крови (плазменный калликреин) и тканях некоторых органов, в частности в поджелудочной и слюнной железах и их секретах, стенке кишечника, почках и моче, половых и потовых железах (тканевые калликреины). Плазменные калликреины - щелочные белки с pI около 8,6 и молекулярной массой 90 кДа; тканевые калликреины - кислые гликопротеины (pI 3,5 - 4,5) с молекулярной массой от 24 до 40 кДа [Margolius H.S., 1998; Гомазков О.А., 2000]. Калликреины также находятся в плазме крови и тканях в виде неактивных предшественников – прекалликреинов или калликреиногенов. Прекалликреин является гликопротеином, представленным одной пептидной цепью, состоящей из 619 аминокислотных остатков. Концентрация прекалликреина в плазме крови составляет 295 - 580 нМ (35 - 50 мкг/мл) [Wong P. et al., 1977]. Синтезируется прекалликреин в гепатоцитах. Ген, кодирующий прекалликреин, состоит из 15 экзонов и 14 интронов, локализованных в дистальной части хромосомы 4 [Martin-Castano M.E. et al., 2002]. Кроме кининогеназной функции установлена центральная роль калликреина в

регуляции активности других протеолитических систем плазмы крови. Калликреин плазмы крови активирует фактор XII гемокоагуляции, плазминоген, проурокиназу, первый компонент классического пути и фактор В альтернативного пути активации комплемента, проренин [Kaplan A.P., 1976; Majama M., 2001]. Известно, что калликреин является плазменным фактором воспаления и стимулирует освобождение гранулоцитарной эластазы и активацию латентной коллагеназы из полиморфноядерных лейкоцитов [Маянский Д.Н., 1997]. Показано также, фрагментация апобелков липопротеинов низкой плотности протекает с участием калликреина. В результате липопротеины низкой плотности теряют способность связываться с соответствующими рецепторами, что усиливает их атерогенность [Chabit M. et al., 1997; Nordt T.K., 2002]. В плазме крови активность калликреина контролирует главным образом α_1 -протеиназный ингибитор, инактиватор первого компонента комплемента, α_2 -макроглобулин и в меньшей степени антитромбин III и инактиватор протеина C [Гомазков О.А., 1993, 2000; Duncan A.M., 2000].

Важнейшими кининами плазмы крови являются брадикинин, каллидин и метионил-лизил-брадикинин. Центральную роль в калликреин-кининовой системе занимает брадикинин [Okahama P. et al., 1999; Гомазков О.А., 1976, 1993, 2001]. В плазме крови содержание кининов обычно ничтожно, в свободном состоянии их можно обнаружить только в моче [Пасхина Т.С., 1976].

Кинины являются регуляторами кровообращения на всех уровнях деятельности сердечно-сосудистой системы, органов дыхания, пищеварения, мочеотделения [Пасхина Т.С., 1976; Гомазков А.О., 1976, 1993; Суровкина М., 1995; Adam A. et al., 2000]. Они влияют на тонус сосудов гладких мышц бронхов, кровеносных сосудов, легочную вентиляцию [Гомазков А.О., 1976], рецепторы вегетативной нервной системы, состояние эндотелия, проницаемость сосудистой стенки, экскрецию натрия и воды почками [Duncan A.M. et al., 2000], биосинтез, скорость и секрецию ряда прессорных гормонов, утилизацию кислорода и глюкозы тканями, миграцию и хемотаксис лейкоцитов [Токаева Л.К. и др., 1979; Шварц Г.А., 1979; Duncan A.M. et al., 2000]. Кинины оказывают избирательное сосудорасширяющее действие на сердце и сосуды малого круга кровообращения: повышают систолический и минутный объем крови, увеличивают коронарный приток к правому предсердию и ее отток из левого, снижают кровяное давление в

общем круге циркуляции и повышают его в легочной артерии, усиливают потребление кислорода и обмен веществ в миокарде [Гомазков А.С., 1993; Emanuelli C. et al., 1999; Campbell D.J., 2000]. Кинины опосредуют восприятие боли и влияют на состояние рецепторов гормонов [Шумилов С.П., 1993; Яровая Г.А., 2001; Campbell D.J., 2000].

Брадикинин также рассматривают как нейрогормон, опосредующий многие функции мозга. Взаимодействие брадикинина, осуществляемое, по крайней мере, с двумя специфическими рецепторами B_1 и B_2 , обеспечивает его биологические эффекты [Шумилов С.П., 1993; Суровкина М.П., 1995; Vora J.P. et al., 1997; Emanuelli C. et al., 1999; Griesbacher T., 2000; Яровая Г.А., 2001; Martin-Castano M.E. et al., 2002]. Большинство эффектов брадикинин осуществляет через B_2 рецепторы, которые экспрессируются в различных тканях. Связывание брадикинина с B_2 рецепторами приводит к развитию боли и воспаления в дыхательных путях. Аналогичные эффекты наблюдаются при кардиоваскулярной ишемии [Marceau F., 1999; Campbell D.J., 2000]. Взаимодействие брадикинина с B_1 рецепторами вызывает гиперальгезию, связанную с хроническим воспалением. Взаимодействие B_2 и B_1 рецепторов приводит к мобилизации внутриклеточного Ca^{2+} с последующей активацией протеинкиназы C, запускающей каскад передачи сигнала внутри клетки через вторичные мессенджеры, такие как оксид азота (NO) [Nahser P.J. et al., 1995; Zhang X. et al., 1997; Park J.K. et al., 1999], циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ), простагландины. Образование этих мессенджеров в эндотелиальных клетках и поступление их в гладкомышечные клетки обеспечивает процесс сосудистой релаксации [Marceau F., 1999; Remme W.J., 1999; Emanuelli C., 1999; Duncan A.M. et al., 2000].

Кинины обладают весьма кратковременным действием в организме. Это объясняется высокой активностью киназаз-ферментов, инактивирующих кинины. Киназазы найдены в плазме крови и почти во всех тканях. В плазме крови обнаружены 2 киназазы – карбоксипептидаза N, инактивирующая брадикинин путем отщепления C-концевого аргинина, и карбоксикапепсин, или пептидилдипептидаза, расщепляющая пептидную связь между остатками пролина и фенилаланина в молекуле брадикинина [Гомазков О.А., 1993; Елисеева Ю.Е., 2001]. Кратковременность гипотензивного действия брадикинина в плазме крови

связана в основном, с весьма высокой активностью карбоксипептидазы N [Пасхина Т.С., 1976; Margolius H.S., 1978; Adam A. et al., 2000; Елисеева Ю.Е., 2001].

Многочисленные экспериментальные и клинические исследования свидетельствуют об участии ККС в развитии острого и хронического воспаления, шока различной этиологии, диабета, аллергии, тромбо-геморрагических нарушений, в том числе дессиминированного внутрисосудистого свертывания крови, онкологических заболеваний и других патологических состояний организма [Ланцберг Л.А., 1972; Некрасова А.А. и др., 1973; Шхвацабая И.К. и др., 1973; Пасхина Т.С., 1976; Суровкина М.С., 1995; Stadnicki A. et al., 1996; Акбашева О.Е. и др., 1999; Park J.K. et al., 1999; Remme W.J., 1999; Яровая Г.А. и др., 2001].

Выделяют несколько типов реагирования ККС при повреждениях. В процессе адаптации происходит переход системы из неактивного состояния в активное, что приводит к увеличению активности калликреина, кининаз и уменьшению содержания кининогена. Активация ККС при патологических процессах сопровождается угнетением активности ингибиторов, а при истощении кининовой системы снижается общая ингибиторная активность, и наблюдается дефицит прекалликреина и кининогена [Гомазков О.А., 1976].

В литературе имеются сведения, что ККС активируется на начальных этапах развития СД 1 типа [Zuccollo A. et al., 1999]. С развитием сосудистых осложнений происходит истощение кининовой системы [Суровкина М.П., 1995]. В эксперименте было показано, что инсулин способен снижает активность ККС в условиях *in vitro* и *in vivo* [Rothschild A.M. et al., 1999]. Эти данные свидетельствуют о том, что инсулин участвует в регуляции ККС, ограничивая ее активность.

Таким образом, к настоящему времени накоплены многочисленные данные об участии ККС в развитии многих заболеваний. Большой интерес по-прежнему вызывает изучение связи ККС с другими системами протеолиза.

1.2 РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВАЯ СИСТЕМА

Ренин-ангиотензиновая система (РАС) выполняет ключевую роль в регуляции функции сердечно-сосудистой системы и почек. Активация этой системы приводит к повышению АД за счет возрастания объема циркулирующей крови (ОЦК) и увеличения активности других вазоконстрикторных факторов [Гомазков О.А.,

1976, 1993, 2000; Коломиец В.В. и др., 2001; Bader M., 2001]. До недавнего времени функции ренин-ангиотензиновой ограничивались лишь ее влиянием на водно-солевой обмен и регуляцию артериального давления. За последние годы получены научные доказательства параллельного функционирования гуморальной и тканевой ренин-ангиотензин-альдостероновых систем [Де Лиув, 1997; Коломиец В.В. и др., 2001; Bader M., 2001]. Гуморальная РАС обеспечивает кратковременные эффекты за счет сужения сосудов, развития хронотропного и аритмогенного эффектов сердца, реабсорбции натрия и воды. В тоже время долговременные эффекты - гипертрофия стенок сосудов и миокарда, развитие внутриклубочковой гипертензии и антидиуретического эффекта в почках обусловлены тканевой РАС [Коломиец В.В. и др., 2001; Dzau V.J. et al., 2001].

Основными ферментами РАС являются ренин и ангиотензин-превращающий фермент (АПФ). Ренин секретируется почками, клетками юстагломерулярного аппарата, ангиотензиноген образуется в печени [Коломиец В.В. и др., 2001; Bader M., 2001]. Под действием ренина из ангиотензиногена образуется ангиотензин I, переходящий под влиянием находящегося в легких, почках и плазме АПФ в ангиотензин II (АТ II) [Гомазков О.А., 1993; Шестакова М.В., 1999, 2001]. Активность ренина и АПФ регулируется ангиотензином II на основе механизма отрицательной обратной связи [Imig D.J., 1999]

АПФ рассматривается как ключевой фактор, связывающий ККС и РАС крови. Кроме перевода ангиотензина II в активное состояние, фермент способен инактивировать брадикинин [Альтшулер Б.Ю. и др., 2000; Елисеева Ю.Е., 2001].

АТ II обладает мощным вазоконстрикторным действием, оказывает влияние на многие физиологические системы, в том числе систему регуляции АД, функцию почек и секрецию альдостеро в коре надпочечников [Гомазков О.А., 1993, 2000; Remme K., 2001; Bader M., 2001; Кутырина И.М., 2002]. Доказано его прямое влияние на проницаемость базальной мембраны сосудов почек и развитие протеинурии [Ruggenenti P. et al., 1998]. АТ II способствует пролиферации мезангиальных клеток и экспрессии β -трансформирующего фактора роста эндотелия сосудов, приводящего к повышенному синтезу экстрацеллюлярного матрикса [Kim S. et al., 2000]. Стимулируя активацию макрофагов и фагоцитоза,

АТ II способен усиливать процессы воспаления в поврежденной ткани [Kim S. et al., 2000]. АТ II стимулирует образование ингибитора-1 активатора плазминогена эндотелиальными клетками и гладкомышечными клетками сосудов [Kim S. et al., 2000]. Известно, что АТ II принимает участие в активации механизмов иммунного поражения почек за счет усиления выработки цитокинов [Шестакова М.В., 1999, 2001; Есаян А.М., 2002].

В последнее время большое внимание уделяется изучению его роли в механизмах окислительного стресса и эндотелиальной дисфункции [Гомазков О.А., 2000]. В эксперименте на сосудистых клетках показана стимуляция супероксидных анионов при добавлении АТ II [Graier W.F., et al., 1999; Гомазков О.А., 2000]. В культуре эндотелиоцитов в ответ на введение в среду АТ II вырабатывается эндотелин – один из важных сосудосуживающих факторов [Подзолков В.И., 1996].

Многообразие функций РАС связано с существованием 2 типов рецепторов к ангиотензину II АТ₁ и АТ₂. Оба типа рецепторов относятся к семейству трансмембранных структур, сопряженных с G-белком. Все известные эффекты АТ II, включая регуляцию системного давления, стимуляцию и синтез альдостерона, канальцевую реабсорбцию натрия и воды в почках, опосредуют АТ₁ рецепторы [Holenberg N.K. et al., 1998]. Стимуляция АТ₂ рецепторов связана с образованием цГМФ и увеличением уровня NO [Martin-Castano M.E., 2002].

Выявлена роль РАС в механизмах развития гипертензии у взрослых и детей [Chabit M. et al., 1997; Fujisawa T., et al., 1998] и при развитии поражений сердца [Nahser P.J. et al., 1995; Park J.K., et al., 1999, Bader M., 2001].

Большое значение состоянию РАС уделяется при развитии диабетической нефропатии. Известно, что в эпителии и интимае сосудов обнаружены ренин, ангиотензиноген, и ангиотензин и рецепторы к нему [Де Лиув, 1997; Bader M., 2001]. В почке чрезвычайно высоки концентрации ангиотензиногена и самые высокие в организме концентрации АПФ [Imig G.D. et al., 1999]. Установлено, что внутрипочечный АТ II формируется из ангиотензина I, поступающего из кровотока, и АТ II, образующегося в самой почечной ткани [Navar L.G. et al., 2000].

Установлено, что у 5-10% больных сахарным диабетом было выявлено снижение активности ренина плазмы крови, что приводит к развитию так называемого синдрома «гипоренинемического гипоальдостеронизма» [Chabit M. et

al., 1997; Fujisawa T. et al., 1998; Шестакова М.В., 1999, 2001; Есаян А.М., 2002]. Однако в серии экспериментов на модели ангиотензин II - зависимой гипертензии было показано, что содержание интратенального АТ II возрастает в большей степени, чем в циркуляции [Navar L.G. et al., 2000]. Повышение уровня пептида в почках происходит даже в условиях низкой активности ренина [Шестакова М.В., 1999, 2001; Есаян А.М., 2002]. Следовательно, развитие диабетической нефропатии связано с активацией РАС в почках.

С развитием молекулярно-генетических методов исследования идет активный поиск вклада генов РАС в развитие артериальной гипертензии, сердечно-сосудистых заболеваний, инфаркта миокарда, сосудистых осложнений сахарного диабета 1 и 2 типов и др. В настоящее время выделен ряд генов-кандидатов, значение которых активно изучается. К ним относятся гены ренина, ангиотензиногена (angiotensinogen, AGT), АПФ (angiotensin-converting enzyme, ACE) и гены рецепторов к ангиотензину [Дедов И.И., 2002]. При анализе T174M полиморфизма гена AGT выделяли 2 аллеля: T (отсутствие сайта рестрикции) и аллель M (присутствие сайта рестрикции). Известно, что аллель M гена AGT рассматривают в качестве маркера развития артериальной гипертензии [Gulmann S. et al., 1999; Сергеева Т.В., 2002]. Для гена ACE описан двухаллельный полиморфизм типа вставка/отсутствие вставки (Insertion/Deletion) и аллели получили название I и D аллели.

Установлено, что носители генотипа II имеют наиболее низкую активность АПФ, а у людей с генотипом DD она значительно выше [Кондратьев Я.Ю., 1998; Fujisawa T. et al., 1998; Елисеева Ю.Е., 2001]. Полагают, что аллель D и особенно генотип DD ассоциируется с повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний [Barnas U. et al., 1997; Kobayashi K. et al., 1999; Park J.K. et al., 1999], в отличие от аллеля I и генотипа II, которые оказывают защитное действие. I-аллели связаны с повышенной выносливостью при физических нагрузках у спортсменов [Nahser P.J. et al., 1995]. Обнаружена связь между генотипом DD и развитием гипертрофии левого желудочка, гипертрофической кардиомиопатией, пролиферацией гладкомышечных элементов сосудистой стенки и активностью атеросклеротического процесса, высоким риском стеноза и рестеноза коронарных артерий [Елисеева Ю.Е., 2001], развитием инфаркта миокарда и нефропатии при

СД 1 типа [Шестакова М.В., 2000; Woods D.R. et al., 1999; Bouhanick B. et al., 1999; Chiarelli F et al., 1999; Fujisawa T. et al., 1998; McFarlane R. et al., 1999; Кондратьев Я.Ю., 2000]. Генотип DD является независимым фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний и не проявляет кумулятивного эффекта с курением, дислипидемией и артериальной гипертонией [Fujisawa T. et al., 1998]. Предполагается, что выраженность и продолжительность действия ингибиторов АПФ может зависеть от генотипа. Так, у лиц с DD генотипом применение ингибиторов АПФ имеет наибольшую эффективность [Fujisawa T. et al., 1998; Bouhanick B. et al., 1999; Elzouki A.N. et al., 1999; Елисеева Ю.Е., 2001].

Таким образом, активация РАС оказывает существенное патогенетическое влияние на развитие гипертензивных состояний при заболеваниях сердечно-сосудистой системы, в том числе и при диабетической нефропатии.

1.3. АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩИЙ ФЕРМЕНТ

Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ, пептидил-дипептидаза А, КФ 3.4.15.1) относится к группе металлопротеинов, так как содержит цинк, определяющий его биологическую активность. Выявлены две формы АПФ: высоко- и низкомолекулярная. Синтез этих форм АПФ регулируется двумя специфическими тРНК, транскрипция которых осуществляется одним геном, локализованным на 17 хромосоме. Большая часть фермента синтезируется эндотелиальными клетками особенно интенсивно в сосудах легких и почек [Imboden H. et al., 1987; Galabov P., 1992; Альтшулер Б.Ю. и др., 2000; Елисеева Ю.Е., 2001; Яровая Г.А., 2001]. АПФ контролирует функциональное состояние сосудов, воздействуя на их тонус через генерацию октапептида АТ II [Ивлева А.Я., 1998; Hollenberg N.K. et al., 1998; Альтшулер Б.Ю. и др., 2000; Елисеева Ю.Е., 2001; Яровая Г.Я., 2001].

АПФ присутствует в плазме крови, нервных клетках, легочной ткани, клетках почечных канальцев, слюнных железах, на нервных окончаниях, на клетках моноклеарного ряда, а также в репродуктивных органах [Galabov P., 1992; Альтшулер Б.Ю. и др., 2000; Елисеева Ю.Е., 2001; Яровая Г.Я., 2001]. Основным местом синтеза АПФ в организме человека являются эндотелиальные клетки, особенно сосуды почек [Jören O. et al., 1997].

АПФ хорошо известен как фермент, регулирующий артериальное давление. Его ведущая роль в регуляции давления подтверждается широким и успешным применением ингибиторов АПФ в клинике для лечения различных форм гипертонии, также других нарушений кровообращения [Nahser P.J., et al., 1995; Park J.K. et al., 1999; Bader M., 2001].

Регуляция артериального давления - это основная, но не единственная функция АПФ. Он участвует в целом ряде процессов, протекающих в организме [Сидоренко Б.А. и др., 1998; Елисеева Ю.Е., 2001]. Известно о роли фермента в обмене нейропептидов, а также в реализации таких функций как защитные и иммунные реакции организма и репродуктивные процессы [Nahser P.J. et al., 1995; Насонов Е.Л. и др., 1998; Park J.K. et al., 1999; Елисеева Ю.Е., 2001]. АПФ обладает кининазной активностью, отщепляет от брадикинина С-концевой дипептид (фенилаланиларгинин) и препятствуют его сосудорасширяющему действию брадикинина [Насонов Е.Л. и др., 1998; Гомазков О.А. 2000; Елисеева Ю.Е., 2001]. При возникновении острой ишемии происходит угнетение кининазной активности АПФ с преобладанием ангиотензин-конвертирующей [Гомазков О.А., 1977, 2000].

Определение активности АПФ широко используется в клинической практике [Альтшулер Б.Ю. и др., 2001, Bader M. et al., 2001]. Высокая активность АПФ отмечена в детском и подростковом возрасте. Активность АПФ сыворотки крови взрослых составляет 20-50 Ед/л [Maguire G.A. et al., 1985; Remme W.J., 1999]. Увеличение активности фермента наблюдается более чем у половины больных тиреотоксикозом, у 30% больных сахарным диабетом [Насонов Е.Л. и др., 1998; Доценко В.Л., 2001]. Значительное снижение активности АПФ обнаружено под влиянием стероидных препаратов, особенно преднизолон, в активную фазу геморрагического васкулита [Альтшулер Б.Ю. и др., 2001]. Поскольку основным источником АПФ являются клетки сосудистого эндотелия, предполагается, что активность АПФ в сыворотке может отражать состояние эндотелиальных клеток [Насонов Е.Л. и др., 1998; Альтшулер Б.Ю. и др., 2001].

Таким образом, ангиотензин-превращающий фермент играет важную роль регуляции состояния эндотелия, работы сердца, почек, легких, центральной нервной системы, системной регуляции кровообращения. Нарушение активности фермента является одной из причин развития патологии этих систем.

1.4. ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

В организме здорового человека существует динамическое равновесие между системами протеиназ и их ингибиторами. При патологии это равновесие может изменяться в сторону угнетения или активации этих систем, что приводит к развитию различных осложнений.

Важную роль в регуляции протеолиза играют специфические белки-ингибиторы, обладающие свойством связывать протеолитические ферменты эндогенного и экзогенного происхождения. После альбуминов и иммуноглобулинов они представляют по количеству третью группу функционально активных белков (около 10% от общего уровня). Ингибиторы имеют большое значение в регуляции активности протеолитических ферментов, участвующих в процессах свертывания крови, фибринолиза, иммунных реакциях, образовании и распаде физиологически активных белков и пептидов, гормонов, структурных белков, во внутриклеточной белковом метаболизме, обмене соединительной ткани, воспалительных и аллергических реакциях [Веремеенко К.Н., 1985; Проценко В.А. и др., 1988; Казанская В.Ф., 1994; Norman M.R. et al., 1998].

Особый интерес вызывает α_1 -протеиназный ингибитор (α_1 -ПИ). α_1 -ПИ является одним из основных естественных ингибиторов сериновых протеиназ плазмы крови [Уорд А.М., 1981; Веремеенко К.Н., 1985; Котова Т.С. и др., 1986]. α_1 -ПИ угнетает эластазу, коллагеназу, тромбин, плазмин, ренин, калликреин, спермакрозин, а также бактериальные и гранулоцитарные протеазы [Котова Т.С., 1986; Cook L., et al., 1996].

α_1 -ПИ представляет собой гликопротеид с молекулярной массой 50000-55000, который содержит 12,5% углеводов и составляет 75% фракции α_1 -глобулинов. Синтезируется он в клетках паренхимы печени и распределяется по внутрисосудистому и внесосудистым пространствам. α_1 -ПИ является индикатором острой фазы воспаления, поэтому его уровень возрастает при травмах или инфекциях [Уорд А.М., 1981; Norman M.R. et al., 1997, 1998].

Детальные исследования показали, что ингибитор обладает множественным генетическим полиморфизмом и представлен целой системой белков,

обозначенной PI, классификация которой основана на электрофоретической подвижности изоформ ингибитора. К настоящему моменту в этой системе выявлено по меньшей мере около 75 различных типов и подтипов [Уорд А.М., 1981; Cook L. et al., 1996; Taddei C. et al., 1999]. Наиболее часто встречается аллель PiM с фенотипом PiMM. Около 10 изотипов связаны с недостаточностью ингибитора (Z, W₁, W₂, S, P, V, X, Y₁, Y₂ и нулевой) [Уорд А.М., 1981; Веремеенко К.Н., 1985; Пилипчук М., 1991].

α_1 -ПИ имеет отношение к развитию ряда как наследственных, так и приобретенных заболеваний. В настоящее время полагают, что врожденная недостаточность белка способствует развитию хронических заболеваний легких (эмфизема, хронический обструктивный бронхит, рак легких), печени (ювенильный цирроз, гепатоцеллюлярная карцинома) [Уорд А.М., 1981; Котова Т.С. и др., 1986; Cook L. et al., 1996; Hernandez-Richter T. et al., 1997]. Низкая активность наблюдается у больных с неонатальной дыхательной недостаточностью, острой желтой атрофией печени, при заболеваниях почек, связанных с повышенной протеинурией и после хирургического вмешательства [Уорд А.М., 1981; Веремеенко К.Н., 1985].

Повышение активности α_1 -ПИ плазмы крови наблюдается при большинстве воспалительных состояний и некрозе тканей. Увеличение содержания этого белка менее выражено при хронических воспалительных заболеваниях и коллагеновых сосудистых заболеваниях, ревматоидном артрите и узловатом полиартрите, а также при сахарном диабете [Котова Т.С. и др., 1986]. Значительное повышение уровня белка наблюдается у опухоленосителей, когда процесс носит распространенный характер [Уорд А.М., 1981; Веремеенко К.Н., 1985; Проценко В.А. и др., 1988; Shahid A., et al., 1996; Акбашева О.Е. и др., 1999 Lisowska-Mysiak B., 2001].

α_2 -Макроглобулин (α_2 -МГ) также относится к основным ингибиторам протеолитических ферментов плазмы крови. Этот белок имеет выраженное антифибринолитическое действие и обладает высоким сродством к калликреину и трипсину [Проценко А.В. 1984; Котова Т.С. и др., 1986]. α_2 -МГ относится к гликопротеинам, имеет молекулярную массу 724000 кДа, состоит из 4 субъединиц [Пасхина Т.С., 1976]. Известно, что α_2 -МГ является универсальным ингибитором протеиназ всех 4 классов – сериновых, тиоловых, кислых и металлопротеиназ

[Проценко А.В. 1984; Котова Т.С. и др., 1986]. Его синтез осуществляется в печени. Ингибитор играет важную роль в деятельности иммунной системы, взаимодействуя с факторами, контролирующими стадии иммунного ответа, предотвращает избыточный протеолиз и является важным диагностическим показателем ряда патологических состояний. Увеличение его активности наблюдается при сахарном диабете [Веремеенко К.Н. и др., 1969; Яровая Г.А. и др. 1994] при этом активность α_1 -ПИ находится в пределах нормы или снижена [Карнаух В.И., 1983, 1989; Bristow C.L. et al., 1996]. Увеличение активности α_2 -МГ наблюдается при нарушении липидного обмена и развитии дис- и гиперлипидемий [Bristow C.L. et al., 1996; Cook L. et al., 1996]. Снижение активности α_2 -МГ происходит при вирусном гепатите, на ранних стадиях ожоговой болезни, хроническом бронхите, бронхиальной астме [Яровая Г.А. и др., 1994; Bristow C.L. et al., 1996].

Имеются данные о наличии дисбаланса между этими системами при семейной гиперхолестеролемии [Алиджанова Х.Г. и др., 1989]; атеросклерозе [Statisaitis D. et al., 2001]; при заболеваниях легких, печени [Уорд А.М., 1981; Гельцер Б.И. и др. 1992; Гришина Е.И. и др., 1992], геморрагической лихорадке [Обухова Г.Г., 1980], гломерулонефрите [Карнаух В.И., 1983, 1989]. Существующее динамическое равновесие может нарушаться под действием внешних факторов (физической нагрузки, инфракрасного излучения [Зубкова С.М. и др., 1995] и зависит от возрастных [Базис В.Ю. и др., 1987] и индивидуальных особенностей [Удуд В.В. и др., 1998]. При сахарном диабете имеются единичные исследования, указывающие на наличие дисбаланса между системами протеолиза и их ингибиторами, что является фактором прогрессирования сосудистых осложнений заболевания [Ванюрихина Л.Т. и др., 1989].

В настоящее время большое внимание уделяется поиску новых препаратов, влияющих на состояние протеолиза. В клинической практике получили широкое распространение ингибиторы АПФ, которые являются препаратами выбора в терапии гипертензивных состояний, а также кардио-васкулярных и почечных патологий [The Eurodiab Ace Study Group and the Eurodiab Ace Substudy 2 Study Group, 1998; Remme W.J., 1999; Mogensen C.E, 1999; Manley H.J., 2000]. К ним относятся каптоприл, эналаприл, лизиноприл, рамиприл, перидонприл и др.

Каптоприл, созданный в 1975 г. в лаборатории фирмы «Squibb», является первым пероральным ИАПФ [Венгеровский А.И., 1998; Шестакова М.В., 2001].

Отличительная особенность этой группы препаратов состоит в том, что они сочетают в себе свойства мощного нейрогуморального модулятора и периферического, коронарного вазодилататора [Шестакова М.В., 1999, 2001; Barnas U. et al., 1997; Ruschitzka F. et al., 1999; Bader M., 2001; Gilbert R.E. et al., 2000; Hogeboom van Buggenum I. M. et al., 2002; Белова Л.А., 2002]. Ингибиторы АПФ непосредственно влияют на активность РАС, которая участвует в патогенезе гипертонической болезни и хронической сердечной недостаточности [Remme W.J., 1999; Mogensen C.E., 1999; Manley H.J., 2000; Kshirsagar A.V., 2000].

Ингибиторы АПФ реализуют свои фармакодинамические эффекты, влияя на два ключевых механизма. Во-первых, подавляя активность АПФ, ингибиторы тормозят образование ангиотензина II. Вследствие чего снижается вазоконстрикторная активность циркулирующих и тканевых компонентов РАС и опосредованно активность симпато-адреналовой системы. Ингибиторы АПФ способны также влиять на тонус n. Vagus. Снижение активности РАС приводит к торможению секреции вазопрессина и способствуют высвобождению оксида азота и предсердного натрийуретического гормона. Известно, что увеличение содержания тканевого активатора плазминогена также связано со снижением активности РАС [Сидоренко Б.А. и др., 1998; Карпов Р.С. и др., 2002]. Во-вторых, ингибиторы АПФ способны повышать содержание кининов в тканях и крови [Ольбинская Л.И., 1995; Bader M., 2001; Martin-Castano M.E. et al., 2002]. Повышенное содержание брадикинина после приема АПФ приводит к усилению вазодилатации и натрийуреза [The Eurodiab Ace Study Group and the Eurodiab Ace Substudy 2 Study Group, 1998; Remme W.J., 1999; Mogensen C.E., 1999; Manley H.J., 2000; Михайлов А.А., 2001].

Ингибиторы АПФ способны также изменять содержание эндотелинов - важнейшего патогенетического звена в развитии артериальной гипертонии. Установлено, что при приеме ингибиторов АПФ наблюдается повышение уровня эндотелинзависимого релаксирующего фактора и предсердного натрийуретического фактора, что сопровождается снижением концентрации

эндотелинов [Подзолков В.И., 1996; Könen C. et al., 2000; Haider A. et al., 2000; HOPE Study Investigators, 2000].

Некоторые из аналогов каптоприла выступают в качестве агонистов нитратов и оказывают дополнительное кардиопротективное действие [Сидоренко Б.А., 1998; Кутырина И.М., 2001]. Для ингибиторов АПФ свойственно наличие негемодинамических эффектов. Они препятствуют развитию протеинурии за счет снижения проницаемости базальной мембраны сосудов почек и блокады пролиферации мезангиальных клеток и экспрессии β -трансформирующего фактора роста эндотелиоцитов [Ruggenenti P. et al., 1998 Kim S. et al., 2000; Шестакова М.В., 2002].

Таким образом, ингибиторы протеолитических ферментов оказывают свое регулирующее влияние на скорость и течение процессов протеолиза. Для ингибиторов АПФ помимо их прямого действия на активность фермента характерно также наличие комплексного эффекта на гемодинамику, состояние эндотелия и прогрессирование сосудистых осложнений многих хронических заболеваний.

2. МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА И ЕГО ОСЛОЖНЕНИЙ

2.1. ЭТИОЛОГИЯ И ПАТОГЕНЕЗ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА

По определению ВОЗ (1999) СД – это группа метаболических (обменных) заболеваний, характеризующихся гипергликемией, которая является результатом дефектов секреции инсулина, действия инсулина или обоих этих факторов [Дедов И.И. и др., 2002]. В структуре эндокринных заболеваний по данным ВОЗ на сахарный диабет приходится 7-15% [Дедов И.И., 1998, 2000; Балаболкин М.И., 2000]. Однако истинная заболеваемость сахарным диабетом значительно выше и, по проведенным расчетам, реальное количество больных сахарным диабетом в России должно составлять 6-8 млн. человек. Эти данные базируются на основе проведенных эпидемиологических исследований в Москве, Санкт-Петербурге и других городах Российской Федерации [Никитин Ю.П., 1998; Сунцов Ю.Н. и др., 2002].

В 1999 ВОЗ предложена новая классификация нарушений углеводного обмена. В ней название «инсулинзависимый» и «инсулиннезависимый» диабет было изменено на диабет 1 и 2 типа. В Российской Федерации, по данным обращаемости, в 1993-1996 гг. зарегистрировано около 2 млн. больных сахарным диабетом, из которых около 300 тыс. приходится на больных, страдающих сахарным диабетом 1 типа (СД 1 типа), и около 1 млн 700 тыс - на больных сахарным диабетом 2 типа (СД 2 типа). В последние годы возросло число случаев заболеваемости СД 1 типа в детском возрасте. В среднем, ежегодно регистрируется до 9-15 случаев на 100 тысяч детского населения [Дедов И.И. др., 2002].

В основе СД 1 типа лежит деструкция β -клеток, обычно приводящая к абсолютному дефициту инсулина [Bach J.F., 1986; Atkinson M.A. et al., 1994; Дедов И.И. и др., 1996, 1998, 2002]. Согласно классификации различают 2 вида СД 1 типа: аутоиммунный, идиопатический. Аутоиммунный сахарный диабет характеризуется наличием антител к β -клеткам, полной инсулинзависимостью, тяжелым течением с склонностью к кетоацидозу, ассоциацией с генами главного комплекса гистосовместимости – HLA. К идиопатическому сахарному диабету относят случаи заболевания обычно у лиц, не относящихся к европейской расе, с деструкцией β -клеток, склонностью к кетоацидозу, но неизвестным патогенезом [Дедов И.М. и др., 2002].

Сахарный диабет – полиэтиологическое заболевание. В его развитии участвуют аутоиммунные, генетические, гормональные механизмы. В этиологии СД детского возраста большое значение придается генетическому фактору. Изучение наследования СД 1 типа выявило несомненную связь с генами гистосовместимости (HLA) [Давиденкова Е.Ф. и др., 1988; Осокин И.В. и др., 1992; Кураева Т.Л. и др., 1996; Green A. et al., 1996; Cryer P.E. et al., 1996]. Развитию болезни у детей способствуют персистирующие вирусы, провоцирующие аутоиммунный процесс. Панкреотропное действие оказывают вирусы Коксаки В, кори, краснухи, ветряной оспы. Но вирусная инфекция может провоцировать развитие диабета только у лиц с генетической предрасположенностью [Коноплева Т.Н. и др., 1992; Atkinson M.A., 1994]. Возможно, вирусы оказывают повреждающее действие на мембрану β -клеток, изменяя ее антигенные свойства. Вследствие этого запускается аутоиммунный процесс с последующей гибелью

клеток островков Лангерганса и формированием абсолютного дефицита к инсулину [Потемкин В. В. и др., 1985; Palmer J.F., 1993; Кравец Е.Б. и др., 1994; Becker J., 1996; Noorchasm N., 1997; Дедов И.И., 2002].

Известно, что инсулин является глобулярным белком, состоящим из 2 цепей А и В. Синтезируется в виде предшественника, который после отщепления С-пептида образует двухцепочечную структуру инсулина. Секрецию инсулина усиливает глюкоза, ионы кальция, аргинин и лейцин. Контролируют секрецию инсулина соматотропин и соматостатин [Дедов И.И., 1998]. Главная функция инсулина - регуляция метаболизма белков, жиров, углеводов. Это анаболический гормон. Он стимулирует поступление глюкозы в клетки, аминокислот, жирных кислот; способствует синтезу гликогена, белков, триглицеридов; стимулирует гликолиз; а также тормозит глюконеогенез и распад гликогена, белков и триглицеридов [Ефимов А.С., 1989; Atkinson M.A., 1994; Дедов И.И., 1998, 2000; 2002; Dawson K. et al., 1998; Балаболкин М.И., 2000;].

При дефиците инсулина наблюдается гипергликемия, увеличивается распад белков, что сопровождается избыточным высвобождением аминокислот, продукты превращения которых используются в глюконеогенезе. Их ускоренное дезаминирование ведет к увеличению образования аммиака и мочевины. Одновременное усиление липолиза и, следовательно, повышение содержания свободных жирных кислот способствует усиленному образованию кетоновых тел и холестерина из ацетил-КоА, накапливающихся в избытке за счет β -окисления жирных кислот. Биохимические нарушения приводят в конечном итоге к отрицательному азотистому балансу и к формированию гиперосмотической дегидратации [Ефимов А.С., 1989; Бышевский А.Ш. и др., 1994; Дедов И.И., 1998, 2000; Балаболкин М.И., 2000; Mc Lennan S.V. et al., 2002; Микаелян Н.П. и др., 2002; Шестакова М.В. и др., 2002].

Основной особенностью диабета у детей является острое манифестное начало заболевания. Основные симптомы заболевания представлены полиурией, полидиспсией, полифагией, потерей массы тела [Ефимов А.С., 1989; Бышевский А.Ш. и др., 1994; Bingley P.J. et al., 1997; Boggetti E., 1997 Дедов И.И., 1998, 2000; Балаболкин М.И., 2000].

Диагностика сахарного диабета осуществляется с помощью критериев ВОЗ (1999): при повышении содержания глюкозы в плазме крови натощак до 7,0 ммоль/л либо при уровне глюкозы более 11 ммоль/л через 2 часа после приема пищи. При СД 1 типа диагноз считается установленным, если уровень гликемии, определяемый в любое время суток более 11 ммоль/л в капиллярной крови и более 10 ммоль/л в плазме крови. Критерием компенсации является уровень гликозилированного гемоглобина (HbA_{1c}), который отражает содержание глюкозы в течение 3 месяцев. Уровень HbA_{1c} при компенсации СД 1 типа находится в пределах 6,0 – 7,0%, при субкомпенсации – 7,1-7,5% и при декомпенсации – более 7,5%. Однако при СД 1 типа у детей данные показатели несколько выше в связи с лабильностью диабета в детском возрасте и склонностью их к гипогликемиям [Дедов И.И., 2002].

Для лечения СД 1 типа и профилактики его сосудистых осложнений препаратами выбора являются генно-инженерные инсулины человека. Суточная потребность в инсулине на кг массы тела в дебюте заболевания составляет 0,5-0,6 Ед, при длительном диабете увеличивается до 0,7-0,8 Ед и в состоянии декомпенсации – 1,0-1,5 Ед. В период пубертата доза инсулина также возрастает до 1,5-2,0 Ед/кг массы тела. Коррекция дозы инсулина осуществляется на основании уровня гликемии в течении суток [Балаболкин М.П., 2000; Дедов И.И., 2002].

К сосудистым осложнениям СД относятся микроангиопатии – поражение капилляров, артериол и венул, макроангиопатии – поражение сосудов крупного и среднего калибра [Vach J.F. 1986; Воронцов А.В., 1997; Шестакова М.В., 1999]. Макроангиопатии характерны для СД 2 типа, микроангиопатии – для СД 1 типа. Клиническим проявлением микроангиопатий являются ретинопатия и нефропатия. Макроангиопатии приводят к инфаркту миокарда, инсульту, гангрене нижних конечностей [Barnas U. et al., 1997; Добронравов А.А., 2002; Дедов И.И., 2002].

Диабетическая ретинопатия является классическим примером сосудистых осложнений сахарного диабета. Ретинальные сосудистые осложнения проявляются у больных СД 1 и 2 типов [Ефимов А.С., 1989; Шестакова М.В., 1999, 2002]. Ретинопатия занимает одно из первых мест среди болезней органов зрения, приводящих к полной потере зрения у лиц молодого возраста [Klein R., 1992; Bognetti E. et al., 1997; Дедов И.И. и др., 2002]. Слепота у больных сахарным

диабетом наступает в 25 раз чаще, чем в общей популяции [Robinson N. et al., 1996; Laakso M., 1997]. Инвалидность по зрению отмечается более чем у 10% больных сахарным диабетом. Патологические изменения глазного дна в большинстве случаев возникают через 5-10 лет от начала заболевания.

Диабетическая нефропатия в настоящее время является ведущей причиной гибели больных СД. Частота развития диабетической нефропатии колеблется от 40 до 50% у больных СД 1 типа и от 15 до 30% у СД 2 типа [Robinson N. et al., 1996; Barnas U. et al., 1997; Наточин Ю.В., 2001]. Опасность этого осложнения состоит в том, что развиваясь достаточно медленно и постепенно, диабетическое поражение почек долгое время остается незамеченным, поскольку клинически не вызывает у больного ощущения дискомфорта [Касаткина Э.П., 1996; Бондарь И.А., 1997; Mongensen C. E., 1999; Haider A et al., 2000; Балаболкин М.П. 2000; Mc Lennan S.V. et al., 2002; Микаелян Н.П. и др., 2002; Шестакова М.В. и др., 2002]. Основными признаками диабетической нефропатии являются протеинурия, отеки, повышение артериального давления. Многими исследователями выявлена устойчивая взаимосвязь между длительностью диабета и развитием диабетической нефропатии [Ракова Н.Г, 1998; Дедов И.И. и др., 2002]. Анализ распространенности диабетической нефропатии в ретроспективных исследованиях больших групп больных ювенильным СД показал ее рост пропорционально длительности заболевания. У детей при длительности СД менее 5 лет вероятность развития нефропатии минимальна и регистрируется в единичных случаях. Среди пациентов, страдающих СД 1 типа 5-10 лет, диабетическая нефропатия выявляется у 37%, а свыше 10 лет – у 60% обследованных [Дедов И.И. и др., 2002]. Поражение почек при СД приводит к развитию хронической почечной недостаточности, что является показанием для трансплантации почек.

Нейропатия нижних конечностей также относится к осложнениям сахарного диабета. Распространенность диабетической нейропатии колеблется в достаточно широких пределах – 5-90%, что в первую очередь связано с отсутствием стандартизированных диагностических критериев. Частота поражения периферических нервов при СД коррелирует с длительностью заболевания [Young R., 1983] Значительное место при развитии нейропатии отводится первичному

поражению сосудов, участвующих в кровоснабжении периферических отделов нервной системы [Donaghue K., 1998; Cameron N.E. et al., 2001].

Патогенез сосудистых осложнений сахарного диабета окончательно не установлен. Остается вопрос о первичности или вторичности ангиопатий по отношению к сахарному диабету, т.е. являются ли ангиопатии поздними осложнениями сахарного диабета или же проявлениями заболевания [Юшков П.В. и др., 2001; Mc Lennan S.V. et al., 2002; Микаелян Н.П. и др., 2002; Шестакова М.В. и др., 2002; Дедов И.И., 2002]. Известно, что микроангиопатии встречаются при сахарном диабете и отсутствуют при других заболеваниях, связанных с патологией сосудистой системы [Балаболкин М.И., 1997, 1998, 2000; Karamanos V. et al., 2001].

2.2. ПАТОГЕНЕЗ СОСУДИСТЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Изучение распространенности и частоты осложнений диабета показывает, что не у всех больных, даже при наличии неудовлетворительной компенсации диабета, развиваются сосудистые осложнения. Так, нефропатия встречается у 40%, ретинопатия – у 60% больных диабетом [Ефимов А.С., 1989; Шестакова 1999; Наточин Ю.В., 2002]. В патогенезе ангиопатий выделяют два основных фактора - внутренний и внешний. К внутреннему фактору следует отнести генетическую предрасположенность, т.е. наследование ангиопатий. Наиболее интенсивно исследуются генов кандидатов, имеющих полиморфные аллели при развитии диабетической нефропатии [Шестакова М.В., 2000; Дедов И.И., 2002]. Большое внимание уделяется ее ассоциации с I/D полиморфизмом гена АПФ, VNTR полиморфизмом гена NO-синтазы и рестрикционным полиморфизмом гена AGT [Ringel J. et al., 1997; Tarnow L. et al., 2000; Шахмалова М.Ш., 2001]. Для реализации генетической предрасположенности к развитию ангиопатий необходимо участие внешних факторов, в роли которых выступают в первую очередь гипергликемия и длительность заболевания [Karamanos V., et al., 2001].

Нарушения метаболизма при СД приводят не только к функциональным, но и структурным изменениям в клетках эндотелия. Известно, что гипергликемия является не единственным этиологическим фактором развития сосудистых катастроф. И все же повышение содержания глюкозы является достаточно

токсичным для клеток различных органов и тканей [Ангельский А.Н., 1995; Балаболкин И.И., 1998, 2000]. Следует отметить, что клетки сосудистого эндотелия являются независимыми от инсулина потребителями глюкозы. При гипергликемии эндотелий становится мишенью токсического воздействия высоких концентраций глюкозы [Cameron N.E. et al., 2001].

Хроническая гипергликемия является причиной гликозилирования многих белков и субстратов в организме. Накопление продуктов неферментативного гликозилирования белков нарушают структуру и функцию сосудистой стенки [Chiarelli F. et al., 1999].

Несомненна роль активации метаболизма глюкозы по полиоловому пути в патогенезе ангиопатий, что приводит к накоплению большого количества сорбитола и фруктозы в клетках [Балаболкин, 1998, 2001; Gopaul N.K., 2001]. Эти изменения нарушают внутриклеточную осморегуляцию, вызывают внутриклеточное накопление жидкости, отек и разрыв мембраны эндотелиоцитов [Дедов И.И., 2002].

При развитии сахарного диабета большое значение уделяется процессам перекисного окисления липидов [Галенок В.А. и др., 1985; Нелаева А.А. и др., 1999; Дедов И.И. и др., 2002]. Известно, что при СД 1 отдельные звенья антиоксидантной защиты организма не справляются с возросшей нагрузкой на фоне хронической гипергликемии [Серкова В.К., 1986; Ефимов А.С., 1989; Chin J. H. et al., 1992].

Метаболические нарушения при СД сопровождаются также изменениями липидного обмена. Как правило, в крови больных наблюдается повышение концентрации холестерина, липопротеинов низкой плотности и липопротеинов очень низкой плотности, содержание липопротеинов высокой плотности снижается [Ефимов А.С., 1989; Климов А.Н., 1995; Дедов И.И., 1999; Кондратьева Е.И. и др., 2000]. При СД 1 типа обнаружено образование модифицированных форм липопротеинов сыворотки крови (гликозилированных, перекисно-модифицированных). Большое значение в развитии ангиопатий отводится механизмам, связанным с нарушением структуры апо-белков липопротеинов [Климов А.Н., 1995].

При сахарном диабете нарушения липидного обмена и усиление ПОЛ создают предпосылки для нарушения структуры и функций мембран клеток. В работах ряда

исследователей [Новицкий В.В. и др., 1997-2000; Колосова М.В., 1999] было показано, что при сахарном диабете 1 типа у детей наблюдается изменение ультраструктуры и поверхностной архитектоники эритроцитов периферической крови, изменения состава мембран. Данные нарушения сопровождались повышением микровязкости липидного бислоя и усилением процессов обратимой агрегации эритроцитов, что способствует изменению реологических свойств крови.

Рассматривая аутоиммунную концепцию патогенеза заболевания и последующего развития микроангиопатий, нельзя не учитывать роль нарушений иммунной системы в данных процессах. При манифестации СД 1 отмечается депрессия Т-клеточного звена иммунной системы при активации гуморального иммунитета, которая становится более выраженной с увеличением продолжительности заболевания [Кравец Е.Б. и др., 1994; Кураева Т.Л., 1991, 1997; Бондарь И.А., 1997; Дедов И.И. и др., 1999; Балаболкин М.И., 2000; Кондратьева Е.И., 2001].

Поражение эндотелия микрососудов многими авторами признается первичными в развитии ангиопатий [Юшков П.В. и др., 2001; Алмазов В.А., 2001]. В настоящее время сосудистые осложнения при сахарном диабете связывают с нарушением функции эндотелия (эндотелиальная дисфункция) [Mombouli J.V., Vanhoutte P.M., 1999; Pepinne C.J., 1999; Коломоец Н.М., 2001;]. Состояние сосудистого эндотелия имеет важное клиническое значение в оценке активности патологического процесса и прогнозирования развития осложнений [Шестакова М.В. и др., 1995; Насонов Е.Л. и др., 1998; Vanhoutte P.M., 1998; Mc Farlane R. et al., 1999; Pepine C.J., 1999; Drexler H., 1999; Monbouli G.V. et al., 1999; Маланьина К.М. и др., 2002]

Эндотелий сосудов вырабатывает ряд сосудосуживающих, релаксирующих и ростовых факторов, факторов свертывания крови и компонентов фибринолитической системы [Иванова О.В., 1997; Drexler H., 1998; Затейщикова А.А. и др., 1998; Arosio E. et al., 1999; Pepine C.J., 1999; Беленков Ю.Н., 2000; Dogra G. et al., 2001; Карпов Р.С., 2002]. Мощным сосудорасширяющим действием обладают оксида азота, простаглицлин и эндотелийзависимый фактор гиперполяризации. При длительном воздействии различных повреждающих факторов происходит постепенное истощение и извращение дилатирующей

способности эндотелия. Преимущественным ответом эндотелиальных клеток на обычные же стимулы становятся вазоконстрикция и пролиферация, что составляет основу эндотелиальной дисфункции [Шестакова М.В. и др., 1995; Бондарь И.А., 1997; Drexler H., 1998; Беленков Ю.Н., 2000; Коломоец Н.М., 2001].

Эндотелиальная дисфункция составляет концепцию развития атеросклероза, эссенциальной гипертонии и ишемической болезни сердца [Иванова О.В., 1997; Затеищикова А.А. и др., 1998; Monbouli G.V. et al., 1999; Беленков Ю.Н. и др., 2000; Алмазов В.А. и др., 2001; Коломоец Н.М., 2001; Маланьина К.М., 2002].

Большое внимание в развитии эндотелиальной дисфункции уделяется РАС и ККС. Повышение активности АПФ приводит к увеличению содержания АТ II. Известно, что АТ II обладает мощным вазоконстрикторным эффектом [The Eurodiab Ace Study Group and the Eurodiab Ace Substudy 2 Study Group, 1998; Remme W.J., 1999; Mogensen C.E., 1999; Manley H.J., 2000;]. Также АТ II способствует пролиферации мезангиальных клеток [Ruggenetti P. et al., 1998; Kim S. et al., 2000]. К генетическим факторам развития эндотелиальной дисфункции относят DD-генотип гена ACE, что связано с высокой активностью АПФ [Butler R., 1999; Perticone F. et al., 1999; Park J.K. et al., 1999].

ККС препятствует развитию эндотелиальной дисфункции [Katori M. et al., 1998; Emanuelli C. et al., 1999; Monbouli G.V. et al., 1999; Majama M., 2001]. Полагают, что брадикинин – продукт активации ККС способствует расширению сосудов и стимулирует синтез NO [Nolly H. et al., 1997; Zhang X. et al., 1997; Гомазков О.А., 2000; Majima M., 2001]. По данным ряда авторов инсулин также обладает вазодилатирующим действием. Введение инсулина при сахарном диабете 1 типа восстанавливает функцию эндотелия [Sobrevia L. et al., 1997; Nahser P.J. et al., 1995].

Таким образом, в патогенезе сосудистых осложнений при сахарном диабете 1 типа весомая роль принадлежит гипергликемии и недостатку инсулина. Известно значение перекисного окисления липидов, активации полиолового пути метаболизма глюкозы, неферментативного гликозилирования белков и нарушения липидного обмена, иммунных процессов в механизме поражения эндотелия сосудов. Активно изучается участие гемодинамических факторов в развитии нефропатии. Однако роль протеолитических систем в патогенезе сосудистых

осложнениях сахарного диабета 1 типа недостаточно изучено. Одной из важных проблем, связанных с изучением сахарного диабета является регуляция активности систем протеолиза. Выяснение механизма микроциркуляторных расстройств при сахарном диабете открывает новые подходы в диагностике, лечении и профилактики его осложнений.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. ОБЪЕМ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинический материал. Обследовано 119 детей больных СД 1 типа в возрасте от 8 до 15 лет. Кратность наблюдения составила в среднем 2-3 раза, длительность наблюдения – до 2-х лет. Диагноз СД 1 типа устанавливали после детального клинико-инструментального обследования на основании критериев Комитета экспертов ВОЗ (1999). В табл. 1 приведено распределение обследуемых детей по группам. Контрольную группу составили 32 практически здоровых ребенка, средний возраст $12,8 \pm 0,1$ лет. Обследованные дети не имели хронических заболеваний и не болели острыми респираторными заболеваниями в течение 1 месяца до взятия крови на определение изучаемых показателей.

Общую группу больных СД 1 типа составили 59 мальчиков и 60 девочек. По длительности заболевания больных разделили на 6 групп от впервые выявленного диабета до срока более 10 лет. Было выделено 4 группы больных, имеющих сосудистые осложнения. В группу детей без осложнений не были включены дети с впервые выявленным диабетом и на первом году заболевания, когда активно идут аутоиммунные процессы и сохраняется остаточная секреция β -клеток поджелудочной железы. Для диагностики диабетической ретинопатии использовали классификацию E. Koper, M. Porta (1992). Критерием диагностики диабетической нефропатии (ДН) у детей служила классификация C. Mogensen et al. (1983), в соответствии с которой выделены группы больных с микроальбуминурией и протеинурией. Стадия микроальбуминурии соответствовала содержанию альбумина в моче от 30 до 300 мг в сутки, протеинурии определяли при уровне белка в моче более 300 мг в сутки. Выявлено 15 больных СД 1 типа с нефропатией на стадии микроальбуминурии, доклинической стадии. Клинические признаки нарушения функции почек в виде отеков и непостоянного повышения артериального давления обнаружены у 11 детей, которые составили группу больных с ДН на стадии протеинурии.

Потребность в инсулине в среднем составила $0,70 \pm 0,02$ ЕД на кг массы тела. Дети с потребностью в инсулине до 0,7 ЕД на кг массы тела в сутки и выше 0,7 ЕД/кг в сутки составили 2 группы больных. Критерием компенсации заболевания

являлся уровень HbA_{1c} [Касаткина Э.П., 1991; Дедов И.И., 1999]. Больные были разделены на 3 группы с уровнем HbA_{1c} от 8 до 11%, от 11 до 15% и более 15%.

Обследование детей включало подробный анализ анамнестических данных с учетом сведений о состоянии здоровья родителей и родственников. Для изучения влияния наследственности на исследуемые показатели были выделены группы детей с наличием и отсутствием в семейном анамнезе случаев сахарного диабета и заболеваний сердечно-сосудистой системы, таких как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертензия.

Таблица 1

Характеристика групп больных сахарным диабетом 1 типа

Здоровые дети, n=32, средний возраст – 12,8±0,1 лет			Сахарный диабет 1 типа, n=119, средний возраст – 13,1±0,3 лет		
Пол					
Мальчики, n=59, средний возраст – 12,8±0,4 лет			Девочки, n=60, средний возраст – 13,4±0,4 лет		
Длительность заболевания					
Впервые выявленный, n=26	От 1 до 3 лет, n=18	От 3 до 5 лет, n=27	От 5 до 7 лет, n=14	От 7 до 10 лет, n=26	Более 10 лет, n=8
Потребность в инсулине					
До 0,7 ЕД/кг массы тела n=52			Более 0,7 ЕД/кг массы тела n=67		
Наличие осложнений СД 1 типа					
Без осложнений, n=54		Ретинопатия, n=13		Нефропатия, n=26	
				Стадия микроальбуминурии n=15	Стадия протеинурии n=11
Степень компенсации заболевания (по уровню HbA_{1c} , %)					
От 8 до 11%, n=11		От 11 до 15%, n=21		Более 15%, n=9	
Наличие семейных случаев сахарного диабета					
Без отягощенной наследственности, n=90			С отягощенной наследственностью, n=29		
Наличие семейных случаев сердечно-сосудистых заболеваний					
Без отягощенной наследственности, n=81			С отягощенной наследственностью, n=38		

Для коррекции гемодинамических нарушений у больных с диабетической нефропатией использовали препарат ЭНАП или эналаприл (KRKA, Slovenia). Дети получали препарат в дозе 5 мг в сутки в течение 4 месяцев. У 12 больных этой группы на фоне проводимой терапии дополнительно определяли активность ангиотензин-превращающего фермента.

Экспериментальные исследования. В условиях *in vitro* проводили 3 серии экспериментов с добавлением инсулина, глюкозы и каптоприла к плазме крови 50 больных СД 1 типа и 15 здоровых детей (табл. 2). Общая группа больных состояла из 38 детей без осложнений и 12 больных с диабетической нефропатией. К 0,25 мл плазмы крови 15 здоровых и 50 больных детей добавляли инсулин в дозах 7,5; 15,0 и 30,0 мкЕд/мл, глюкозу в дозах 2,0; 5,0; 15,0 ммоль/л и каптоприл в дозах 0,075; 0,15 и 0,30 мкг/мл.

Концентрации инсулина и глюкозы в пробах соответствовали низкому, нормальному и повышенному его уровню в сыворотке крови человека [Кравец Е.Б. и др., 1989]. Содержание каптоприла было рассчитано, исходя из его минимальной, поддерживающей и максимальной дозы для детей [Машковский М.Д., 1998].

Таблица 2

Схема эксперимента

Препарат	Здоровые дети, n=15	Больные сахарным диабетом 1 типа, n=50
Инсулин, мкЕд/мл	7,5	7,5
	15	15
	30	30
Глюкоза, ммоль/л	2	2
	5	5
	15	15
Каптоприл, мкг/мл	0,075	0,075
	0,15	0,15
	0,30	0,30

Молекулярно-генетические исследования. У 70 детей с СД 1 типа (26 девочек и 44 мальчика) было проведено молекулярно-генетическое обследование, включавшее определение I/D-полиморфизма гена ACE и рестрикционного полиморфизма гена AGT. Было выявлено 15 детей с генотипом II, 37 больных - с

генотипом ID и 18 –с генотипом DD. T174M рестрикционный полиморфизм гена AGT был определен только у 61 ребенка, из них 50 детей имели TT генотип AGT, 10 детей - TM генотип и 1 ребенок – MM генотип. Молекулярно-генетические исследования были проведены на базе НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН РФ (директор – академик РАМН, проф., д.м.н. В.П. Пузырев) аспирантами Е.В. Юрченко и Н.В. Тарасенко под руководством д.м.н. Е.И. Кондратьевой.

2.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы клинико-инструментальные, биохимические, статистические методы исследования.

1. Клинико-инструментальные методы исследования включали обследование ребенка больного СД с использованием скрининговых методов исследования (определение микроальбуминурии, гликозилированного гемоглобина, осмотр глазного дна, определение полей и остроты зрения).
2. Биохимические методы включали определение показателей активности калликреина, калликреиногена, ангиотензин-превращающего фермента, α_1 -протеиназного и ингибитора и α_2 -макроглобулина.
3. Молекулярно-генетические методы исследования включали анализ I/D-полиморфизма гена ACE и T174M рестрикционного полиморфизма гена AGT.
4. Статистическая обработка включала методы описания количественных показателей, корреляционный, регрессионный и дисперсионный методы анализы, исследование диагностической ценности показателей при диабетической нефропатии

Получение сыворотки и плазмы крови

У всех обследованных утром, натощак, через 10 часов после последнего приема пищи брали кровь из локтевой вены для получения плазмы и сыворотки крови. Сыворотку отделяли от сгустка и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Для получения плазмы в кровь добавляли 3,8% раствор цитрата натрия с последующим центрифугированием.

Определение активности калликреина и калликреиногена плазмы крови

[Пасхина Т.С. и др., 1974]

Калликреин (КФ 3.4.4.14) фермент класса гидролаз группы сериновых протеиназ. Основу метода определения активности калликреина составляют его катионные свойства, в силу чего он не сорбируется при низкой ионной силе раствора при pH 7,0 на DEAE-сефадексе А-50, и может быть определен в не адсорбированной фракции плазмы крови.

0,25 мл плазмы крови разводили 0,02 М фосфатным буфером pH 7,0 в 3 раза, переносили в колонку, заполненную суспензией DEAE-сефадекса А-50, приготовленную на 0,02 М Na,K-фосфатном буфере, pH 7,0. Фермент элюировали 0,02 М фосфатным буфером, содержащим 0,05 М NaCl со скоростью 1 мл в мин. Доводили объем элюата до 5 мл. Для определения активности калликреина к элюату добавляли 0,1 М Na⁺,K⁺-фосфатный буфер, pH 8,0, оставляли на 10 мин при температуре 25° С, затем вносили 1,5 мМ раствор БАЭЭ (α -N-бензоил-L-аргинин этилового эфира). Спектрофотометрировали при 253 нм. Для определения активности калликреиногена к элюату, полученному при пропускании плазмы через колонку, заполненную DEAE-сефадексом А-50, добавляли 0,1 М Na,K-фосфатный буфер, pH 8,0 и 0,1 % раствор ингибитора трипсина из сои в 10 мМ растворе CaCl₂ на 1 мМ растворе HCl. Пробу инкубировали 2 минуты при 25° С, добавляли 0,1 % раствор ингибитора трипсина из сои в 0,1 М Na,K-фосфатном буфере, pH 8,0. Через 15 минут вносили 1,5 мМ раствор БАЭЭ. Эстеролитическую активность пробы измеряли спектрофотометрически по приросту оптической плотности при длине волны 253 нм. БАЭЭ-эстеразную активность калликреина и калликреиногена выражали в миллиединицах на мл (мЕ/мл). За единицу активности принимали количество калликреина, которое катализирует расщепление БАЭЭ в стандартных условиях, освобождая 1мкМ бензоил-аргинина за 1 минуту.

Определение активности α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина плазмы крови [Нартикова В.Ф. и др., 1979]

Активность α_1 -протеиназного ингибитора (α_1 -ПИ) и α_2 -макроглобулина (α_2 -МГ) определяли энзиматическим методом по торможению гидролиза БАЭЭ трипсином. Сыворотку крови перед определением активности α_2 -МГ разводили в 10 раз, для α_1 -ПИ – в 50 раз.

Определение активности α_1 -протеиназного ингибитора. Готовили две пробы – опытную и контрольную. Опытная проба содержала 1,8 мл 0,05 М трис-НСl-буфера, рН 8,0, 0,1 мл разведенной 1 : 50 плазмы крови и 0,1 мл 0,01% раствора трипсина. Контрольная проба содержала 1,9 мл трис-НСl-буфера и 0,1 мл 0,01% раствора трипсина. Обе пробы выдерживали в кюветах в течение 5 мин при 25 °С. Затем добавляют в каждую пробу по 1 мл раствора БАЭЭ; быстро перемешивали и измеряли прирост оптической плотности при длине волны 253 нм против пробы, содержащей только реактивы.

Активность α_1 -протеиназного ингибитора выражали в ИЕ/мл. За 1 ингибиторную единицу (ИЕ) принимали такое количество плазмы крови, которое тормозит или связывает активность 1 Е трипсина (расщепление 1 мкмоль БАЭЭ за 1 мин).

Определение активности α_2 -макроглобулина. К 1,75 мл 0,05 М трис-НСl-буфера, рН 8,0, добавляли 0,1 мл разведенной 1 : 10 плазмы крови и 0,05 мл раствора 0,1% трипсина, преинкубировали в течение 5 мин при 25 °С, после чего вносили 0,1 мл 0,1% раствора соевого ингибитора трипсина, перемешивали содержимое кюветы и через 5 мин добавляли 1 мл 1,5 мМ раствора БАЭЭ; пробу перемешивали и измеряли прирост оптической плотности при длине волны 253 нм в течение 5 мин против контрольной пробы, содержащей только реактивы (2 мл трис-НСl-буфера, 1 мл раствора БАЭЭ). Активность α_2 -макроглобулина выражали в ИЕ/мл.

Спектрофотометрический метод определения активности ангиотензин-превращающего фермента [Голиков П.П. и др., 1998]

Активность ангиотензин-превращающего фермента определяли по скорости гидролиза синтетического субстрата фурилакрилоилфенилаланилглицилглицина (ФАПГГ).

В 2 пробирки вносили по 0,02 мл сыворотки крови, в одну из них добавляли 0,1 мл 1 мМ раствора ФАПГГ в 50 мМ трис-(гидроксиметил)-аминометановом буфере, содержащем 300 мМ хлорида натрия, (рН 8,3), в другую – 0,1 мл 20 мМ раствора ЭДТА (контроль). Пробы инкубировали в термостате в течение 30 мин при 37 °С. Затем пробирки помещали в ледяную баню и в опытную пробирку добавляли 0,1 мл 20 мМ раствора ЭДТА, в контрольную – 0,1 мл 1 мМ раствора ФАПГГ, тщательно перемешивали. Через 5 мин в обе пробирки вносили по 2,3 мл буферного раствора и на спектрофотометре определяли оптическую плотность при длине волны 334 нм. Активность фермента выражали в мкмоль/мин·л.

Выделение ДНК

Выделение ДНК проводили с помощью неэнзиматического метода с некоторыми модификациями (Lahiri D.K. et al., 1992).

Методика выделения ДНК из цельной крови включала следующие этапы:

- размораживание крови (в течение суток при +4⁰С);
- добавление 20 мл дистиллированной воды (предварительно охлажденной) и центрифугирование при 5000g в течение 20 минут при температуре +4⁰С для осаждения клеток;
- ресуспензирование клеточного осадка в 20 мл 0,1% раствора Тритон X100 (предварительно охлажденного) и центрифугирование в том же режиме для отмывания эритроцитов;
- ресуспензирование клеточного осадка в 2 мл буфера для лизиса лейкоцитов (50 мМ раствора трис-HCl, 150 мМ раствора NaCl, 100 мМ раствора EDTA);
- лизис клеток и ядер добавлением 350 мкл 10% раствора додецилсульфата натрия;
- осаждение белков добавлением 600 мкл 5М раствора NaClO₄;
- денатурация термостабильных белков в течение 10 мин на водяной бане при 60⁰С;

- экстракция липидов и последующее центрифугирование при 3000 об/мин в течение 20 мин при +4⁰С.
 - осаждение ДНК добавлением охлажденного 96% этанола (2 объема);
 - промывка ДНК в 70% охлажденном этаноле;
 - высушивание ДНК при комнатной температуре и растворение в деионизованной воде (2 мл) в течение суток при +4⁰С.
- Раствор выделенной ДНК хранили при -20⁰С.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)

ПЦР представляет собой многократно повторяющиеся циклы синтеза (амплификация) специфической области ДНК-мишени в присутствии термостабильной ДНК-полимеразы, дезоксирибозид-трифосфатов, соответствующего солевого буфера и олигонуклеотидных затравок - праймеров, определяющих границы амплифицируемого участка репликации.

Каждый цикл состоит из трех стадий с различными температурными режимами. На первой стадии при 94⁰ С происходит денатурация цепей ДНК, затем при 54-58⁰ С - присоединение (отжиг) праймеров к гомологичным последовательностям на ДНК-мишени. При температуре 72⁰ С протекает синтез новых цепей ДНК путем удлинения праймера в направлении 5'-3'. В каждом цикле происходит удвоение числа копий амплифицируемого участка, что позволяет за 25-40 циклов наработать ДНК, соответствующую размеру этого участка, в количестве, достаточном для ее определения с помощью электрофореза.

Анализ полиморфизма в генах ACE и AGT проводили при помощи ПЦР с использованием праймеров, синтезированных группой синтеза и секвенса нуклеиновых кислот НИИ медицинской генетики ТЦ СО РАМН (руководитель – А.И.Кутмин). Нуклеотидная последовательность праймеров соответствовала данным, приведенным в литературе.

Смесь для амплификации (20 мкл) включала: 5 мкл 10-кратного буфера, поставляемого с Taq-полимеразой (650 mM трис-НСl (рН=8,9), 160 mM раствора (NH₄)₂SO₄, 15mM раствора MgCl₂, 0,5% Tween-20); 3 мкл раствора dNTP с 2mM концентрацией каждого dNTP (т.е. по 6 нМ каждого); 5 мкл прямого и 5 мкл обратного праймера с концентрацией 1 о.е./мл; 2 мкл образца ДНК; 1,5 е.а. Taq-

полимеразы. Все компоненты смешивали в 0,5 мл пластиковых пробирках, сверху наносили для предотвращения испарения 30 мкл масла и проводили амплификацию в термоциклере MJ Research (США).

I/D полиморфизм гена ACE и T174M рестрикционный полиморфизм гена AGT

Для генотипирования I/D полиморфизма гена ACE и AGT разделение продуктов амплификации проводили путем электрофореза в 2% агарозном геле с последующей визуализацией в ультрафиолетовом свете. Применяли следующую номенклатуру аллелей: для гена ACE - аллель I (490 п.н.) – наличие (инсерция) Alu-повтора, аллель D (190 п.н.) – его отсутствие; для гена AGT - аллель T (303 п.н.) - отсутствие сайта рестрикции, аллель M (присутствие сайта) - два фрагмента 211 п.н. и 92 п.н. В качестве маркеров молекулярного размера применяли ДНК плазмиды pUC19, гидролизованную ферментом MspI. Размер рестрикционных фрагментов определяли по методу наименьших квадратов, исходя из длины пробега маркерных фрагментов. В процессе работы были использованы реактивы, произведенные фирмами Sigma (США), Медиген и Сибэнзим (Россия).

МЕТОДЫ СТАТИСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДАННЫХ

Результаты исследований вносили в компьютерную базу данных с последующей статистической обработкой с применением пакетов прикладных программ Microsoft Excel, Statistica 5.0.

Статистические методы были разделены на методы для описания количественных признаков [Лакин Г.Ф., 1980] и специальные методы для проведения генетического анализа [Тюрин Ю.Н. и др., 1995].

Проводили оценку параметров распределения количественных показателей (среднее значение, стандартные ошибки средних). Для проверки нормального характера распределения исследуемых признаков использовали критерий Шапиро-Уилкса. При отклонении распределения от нормального применяли непараметрический критерий Манна-Уитней [Флетчер Э. и др., 1998; Реброва О.А., 2002]. Различия между статистическими выборками считали достоверными при $p < 0,05$.

Наличие связи между изучаемыми показателями оценивали при помощи корреляционного анализа Кендаля. Для изучения зависимости активности АПФ от показателей протеолиза был проведен линейный регрессионный анализ [Ферстер Э и др., 1983; Реброва О.Ю., 2002]. Эффективность действия изучаемых факторов в отношении исследуемых показателей оценивалась с помощью однофакторного дисперсионного анализа (F-критерия Фишера). Для оценки степени влияния фактора на результативный признак использовали способ Снедекора [Лакин Г.Ф., 1980; Гельман В.Я., 2000].

Для оценки качественных характеристик больного на изучаемые показатели использовали многофакторный дисперсионный анализ [Дюк В., 1997; Реброва О.Ю., 2002].

Определяли диагностическую ценность изучения показателей протеолиза при диабетической нефропатии: рассчитывали коэффициенты чувствительности, специфичности и прогностичности [Флетчер Э. и др., 1998].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение активности калликреин-кининовой (ККС) и ренин-ангиотензиновой (РАС) систем имеет большое значение для оценки процессов протеолиза, развития необратимых и обратимых реакций и прогнозирования сосудистых осложнений при СД 1 типа. Для выявления наиболее существенных изменений были изучены показатели протеолиза у практически здоровых лиц и больных СД 1 типа на разных этапах заболевания и при наличии ретино- и нефропатии. Всего обследовано 151 человек. В отдельной серии исследований изучали взаимосвязи I/D полиморфизма гена ACE и рестрикционного полиморфизма гена AGT с показателями ангиотензин-превращающего фермента, кининогеноза, и ингибиторов протеолиза при СД 1 типа. В условиях *in vitro* исследовали влияние инсулина, глюкозы и каптоприла на показатели протеолиза плазмы крови здоровых и больных детей.

3.1. Состояние протеолитических систем практически здоровых детей

Для характеристики ККС и РАС плазмы крови изучали активность калликреина, калликреиногена, ангиотензин-превращающего фермента, α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина (табл. 3).

Таблица 3

Активность протеиназ и ингибиторов плазмы крови здоровых детей ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Здоровые дети		
	Общая группа, n=32	Мальчики, n=23	Девочки, n=9
Калликреин, мЕ/мл	62,1±6,4	60,8±8,6 p1>0,05	65,8±10,0 p1>0,05 p2>0,05
Калликреиноген, мЕ/мл	373,2±22,6	358,2±19,6 p1>0,05	383,2±28,6 p1>0,05 p2>0,05
Ангиотензин-превращающий фермент, мкмоль/мин·л	33,2±2,5	34,2±3,3 p1>0,05	31,5±3,6 p1>0,05 p2>0,05
α_1 -Протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	29,5±1,8	28,0±2,2 p1>0,05	30,0±2,5 p1>0,05 p2>0,05
α_2 -Макроглобулин, ИЕ/мл	5,1±0,5	5,2±0,3 p1>0,05	4,9±0,9 p1>0,05 p2>0,05

Примечание:

p1 – достоверность различий показателей по сравнению с общей группой здоровых детей;
p2 – достоверность различий показателей по сравнению с мальчиками.

Обследовано 32 практически здоровых ребенка: 23 мальчика и 9 девочек. Средний возраст детей составил $12,8 \pm 0,2$ лет. Активность калликреина (КК), калликреиногена (ККГ) и ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) в контрольной группе составила $62,1 \pm 6,4$ мЕ/мл; $373,2 \pm 22,6$ мЕ/мл и $33,2 \pm 2,5$ мкмоль/мин·л, что соответствует данным литературы [Яровая Г.А., 1994; Альтшулер Б.Ю., 1998]. Состояние протеолиза зависит от специфических белков-ингибиторов, которые инактивируют протеолитические ферменты. У здоровых детей активность α_1 -протеиназного ингибитора (α_1 -ПИ) составила $29,5 \pm 1,8$ ИЕ/мл, α_2 -макроглобулина (α_2 -МГ) - $5,1 \pm 0,5$ ИЕ/мл. По данным литературы в норме эти показатели находятся в пределах 27-34 ИЕ/мл и 4-8 ИЕ/мл, соответственно [Веремеенко К.Н., 1985]. Отличий активности изучаемых показателей между мальчиками и девочками не обнаружено.

В дальнейшем показатели практически здоровых детей использовали в качестве контроля.

3.2. Состояние протеолитических систем при сахарном диабете 1 типа у детей

Обследовано 119 детей больных сахарным диабетом 1 типа. Дети были разделены на группы в зависимости от длительности заболевания, потребности в инсулине, наличия сосудистых осложнений, степени компенсации заболевания и семейных случаев заболеваний сердечно-сосудистой системы и сахарного диабета.

3.2.1. Активность калликреина и калликреиногена при сахарном диабете 1 типа у детей

КК катализирует реакцию образования брадикинина, участвующего в регуляции тонуса сосудов и обладающего вазодилатирующим действием. ККГ является предшественником КК, в норме его активность превышает активность фермента [Пасхина Т.С., 1976; Суханова Г.А., 1992; Яровая Г.А., 2001]. Результаты исследования показателей кининогенеза больных СД 1 типа представлены в табл.4. В общей группе больных СД 1 активность КК увеличивалась в 1,6 раза, активность ККГ снижалась на 30%, что свидетельствовало об активации кининогенеза. Различия активности КК и ККГ у мальчиков и девочек оказались не достоверными ($p > 0,05$), в связи с чем в последующих разделах приводятся общие данные без деления больных по полу.

Активность калликреина и калликреиногена плазмы крови больных сахарным диабетом 1 типа ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Контроль n=32,	Сахарный диабет 1 типа		
		Общая группа, n=119	Мальчики, n=59	Девочки, n=60
Калликреин, мЕ/мл	62,1±6,4	102,6±6,4 p1<0,05	101,0±11,0 p1<0,05	99,6±16,4 p1<0,05 p2>0,05
Калликреиноген, мЕ/мл	373,2±22,6	260,7±12,8 p1<0,05	273,2±22,6 p1<0,05	245,7±25,8 p1<0,05 p2>0,05

Примечание:

p1 – достоверность различий показателей по сравнению с контролем;

p2 – достоверность различий показателей по сравнению с мальчиками.

Результаты исследования активности КК и ККГ у детей с разной длительностью заболевания приведены в табл. 5. При поступлении в клинику детей с впервые выявленным диабетом активность КК была наиболее высокой и превышала уровень контрольной группы на 69%, активность ККГ снижалась на 27%. Повышение активности КК на фоне низкой активности ККГ, наблюдаемое при манифестации СД 1 типа, сохранялось в течение 5 лет (рис. 1).

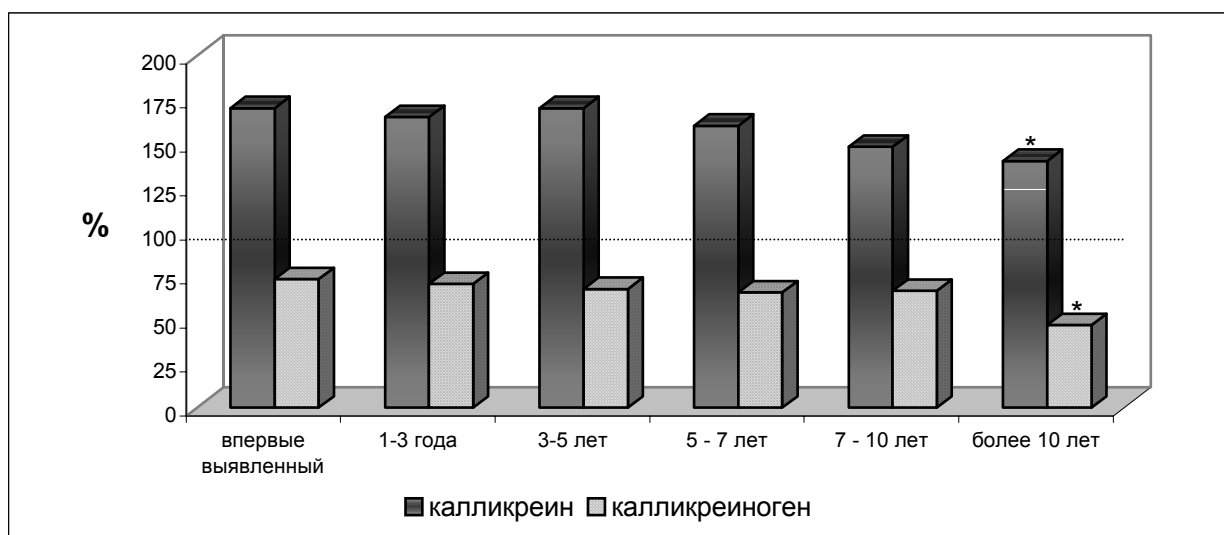


Рис. 1. Активность калликреина и калликреиногена плазмы крови больных сахарным диабетом 1 типа в зависимости от длительности диабета (за 100% приняты показатели здоровых детей)

* - достоверность различий по сравнению с детьми с впервые выявленным диабетом ($p<0,05$)

С увеличением длительности заболевания активность КК и ККГ плазмы крови детей снижалась. Снижение активности КК и ККГ было отмечено в группе детей с длительностью заболевания более 10 лет ($p<0,05$).

Активность калликреина и калликреиногена плазмы крови больных сахарным диабетом 1 типа в зависимости от длительности заболевания

$(\bar{X} \pm m)$

Показатель	ЗДОРОВЫЕ ДЕТИ, N=32	ДЛИТЕЛЬНОСТЬ ЗАБОЛЕВАНИЯ					
		ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫЙ ДИАБЕТ, N=26	ОТ 1 ДО 3 ЛЕТ, N=18	ОТ 3 ДО 5 ЛЕТ, N=27	ОТ 5 ДО 7 ЛЕТ, N=14	ОТ 7 ДО 10 ЛЕТ, N=26	БОЛЕЕ 10 ЛЕТ, N=8
Калликреин, мЕ/мл	62,1±6,4	105,4±10,6 P1<0,05	102,6±15,8 p1<0,05 P2>0,05	106,2±10,8 p1<0,05 P2>0,05 P3>0,05	99,3±9,6 p1<0,05 P2>0,05 P3>0,05 P4>0,05	91,8±5,9 p1<0,05 P2>0,05 P3>0,05 P4>0,05	88,1±10,4 p1<0,05 P2<0,05 P3<0,05 P4<0,05
Калликреиноген, мЕ/мл	373,2±22,6	272,3±27,6 P1<0,05	261,9±15,8 p1<0,05 P2>0,05	251,0±20,0 p1<0,05 P2>0,05 P3>0,05	244,2±18,0 p1<0,05 P2>0,05 P3>0,05 P4>0,05	247,3±24,4 p1<0,05 P2>0,05 P3>0,05 P4>0,05	175,0±21,5 p1<0,05 P2<0,05 P3<0,05 P4<0,05

Примечание:

p1 – достоверность различий по сравнению со здоровыми детьми;

p2 – достоверность различий по сравнению с группой больных с впервые выявленным диабетом;

p3 – достоверность различий по сравнению с группой больных с длительностью заболевания от 1 до 3 лет;

p4 – достоверность различий по сравнению с группой больных с длительностью заболевания от 3 до 5 лет.

Активность КК и ККГ в этой группе больных уменьшалась на 14-17% и 30-36%, соответственно, по сравнению с детьми с впервые выявленным диабетом и болеющих от 1 до 5 лет. Однако активность КК была выше показателя здоровых детей.

Таким образом, активность КК и ККГ с увеличением длительности заболевания снижалась по сравнению с детьми при манифестации диабета и болеющих от 1 до 5 лет, что особенно было выражено у детей с продолжительностью заболевания более 10 лет.

Наиболее тяжелыми осложнениями СД 1 в детском возрасте являются диабетические микроангиопатии. Клиническим проявлением микроангиопатий являются ретинопатия, нейроангиопатия нижних конечностей и нефропатия. В табл. 6 приведены результаты исследования КК и ККГ у больных с СД 1 типа без сосудистых осложнений, с ретинопатией и нефропатией на стадии микроальбуминурии и протеинурии.

Таблица 6

Активность калликреина и калликреиногена плазмы крови больных сахарным диабетом 1 типа при сосудистых осложнениях ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Здоровые дети, n=32	Больные сахарным диабетом 1 типа			
		Без осложнений, n=54	Ретинопатия, n=13	Нефропатия	
				Стадия микроальбуминурии, n=15	Стадия протеинурии, n=11
Калликреин, мЕ/мл	62,1±6,4	105,2±8,5 p1<0,05	96,8±7,4 p1<0,05 p2>0,05	87,5±15,7 p1>0,05 p2>0,05	80,8±5,7 p1<0,05 p2<0,05
Калликреиноген, мЕ/мл	373,2±22,6	253,5±17,7 p1<0,05	244,6±15,6 p1<0,05 p2>0,05	228,2±28,8 p1<0,05 p2>0,05	237,9±25,5 p1<0,05 p2>0,05

Примечание:

p1 – достоверность различий по сравнению со здоровыми детьми;

p2 – достоверность различий по сравнению с группой детей без осложнений.

В исследуемых группах больных изменение активности КК и ККГ соответствовало тенденции, выявленной в общей группе детей. У больных без сосудистых осложнений СД 1 типа активность КК увеличивалась в 1,7 раза, активность его предшественника снижалась на 32% (p<0,05) по сравнению с

контрольной группой. При диабетической ретинопатии активность КК и ККГ не изменялась по сравнению с группой больных без осложнений. В группе детей с нефропатией на стадиях микроальбуминурии и протеинурии наблюдалось снижение активности КК на 17% ($p>0,05$) и 23% ($p<0,05$), соответственно, по сравнению с больными без осложнений. Активность ККГ в обеих группах больных с нефропатией не изменялась по отношению к больным без осложнений (рис. 2).

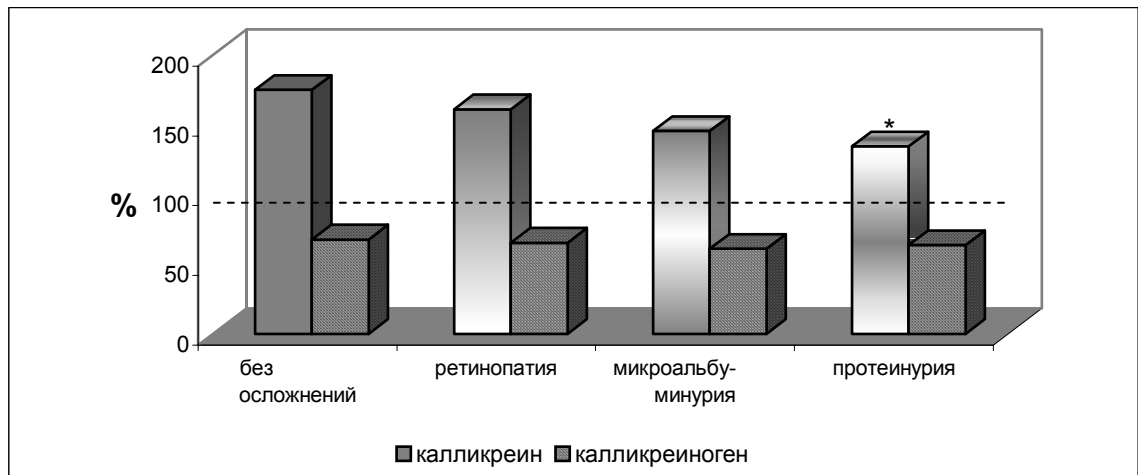


Рис.2. Активность калликреина и калликреиногена плазмы 1 типа крови больных сахарным диабетом при сосудистых осложнениях (за 100% приняты показатели здоровых детей)

* - достоверность различий по сравнению с больными без осложнений ($p<0,05$)

Таким образом, развитие сосудистых осложнений приводило к снижению активности КК, особенно при развитии диабетической нефропатии. Активность ККГ не зависела от наличия сосудистых осложнений СД 1 типа.

СД 1 типа, как известно, обусловлен гибелью β -клеток островков Лангерганса и абсолютной недостаточностью инсулина в организме. Введение экзогенного инсулина больным является важным средством патогенетической терапии. В табл.7 представлено изменение активности КК и ККГ в зависимости от потребности в инсулине больных СД 1 типа. Увеличение активности КК составило 60 и 72% ($p<0,05$) в группах больных с потребностью в инсулине менее 0,7 Ед/кг в сутки и выше этого значения по сравнению со здоровыми детьми. Активность ККГ снижалась на 30 и 26 %, соответственно. Между группами больных различий активности изучаемых ферментов не выявлено.

Таким образом, активность КК и ККГ плазмы крови больных СД 1 типа не зависела от дозы экзогенно вводимого инсулина.

Таблица 7

Активность калликреина и калликреиногена плазмы крови больных сахарным диабетом 1 типа с разной потребностью в инсулине ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Здоровые дети, n=32	Потребность в инсулине, Ед/кг	
		Менее 0,7 Ед/кг, n=52	Более 0,7 Ед/кг, n=67
Калликреин, мЕ/мл	62,1±6,4	99,3±11,5 p1<0,05	107,4±15,5 p1<0,05 p2>0,05
Калликреиноген, мЕ/мл	373,2±22,6	262,7±21,5 p1<0,05	277,2±26,7 p1<0,05 p2>0,05

Примечание:

p1 – достоверность различий по сравнению со здоровыми детьми;

p2- достоверность различий по сравнению с группой больных с потребностью в инсулине менее 0,7 Ед/кг.

Уровень гликозилированного гемоглобина (HbA_{1c}) является показателем, отражающим состояние углеводного обмена за предшествующие 3 месяца. Компенсацию считают удовлетворительной при уровне HbA_{1c} не более 6,4%, для детей данный показатель может быть более высоким до 8% [Петеркова В.А., 1998]. Среднее значение у больных HbA_{1c} составило 14,3±0,6%. В табл. 8 приведена активность КК и ККГ в трех группах больных с разным уровнем гликозилированного гемоглобина.

Таблица 8

Активность калликреина и калликреиногена плазмы крови больных сахарным диабетом 1 типа в зависимости от уровня гликозилированного гемоглобина ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Здоровые дети, n=32	Гликозилированный гемоглобин		
		От 8 до 11%, n=11	От 11 до 15%, n=21	более 15%, n=9
Калликреин, мЕ/мл	62,1±6,4	102,7±12,0 p<0,05	106,4±8,0 p<0,05	108,1±11,9 p<0,05
Калликреино-ген, мЕ/мл	373,2±22,6	283,8±22,3 p<0,05	266,5±14,0 p<0,05	250,5±21,8 p<0,05

Примечание:

p – достоверность различий по сравнению со здоровыми детьми.

Активность изучаемых ферментов у больных СД 1 типа во всех трех группах была повышенной по сравнению со здоровыми детьми. С увеличением количества гликозилированного гемоглобина отмечено повышение активности КК и снижение активности ККГ, однако значимых изменений не выявлено.

Значительный интерес представляет влияние семейных случаев сахарного диабета на частоту осложнений у больных. Группу детей с отягощенным анамнезом составили 29 детей, из них 4 ребенка с ретинопатией и 11 детей с нефропатией. Из 90 детей без отягощенной наследственности по сахарному диабету в семьях у 7 детей выявлена ретинопатия и у 10 - нефропатия. На рис. 3 представлена частота выявления сосудистых осложнений при СД 1 типа.

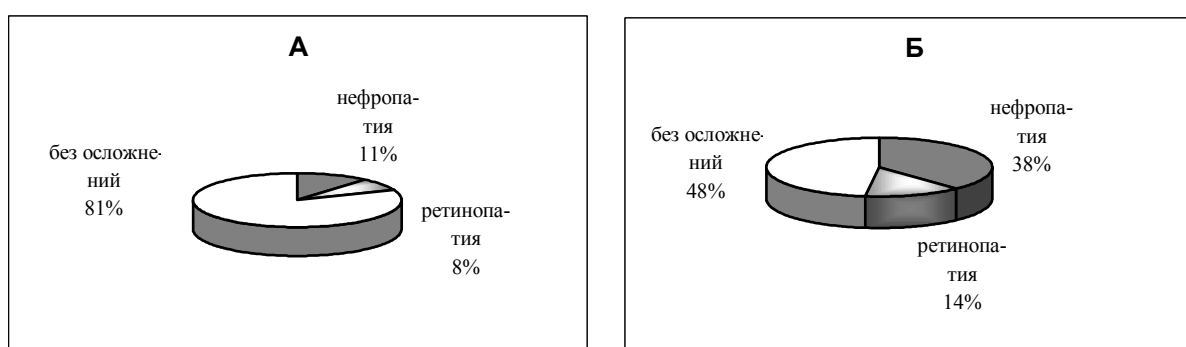


Рис. 3. Частота сосудистых осложнений у больных без отягощенной наследственности по сахарному диабету (А) и с наличием семейных случаев заболевания у родственников (Б)

Среди детей без отягощенной наследственности больные без осложнений составили 81% (73 ребенка), с ретинопатией – 8% (7 детей) и с нефропатией – 11% (10 детей). В группе с отягощенной наследственностью по СД количество детей без осложнений достигало 48%. В этой группе отмечено увеличение числа детей с нефропатией до 38% (11 детей). Дети с ретинопатией составили 14% (4 человека). Следовательно, увеличение частоты встречаемости сосудистых осложнений у больных связано с отягощенной наследственностью по сахарному диабету.

Результаты изучения активности КК и ККГ в плазме крови детей с отягощенной наследственностью по сахарному диабету представлены в табл. 9. Дети с отягощенной наследственностью не имели изменений этих показателей при сравнении с группой с неотягощенной наследственностью. Поэтому в последующих разделах больных не разделяли на группы в зависимости от наличия семейных случаев сахарного диабета.

Активность калликреина и калликреиногена плазмы крови больных сахарным диабетом 1 типа в зависимости от отягощенной наследственности по сахарному диабету ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Здоровые дети, n=32	Наследственность по сахарному диабету	
		Не отягощена, n=90	Отягощена, n=29
Калликреин, мЕ/мл	62,1±6,4	106,3±14,0 p1<0,05	99,8±6,9 p1<0,05 p2>0,05
Калликреиноген, мЕ/мл	373,2±22,6	267,4±25,2 p1<0,05	253,6±22,3 p1<0,05 p2>0,05

Примечание:

p1 – достоверность различий по сравнению со здоровыми детьми;

p2- достоверность различий по сравнению с группой больных без отягощенной наследственности.

Для характеристики осложнений СД 1 типа у детей большое значение может иметь также наличие семейных случаев сердечно-сосудистой заболеваний. В связи с этим были выделены 2 группы детей без отягощенной наследственности и с наличием в анамнезе данных заболеваний у родственников. Среди больных без отягощенной наследственности больные без осложнений составляли 70,2% (57 детей), с ретинопатией – 10% (8 детей) и с нефропатией – 19,8% (16 детей). В группе детей с наличием семейных случаев сердечно-сосудистых заболеваний выявлено 68,5% (26 детей) детей без осложнений. Диабетическая ретинопатия встречалась у 10,5% больных с отягощенной наследственностью (4 ребенка), нефропатия – у 21% (8 детей), соответственно. Следовательно, частота встречаемости сосудистых осложнений у детей с СД 1 типа не зависела от наличия в анамнезе семейных случаев сердечно-сосудистых заболеваний.

В табл. 10 представлена активность КК и ККГ в исследуемых группах детей. Достоверных различий изменения активности изучаемых ферментов между группами больных в зависимости от наследственности по заболеваниям сердечно-сосудистой системы не обнаружено. В последующем, разделение больных на группы в зависимости от наличия семейных случаев сердечно-сосудистых заболеваний не проводили.

Активность калликреина и калликреиногена плазмы крови больных сахарным диабетом 1 типа в зависимости от отягощенной наследственности по сердечно-сосудистой патологии ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Здоровые дети, n=32	Наследственность по сердечно-сосудистым заболеваниям	
		Не отягощена, n=81	Отягощена, n=38
Калликреин, мЕ/мл	62,1±6,4	98,8±11,6 p1<0,05	107,7±16,6 p1<0,05 p2>0,05
Калликреиноген, мЕ/мл	373,2±22,6	248,5±21,8 p1<0,05	258,3±24,8 p1<0,05 p2>0,05

Примечание:

p1 – достоверность различий по сравнению со здоровыми детьми;

p2- достоверность различий по сравнению с группой больных без отягощенной наследственности.

Таким образом, в результате проведенного исследования было выявлено, что при сахарном диабете 1 типа наблюдалась активация ККС с повышением активности КК и снижением активности ККГ в плазме крови детей. С увеличением длительности заболевания более 5 лет и развитием сосудистых осложнений активность КК уменьшалась. Наиболее выраженное снижение активности КК наблюдалось у детей с нефропатией. Зависимости исследуемых показателей от потребности в инсулине, уровня гликозилированного гемоглобина и наследственности по сахарному диабету и сердечно-сосудистым заболеваниям не выявлено.

3.2.2. Активность ангиотензин-превращающего фермента при сахарном диабете 1 типа у детей

Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ) участвует в образовании ангиотензина II, обладающего вазоконстрикторным действием [Альтшулер Б.Ю. и др., 2000; Bader M., 2000; Елисеева Ю.Е., 2001; Яровая Г.Я., 2001]. Изучение активности АПФ при СД 1 типа у детей проводили в группах больных в зависимости от длительности заболевания, потребности в инсулине и уровня гликозилированного гемоглобина.

Результаты показали, что у 51% больных СД 1 типа активность АПФ не выходила за пределы референтных значений, у 25% детей было обнаружено увеличение активности АПФ до 80 мкмоль/мин·л, а 24%- имели низкие показатели ($18,3 \pm 2,3$) (при норме от 20-50 мкмоль/мин·л). В табл. 11 приведены результаты исследования активности АПФ в сыворотке крови общей группы больных СД 1 типа. Активность АПФ сыворотки крови в общей группе больных СД 1 типа практически не отличалась от показателей у здоровых детей.

Таблица 11

Активность ангиотензин-превращающего фермента сыворотки крови больных сахарным диабетом 1 типа ($\bar{X} \pm m$)

Показатель	Здоровые дети, n=32	Общая группа больных, n=119
Ангиотензин-превращающий фермент, мкмоль/мин·л	$33,2 \pm 2,5$	$39,1 \pm 1,9$ p>0,05

Примечание:

p- достоверность различий по сравнению со здоровыми детьми.

Более значительные изменения получены при изучении активности АПФ в группах детей с различной длительностью заболевания (табл. 12). При впервые выявленном диабете и в группе детей с длительностью заболевания до 3 лет активность фермента не изменялась. При длительности заболевания от до 10 лет активность АПФ увеличивалась на 24-29% по сравнению со здоровыми детьми ($p < 0,05$) (рис. 4).

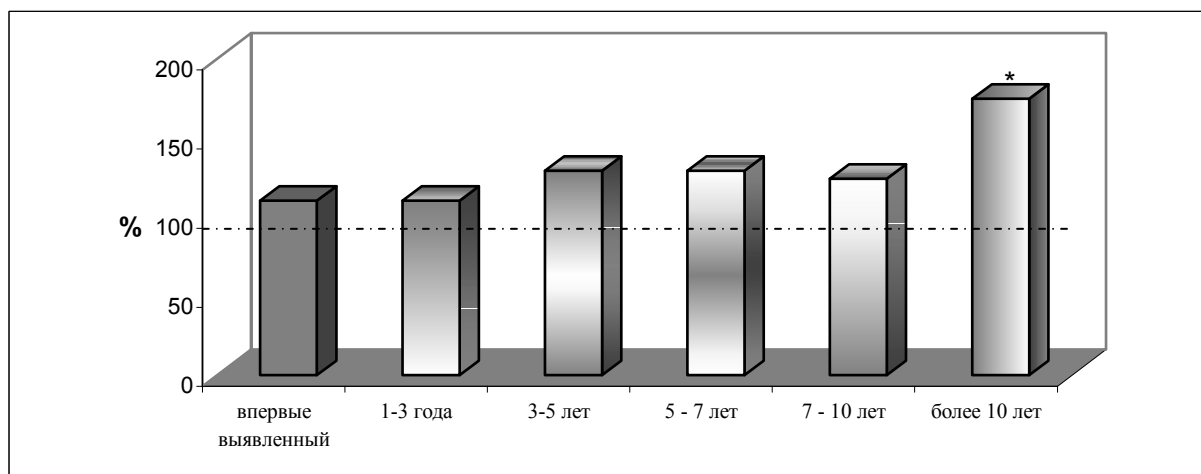


Рис. 4. Активность ангиотензин-превращающего фермента сыворотки крови больных сахарным диабетом 1 типа в зависимости от длительности заболевания (за 100% приняты показатели здоровых детей)

*- достоверность различий по сравнению с детьми с впервые выявленным диабетом ($p < 0,05$)

**Активность ангиотензин-превращающего фермента сыворотки крови
больных сахарным диабетом 1 типа с разной длительностью заболевания
($\bar{X} \pm m$)**

Показатель	ЗДОРОВЫЕ ДЕТИ, N=32	ДЛИТЕЛЬНОСТЬ ЗАБОЛЕВАНИЯ					
		ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫЙ ДИАБЕТ, N=26	ОТ 1 ДО 3 ЛЕТ, N=18	ОТ 3 ДО 5 ЛЕТ, N=27	ОТ 5 ДО 7 ЛЕТ, N=14	ОТ 7 ДО 10 ЛЕТ, N=26	БОЛЕЕ 10 ЛЕТ, N=8
Ангиотензин- превращающий фермент, мкмоль/мин·л	33,2±2,5	36,6±2,9 P1>0,05	36,6±2,9 p1>0,05 P2>0,05	42,9±3,5 p1<0,05 P2>0,05 P3>0,05	42,9±2,1 p1<0,05 P2>0,05 P3>0,05	41,2±3,5 p1<0,05 P2>0,05 P3>0,05	58,0±3,1 p1<0,05 P2<0,05 P3<0,05

Примечание:

p1 – достоверность различий по сравнению со здоровыми детьми;

p2 – достоверность различий по сравнению с группой больных с впервые выявленным диабетом;

p3 – достоверность различий по сравнению с группой больных с длительностью заболевания от 1 до 3 лет.

Наиболее высокая активность АПФ отмечалась у больных с длительностью заболевания более 10 лет и превышала уровень контрольной группы на 74%, а показатели больных с впервые выявленным диабетом и болеющих от 1 до 3 лет – на 58%, соответственно.

Еще большее значение имеет активность АПФ при развитии сосудистых осложнений. В табл. 13 приведены результаты исследования активности АПФ сыворотки крови больных в группах с диабетической ретинопатией и нефропатией.

Таблица 13

Активность ангиотензин-превращающего фермента сыворотки крови больных сахарным диабетом 1 типа при сосудистых осложнениях ($\bar{X} \pm m$)

Показатель	Здоровые дети, n=32	Больные сахарным диабетом 1 типа			
		Без осложнений, n=54	Ретинопатия, n=13	Нефропатия	
				Стадия микроальбуминурии, n=15	Стадия протеинурии, n=11
Ангиотензин-превращающий фермент, мкмоль/мин·л	33,2±2,5	38,1±2,8 p1>0,05	35,5±3,7 p1>0,05 p2>0,05	51,3±3,4 p1<0,05 p2<0,05	57,0±2,9 p1<0,05 p2<0,05

Примечание:

p1 – достоверность различий по сравнению со здоровыми детьми;

p2 – достоверность различий по сравнению с группой без осложнений.

Дети с нефропатией были в соответствии с классификацией Mogensen C. et al. (1983) в модификации Дедова И.И. и Шестаковой М.В. (2000) разделены на 2 группы: больные с нефропатией на стадии микроальбуминурии и протеинурии. В группе детей без осложнений СД 1 не отмечено различий активности АПФ по сравнению со здоровыми детьми. При диабетической ретинопатии активность фермента также практически не изменялась по сравнению с детьми из контрольной группы. Однако при развитии нефропатии на стадии микроальбуминурии и протеинурии активность АПФ повышалась в 1,5 и 1,7 раза, соответственно (p<0,05) (рис. 5).

Таким образом, активность АПФ сыворотки крови больных СД 1 типа повышена при развитии нефропатии на стадии микроальбуминурии и протеинурии по сравнению с детьми без осложнений.

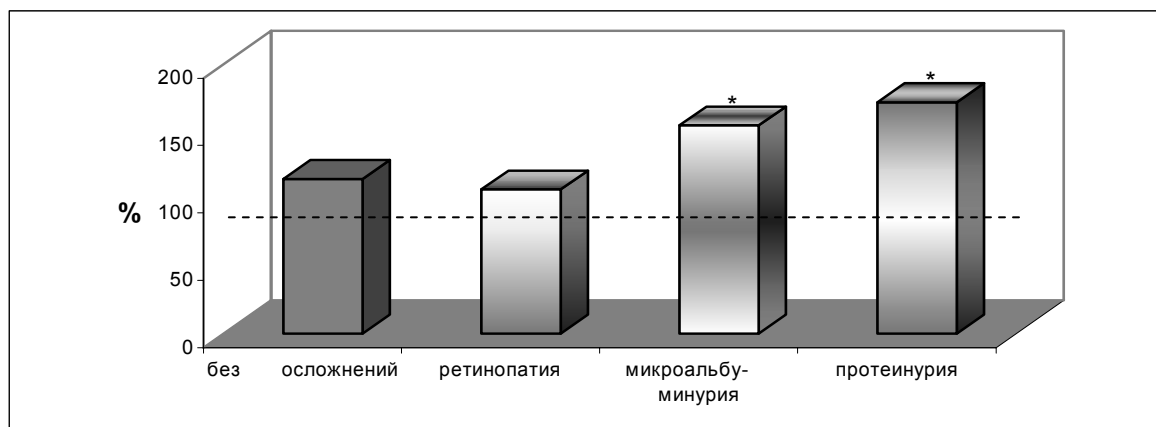


Рис. 5. Активность ангиотензин-превращающего фермента сыворотки крови больных при сосудистых осложнениях сахарного диабета 1 типа (за 100% приняты показатели здоровых детей)

* - достоверность различий по сравнению с больными без осложнений ($p < 0,05$)

Результаты исследования зависимости активности АПФ сыворотки крови от дозы вводимого инсулина приведены в табл. 14. Активность АПФ у детей с потребностью в инсулине менее 0,7 Ед/кг были выше, чем при высоких дозах, что однако не являлось статистически достоверным.

Таблица 14

Активность ангиотензин-превращающего фермента сыворотки крови больных сахарным диабетом 1 типа с разной потребностью в инсулине ($\bar{X} \pm m$)

Показатель	Здоровые дети, n=32	Потребность в инсулине, Ед/кг массы тела	
		Менее 0,7 Ед/кг, n=52	Более 0,7 Ед/кг, n=67
Ангиотензин-превращающий фермент, мкмоль/мин·л	33,2±2,5	39,7±3,4 p1>0,05	34,1±3,5 p1>0,05 p2>0,05

Примечание:

p1 – достоверность различий по сравнению со здоровыми детьми;

p2 – достоверность различий по сравнению с группой детей с потребностью в инсулине менее 0,7 Ед/кг.

Таким образом, активность АПФ сыворотки крови больных не зависела от дозы инсулина при лечении СД 1 типа.

Большое значение для характеристики развития СД 1 типа имеет степень компенсации диабета. Активность АПФ в зависимости от компенсации заболевания представлена в табл. 15. Достоверных отличий показателей между группами больных с разным уровнем HbA_{1c} не было получено. При повышении

содержания гликозилированного гемоглобина у больных наблюдалась тенденция к увеличению активности АПФ сыворотки крови. У больных с уровнем HbA_{1c} более 15% активность фермента была повышена на 32% ($p < 0,05$) по сравнению со здоровыми детьми. Следовательно, активность АПФ сыворотки крови повышена у больных с декомпенсацией СД 1 типа.

Таблица 15

Активность ангиотензин-превращающего фермента сыворотки больных сахарным диабетом 1 типа в зависимости от уровня гликозилированного гемоглобина ($\bar{X} \pm m$)

Показатель	Здоровые дети, n=32	Гликозилированный гемоглобин		
		8-11%, n=11	11-15%, n=21	более 15%, n=9
Ангиотензин-превращающий фермент, мкмоль/мин·л	33,2±3,5	36,5±1,9 p1>0,05	38,3±2,9 p1>0,05 p2>0,05	43,8±2,6 p1<0,05 p2>0,05

Примечание:

p1- достоверность различий по сравнению со здоровыми детьми;

p2 – достоверность различий по сравнению с группой больных с уровнем HbA_{1c} от 8-11%.

В лечении больных с диабетической нефропатией применяют ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, которые снижают внутриклубочковую гипертензию и препятствуют набуханию и деструкции базальной мембраны капилляров почек [The Eurodiab Ace Study Group and the Eurodiab Ace Substudy 2 Study Group, 1998; Remme W.J., 1999; Mogensen C.E., 1999; Manley H.J., 2000; Kshirsagar A.V., 2000]. Активность АПФ сыворотки крови больных диабетической нефропатией на фоне лечения эналаприлом представлена в табл. 16. До лечения активность фермента у больных была выше показателя контрольной группы на 73%. Активность АПФ снижалась на 62% после лечения эналаприлом и не отличалась от показателя здоровых детей. Следует отметить, что у 3 (25%) больных с диабетической нефропатией несмотря на применение ингибиторов АПФ наблюдалось прогрессирование нефропатии с увеличением содержания альбумина в моче. При этом активность АПФ сыворотки крови этой группы больных до лечения эналаприлом была невысокой и не превышала нормальных значений (не более 50 мкмоль/мин·л). Следовательно, применение ингибиторов АПФ у больных с диабетической нефропатией эффективно при высокой активности АПФ.

**Активность ангиотензин-превращающего фермента сыворотки крови
больных с диабетической нефропатией до и после лечения эналаприлом
($\bar{X} \pm m$)**

Показатель	Здоровые дети, n=32	Больные сахарным диабетом	
		До лечения, n=12	После лечения, n=12
Ангиотензин-превращающий фермент, мкмоль/мин·л	33,2±3,5	58,6±4,4 p1<0,05	36,0±1,7 p1>0,05 p2<0,05

Примечание:

p1- достоверность различий по сравнению со здоровыми детьми;

p2 – достоверность различий по сравнению с группой больных до лечения эналаприлом.

Таким образом, активность АПФ в общей группе больных с сахарным диабетом 1 типа не отличалась от контроля. Активность исследуемого показателя не зависел от потребности в инсулине. Повышение активности АПФ было выявлено у больных с увеличением длительности заболевания более 3 лет и с уровнем гликозилированного гемоглобина более 15%. Существенное увеличение активности фермента происходило при диабетической нефропатии. При применении эналаприла в лечении больных с диабетической нефропатией активность АПФ снижалась, достигая уровня показателя здоровых детей.

3.2.3. Взаимосвязь ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем при сахарном диабете 1 типа

Для оценки соотношения РАС и ККС в ранние и отдаленные сроки заболевания и при осложнениях СД 1 типа рассчитывалось отношение КК/АПФ. Активность КК, соответствующая 60,0 МЕ/мл, и активность АПФ, равная 32,0 мкмоль/мин·л, здоровых детей считали равными 100%. Следовательно, отношение КК/АПФ в контроле было равно 1,00±0,13, у больных СД 1 данный показатель составлял 1,70±0,17.

Значения коэффициента в группах больных в зависимости от длительности заболевания приведены в табл. 17. Самый высокий коэффициент обнаружен в группе детей с впервые выявленным диабетом и при длительности заболевания до 3 лет, когда была повышена активность КК. В группах детей с длительностью

заболевания 3-5 лет, 5-7 лет, 7-10 и больше 10 лет наблюдалось его снижение на 24%, 38%, 45% и 69%, соответственно, по сравнению с детьми с впервые выявленным диабетом. Следовательно, отношение КК/АПФ зависит от длительности заболевания и через каждые 3 года снижается на 7-14%.

Таблица 17

Отношение активности калликреина к ангиотензин-превращающему ферменту (КК/АПФ) у больных сахарным диабетом 1 типа с разной длительностью заболевания ($\bar{X} \pm m$)

Группы	КК/АПФ
Здоровые дети, n=32	1,06±0,13
Общая группа больных, n=119	1,70±0,17 p1<0,05
Больные с впервые выявленным диабетом, n=26	2,20±0,35 p2<0,05
Больные с длительностью сахарного диабета от 1 до 3 лет, n=18	1,90±0,35 p1<0,05 p2>0,05
Больные с длительностью сахарного диабета от 3 до 5 лет, n=27	1,67±0,36 p1<0,05 p2<0,05
Больные с длительностью сахарного диабета от 5 до 7 лет, n=14	1,36±0,30 p1>0,05 p2<0,05
Больные с длительностью сахарного диабета от 7 до 10 лет, n=26	1,21±0,18 p1>0,05 p2<0,05
Больные с длительностью сахарного диабета более 10 лет, n=7	0,68±0,17 p1<0,05 p2<0,05

Примечание:

p1 - достоверность различий по сравнению с контролем;

p2 - достоверность различий по сравнению с больными с впервые выявленным диабетом.

Анализ изучаемой взаимосвязи в группах с осложнениями СД 1 типа показал, что у больных с ретинопатией наблюдалось снижение коэффициента на 46% по сравнению с больными без осложнений (табл.18). Существенное снижение отношения КК/АПФ происходило при нефропатии на стадии микроальбуминурии и протеинурии.

На основании этих данных можно заключить, что наиболее выраженные нарушения соотношения РАС и ККС при СД 1 типа наблюдались при длительности заболевания более 5 лет и наличии нефропатии. Особое значение этот показатель имеет, очевидно, при развитии диабетической нефропатии на стадии микроальбуминурии, когда клинические симптомы нефропатии еще не выражены.

Таблица 18

Отношение активности калликреина к активности ангиотензинпревращающего фермента больных сахарным диабетом 1 типа при сосудистых осложнениях ($\bar{X} \pm m$)

Группы обследуемых	КК/АПФ
Здоровые дети, n=32	1,06±0,13
Больные без осложнений, n=54	1,90±0,18 p2<0,05
Больные с ретинопатией, n=13	1,30±0,20 p1>0,05 p2<0,05
Больные с нефропатией на стадии микроальбуминурии, n=15	0,70±0,19 p1>0,05 p2<0,05
Больные с нефропатией на стадии протеинурии, n=11	0,60±0,11 p1<0,05 p2<0,05

Примечание:

p1 - достоверность различий по сравнению с контролем;

p2 - достоверность различий по сравнению с группой больных без осложнений.

Таким образом, коэффициент КК/АПФ характеризует соотношение ККС и РАС, обладающих дилатирующим и констрикторным действием на сосуды. При СД 1 типа коэффициент повышен на ранних стадиях заболевания и снижался при длительности более 10 лет по сравнению со здоровыми детьми. Самые низкие значения коэффициента КК/АПФ выявлены при развитии нефропатии.

3.2.3. Активность α_1 -протеиназный ингибитора и α_2 -макроглобулина при сахарном диабете 1 типа у детей

Состояние протеолиза зависит от специфических белков-ингибиторов, которые ограничивают активность протеолитических ферментов. В табл. 19 представлена активность ингибиторов плазмы крови при СД 1 типа у детей. В общей группе больных СД 1 типа не обнаружено значительных изменений активности α_1 -ПИ и α_2 -МГ ($p>0,05$), однако отмечена тенденция к снижению активности α_1 -ПИ по сравнению с здоровыми детьми.

Таблица 19

Активность α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макро-глобулина плазмы крови больных сахарным диабетом 1 типа ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Здоровые дети, n=32	Общая группа больных, n=119
α_1 -Протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	29,5±1,8	25,1±1,0 p>0,05
α_2 -Макроглобулин, ИЕ/мл	5,1±0,5	5,4±0,2 p>0,05

Примечание: p – достоверность различий по сравнению со здоровыми детьми

В табл. 20 приведены результаты исследования активности ингибиторов в зависимости от длительности заболевания. В группе детей с впервые выявленным диабетом активность α_2 -МГ была повышена на 16% ($p>0,05$) по сравнению с детьми из контрольной группы, при этом активность α_1 -ПИ снижалась 21% ($p<0,05$). Повышенная активность ингибитора сохранялась до 5 лет. При длительности заболевания от 5 до 10 лет происходило снижение активности α_1 -ПИ на 23% ($p<0,05$). Значительное снижение активности α_1 -ПИ на 30% ($p<0,05$) и на 21-29% ($p<0,05$) отмечено при продолжительности СД 1 типа более 10 лет по сравнению со здоровыми детьми и с больными с длительностью диабета от 1 до 5 лет. Активность α_2 -МГ также уменьшалась на 36-37% ($p<0,05$) у детей, болеющих более 10 лет по сравнению с больными с впервые выявленным диабетом и с длительностью заболевания до 5 лет (рис. 6).

Активность α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макро-глобулина плазмы крови больных сахарным диабетом 1 типа в зависимости от длительности заболевания ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	ЗДОРОВЫЕ ДЕТИ, N=32	ДЛИТЕЛЬНОСТЬ ЗАБОЛЕВАНИЯ					
		ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫЙ ДИАБЕТ, N=26	ОТ 1 ДО 3 ЛЕТ, N=18	ОТ 3 ДО 5 ЛЕТ, N=27	ОТ 5 ДО 7 ЛЕТ, N=14	ОТ 7 ДО 10 ЛЕТ, N=26	БОЛЕЕ 10 ЛЕТ, N=8
α_1 -Протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	29,5±1,8	23,2±1,5 P1<0,05	28,7±3,1 p1>0,05 P2>0,05	25,7±1,6 p1>0,05 P2>0,05 P3>0,05	22,7±2,3 p1<0,05 P2>0,05 P3<0,05 P4>0,05	22,7±2,7 p1<0,05 P3<0,05 P4>0,05	20,1±1,9 p1<0,05 P2>0,05 P3<0,05 P4>0,05
α_2 -Макроглобулин, ИЕ/мл	5,1±0,5	5,9±0,6 P1>0,05	5,8±0,7 p1>0,05 P2>0,05	5,9±0,4 p1>0,05 P2>0,05 P3>0,05	4,8±0,4 p1>0,05 P2>0,05 P3>0,05 P4>0,05	4,9±0,3 p1>0,05 P2>0,05 P3>0,05 P4>0,05	3,7±0,3 p1>0,05 P2<0,05 P3<0,05 P4<0,05

Примечание:

p1 – достоверность различий по сравнению со здоровыми детьми;

p2 – достоверность различий по сравнению с группой больных с впервые выявленным диабетом;

p3 – достоверность различий по сравнению с группой больных с длительностью заболевания от 1 до 3 лет; p4- достоверность различий по сравнению с группой больных с длительностью заболевания от 3 до 5 лет.

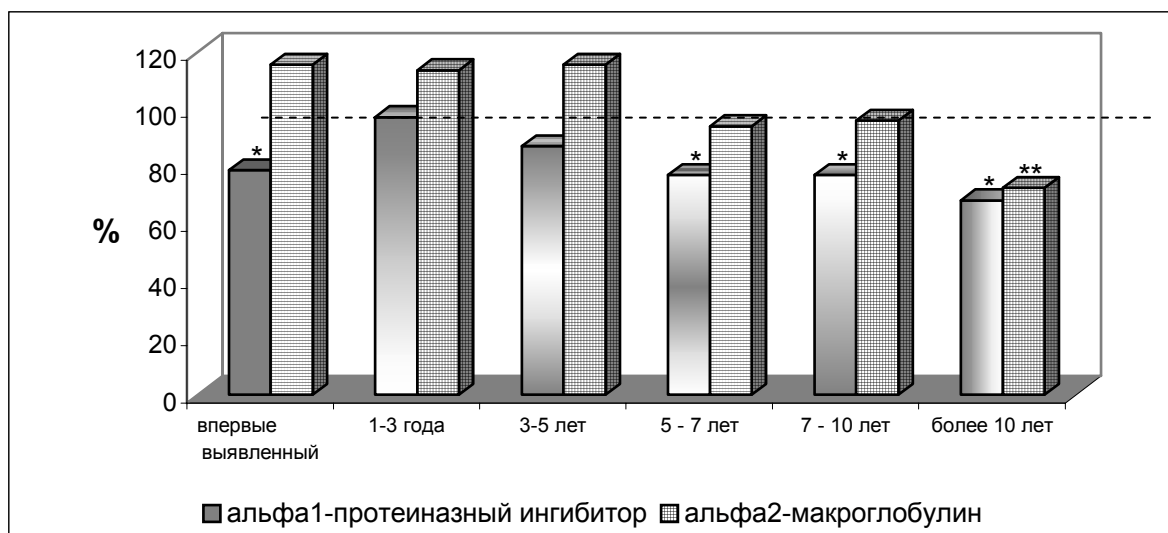


Рис. 6. Активность α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина больных сахарным диабетом 1 типа в зависимости от длительности заболевания (за 100% приняты показатели здоровых детей)

* - достоверность различий по сравнению со здоровыми детьми ($p < 0,05$)

** - достоверность различий по сравнению с детьми с впервые выявленным диабетом ($p < 0,05$)

Таким образом, с увеличением длительности заболевания активность обоих ингибиторов постепенно снижалась.

Результаты исследования активности ингибиторов больных СД 1 типа в зависимости от наличия сосудистых осложнений приведены в табл. 21.

Таблица 21

Активность α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макро-глобулина плазмы крови больных сахарным диабетом 1 типа в зависимости от длительности заболевания при сосудистых осложнениях ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Здоровые дети, n=32	Больные сахарным диабетом 1 типа			
		Без осложнений, n=54	Ретинопатия, n=13	Нефропатия	
				Стадия микроальбуминурии, n=15	Стадия протеинурии, n=11
α_1 -Протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	29,5±1,8	27,6±1,6 $p_1 > 0,05$	23,8±1,8 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$	22,8±2,2 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$	21,1±1,2 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
α_2 -Макроглобулин, ИЕ/мл	5,1±0,5	5,8±0,4 $p_1 > 0,05$	5,0±0,6 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	4,5±0,4 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	4,3±0,3 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$

Примечание:

p_1 – достоверность различий по сравнению со здоровыми детьми;

p_2 – достоверность различий по сравнению с группой детей без осложнений.

Активность обоих ингибиторов не изменялась в группе детей без осложнений по сравнению с контролем. Значительное снижение активности α_1 -ПИ плазмы крови наблюдались при ретинопатии и нефропатии. При развитии диабетической ретинопатии активность α_1 -ПИ уменьшалась на 19% по сравнению со здоровыми детьми ($p < 0,05$). В группе детей с нефропатией на стадиях микроальбуминурии и протеинурии снижение активности этого ингибитора составляло 22% и 28%, соответственно, по сравнению с детьми из контрольной группы ($p < 0,05$). Повышение активности α_2 -МГ на 15% наблюдалось в группе больных без осложнений по сравнению с контролем, что однако было статистически не значимо. Снижение активности α_2 -МГ выявлено у больных с ДН на стадии протеинурией, которое составило 25% ($p < 0,05$) по сравнению с детьми с впервые выявленным заболеванием (рис. 7).

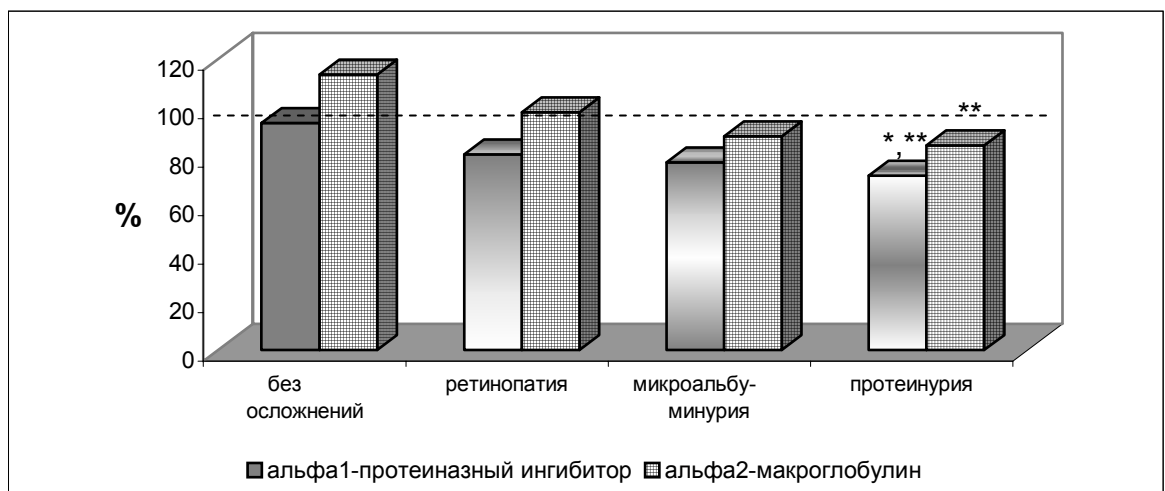


Рис. 7. Активность α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина больных сахарным диабетом 1 типа при сосудистых осложнениях сахарного диабета 1 типа (за 100% приняты показатели здоровых детей)

* - достоверность различий по сравнению со здоровыми детьми ($p < 0,05$)

** - достоверность различий по сравнению с больными без осложнений ($p < 0,05$)

Таким образом, при развитии микроангиопатий у больных СД 1 типа активность α_1 -ПИ и α_2 -МГ снижается по сравнению группой детей без осложнений. Достоверное снижение активности ингибиторов наблюдалось при диабетической нефропатии на стадии протеинурии по сравнению со здоровыми детьми и больными без осложнений.

В табл. 22 представлена активность ингибиторов протеолиза в зависимости от потребности в инсулине больных СД 1 типа.

Активность α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина плазмы крови больных сахарным диабетом 1 типа с разной потребностью в инсулине ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Здоровые дети, n=32	Потребность в инсулине, Ед/кг массы тела	
		Менее 0,7 Ед/кг, n=52	Более 0,7 Ед/кг, n=67
α_1 - Протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	29,5±1,8	21,2±1,4 p1<0,05	25,9±2,0 p1>0,05 p2>0,05
α_2 - Макроглобулин, ИЕ/мл	5,1±0,5	5,6±0,4 p1>0,05	5,4±0,5 p1>0,05 p2>0,05

Примечание:

p1 – достоверность различий по сравнению со здоровыми детьми;

p2- достоверность различий по сравнению с группой больных с потребностью в инсулине менее 0,7 Ед/кг.

Значимое снижение активности α_1 -ПИ плазмы крови на 28% выявлено в группе детей с потребностью в инсулине менее 0,7 Ед/кг по сравнению со здоровыми детьми ($p<0,05$). Достоверных различий активности ингибиторов между группами больных с разной потребностью в инсулине не обнаружено.

Таким образом, при низкой потребности в инсулине активность α_1 -ПИ плазмы крови снижена по сравнению со здоровыми детьми. Результаты исследования активности ингибиторов в группах детей с разным уровнем гликозилированного представлены в табл. 23. Достоверное снижение активности α_1 -ПИ на 22% по сравнению с контролем было обнаружено у детей с уровнем HbA_{1c} более 15%. Различий активности α_1 -ПИ между группами больных с разной степенью компенсации диабета не обнаружено. Однако активность α_2 -МГ снижалась на 12% ($p>0,05$) и 20% ($p<0,05$) при уровнях HbA_{1c} от 11 до 15% и более 15%, соответственно, по сравнению с группой больных с содержанием HbA_{1c} от 8 до 11%.

Таким образом, при СД 1 типа выявлено снижение активности α_1 -ПИ плазмы крови. С увеличением длительности заболевания и при повышении уровня

гликозилированного гемоглобина более 15% происходило угнетение активности α_1 -ПИ и α_2 -МГ.

Таблица 23

Активность α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина плазмы крови больных сахарным диабетом 1 типа в зависимости от уровня гликозилированного гемоглобина ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Здоровые дети, n=32	Гликозилированный гемоглобин		
		8-11%, n=11	11-15%, n=21	более 15%, n=9
α_1 - Протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	29,5±1,8	26,2±1,3 p1>0,05	23,6±2,0 p1>0,05 p2>0,05	22,9±1,6 p1<0,05 p2>0,05
α_2 - Макроглобулин, ИЕ/мл	5,1±0,5	5,8±0,3 p1>0,05	5,1±0,4 p1>0,05 p2>0,05	4,6±0,3 p1>0,05 p2<0,05

Примечание:

p1 – достоверность различий по сравнению со здоровыми детьми;

p2- достоверность различий по сравнению с группой детей с уровнем HbA_{1c} 8-11%.

Анализируя полученные результаты, в целом, следует заключить, что на ранних этапах развития сахарного диабета 1 типа у детей отмечена активация ККС. Развитие сосудистых осложнений, ретинопатии и нефропатии, сопровождается снижением активности калликреина и дефицитом α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина плазмы крови. Снижение активности ингибиторов протеолиза у больных СД 1 типа наиболее выражено в группах с декомпенсацией диабета (гликозилированный гемоглобин более 15%). У детей с длительностью диабета более 3 лет и при нефропатии значительно увеличивается активность ангиотензин-превращающего фермента, что приводит к еще более выраженному дисбалансу вазоактивных факторов. Активность ангиотензин-превращающего фермента повышена у больных с наиболее выраженной декомпенсацией. Коэффициент КК/АПФ, повышенный на ранних этапах заболевания и существенно снижающийся при развитии нефропатии, вероятно, позволяет прогнозировать развитие сосудистых осложнений при сахарном диабете 1 типа у детей.

3.3. Связь биохимических показателей с генетическими маркерами при сахарном диабете 1 типа у детей

В регуляции гемодинамики важную роль играют гены, кодирующие ангиотензиноген (AGT) и ангиотензин-превращающий фермент (ACE) [Ruggenetti P., 1996; Воронцов А.В. и др., 1997; Remuzzi G;1998; Дедов И.И.,2000]. Имеются сведения об ассоциации D аллеля гена ACE с диабетической нефропатией [Bouhanick V. et al., 1999; Perticone F. et al., 1999; Дедов И.И. и др., 2001]. С развитием гипертензии связывают наличие M аллеля гена AGT [Gulmann C. et al., 1999; Tarnow L. et al., 2000; Шестакова М.В. и др., 2002]. В дальнейшем, была исследована связь генотипа гена ACE и AGT с активностью ангиотензин-превращающего фермента, а также с показателями кининогенолиза и ингибиторами протеолиза.

Согласно данным литературы I/D полиморфизм гена ACE представлен II, ID и DD генотипами. Установлено, что носители генотипа II имеют низкую активность АПФ, а у людей с генотипом DD она значительно выше [Кондратьев Я.Ю., 1998; Fujisawa T. et al., 1998; Елисеева Ю.Е., 2001]. В популяции распространена гетерозиготная форма фермента и ее носители имеют средний уровень активности фермента [Fujisawa T. et al., 1998; Bouhanick V. et al., 1999].

В табл. 24 приведены результаты исследования показателей протеолиза больных с разными генотипами гена ACE. У детей, страдающих СД 1 типа, с II генотипом гена ACE активность АПФ составила $35,6 \pm 3,7$ мкмоль/мин·л, при генотипе ID активность фермента увеличивалась на 9% ($p > 0,05$), в группе детей с генотипом DD данный показатель был в 1,3 раза выше по сравнению с группой детей с II-генотипом ($p < 0,05$). Активность КК и ККГ в группах детей с генотипами гена ACE II, ID и DD не различалась между группами.

Изменение активности АПФ в зависимости от генотипа отражалось на отношении КК/АПФ. Коэффициент КК/АПФ не изменялся в группах детей с генотипами II и ID, но при генотипе DD этот коэффициент был на 44% ($p < 0,05$) ниже по сравнению с генотипом II. Достоверных различий активности ингибиторов протеолиза между группами больных с генотипами II, ID и DD гена ACE не выявлено.

Таким образом, у больных с генотипом DD I/D полиморфизма гена ACE активность АПФ в сыворотке крови больных СД 1 типа выше, чем при II и ID генотипах, что приводит к значительному снижению коэффициента КК/АПФ.

Таблица 24

Влияние I/D-полиморфизма гена ACE на активность показателей протеолиза плазмы крови больных сахарным диабетом 1 типа ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	1	2	3
	Генотип II, n=15	Генотип ID, n=37	Генотип DD, n=18
Ангиотензин-превращающий фермент, мкмоль/мин·л	35,6±3,5 p1-2>0,05 p1-3<0,05	38,8±3,1 p1-2>0,05 p2-3>0,05	45,4±3,7 p1-3<0,05 p2-3>0,05
Калликреин, мЕ/мл	101,5±11,0 p1-2>0,05 p1-3>0,05	107,7±9,5 p1-2>0,05 p2-3>0,05	98,8±7,2 p1-3>0,05 p2-3>0,05
Калликреиноген, мЕ/мл	249,1±29,6 p1-2>0,05 p1-3>0,05	260,5±21,9 p1-2>0,05 p2-3>0,05	285,1±23,5 p1-3>0,05 p2-3>0,05
Отношение КК / АПФ	1,99±0,26 p1-2>0,05 p1-3<0,05	1,59±0,19 p1-2>0,05 p2-3>0,05	1,12±0,20 p1-3<0,05 p2-3>0,05
α_1 -Протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	25,8±2,3 p1-2>0,05 p1-3>0,05	23,7±1,7 p1-2>0,05 p2-3>0,05	29,6±4,4 p1-3>0,05 p2-3>0,05
α_2 -Макроглобулин, ИЕ/мл	5,3±0,4 p1-2>0,05 p1-3>0,05	5,1±0,3 p1-2>0,05 p2-3>0,05	5,5±0,7 p1-3>0,05 p2-3>0,05

Примечание:

p1-2 – достоверность различий между группами детей с генотипами II и ID;
p1-3 – достоверность различий между группами детей с генотипами II и DD;
p2-3 – достоверность различий между группами детей с генотипами ID и DD.

T174M рестрикционный полиморфизм гена AGT представлен 2 аллельными формами T и M, выделяют 3 генотипа гена: TT, TM и MM. Установлено, что M аллель гена AGT является фактором риска развития артериальной гипертензии [Gulmann S. et al., 1999; Сергеева Т.В., 2002]. В популяции наиболее распространен T аллель изучаемого полиморфизма гена AGT.

Результаты исследования зависимости показателей протеолиза от T174M рестрикционного полиморфизма гена AGT представлены в табл. 25. Достоверных отличий между группами больных с TT и TM генотипами не выявлено.

Таблица 25

Влияние T174M рестрикционного полиморфизма гена AGT на активность показателей протеолиза плазмы крови больных сахарным диабетом 1 типа ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	1	2
	Генотип TM, n=11	Генотип TT, n=50
Ангиотензин-превращающий фермент, мкмоль/мин·л	34,4±3,0	42,7±2,7 p1-2>0,05
Калликреин, мЕ/мл	95,6±10,3	106,5±7,6 p1-2>0,05
Калликреиноген, мЕ/мл	224,7±18,4	262,3±17,0 p1-2>0,05
Отношение КК/ АПФ	1,50±0,26	1,70±0,19 p1-2>0,05
α_1-Протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	24,7±2,0	25,2±1,6 p1-2>0,05
α_2-Макроглобулин, ИЕ/мл	4,9±0,3	5,1±0,3 p1-2>0,05

Примечание:

p1-2 – достоверность различий между группами детей с генотипами TT и TM.

При исследовании роли генетических маркеров установлено, что только при наличии у больных СД 1 типа DD генотипа гена ACE активность АПФ повышается.

С наличием DD генотипа гена ACE связывают развитие диабетической нефропатии у детей с СД 1 типа [Кондратьев Я.Ю., 1998; Kobayashi K. et al., 1999; Park J.K. et al., 1999]. В табл. 26 приведены результаты исследования состояния протеолиза в зависимости от генотипов I/D полиморфизма гена ACE и наличия диабетической нефропатии. У детей, не имеющих осложнений СД 1 типа, с II и DD генотипами отмечена тенденция к повышению активности АПФ. При нефропатии высокая активность АПФ выявлена при всех генотипах гена ACE.

Активность КК повышена при генотипе ID гена ACE в группах больных без осложнений по сравнению с больными с II и ID генотипами. При сочетании нефропатии и генотипа DD активность фермента снижена. Также было выявлено

Активность показателей протеолиза больных сахарным диабетом 1 типа с разными генотипами гена ACE и при диабетической нефропатии ($\bar{X} \pm m$)

показатель	Без осложнений			Диабетическая нефропатия		
	Генотип II, n =15	Генотип ID, n =37	Генотип DD, n =18	Генотип II, n =15	Генотип ID, n =37	Генотип DD, n =18
Калликреин, мЕ/мл	96,8±8,4 p1-2<0,05 p1-3>0,05	120,4±9,4 p1-2<0,05 p2-3<0,05	95,4±7,7 p1-3>0,05 p2-3<0,05	88,6±10,3 p1-2>0,05 p1-3>0,05 p>0,05	95,3±9,9 p1-2>0,05 p2-3>0,05 p<0,05	68,3±9,2 p1-3<0,05 p2-3<0,05 p<0,05
Калликреиноген, мЕ/мл	242,5±26,9 p1-2>0,05 p1-3>0,05	257,4±22,0 p1-2>0,05 p2-3>0,05	290,1±22,6 p1-3>0,05 p2-3>0,05	218,18±15,2 p1-2>0,05 p1-3>0,05 p>0,05	235,5±22,4 p1-2>0,05 p2-3>0,05 p>0,05	185,5±21,6 p1-3>0,05 p2-3>0,05 p<0,05
Ангиотензинпревращающий фермент, мкмоль/мин·л	32,1±3,0 p1-2>0,05 p1-3>0,05	36,5±3,7 p1-2>0,05 p2-3>0,05	37,1±3,7 p1-3>0,05 p2-3>0,05	51,5±5,0 p1-2>0,05 p1-3>0,05 p<0,05	51,5±3,4 p1-2>0,05 p2-3>0,05 p<0,05	57,8±6,4 p1-3>0,05 p2-3>0,05 p<0,05
α₁-Протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	25,6±2,2 p1-2>0,05 p1-3>0,05	25,5±2,2 p1-2>0,05 p2-3>0,05	29,5±2,0 p1-3>0,05 p2-3>0,05	21,4±3,2 p1-2>0,05 p1-3>0,05 p>0,05	23,4±2,9 p1-2>0,05 p2-3>0,05 p>0,05	21,4±2,5 p1-3>0,05 p2-3>0,05 p<0,05
α₂-Макроглобулин, ИЕ/мл	5,6±0,5 p1-2>0,05 p1-3>0,05	5,5±0,4 p1-2>0,05 p2-3>0,05	5,6±0,8 p1-3>0,05 p2-3>0,05	4,1±0,7 p1-2>0,05 p1-3>0,05 p>0,05	4,7±0,4 p1-2>0,05 p2-3>0,05 p>0,05	4,5±0,5 p1-3>0,05 p2-3>0,05 p>0,05

Примечание:

p – достоверность различий по сравнению с группой детей без осложнений СД 1 типа;

p 1-2 – достоверность различий между группами детей с генотипами II и ID;

p 1-3 – достоверность различий между группами детей с генотипами II и DD;

p 2-3 - достоверность различий между группами детей с генотипами ID и DD.

уменьшение активности ККГ при развитии нефропатии в группе больных с генотипом DD по сравнению с детьми без осложнений.

Исследование активности ингибиторов протеолиза показало, что при отсутствии осложнений СД 1 типа имеется тенденция к увеличению их активности по сравнению с детьми с нефропатией. С развитием диабетической нефропатии у больных с генотипом DD выявлено наиболее существенное снижение активности α_1 -ПИ, которое составило 40%, по сравнению с детьми без осложнений.

В результате проведенного исследования выявлено, что состояние протеолиза связано с I/D полиморфизмом гена ACE. Высокая активность ангиотензин-превращающего фермента сыворотки крови больных наблюдается при DD генотипе и является фактором развития нефропатии. Исследование динамики изучаемых показателей при развитии нефропатии выявило их существенное изменение при DD генотипе гена ACE. Показатели протеолиза не зависели от T174M рестрикционного полиморфизма гена AGT.

3.4. Состояние протеолитических систем при добавлении инсулина, глюкозы и каптоприла в условиях *in vitro*

Инсулин и глюкоза являются основными патогенетическими факторами развития СД 1 типа. Заболевание проявляется гипергликемией на фоне абсолютной инсулиновой недостаточности. При развитии диабетической нефропатии у больных применяют ингибиторы АПФ. Самым первым и широко распространенным препаратом этой группы является каптоприл. В условиях *in vitro* изучали влияние инсулина, глюкозы и каптоприла в регуляции протеолиза, которые добавляли к плазме крови 15 здоровых и 50 больных детей.

3.4.1. Влияние инсулина на показатели протеолиза плазмы крови здоровых и больных сахарным диабетом 1 типа в условиях *in vitro*

Результаты изучения активности КК, ККГ, АПФ и ингибиторов протеолиза при добавлении инсулина в плазму крови приведены в табл. 27. В качестве контроля использовали исходные показатели протеолиза практически здоровых детей. При добавлении инсулина в дозах 7,5; 15 и 30 мкЕд/мл к плазме крови не выявлено достоверных изменений, однако имелась тенденция к повышению активности КК.

Таблица 27

Показатели протеолиза при добавлении инсулина к плазме крови здоровых детей в условиях *in vitro* ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Контроль	Инсулин мкЕд/мл		
		7,5	15	30
Калликреин, мЕ/мл	68,4±9,7	77,1±11,8 p>0,05	84,4±11,4 p>0,05	81,4±11,1 p>0,05
Калликреиноген, мЕ/мл	331,5±11,6	296,7±14,2 p>0,05	296,6±14,2 p>0,05	331,5±11,6 p>0,05
Ангиотензин-превращающий фермент, мкмоль/мин л	34,2±2,3	28,4±1,0 p>0,05	36,5±2,6 p>0,05	33,4±2,9 p>0,05
α_1 -Протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	27,5±2,6	26,4±2,8 p>0,05	27,3±2,3 p>0,05	28,2±2,8 p>0,05
α_2 -Макроглобулин, ИЕ/мл	5,0±0,2	4,9±0,2 p>0,05	5,2±0,1 p>0,05	5,0±0,2 p>0,05

Примечание: p - достоверность различий по сравнению с контролем.

При добавлении инсулина в плазму крови больных СД 1 типа выявлены иные закономерности (табл. 28). В качестве контроля использовали исходные показатели протеолиза в общей группе больных.

Таблица 28

Показатели протеолиза при добавлении инсулина к плазме крови больных сахарным диабетом 1 типа в условиях *in vitro* ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Контроль	Инсулин мкЕд/мл		
		7,5	15	30
Калликреин, мЕ/мл	106,8±9,2	163,1±12,4 p<0,05	162,6±10,7 p<0,05	111,6±7,4 p>0,05
Калликреиноген, мЕ/мл	243,9±11,3	270,6±14,7 p>0,05	276,6±14,7 p>0,05	257,5±14,7 p>0,05
Ангиотензин-превращающий фермент, мкмоль/мин л	39,8±2,0	38,2±1,6 p>0,05	44,9±1,9 p<0,05	53,5±2,9 p<0,05
α_1 -Протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	25,9±1,0	24,4±0,9 p>0,05	25,2±0,7 p>0,05	32,3±1,0 p<0,05
α_2 -Макроглобулин, ИЕ/мл	5,1±0,2	5,1±0,2 p>0,05	4,8±0,2 p>0,05	4,6±0,15 p>0,05

Примечание: p - достоверность различий по сравнению с контролем.

При добавлении низких и средних доз инсулина к плазме крови больных происходило достоверное увеличение активности КК в 1,5 раза по сравнению с контролем. При максимальной дозе инсулина активность фермента снижалась до контрольных значений. Активность ККГ под влиянием инсулина не изменялась, хотя при низких дозах гормона наблюдалось незначительное снижение активности профермента. Добавление инсулина приводило к увеличению активности АПФ плазмы крови больных. При концентрации инсулина 15 мкЕд/мл активность фермента увеличилась на 13% (p<0,05), при дозе инсулина 30 мкЕд/мл – на 34% (p<0,05). При исследовании активности α_1 -ПИ плазмы крови больных СД 1 типа наблюдалось увеличение активности ингибитора на 25% (p<0,05) при дозе инсулина 30 мкЕд/мл. Активность α_2 -МГ не зависела от добавления инсулина в условиях *in vitro*.

Таким образом, инсулин в условиях *in vitro* увеличивал активность КК, α_1 -ПИ и АПФ плазмы крови больных СД 1 типа, что свидетельствует об активации протеолиза.

При добавлении инсулина к плазме крови больных диабетической нефропатией получены более выраженные изменения (табл. 29). В качестве контроля были приняты показатели протеолиза плазмы крови больных с нефропатией.

Таблица 29

Показатели протеолиза при добавлении инсулина к плазме крови больных диабетической нефропатией в условиях *in vitro* ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Контроль	Инсулин мкЕд/мл		
		7,5	15	30
Калликреин, мЕ/мл	89,3±6,7	129,0±10,8 p<0,05	116,5±9,9 p<0,05	112,9±11,4 p<0,05
Калликреиноген, мЕ/мл	208,9±24,8	255,5±13,2 p<0,05	238,6±12,3 p>0,05	240,2±23,7 p>0,05
Ангиотензин-превращающий фермент, мкмоль/мин л	54,7±2,5	55,3±1,8 p>0,05	54,8±3,8 p>0,05	54,1±2,2 p>0,05
α_1-Протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	18,6±2,0	20,5±2,2 p>0,05	27,3±0,9 p<0,05	34,1±2,3 p<0,05
α_2-Макроглобулин, ИЕ/мл	4,7±0,2	4,5±0,3 p>0,05	4,7±0,2 p>0,05	4,6±0,3 p>0,05

Примечание: p - достоверность различий по сравнению с контролем.

Максимальное повышение активности фермента наблюдалось при исследовании активности КК плазмы крови больных с диабетической нефропатией. Она увеличивалась при добавлении инсулина в плазму крови в дозах 7,5 мкЕд/мл и 15 мкЕд/мл в 1,4 и 1,3 раза, а при дозе инсулина 30 мкЕд/мл активность фермента была выше контрольных значений на 26% (p<0,05). Активность ККГ возрастала при низких концентрациях инсулина. При дозе 7,5 мкЕд/мл повышение активности фермента составило 22% (p<0,05), при увеличении концентрации инсулина в среде инкубации активность ККГ была выше контрольных значений, но это изменение было статистически не значимо. В плазме крови больных диабетической нефропатией в присутствии инсулина в разных концентрациях изменений активности АПФ не наблюдалось. Инсулин увеличивал активность α_1 -ПИ. При концентрации препарата 15 мкЕд/мл активность ингибитора увеличивалась на 46%, а при концентрации 30 мкЕд/мл - в 1,8 раза (p<0,05), соответственно. Активность α_2 -МГ при этом не изменялась.

На рис. 8 представлено изменение показателей протеолиза плазмы крови под влиянием инсулина в условиях *in vitro*. Инсулин не изменял показатели протеолиза плазмы крови здоровых детей. При СД 1 типа добавление инсулина в низких дозах сопровождалось повышением активности КК, что наиболее выражено при развитии диабетической нефропатии. Активность АПФ была высокой при дозе инсулина, 30 мкЕд/мл. При исследовании влияния инсулина на активность ингибиторов протеолиза обнаружено увеличение активности α_1 -ПИ.

3.4.2. Влияние глюкозы на показатели протеолиза плазмы крови здоровых и больных сахарным диабетом 1 типа в условиях *in vitro*

Результаты исследования влияния глюкозы на показатели протеолиза здоровых детей приведены в табл. 30. При добавлении глюкозы к плазме крови здоровых детей значимых изменений не выявлено. В качестве контроля использовали исходные показатели протеолиза практически здоровых детей.

Таблица 30

Показатели протеолиза при добавлении глюкозы к плазме крови здоровых детей в условиях *in vitro* ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Контроль	Глюкоза, ммоль/л		
		2	5	15
Калликреин, мЕ/мл	68,4±9,7	61,0±10,7 p>0,05	68,5±9,4 p>0,05	67,2±8,8 p>0,05
Калликреиноген, мЕ/мл	331,5±11,6	314,1±23,2 p>0,05	331,5±11,6 p>0,05	314,1±23,3 p>0,05
Ангиотензин-превращающий фермент, мкмоль/мин л	34,2±2,3	39,6±3,8 p>0,05	29,4±2,3 p>0,05	30,2±2,0 p>0,05
α_1 -Протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	27,5±2,6	31,7±2,2 p>0,05	27,3±2,3 p>0,05	25,7±1,4 p>0,05
α_2 -Макроглобулин, ИЕ/мл	5,0±0,2	5,3±0,1 p>0,05	4,7±0,2 p>0,05	4,9±0,2 p>0,05

Примечание: p - достоверность различий по сравнению с контролем.

В табл. 31 представлены результаты изучения показателей протеолиза в общей группе больных СД 1 типа под влиянием глюкозы. В качестве контроля приняты исходные показатели протеолиза плазмы крови в общей группе больных.

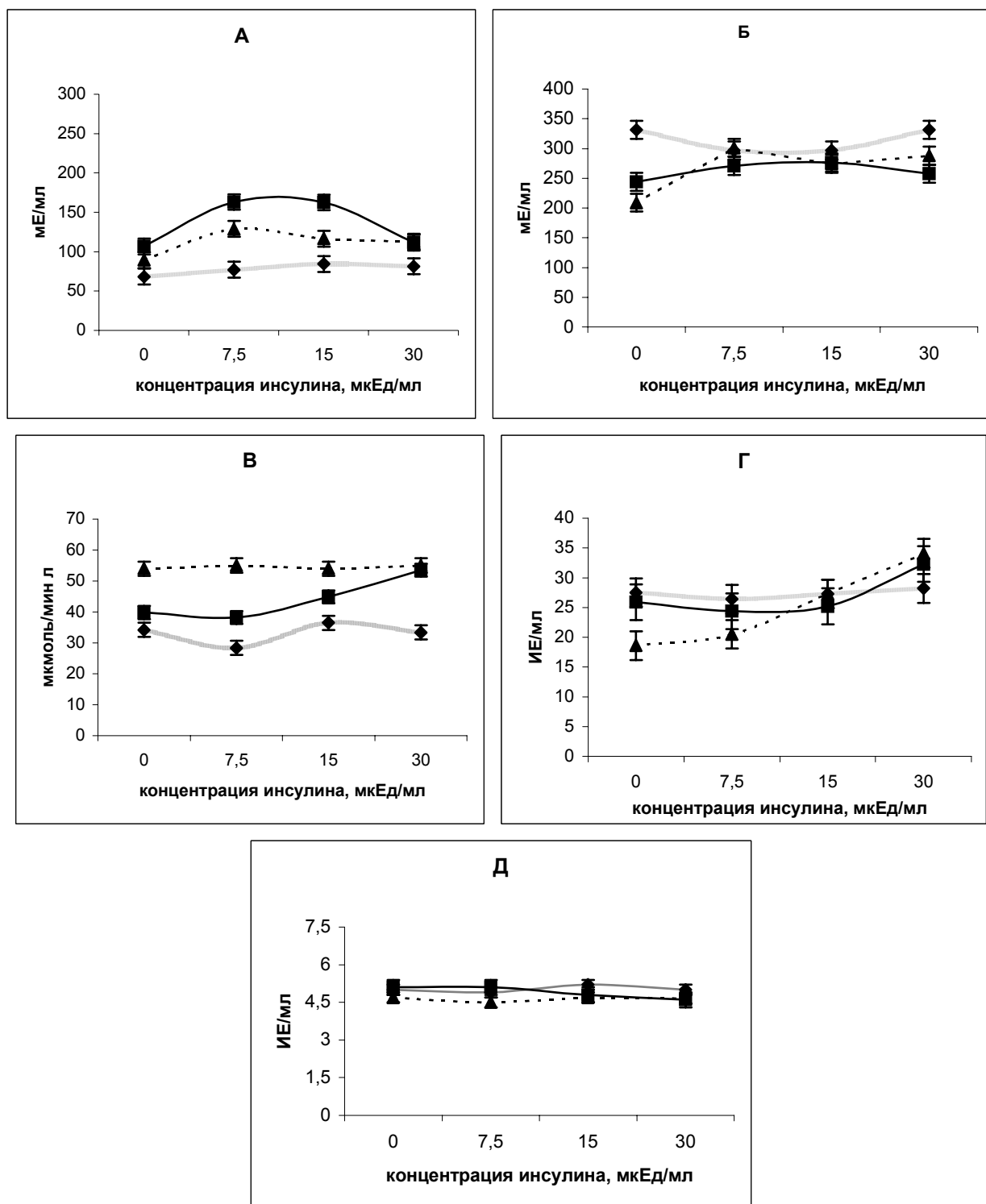


Рис. 8. Активность калликреина (А), калликреиногена (Б), ангиотензин-превращающего фермента (В), α_1 -протеиназного ингибитора (Г) и α_2 -макроглобулина (Д) при добавлении инсулина в плазму крови здоровых детей и больных сахарным диабетом 1 типа в условиях *in vitro*

Примечание:

—◆— здоровые дети; —◆— больные сахарным диабетом 1 типа;
◆..... больные с диабетической нефропатией.

Активность КК увеличивалась при добавлении глюкозы к плазме крови больных СД 1 типа. При дозах глюкозы 2; 5 и 15 ммоль/л активность КК повышалась на 45%, 65% и 214% по отношению к исходной активности, соответственно. При добавлении к плазме крови высокой концентрации глюкозы активность ККГ снижалась на 17% ($p < 0,05$). Глюкоза оказывала влияние на активность АПФ в концентрации 5 и 15 ммоль/л. Максимальное увеличение активности фермента на 20% наблюдалось при ее концентрации 15 ммоль/л ($p < 0,05$). Активность α_1 -ПИ и α_2 -МГ при действии глюкозы не изменялась.

Таблица 31

Показатели протеолиза при добавлении глюкозы к плазме крови больных сахарным диабетом 1 типа в условиях *in vitro* ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Контроль	Глюкоза, ммоль/л		
		2	5	15
Калликреин, мЕ/мл	106,9±4,8	155,3±10,0 $p > 0,05$	176,3±12,6 $p < 0,05$	229,8±14,5 $p < 0,05$
Калликреиноген, мЕ/мл	232,7±16,0	250,2±14,4 $p > 0,05$	261,7±14,7 $p > 0,05$	192,6±9,9 $p < 0,05$
Ангиотензин-превращающий фермент, мкмоль/мин л	39,8±2,0 $p > 0,05$	42,9±2,7 $p > 0,05$	41,4±2,3 $p > 0,05$	48,0±3,1 $p < 0,05$
α_1 -Протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	25,9±1,0	23,7±1,3 $p > 0,05$	23,9±1,3 $p > 0,05$	26,1±1,2 $p > 0,05$
α_2 -Макроглобулин, ИЕ/мл	5,1±0,2	5,4±0,2 $p > 0,05$	5,4±0,1 $p > 0,05$	5,5±0,1 $p > 0,05$

Примечание: p - достоверность различий по сравнению с контролем.

Таким образом, при добавлении высоких концентраций глюкозы к плазме крови больных СД 1 типа наблюдалось увеличение активности КК и АПФ, при одновременном снижении активности ККГ. Активность ингибиторов протеолиза под действием глюкозы не изменялась.

В табл. 32 приведены показатели протеолиза при добавлении глюкозы к плазме крови больных диабетической нефропатией в условиях *in vitro*. Значения этих показателей при нефропатии использовали в качестве контроля. При добавлении глюкозы к плазме крови больных диабетической нефропатией наблюдалось значительное увеличение активности КК. При максимальной

концентрации глюкозы активность фермента возрастала в 2,7 раза. Также наблюдалось снижение активности ККГ, при концентрации глюкозы 15 ммоль/л оно составило 22% по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Активность АПФ у детей с диабетической нефропатией повышалась на 25% при максимальной концентрации глюкозы в среде инкубации ($p < 0,05$). Активность ингибиторов протеолиза достоверно не изменялась.

Таблица 32

Показатели протеолиза при добавлении глюкозы к плазме крови больных с диабетической нефропатией в условиях *in vitro* ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Контроль	Глюкоза, ммоль/л		
		2	5	15
Калликреин, мЕ/мл	89,3±6,7	152,7±13,0 p<0,05	181,8±19,9 p<0,05	239,8±14,8 p<0,05
Калликреиноген, мЕ/мл	208,9±24,8	208,7±21,8 p>0,05	203,6±18,3 p>0,05	160,9±18,4 p<0,05
Ангиотензин-превращающий фермент, мкмоль/мин л	53,3±2,3	47,2±3,5 p>0,05	55,2±2,5 p>0,05	66,7±1,9 p<0,05
α_1 -Протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	18,6±2,0	18,6±2,0	20,3±3,2 p>0,05	18,6±2,2 p>0,05
α_2 -Макроглобулин, ИЕ/мл	4,7±0,2	4,9±0,3 p>0,05	5,2±0,2 p>0,05	5,1±0,3 p>0,05

Примечание: p - достоверность различий по сравнению с контролем.

На рис. 9 показано, что глюкоза в условиях *in vitro* не влияет на показатели протеолиза плазмы крови здоровых детей. Добавление глюкозы в плазму крови больных СД 1 типа приводит к увеличению активности КК и АПФ на фоне снижения активности ККГ - неактивного предшественника КК. Эти изменения наиболее выражены в плазме крови больных диабетической нефропатией. Активность ингибиторов протеолиза под влиянием глюкозы не изменялась. Существенное влияние глюкозы на ферменты отмечено только при высоких дозах, при физиологических концентрациях изменений активности изучаемых показателей не наблюдается.

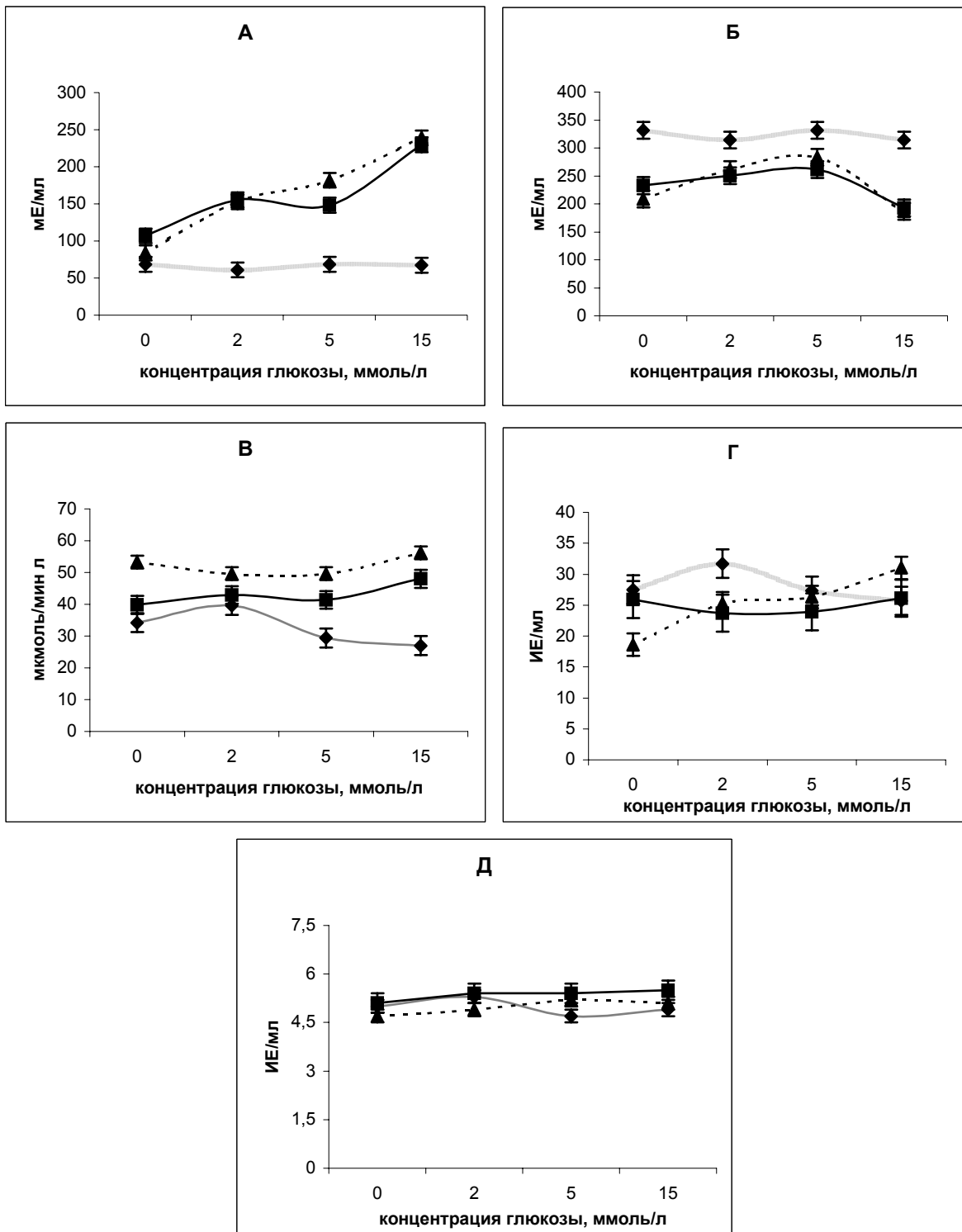


Рис. 9. Активность калликреина (А), калликреиногена (Б), ангиотензин-превращающего фермента (В), α_1 -протеиназного ингибитора (Г) и α_2 -макроглобулина (Д) при добавлении глюкозы в плазму крови здоровых детей и больных сахарным диабетом 1 типа в условиях *in vitro*

Примечание:

—◆— здоровые дети; —◆— больные сахарным диабетом 1 типа;
◆..... больные с диабетической нефропатией.

3.4.3. Влияние каптоприла на показатели протеолиза плазмы крови здоровых и больных сахарным диабетом 1 типа в условиях *in vitro*

Результаты изучения показателей протеолиза при добавлении каптоприла приведены в табл. 33. В качестве контроля приняты исходные показатели протеолиза практически здоровых детей. Каптоприл не оказывал влияние на состояние протеолиза плазмы крови здоровых детей в условиях *in vitro*.

Таблица 33

Показатели протеолиза при добавлении каптоприла к плазме крови здоровых детей в условиях *in vitro* ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Каптоприл, мкг/мл			
	Контроль	0,075	0,15	0,30
Ангиотензин-превращающий фермент, мкмоль/мин л	34,2±2,3	29,8±1,8 p>0,05	29,4±1,2 p>0,05	34,4±3,3 p>0,05
Калликреин, мЕ/мл	68,4±9,7	77,1±10,1 p>0,05	77,1±10,1 p>0,05	62,9±9,9 p>0,05
Калликреиноген, мЕ/мл	331,5±11,6	314,1±21,4 p>0,05	331,5±17,4 p>0,05	314,1±21,4 p>0,05
α_1 -Протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	27,5±2,6	25,1±2,6 p>0,05	25,1±2,2 p>0,05	26,1±2,7 p>0,05
α_2 -Макроглобулин, ИЕ/мл	5,0±0,2	5,2±0,2 p>0,05	5,1±0,1 p>0,05	5,1±0,2 p>0,05

Примечание: p - достоверность различий по сравнению с контролем.

Результаты исследования показателей протеолиза при добавлении каптоприла к плазме крови больных СД 1 типа приведены в табл. 34. В качестве контроля использовали показатели протеолиза больных СД 1 типа. Каптоприл, при добавлении его в среду инкубации, снижал активность АПФ как при низких, так и при высоких концентрациях в среднем на 40%. Активность ферментов кининогенеза не изменялась при добавлении каптоприла к плазме крови больных. Ингибитор АПФ увеличивал активность α_1 -ПИ и α_2 -МГ плазмы крови больных СД 1 типа. Под действием высоких доз каптоприла активность α_1 -ПИ увеличивалась на 17%, α_2 -МГ - на 16%, соответственно, (p<0,05).

Таким образом, добавление каптоприла к плазме больных СД 1 типа сопровождается снижением активности АПФ. При исследовании активности

ингибиторов протеолиза отмечено повышение активности α_1 -ПИ и α_2 -МГ под влиянием каптоприла.

Таблица 34

Показатели протеолиза при добавлении каптоприла к плазме крови больных сахарным диабетом 1 типа в условиях *in vitro* ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Каптоприл, мкг/мл			
	Контроль	0,075	0,15	0,30
Ангиотензин-превращающий фермент, мкмоль/мин л	39,8±2,0	27,1±1,0 p<0,05	27,5±1,6 p<0,05	23,7±0,6 p<0,05
Калликреин, МЕ/мл	106,9±4,8	125,3±6,3 p>0,05	124,7±6,3 p>0,05	112,8±5,8 p>0,05
Калликреиноген, МЕ/мл	232,7±16,0	252,0±17,8 p>0,05	248,1±12,0 p>0,05	232,0±14,5 p>0,05
α_1 -Протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	25,1±1,5	28,1±1,3 p>0,05	28,1±1,4 p>0,05	29,3±1,6 p<0,05
α_2 -Макроглобулин, ИЕ/мл	5,1±0,2	4,6±0,1 p>0,05	5,4±0,1 p>0,05	5,9±0,1 p<0,05

Примечание: p - достоверность различий по сравнению с контролем.

В табл. 35 представлены показатели протеолиза больных диабетической нефропатией при добавлении каптоприла к плазме крови в условиях *in vitro*.

Таблица 35

Показатели протеолиза при добавлении каптоприла к плазме крови больных с диабетической нефропатией в условиях *in vitro* ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Каптоприл, мкг/мл			
	Контроль	0,075	0,15	0,30
Ангиотензин-превращающий фермент, мкмоль/мин л	53,3±2,3	26,9±1,7 p<0,05	27,9±2,4 p<0,05	22,7±1,4 p<0,05
Калликреин, МЕ/мл	89,3±6,7	145,4±12,4 p<0,05	145,4±12,4 p<0,05	119,1±18,4 p<0,05
Калликреиноген, МЕ/мл	208,9±24,8	184,8±17,4 p>0,05	182,0±18,3 p>0,05	162,5±18,3 p<0,05
α_1 -Протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	18,6±2,0	24,1±2,4 p<0,05	22,8±2,7 p<0,05	23,5±2,6 p<0,05
α_2 -Макроглобулин, ИЕ/мл	4,7±0,2	5,2±0,1 p>0,05	5,8±0,2 p<0,05	6,2±0,3 p<0,05

Примечание: p - достоверность различий по сравнению с контролем.

В качестве контроля принимали показатели протеолиза больных диабетической нефропатией. В плазме крови больных диабетической нефропатией активность АПФ при добавлении в среду инкубации каптоприла снижалась в среднем на 57%. Каптоприл в дозе 0,3 мкг/мл увеличивал активность КК в 1,3 раза, при этом активность ККГ снижалась на 22% ($p < 0,05$). Также наблюдалось повышение активности α_1 -ПИ. При концентрации каптоприла 0,075 мкг/мл активность α_1 -ПИ увеличивалась на 30% ($p < 0,05$), при высоких дозах ингибитора АПФ активность α_1 -ПИ увеличивалась в среднем на 26% ($p < 0,05$). Активность α_2 -МГ под влиянием каптоприла возрастала с увеличением дозы. При концентрациях каптоприла 0,15 и 0,3 мкг/мл активность ингибитора повышалась на 23% и 32%, соответственно, ($p < 0,05$).

На рис. 10 показано влияние каптоприла на активность показателей протеолиза. При добавлении каптоприла к плазме крови здоровых детей изменений показателей протеолиза не выявлено. Каптоприл в условиях *in vitro* существенно снижает активность АПФ плазмы крови больных и способствует повышению активности ингибиторов протеолиза. Обнаружено увеличение активности КК при добавлении каптоприла к плазме крови больных диабетической нефропатией

Таким образом, добавление инсулина, глюкозы и каптоприла в плазму крови здоровых детей не влияет на показатели протеолиза. Развитие дисбаланса протеолитических систем при сахарном диабете 1 типа способствует появлению чувствительности к этим веществам. Глюкоза оказывает значительное влияние на активность КК и АПФ и играет иницирующую роль в нарушении состояния протеолиза при сахарном диабете. Инсулин значительно повышает активность α_1 -ПИ, КК и АПФ. Каптоприл наряду со своим прямым действием приводит к повышению активности ингибиторов протеолиза. Наиболее выраженное влияние глюкозы, инсулина и каптоприла на активность показателей протеолиза выявлено при нефропатии.

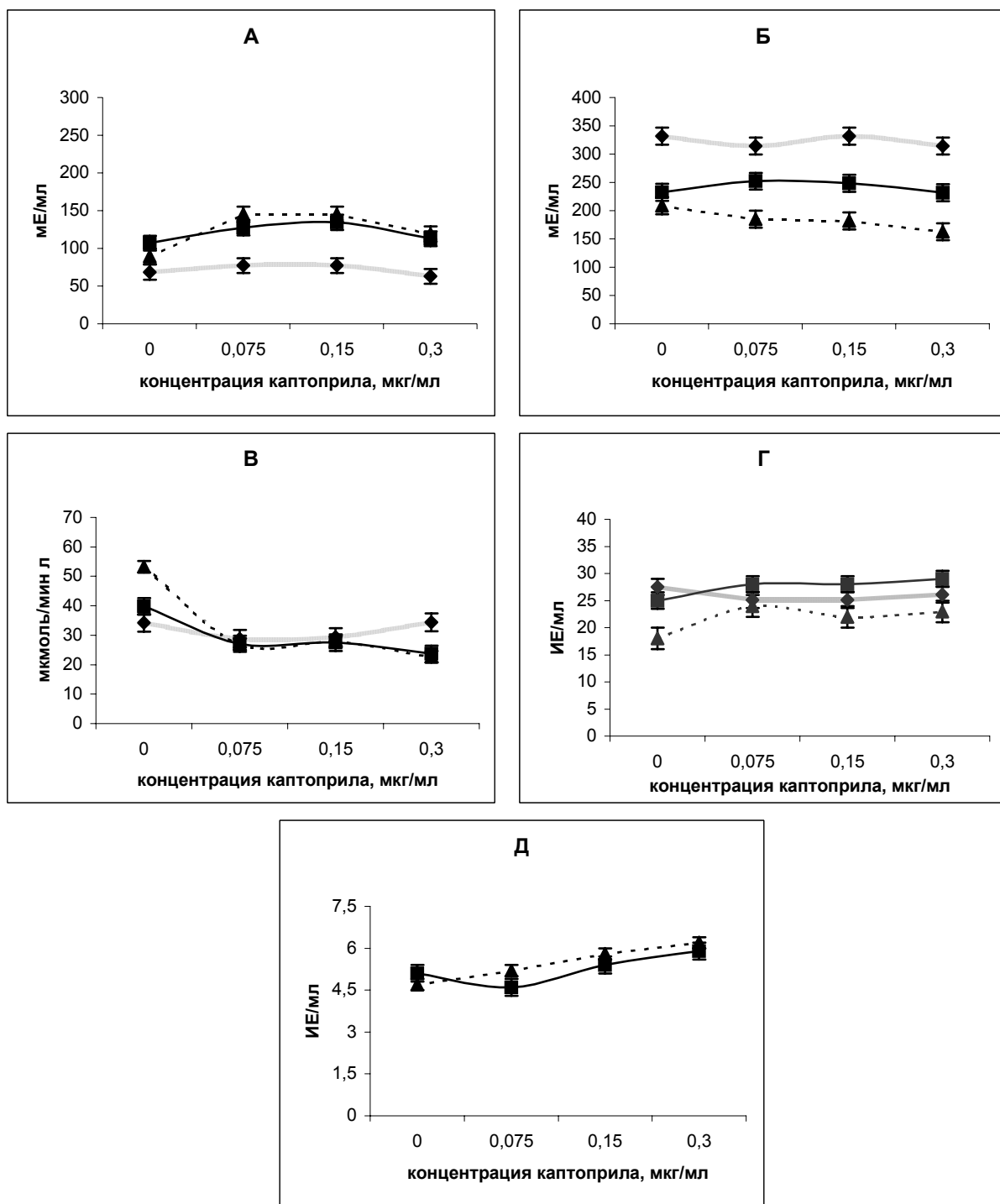


Рис.10. Активность калликреина (А), калликреиногена (Б), ангиотензин-превращающего фермента (В), α_1 -протеиназный ингибитора (Г) и α_2 -макроглобулина (Д) при добавлении каптоприла в плазму крови здоровых детей и больных сахарным диабетом 1 типа в условиях *in vitro*

Примечание:

—◆— здоровые дети; —◆— больные сахарным диабетом 1 типа;
◆..... больные с диабетической нефропатией.

3.5. Статистические методы исследования

3.5.1. Корреляционный анализ

Корреляционный анализ позволяет сделать вывод о наличии взаимосвязей между показателями протеолиза. Использовали данные, полученные при обследовании 32 здоровых детей и 119 больных сахарным диабетом 1 типа. В табл. 36 представлены коэффициенты корреляции между исследуемыми показателями в группе здоровых детей.

Таблица 36

Коэффициенты корреляции между показателями протеолиза практически здоровых детей

Показатели	КК	ККГ	α_1 -ПИ	α_2 -МГ	АПФ
КК	- p>0,05	-0,03 p>0,05	0,4 p>0,05	0,02 p>0,05	-0,5 p>0,05
ККГ	-0,03 p>0,05	- p>0,05	-0,04 p>0,05	0,06 p>0,05	0,22 p>0,05
α_1-ПИ	0,4 p>0,05	-0,04 p>0,05	- p>0,05	0,03 p>0,05	-0,12 p>0,05
α_2-МГ	0,02 p>0,05	0,06 p>0,05	0,03 p>0,05	- p>0,05	-0,07 p>0,05
АПФ	-0,5 p>0,05	0,22 p>0,05	-0,12 p>0,05	-0,07 p>0,05	- p>0,05

В результате проведенного анализа установлено, что коэффициенты корреляции находятся в пределах от 0,02 до 0,5. Однако достоверных связей между показателями не обнаружено.

Результаты корреляционного анализа в общей группе больных СД 1 типа приведены в табл. 37. Умеренные коэффициенты корреляции были получены между активностью КК и α_1 -ПИ ($r = 0,6$; $p < 0,05$) и активностью КК и ККГ ($r = - 0,5$; $p < 0,05$).

**Коэффициенты корреляции между показателями протеолиза при сахарном диабете
1 типа у детей**

Показатели	КК	ККГ	α_1 -ПИ	α_2 -МГ	АПФ
КК	-	-0,5 p<0,05	0,6 p<0,05	-0,3 p>0,05	-0,3 p>0,05
ККГ	-0,5 p<0,05	-	-0,2 p>0,05	-0,3 p>0,05	-0,4 p>0,05
α_1-ПИ	0,6 p<0,05	-0,2 p>0,05	-	0,15 p>0,05	-0,4 p>0,05
α_2-МГ	-0,4 p>0,05	-0,3 p>0,05	0,15 p>0,05		-0,2 p>0,05
АПФ	-0,3 p>0,05	-0,4 p>0,05	-0,4 p>0,05	-0,22 p>0,05	-

Таким образом, при развитии СД 1 типа имеется связь между активностью КК и ККГ, а также между КК и активностью α_1 -протеиназного ингибитора плазмы крови.

Корреляционный анализ был проведен также в группах детей с диабетической ретинопатией и нефропатией. В табл. 38 представлены коэффициенты корреляции изучаемых показателей в группе больных СД 1 типа с ретинопатией.

**Коэффициенты корреляции между показателями протеолиза при
диабетической ретинопатии у детей**

Показатели	КК	ККГ	α_1 -ПИ	α_2 -МГ	АПФ
КК	-	0,2 p>0,05	0,6 p<0,05	0,4 p>0,05	-0,3 p>0,05
ККГ	-0,3 p>0,05	-	0,2 p>0,05	0,6 p<0,05	-0,2 p>0,05
α_1-ПИ	0,6 p<0,05	0,2 p>0,05	-	0,2 p>0,05	0,2 p>0,05
α_2-МГ	0,4 p>0,05	0,6 p<0,05	0,2 p>0,05	-	-0,5 p>0,05
АПФ	0,3 p>0,05	-0,2 p>0,05	0,2 p>0,05	-0,5 p>0,05	-

Выявлена положительная связь между активностью КК и α_1 -ПИ ($r=0,6$; $p<0,05$) и между показателями ККГ и α_2 -МГ ($r=0,6$; $p<0,05$). То есть. при ретинопатии появляется дополнительная связь показателей кининогенеза с α_2 -МГ.

В табл. 39 приведены коэффициенты корреляции между показателями протеолиза в группе больных СД 1 типа с нефропатией.

Таблица 39

Корреляционный анализ показателей протеолиза при диабетической нефропатии у детей

Показатели	КК	ККГ	α_1 -ПИ	α_2 -МГ	АПФ
КК	-	0,2 $p>0,05$	0,8 $p<0,05$	-0,3 $p>0,05$	0,2 $p>0,05$
ККГ	0,2 $p>0,05$	-	0,6 $p<0,05$	0,2 $p>0,05$	-0,4 $p>0,05$
α_1 -ПИ	0,8 $p<0,05$	-0,6 $p<0,05$	-	0,2 $p>0,05$	-0,8 $p<0,05$
α_2 -МГ	-0,3 $p>0,05$	-0,3 $p>0,05$	0,2 $p>0,05$	-	-0,6 $p<0,05$
АПФ	0,2 $p>0,05$	-0,4 $p>0,05$	-0,8 $p<0,05$	-0,6 $p<0,05$	-

Выявлена положительная связь между показателями КК и α_1 -ПИ ($r=0,8$; $p<0,05$) и отрицательная – между α_1 -ПИ и АПФ ($r= -0,8$; $p<0,05$) Обнаружены также умеренные связи между активностью АПФ и α_2 -МГ ($r=-0,6$; $p<0,05$) и между ККГ и α_1 -ПИ ($r=0,6$; $p<0,05$).

Обращает внимание тот факт, что при нефропатии наблюдается увеличение числа связей, появляется связь АПФ с α_1 -ПИ и α_2 -МГ, что указывает на усиление степени сопряженности между показателями. Следовательно, развитие диабетической нефропатии сопровождается появлением зависимостей между изучаемыми показателями.

3.5.2. Регрессионный анализ

Для изучения связи активности АПФ с показателями протеолиза был проведен регрессионный анализ, составлены уравнения регрессии для общей группы больных и с нефропатией. В отличие от корреляционного анализа изучение

регрессии предполагает определение не только направления и силы связи между показателями, но также и вид зависимости между ними [Реброва О.Ю., 2002].

В результате проведенного анализа не выявлено зависимости между данными показателями в общей группе больных СД 1 типа (табл. 40).

Уравнение регрессии: $АПФ = 41,0 - 0,12КК - 0,07ККГ + 0,05\alpha_1\text{-ПИ} + 0,05\alpha_2\text{-МГ}$

Вклад дисперсий исследуемых показателей в этой группе составил лишь 2%.

Таблица 40

Коэффициенты регрессии зависимости ангиотензин-превращающего фермента от показателей протеолиза и их вклад при сахарном диабете 1 типа у детей

Показатель	Коэффициент регрессии	P	Вклад
Калликреин	-0,12	0,30	2%
Калликреиноген	-0,07	0,47	
α_1 -Протеиназный ингибитор	0,05	0,67	
α_2 -Макроглобулин	0,05	0,64	
Остаточная дисперсия			98%

В табл. 41 приведены коэффициенты регрессии КК, ККГ и ингибиторов в группе детей с нефропатией.

Уравнение регрессии: $АПФ = 102,90 + 0,06КК - 0,11ККГ - 0,60\alpha_1\text{-ПИ} - 0,35\alpha_2\text{-МГ}$

Таблица 41

Коэффициенты регрессии зависимости ангиотензин-превращающего фермента от показателей протеолиза и их вклад при диабетической нефропатии у детей

Показатель	Коэффициент регрессии	P	Вклад
Калликреин	0,06	0,79	48%
Калликреиноген	-0,11	0,56	
α_1 -Протеиназный ингибитор	-0,60	0,01	
α_2 -Макроглобулин	-0,35	0,07	
Остаточная дисперсия			52%

При развитии диабетической нефропатии была выявлена отрицательная зависимость между активностью АПФ и α_1 -ПИ. Связь АПФ с КК, ККГ и α_2 -МГ не

являлась статистически значимой. В группе детей с нефропатией изучаемые показатели имеют более существенное значение, и их вклад составил 48%.

Таким образом, при нефропатии к наиболее значимым показателям относятся увеличение активности АПФ и снижение активности α_1 -ПИ, обеспечивающие прогрессирование нефропатии при СД 1 типа у детей.

3.5.3. Дисперсионный анализ

Дисперсионный анализ позволяет обнаружить влияние факторов на резульативный признак [Лакин Г.Ф., 1980; Гельман В.Я., 2000].

При проведении однофакторного дисперсионного анализа было оценено действие инсулина на КК, ККГ, α_1 -ПИ и α_2 -МГ. С помощью критерия Фишера исследована достоверность влияния изучаемых веществ на активность показателей протеолиза. Сила влияния была оценена по способу Снедекора [Лакин Г.Ф., 1980]. В табл. 42 представлены данные дисперсионного анализа изучаемых факторов. При проведении анализа было выявлено влияние инсулина и глюкозы на активность КК. Действием инсулина обусловлено 20% общего варьирования показателя, на долю глюкозы приходится 60%. Каптоприл влияния на активность КК не оказывал. В результате проведенного анализа было выявлено значение глюкозы в изменении активности ККГ, ее вклад составил 25% ($p < 0,05$). Влияние инсулина и каптоприла на активность фермента было не значимо.

Таблица 42

Влияние инсулина, глюкозы и каптоприла на активность показателей протеолиза в условиях *in vitro*

Показатели	Сила влияния факторов, %		
	инсулин	глюкоза	каптоприл
Калликреин	20 $p < 0,01$	60 $p < 0,01$	10 $p > 0,01$
Калликреиноген	0,04 $p > 0,01$	25 $p < 0,01$	9 $p > 0,01$
Ангиотензин-превращающий фермент	20 $p < 0,01$	40 $p < 0,01$	40 $p < 0,01$
α_1 -Протеиназный ингибитор	24 $p < 0,01$	4 $p > 0,01$	21 $p < 0,01$
α_2 -Макроглобулин	3 $p > 0,01$	7 $p > 0,01$	30 $p < 0,01$

Примечание: p - достоверность влияния фактора.

Активность АПФ зависела от влияния всех факторов, на долю инсулина приходилось - 20% общего варьирования, глюкозы – 40%, каптоприла – 40%.

Действием инсулина обусловлено 24% общего варьирования активности α_1 -ПИ, на долю каптоприла приходилось 21%. При анализе влияния инсулина, глюкозы и каптоприла выявлено, что активность α_2 -МГ связана с добавлением каптоприла, вклад этого фактора составил 30% (рис. 11).

Таким образом, глюкоза в большей степени, чем инсулин оказывала влияние на активность КК и АПФ. Значимое влияние на активность α_1 -ПИ оказывал инсулин. Помимо ингибирующего влияния каптоприла на активность АПФ, была отмечена его роль в изменение активности α_2 -МГ. Следовательно, глюкоза является основной причиной в развитии дисбаланса протеолитических систем при СД 1 типа. Применение инсулина и каптоприла сглаживает возникающее нарушение равновесия в системах протеолиза.

Многофакторный дисперсионный анализ был проведен для изучения вклада ряда факторов: длительности заболевания, наличия сосудистых осложнений, компенсации заболевания, потребности в инсулине, индекса массы тела и эндогенных: полиморфизма генов ACE и AGT в изменение изучаемых показателей. В табл. 43 представлены степень и достоверность влияния вышеперечисленных факторов на активность показателей протеолиза. Величина остаточной дисперсии для КК равна 58,7%, и только 41,3% дисперсии приходится на контролируемые факторы. Самое большое влияние имели длительность заболевания и полиморфизм гена ACE, что составило 29,4% и 29,9%, соответственно. Активность КК, как показал дисперсионный анализ, зависела также от потребности в инсулине. На основании данных многофакторного дисперсионного анализа активность ККГ не зависела от изучаемых факторов, степень их влияния оказалась равна 25,6%.

Вклад дисперсий изучаемых факторов для α_1 -ПИ составил лишь 31,4 %. Для α_1 -ПИ значение имела компенсация заболевания (24,4%, $p=0,05$), наличие сосудистых осложнений (24,4%, $p=0,18$) и потребность в инсулине (24,2%, $p=0,17$). Активность α_2 -МГ существенно не изменялась под влиянием контролируемых факторов, их вклад составил только 25%. Их них 42% дисперсии приходилось на

продолжительность заболевания, однако влияние этого фактора не было доказано статистически.

Таблица 43

Влияние экзогенных и эндогенных факторов на показатели протеолиза

Факторы	Влияние %				
	КК	ККГ	α_1 -ПИ	α_2 -МГ	АПФ
Длительность заболевания	29,4 p=0,05	49,7 p=0,31	10,0 p=0,90	42,0 p=0,90	28,3 p=0,21
Наличие сосудистых осложнений	19,4 p=0,15	11,3 p=0,64	24,3 p=0,18	5,6 p=0,18	23,7 p=0,05
Компенсация диабета	3,6 p=0,32	11,3 p=0,73	24,4 p=0,05	13,6 p=0,35	15,0 p=0,66
Потребность в инсулине	13,3 p=0,01	6,6 p=0,66	24,2 p=0,17	12,8 p=0,17	9,0 p=0,98
ИМТ	2,4 p=0,09	7,0 p=0,75	7,5 p=0,68	14,6 p=0,68	7,0 p=0,88
Полиморфизм гена ACE	29,9 p=0,03	6,6 p=0,91	7,5 p=0,91	7,2 p=0,91	8,5 p=0,96
Полиморфизм гена AGT	2,0 p=0,42	7,5 p=0,42	2,0 p=0,50	4,2 p=0,50	8,5 p=0,51
Контролируемые факторы	41,3	25,6	31,4	25,0	35,3
Неконтролируемые факторы	58,7	74,4	68,6	75,0	64,7

Примечание: p – достоверность влияния фактора.

В результате проведенного дисперсионного анализа было выявлено, что активность АПФ зависела в большей степени от длительности заболевания (28,3%) и от наличия сосудистых осложнений (23,7%). Следует заметить, что только наличие сосудистых осложнений СД 1 типа в увеличении активности АПФ было значимым. Вклад контролируемых факторов при этом составил 35,3% (рис. 12).

Таким образом, в результате проведенного анализа был исследован характер изменений состояния протеолиза при СД 1 типа у детей и выявлен ряд факторов, которые, несомненно, играют важную роль при развитии сосудистых осложнений данного заболевания. Для КК большое значение имели продолжительность диабета и потребность в инсулине, для α_1 -ПИ – компенсация заболевания, для АПФ – наличие сосудистых осложнений.

В результате проведенного статистического анализа были подтверждены закономерности изменения показателей протеолиза при сахарном диабете 1 типа у детей. Активация калликреин-кининовой системы за счет наличия тесных связей между показателями способствует нарушению состояния протеолиза, которое усугубляется при развитии диабетической нефропатии. Глюкоза является основным патогенетическим фактором развития дисбаланса между вазоактивными факторами. Инсулин и каптоприл оказывают системное действие на состояние протеолиза и препятствуют развитию микроангиопатий. Подтверждено влияние ранее выявленных факторов на показатели протеолиза.

3.6. Диагностическая ценность определения активности ангиотензин-превращающего фермента и α_1 -протеиназного ингибитора при диабетической нефропатии у детей

Прогрессирующий рост заболеваемости и сосудистых осложнений среди больных сахарным диабетом способствует поиску адекватных методов их своевременной диагностики. В результате проведенного исследования было выявлено повышение активности АПФ сыворотки крови при диабетической нефропатии, что сопровождалось снижением активности α_1 -ПИ плазмы крови. Известно, что точная диагностика диабетической нефропатии без клинических проявлений заболевания включает исследование уровня альбумина в моче больных. Следующий этап исследования заключался в определении диагностической ценности определения активности АПФ и α_1 -ПИ при развитии диабетической нефропатии (ДН) у 119 детей. ДН диагностировали при содержании альбумина в моче более 30 мг в сутки. Повышенная активность АПФ составляла более 50 мкмоль/мин·л [Голиков П.П., 1998], активность α_1 -ПИ менее 27 ИЕ/мл характеризовали как сниженную [Веремеенко М.П., 1985]. Исследуемые методы были оценены с помощью определения их чувствительности и специфичности [Флетчер Р. и др., 1998; Платонов А.Е., 2000; Власов В.В., 2001].

На основании полученных результатов была сформирована четырехпольная таблица. Каждая таблица включала в себя 4 возможных результата исследования: 2 истинных (истинноположительный и истинноотрицательный) и 2 ложных (ложноположительный и ложноотрицательный).

Из 119 детей диабетическая нефропатия по тесту микроальбуминурии была установлена у 26 больных. Следовательно, преваленс диабетической нефропатии составил 22%. В табл 44 представлены результаты диагностики нефропатии по активности АПФ. Истинноположительные (ИП) результаты были у 17 детей, истинноотрицательные (ИО) – у 76 больных, ложноположительные (ЛП) – у 17 и ложноотрицательные (ЛО) – у 9 больных.

Таблица 44

Исследование активности ангиотензин-превращающего фермента при диагностике диабетической нефропатии у детей

Группы	Активность ангиотензин-превращающего фермента	
	Более 50 мкмоль/мин·л	Менее 50 мкмоль/мин·л
Больные с нефропатией	17 истинноположительные (ИП)	9 ложноотрицательные (ЛО)
Больные без нефропатии	17 ложноположительные (ЛП)	76 истинноотрицательные (ИО)

Результаты исследования активности α_1 -ПИ у больных СД 1 типа с нефропатией и без осложнений приведены в табл 45. Активность α_1 -ПИ была снижена у 17 детей с нефропатией (ИП) и у 34 больных без нефропатии (ЛП). ИО результаты были выявлены у 60 больных СД 1 типа, ЛО – у 9 больных с нефропатией.

Таблица 45

Исследование активности α_1 -протеиназного ингибитора при диагностике диабетической нефропатии у детей

Группы	Активность α_1 -протеиназного ингибитора	
	менее 27 ИЕ/мл	Более 27 ИЕ/мл
Больные с нефропатией	17 истинноположительные (ИП)	9 ложноотрицательные (ЛО)
Больные без нефропатии	34 ложноположительные (ЛП)	60 истинноотрицательные (ИО)

В табл. 46 приведены характеристики тестов определения активности АПФ и α_1 -ПИ при диабетической нефропатии у детей. В результате анализа были определены чувствительность, специфичность и прогностическая ценность для

каждого метода. Чувствительность – это доля лиц с положительным результатом теста в популяции с изучаемым заболеванием. Под специфичностью теста понимают долю лиц с отрицательным результатом теста в популяции без изучаемой болезни. Прогностическая ценность положительного результата теста определяется как вероятность заболевания при положительном результате теста; прогностическая ценность отрицательного результата – вероятность отсутствия заболевания при отрицательном результате теста [Флетчер Р. и др., 1998].

Таблица 46

Диагностическая ценность определения активности ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) и α_1 -протеиназного ингибитора (α_1 -ПИ) плазмы крови при диабетической нефропатии

Характеристика	Определение активности АПФ	Определение активности α_1-ПИ
Чувствительность, %	65,	65
Специфичность, %	70,0	63,0
Прогностичность положительного результата, %	50,0	33,0
Прогностичность отрицательного результата, %	89,0	86,0

Чувствительность методов определения активности АПФ и α_1 -ПИ составила 65%. Специфичность метода определения активности АПФ была выше, чем для α_1 -ПИ. Следует отметить высокую прогностичность отрицательного результата, что составляет 89 и 86%, соответственно, для обоих методов. Результаты изучения чувствительности и прогностичности подтверждают мультифакториальный генез ДН и дают возможность использовать изучаемые показатели для формирования групп риска развития данного осложнения. Обращает внимание тот факт, что при отсутствии сосудистых осложнений у 29 детей из общей группы больных СД 1 типа обнаружена высокая активность АПФ (более 50 мкмоль/мин·л). В дальнейшем, у 3 (10%) детей в этой группе сформировалась ДН (стадия микроальбуминурии) в течение года. В другой группе (22 больных) без осложнений выявлена низкая активность α_1 -ПИ (10-26 ИЕ/мл). В течение года у 15% (3 человека) больных с низкой активностью α_1 -ПИ также обнаружена микроальбуминурия. Очевидно, что высокая активность АПФ и низкая активность

α_1 -ПИ имеют значение для прогнозирования развития нефропатии у больных СД 1 типа.

Таким образом, ценность применения методов определения активности АПФ и α_1 -ПИ для диагностики диабетической нефропатии у больных СД 1 типа достаточно высока. Определение активности АПФ и α_1 -ПИ следует рекомендовать для оценки тяжести и прогноза нефропатии.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сахарный диабет 1 типа (СД 1) является мультифакториальным заболеванием, которое характеризуется специфическим аутоиммунным повреждением β -клеток поджелудочной железы, гипергликемией и хроническим воспалительным поражением сосудов [Klein R. et al., 1992; Комитет экспертов ВОЗ по сахарному диабету, 1995; Dawson K. et al., 1998]. Дети составляют 10-12% от всех больных с нарушениями углеводного обмена, основная особенность диабета у этой категории больных является острое манифестное начало заболевания [Дедов И.И. и др., 1997; Балаболкин М.И., 2000]. В отличие от сахарного диабета 2 типа, распространенного среди взрослых, у детей заболевание протекает наиболее тяжело с ранним поражением сосудов микроциркуляторного русла. К основным осложнениям диабета у детей относят ретино- и нефропатии [Bach J.F., 1986; Ефимов А.С., 1989; Atkinson M.A. et al., 1994; Becker J., 1996; Laakso M., 1997; Шестакова М.В., 1999, 2002]. Ранним признаком развития нефропатии является микроальбуминурия, которая без адекватного лечения переходит в стадию протеинурии, а затем - хронической почечной недостаточности (ХПН). Единого мнения о патогенезе микроангиопатий при СД 1 нет. Значение в развитии осложнений СД 1 типа имеют процессы перекисного окисления липидов, нарушения липидного обмена, активация полиолового пути обмена глюкозы и др. [Галенок В.А. и др., 1985; Серкова В.К., 1986; Ефимов А.С., 1989; Климов А.Н., 1995; Бондарь И.А. и др., 2000; Кондратьева Е.И. и др., 2000; Дедов И.И., 2002].

В настоящее время большое внимание уделяется изучению наследования сахарного диабета. Активно ведется поиск генетических маркеров сосудистых поражений при СД 1, таких как гены ангиотензин-превращающего фермента, ангиотензиногена, NO-синтазы и рецептора ангиотензина II [Кураева Т.Л., 1991, 1997; Ringel G. et al., 1997; Дедов И.И., 1998; Кондратьев Я.Ю. и др., 1998; Freire M.V. et al., 1998; Park J.K. et al., 1999; Чистяков Д.А. и др., 1999; Балаболкин М.И., 2000]. Для реализации генетической предрасположенности к развитию ангиопатий необходимо участие внешних факторов, таких как повышенная концентрация глюкозы, нарушения липидного обмена, продолжительности диабета и др.. Ведущую роль в патогенезе микроангиопатий отводят, в первую очередь, хронической гипергликемии, которая является следствием абсолютной

инсулиновой недостаточности [Stenvinkel P. et al., 1997; Freire M.B. et al., 1998; Karamanos B., et al., 2001].

При сосудистой патологии большое значение уделяется состоянию калликреин-кининовой (ККС) и ренин-ангиотензиновой (РАС) системам. Обе системы взаимосвязаны между собой посредством калликреина и ангиотензин-превращающего фермента [Vora J.P. et al., 1997; Katori M. et al., 1998; Nordt T.K. et al., 2000; Bader M., 2001; Martin-Casano M.E. et al., 2002]. Калликреин (КК), катализирующий образование брадикинина, вызывает дилатацию сосудов [Nolly H. et al., 1997; Zhang X. et al., 1997; Гомазков О.А., 2000]. Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ), образующий ангиотензин II, обладает вазоконстрикторным действием и является основным маркером повреждения эндотелия [The Eurodiab Ace Study Group and the Eurodiab Ace Substudy 2 Study Group, 1998; Manley H.J., 2000; Альтшулер Б.Ю. и др., 2000; Елисеева Ю.Е., 2001; Яровая Г.Я., 2001]. При лечении диабетической нефропатии в клинической практике используют ингибиторы АПФ [The Eurodiab Ace Study Group and the Eurodiab Ace Substudy 2 Study Group, 1998; Remme W.J., 1999; Kshirsagar A.V., 2000; Manley H.J., 2000]. Активность протеолитических систем при СД 1 типа, зависимость их от длительности заболевания и наличия осложнений исследована недостаточно. Одной из актуальных проблем исследования механизмов развития СД 1 типа является регуляция протеолиза. Влияние глюкозы и инсулина, основных патогенетических факторов развития сахарного диабета, на состояние протеолиза не изучено. Для каптоприла установлено ингибирующее действие на АПФ сыворотки крови, однако неизвестно влияет ли он на калликреин-кининовую систему.

В связи с изложенным, цель настоящего исследования состояла в изучении роли показателей протеолиза в развитие сахарного диабета 1 типа и его осложнений с учетом наследственных и средовых факторов.

С учетом поставленной цели было обследовано 119 детей с СД 1 типа. Выделены группы больных в зависимости от длительности заболевания, характера осложнений, потребности в инсулине, уровня гликозилированного гемоглобина, а также наличия семейных случаев сахарного диабета и сердечно-сосудистых заболеваний. Контрольную группу составили 32 практически здоровых ребенка. У

всех обследованных в плазме и сыворотке крови определяли активность калликреина, калликреиногена, ангиотензин-превращающего фермента, α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина.

Результаты исследования показали, что у больных СД 1 типа имеются нарушения состояния протеолиза. В общей группе больных обнаружено увеличение активности КК на фоне снижения активности его предшественника – ККГ (табл. 4). При впервые выявленном диабете активация КК более выражена (табл. 5, рис. 1). Аналогичные данные стимуляции ККС при развитии инсулита на ранних стадиях СД 1 типа получены Zucollo A et al. (1999). Калликреин, как известно, снижает тонус сосудов, расширяет их просвет. Возможно, с этим эффектом связано повышение скорости клубочковой фильтрации и наличие полиурии, характерных для ранней стадии патогенеза сахарного диабета [Ефимов А.С., 1989; Ракова Н.Г., 1994; Воронцов А.В. и др., 1997].

Повышенная активность КК сохраняется в течение первых 5 лет заболевания. С увеличением длительности диабета активность КК и ККГ снижается, но остается выше контрольных значений (табл. 5, рис. 1). Известно, что длительность заболевания более 5 лет является показанием для исследования уровня альбумина в моче с целью диагностики доклинической стадии ДН и проведения профилактических мероприятий. Нами установлено, что в группах больных с длительностью заболевания более 10 лет, при развитии ретинопатии и нефропатии активность КК снижена, в еще большей степени, чем при длительности более 5 лет.

Наиболее тяжелым осложнением СД 1 типа является диабетическая нефропатия, которая в соответствии с классификацией С.Е. Mogensen (1983) имеет 5 стадий в зависимости от выраженности нарушений функций почек. Активность КК также зависит от стадии нефропатии: самая низкая активность КК выявлена у детей с протеинурией (табл. 6, рис. 2). Кининовая система находится «на старте» всех протеиназ плазмы крови, ее активация запускает каскады свертывания крови, фибринолиза, комплимента, ренин-ангиотензиновой систем [Пасхина Т.С., 1976; Суханова Г.А., 1992; Vora J.P. et al., 1997; Adam A. et al., 2000; Duncan A.M. et al., 2000; Яровая Г.А., 2001]. Аналогичные данные получены в нашем исследовании на ранних этапах развития СД 1 типа. Снижение активности КК и ККГ, наблюдаемое с увеличением длительности заболевания и при нефропатии характерно для

истощения кининовой системы [Ванюрихина Л.Т. и др., 1989; Суровкина М.П., 1995], что, возможно, приводит к развитию микроангиопатий при СД 1 типа.

При исследовании показателей кининогенеза не выявлено их зависимости от дозы инсулина и степени компенсации диабета (табл. 7, 8). Однако при увеличении дозы экзогенно вводимого инсулина имеется тенденция к повышению активности КК и ККГ плазмы крови больных СД 1 типа (табл. 7). Эти данные подтверждены в условиях *in vitro*, в которых добавление инсулина к плазме крови больных СД 1 типа увеличивает активность КК и ККГ (табл. 28, рис. 8).

Наличие семейных случаев СД 1 типа и СД 2 типа является фактором риска развития диабетических ретинопатии и нефропатии у детей [Кондратьева Е.И., 2001]. При анализе структуры сосудистых осложнений СД 1 типа установлено увеличение частоты встречаемости ретинопатии и нефропатии у больных с наличием семейных случаев сахарного диабета (рис. 3). Однако показатели протеолиза не зависят от наличия заболевания у родственников (табл. 9). Наличие семейных случаев сердечно-сосудистых заболеваний также не влияет на активность КК и ККГ (табл. 10). Отсутствие связи показателей протеолиза с наследственностью можно объяснить тем, что не всегда генетические дефекты реализуются фенотипически [Shahid A. et al., 1996].

АПФ является важным гемодинамическим фактором, способствующим поддержанию артериального давления [Fujisawa T. et al., 1998; Дедов И.И., 1999; Чистяков Д.А. и др., 2000; Елисеева Ю.Е., 2001]. Активность АПФ в общей группе больных СД 1 типа была повышена, что однако не было статистически значимым (табл. 11). При индивидуальном анализе у 25% больных без осложнений было обнаружено увеличение активности АПФ до 80 мкмоль/мин·л, а 24% детей имели показатели ниже референтных значений (менее 20 мкмоль/мин·л). При развитии ДН уже на доклинической стадии (микроальбуминурия) и в большей степени на стадии протеинурии (клиническая стадия) активность АПФ достоверно повышена. Данный факт может иметь значение при прогнозировании развития осложнений заболевания еще до появления микроальбуминурии.

Активность АПФ существенно возрастает у больных с увеличением длительности заболевания. Повышение активности АПФ обнаружено при продолжительности заболевания более 3 лет. Этот факт может быть использован

при проведении профилактических мероприятий по развитию микроангиопатий. Наиболее высокие показатели наблюдались в группе детей с длительностью диабета более 10 лет (табл. 12, рис. 4). Повышение активности АПФ связано с активацией РАС [Nolly H.R. et al., 1997; Коломиец В.В. и др. 2002] и угнетением ККС [Суровкина М.С., 1995; Park J.K. et al., 1999; Remme W.J., 1999; Яровая Г.А. и др., 2001].

На основании полученных данных можно заключить, что при прогрессировании заболевания нарушения протеолиза усугубляются, что сопровождается развитием нефропатии. При исследовании активности АПФ сыворотки крови у больных с сосудистыми осложнениями наиболее высокая активность фермента, как и предполагалось, обнаружена при поражении почек (табл. 13, рис. 5). Выявлена зависимость активности АПФ от тяжести нефропатии: у больных на стадии протеинурии активность фермента выше, чем при микроальбуминурии.

Однако в группе с ДН у 25% больных активность АПФ находится в пределах нормы. У данной категории детей, несмотря на терапию ингибиторами АПФ, наблюдается прогрессирование осложнения. По-видимому, назначение ингибиторов АПФ, к которым относятся каптоприл, эналаприл, лизиноприл, рамиприл, перидонприл и др. наиболее эффективно для больных с повышенными значениями активности фермента (50 мкмоль/мин·л и более).

Имеются сведения, что к развитию дисбаланса между вазоактивными факторами приводит гипергликемия [Шестакова М.В., 1997, 2001, 2002; Mc Lennan S.V. et al., 2002; Микаелян Н.П. и др., 2002]. Возможно, что одной из причин повышения активности АПФ является увеличение содержания глюкозы и неферментативное гликозилирование белков. Активность АПФ сыворотки крови при СД 1 типа также повышается у больных с неудовлетворительной компенсацией диабета (с уровнем гликозилированного гемоглобина более 15%) (табл. 15). Как показали результаты исследования в условиях *in vitro*, глюкоза является одним из основных факторов повышения активности АПФ и КК (табл. 30, рис. 9).

При исследовании активности АПФ у больных с разной потребностью в инсулине изменений активности фермента не обнаружено. Инсулин, добавленный

к плазме крови больных СД 1 типа в условиях *in vitro*, имеет значительно меньшее влияние на АПФ, чем глюкоза (табл. 28, рис. 8).

Большое значение для развития диабетической нефропатии при СД 1 типа у детей имеет выявление взаимосвязи ККС и РАС. В этом плане, существенным является определение отношения активности КК к АПФ сыворотки крови. На ранних этапах заболевания значения коэффициента КК/АПФ наиболее высоки, что связано с увеличением активности калликреина (табл. 17). При длительности заболевания более 5 лет и наличии нефропатии происходит его снижение за счет увеличения активности АПФ (табл. 18).

Таким образом, нарушение баланса между вазоактивными факторами при СД 1 типа сопровождает все этапы патогенеза СД 1 типа. На ранних стадиях и в дебюте заболевания происходит активация ККС, в более поздние периоды на первый план выступает повышение активности АПФ. Коэффициент КК/АПФ характеризует нарушения баланса ККС и РАС в ранние и отдаленные сроки заболевания, а также при осложнениях СД 1 типа. Использование данного коэффициента позволит прогнозировать развитие ретино- и нефропатии при СД 1 типа.

В регуляции протеолиза принимают участие специфические белки-ингибиторы. α_1 -ПИ связывает до 90% всех сериновых протеиназ плазмы человека. α_2 -МГ обладает высоким сродством к калликреину и трипсину [Проценко А.В. 1984; Котова Т.С. и др., 1986]. α_2 -МГ не является белком острой фазы, увеличение его активности наблюдается при сахарном диабете 2 типа [Веремеенко К.Н. и др., 1969; Яровая Г.А. и др. 1994], при этом активность α_1 -ПИ находится в пределах нормы или снижена [Карнаух В.И., 1983, 1989; Bristow C.L. et al., 1998].

В результате наших исследований также установлено снижение активности α_1 -ПИ плазмы крови больных СД 1 типа (табл. 20). Следствием дефицита ингибиторов является чрезмерная активация протеолиза, что может приводить к прогрессированию сосудистых осложнений. При исследовании активности ингибиторов плазмы крови больных с разной длительностью и осложнениями диабета обнаружена повышенная активность α_2 -МГ у детей с впервые выявленным диабетом (табл. 21, рис. 6). Очевидно, высокая активность α_2 -МГ на ранних этапах СД 1 типа является компенсаторной реакцией и ограничивает активацию КК и

других протеолитических ферментов. С увеличением длительности заболевания и при развитии ретинопатии и нефропатии наблюдается снижение активности обоих ингибиторов (рис. 7). Низкая активность ингибиторов, сопровождающая развитие сосудистых осложнений, свидетельствует о неблагоприятном течении заболевания. Дефицит ингибиторов, очевидно, приобретенного характера, усиливает неконтролируемый протеолиз, создает дополнительные условия для развития микроангиопатий. Снижение ингибиторной активности α_1 -ПИ и α_2 -МГ может быть использовано при прогнозировании развития сосудистых осложнений при СД 1 типа.

Дозы инсулинотерапии по-разному влияют на активность α_1 -ПИ. Увеличение потребности в инсулине более 0,7 Ед/кг приводит к увеличению активности α_1 -ПИ плазмы крови больных (табл 22). Выявленная закономерность согласуется с результатами, полученными в условиях *in vitro*, в которых добавление инсулина к плазме крови больных увеличивает активность α_1 -ПИ (табл. 28, рис. 8).

При исследовании связи активности ингибиторов протеолиза и содержания HbA_{1c} установлено, что при повышении уровня гликозилированного гемоглобина наблюдается снижение активности α_1 -ПИ и α_2 -МГ. Самая низкая активность α_1 -ПИ и α_2 -МГ обнаружена при содержании HbA_{1c} более 15% (табл 23). Известно, что гликозилированные белки не способны выполнять свои функции. Вероятно, низкую активность α_1 -ПИ и α_2 -МГ у больных с высоким содержанием HbA_{1c} можно объяснить изменением структуры ингибиторов за счет их гликозилирования, или перекисной модификации [Бондарь И.А., 1997; 2000; Дедов И.И., 2000; Балаболкин М.И., 2001].

Таким образом, прогрессирование СД 1 типа и развитие сосудистых осложнений связано с нарушением протеолиза, что приводит к дисбалансу вазоактивных факторов. Изменения изучаемых показателей зависят от длительности заболевания и наличия ретино- и нефропатии. Наиболее выраженные нарушения состояния протеолитических систем выявлены при нарушении функции почек. Следует заметить, что степень тяжести нефропатии также имеет значение: выраженные нарушения показателей протеолиза наблюдаются у детей с нефропатией на стадии протеинурии. Особого внимания заслуживает факт влияния

длительной гипергликемии на изменение активности АПФ и ингибиторов плазмы крови (табл. 15, 23).

Для решения вопроса о вкладе генетических факторов в нарушения состояния систем протеолиза исследовано значение I/D полиморфизма гена ACE и T174M рестрикционного полиморфизма гена AGT. Изучение роли этих генетических маркеров является перспективным для оценки предрасположенности к нарушению функции почек. Установлено, что имеется ассоциация D аллеля гена ACE с развитием нефропатии у детей с СД 1 типа [Кондратьев Я.Ю. 1998; Barnas U. et al., 1997; Freire M.V. et al., 1998; Чистяков Д.А и др., 1999; Кондратьева Е.И., 2001]. Выраженность нарушений липидного обмена больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями и с сахарным диабетом также зависит от I/D полиморфизма гена ACE [Степанов В.А., 1998; Кондратьева Е.И. и др., 2001].

При анализе использовали данные 70 больных с II, ID и DD генотипами I/D полиморфизма гена ACE. Учитывая связь АПФ с другими показателями протеолиза, также была исследована их зависимость от I/D полиморфизма гена ACE. В общей группе больных не обнаружено изменений активности КК, ККГ, α_1 -ПИ и α_2 -МГ плазмы крови от полиморфизма гена ACE (табл. 24). Активность АПФ, в отличие от остальных показателей, связана с I/D полиморфизмом гена ACE. Как предполагалось, высокая активность АПФ обнаружена у больных с DD генотипом по сравнению с II генотипом гена ACE. Среди 70 обследованных DD генотип выявлен у 16 детей (23%). Вероятно, увеличение активности АПФ связано с наличием D аллеля гена ACE. Таким образом, больные с DD генотипом, обладающие более высокой активностью АПФ, предрасположены к раннему развитию сосудистых осложнений, в первую очередь диабетической нефропатии.

Наличие M аллеля T174M рестрикционного полиморфизма гена AGT многие авторы называют фактором быстрого прогрессирования гипертензии при сахарном диабете 2 типа [Tarnow L. et al., 2000; Шестакова М.В. и др., 2002]. T174M рестрикционный полиморфизм гена AGT изучен у 61 больного СД 1 типа. Влияние этого гена на активность показателей протеолиза не обнаружено (табл. 25). Возможно, отсутствие зависимости связано с низкой встречаемостью генотипа MM в популяции (в нашем исследовании – 1 ребенок) и редким повышением артериального давления у детей при СД 1 типа. Непостоянное повышение

артериального давления имели 11 детей из 119 больных (9%). Эти пациенты составляют группу больных с ДН на стадии протеинурии.

Значительный интерес представляют результаты изучения активности ферментов кининогенеза, АПФ, α_1 -ПИ и α_2 -МГ у больных с II, ID и DD генотипами I/D полиморфизма гена ACE при развитии диабетической нефропатии. На ранних этапах заболевания, в отсутствие клинических признаков патологии почек, выявлена тенденция к повышению активности АПФ у больных с генотипом DD. Диабетическая нефропатия характеризуется повышением активности фермента у больных СД 1 типа не только с DD генотипом, но и при наличии II и ID генотипов гена ACE (табл. 26). Кроме того, у детей с DD генотипом изучаемого гена ACE наблюдается снижение активности КК и ККГ, что, возможно, обусловлено активацией всех систем протеолиза, отмеченного при прогрессировании заболевания. Полученные данные свидетельствуют о существенном влиянии D аллеля гена ACE в патогенезе сосудистых осложнений при СД 1 типа. Это позволяет использовать данные генетического анализа и определения активности АПФ для прогнозирования течения заболевания. Прогноз развития микроангиопатий связан с выявлением D аллеля.

При исследовании активности ингибиторов выявлено снижение активности α_1 -ПИ у больных с DD генотипом гена ACE (табл. 25). Этот факт можно объяснить активацией протеиназ и связанное с ними угнетение ингибиторного звена системы протеолиза. Известно, что недостаточная активность α_1 -ПИ приводит к нарушению баланса вазоактивных факторов [Vora J.P. et al., 1997; Margolius H.S., 1998; Bader M., 2001] и развитию сосудистых осложнений СД 1 типа. Низкая активность α_1 -ПИ, связанная с его наследственным дефицитом, свидетельствует о наиболее неблагоприятном течении заболевания.

Для оценки результатов исследования использовали корреляционный, регрессионный и дисперсионные методы анализа данных. В результате корреляционного анализа доказано наличие статистических связей между активностью ферментов кининогенеза и ингибиторов протеолиза при развитии СД 1 типа у детей (табл. 37). С увеличением длительности заболевания, развитием ДР и ДН происходит усиление связей и появление новых за счет активации PАС (табл. 38, 39). На основании результатов корреляционного анализа были выделены

наиболее значимые показатели для нефропатии, к которым относятся активность АПФ и α_1 -ПИ.

Задача регрессионного анализа, в отличие от корреляционного, представляет собой изучение зависимости одного показателя от других. С этой целью изучена связь АПФ с другими показателями протеолиза (табл. 40, 41). В общей группе больных зависимости АПФ от других показателей протеолиза не выявлено. Однако при нефропатии появляется значимая отрицательная связь между активностью АПФ и α_1 -ПИ. Вклад показателей протеолиза в развитие нефропатии, в отличие от общей группы больных, составляет 48%. Полученные результаты позволяют выделить АПФ и α_1 -ПИ в качестве существенных показателей прогрессирования патологии почек при СД 1 типа у детей.

Цель многофакторного дисперсионного анализа заключается в изучении влияния основных факторов развития сахарного диабета и его осложнений, таких как I/D полиморфизм гена ACE, T174M рестрикционный полиморфизм гена AGT, компенсация заболевания, потребность в инсулине на показатели протеолиза и длительность диабета (табл. 43, рис. 12). В соответствии с результатами дисперсионного анализа КК зависит от длительности заболевания, потребности в инсулине. Активность α_1 -ПИ согласно полученным данным связана с уровнем гликозилированного гемоглобина и может быть использована как дополнительный критерий компенсации заболевания. Активность АПФ, в большей степени, чем другие показатели, связана с наличием сосудистых осложнений.

Высокая активность КК при впервые выявленном заболевании свидетельствует о мощной компенсаторно-приспособительной реакции, затрагивающей все процессы протеолиза. По-видимому, КК принадлежит иницилирующая роль в развитии нарушений протеолитических систем с последующим угнетением ингибиторов и повышением активности АПФ при СД 1 типа.

Таким образом, при изучении показателей протеолиза при СД 1 типа выявлено, что КК является ключевым фактором развития дисбаланса протеолитических систем при СД 1 типа. Большое значение для показателей протеолиза имеют длительность заболевания, наличие осложнений, степень компенсации диабета. Прогрессирование заболевания и развитие сосудистых

осложнений сопровождается более выраженными нарушениями в системах протеолиза.

Основным патогенетическим звеном в развитии СД 1 типа, как известно, являются нарушения углеводного обмена, в основе которых лежит абсолютная инсулиновая недостаточность [Stenvinkel P. et al., 1997; Дедов И.И., 1998, 2000; Tarnow L. et al., 2000; Gopaul N.K. et al., 2001; Hogeboom van Buggenum I. M. et al., 2002; Балаболкин М.И., 2002;]. Длительная гипергликемия приводит нарушению баланса гемодинамических факторов. Однако влияние инсулина и глюкозы на активность процессов протеолиза не исследовано. Каптоприл, один из известных ингибиторов АПФ, успешно используется при лечении диабетической нефропатии [Подзолков В.И., 1996; Könen C. et al., 2000; Haider A. et al., 2000], его действие на другие системы протеолиза также не изучено.

Влияние инсулина, глюкозы и каптоприла на показатели протеолиза в условиях *in vitro* оценивали при использовании доз инсулина и глюкозы, соответствующих низкому, нормальному и повышенному их содержанию в крови [Кравец Е.Б. и др., 1989]. Концентрация каптоприла рассчитана, исходя из его минимальной, поддерживающей и максимальной дозы для детей [Машковский М.Д., 1998].

Протеолитические ферменты плазмы крови здоровых детей контролируются несколькими механизмами: наличием предшественников ферментов, ингибиторов, других факторов регуляции, ограничивающих активацию протеолиза. При добавлении инсулина, глюкозы и каптоприла к плазме и сыворотки крови практически здоровых детей существенных изменений активности показателей протеолиза не выявлено (табл. 27, 30, 33; рис. 8, 9, 10). В плазме крови больных СД 1 типа состояние равновесия нарушено, поэтому инсулин, глюкоза и каптоприл при добавлении к плазме крови в условиях *in vitro*, дают эффекты, отличающиеся друг от друга.

Инсулин, добавленный к плазме крови больных в дозах от 7,5 до 15 мкЕд/мл, соответствующих низкому и нормальному его содержанию в крови, увеличивает активность КК, что наиболее выражено в плазме больных диабетической нефропатией (табл. 29, рис. 8). Активность ККГ при добавлении инсулина также повышается под влиянием инсулина. Возможно, инсулин, являясь пептидным

гормоном, способен стимулировать кининогеназную активность. Кроме того, известно, что брадикинин обладает инсулиноподобной активностью [Duncan A.M. 2000; Яровая Г.А., 2001]. Очевидно, существует связь между инсулином и кининовой системой, что приводит к активации кининогеназа при добавлении гормона к плазме крови больных.

Роль инсулина не ограничивается его влиянием на углеводный обмен. При добавлении инсулина к плазме крови больных наблюдается увеличение активности АПФ. Активация КК, АПФ при действии инсулина, скорее всего, связана со способностью инсулина, переводить системы протеолиза в, так называемое, “активное состояние”, которое О.А. Гомазков (1993) называет «рабочим». Известно, что инсулин *in vivo* способен увеличивать просвет сосудов [Nahser P.J. et al., 1995; Sobrevia L. et al., 1997], однако механизм этого действия неизвестен. Учитывая полученные данные, можно предположить, что вазодилатирующий эффект инсулина связан с повышением активности КК, обладающего аналогичным действием.

Активность α_1 -ПИ повышается при добавлении инсулина в условиях *in vitro* (табл. 28, рис. 8). Значительные изменения активности ингибитора отмечены в плазме крови больных с нефропатией. Повышение активности α_1 -ПИ при добавлении инсулина происходит на фоне активации кининогеназа, что, вероятно, является компенсаторным механизмом восстановления равновесия между кининами и их ингибиторами (рис. 8).

Влияние глюкозы на протеолитические процессы также не изучено. Однако известно, что гликозилирование белков существенно изменяет их функции. Добавление глюкозы к плазме крови больных СД 1 типа приводит к активации КК и снижению активности ККГ (рис. 9), что наиболее выражено в плазме крови больных диабетической нефропатией. Влияние повышенных концентраций глюкозы, возможно, связано с изменением физико-химических свойств среды в условиях гипергликемии, переходом неактивной формы ККГ в активный КК.

Глюкоза также повышает активность АПФ плазмы крови больных (табл. 31). Этот факт соответствует с данными о зависимости активности фермента от уровня HbA_{1c} (табл. 15). Активность АПФ больных СД 1 типа также повышена. На основании этого можно заключить, что избыток глюкозы приводит к повышению

активности АПФ, что в условиях *in vivo* способствует развитию гипертензии и нефропатии при СД 1 типа.

Каптоприл относится к наиболее известным ингибиторам АПФ [Преображенский Ц.В. и др., 2001]. В условиях *in vitro* активность АПФ при добавлении каптоприла к плазме крови больных СД 1 типа снижается (рис. 10). Влияние каптоприла на активность АПФ плазмы крови больных с диабетической нефропатией становится более выраженным. Этот эффект каптоприла связан с терапевтическим действием, направленным на предупреждение сосудистых осложнений и хронической почечной недостаточности. Добавление каптоприла к плазме крови больных СД 1 типа не влияет на активность ферментов кининогенеза (рис. 10), однако повышает активность КК в плазме крови больных диабетической нефропатией. Особый интерес представляет факт повышения активности α_1 -ПИ и α_2 -МГ в плазме крови больных под влиянием каптоприла. Вероятно, каптоприл, являясь ингибитором АПФ, обладает аналогичным действием на другие протеолитические ферменты.

По результатам однофакторного дисперсионного анализа представлена схема влияния инсулина, глюкозы и каптоприла на ферменты и ингибиторы протеолиза (рис. 11). Выявлено, что глюкоза в большей степени влияет на активность КК и АПФ. Инсулин оказывает значимое влияние на активность α_1 -ПИ. Каптоприл кроме ингибирующего действия на АПФ, изменяет активность α_1 -ПИ и α_2 -МГ. Очевидно, глюкоза является одним из важных факторов дисбаланса протеолитических систем при СД 1 типа. Инсулин и каптоприл, в основном, воздействуют на регуляторное звено протеолиза. В связи с этим становятся понятными их новые функции в лечении СД 1 типа и диабетической нефропатии: усиление контроля протеолиза, предупреждение сосудистых осложнений, связанных с действием КК и АПФ.

Определение диагностической ценности показателей протеолиза в характеристике СД 1 типа и ДН имеет не только теоретическое, но и практическое значение. На основании результатов регрессионного анализа наиболее значимыми показателями при нефропатии являются АПФ и α_1 -ПИ. Высокая активность ангиотензин-превращающего фермента относится к достаточно специфичным признакам (70%) диабетической нефропатии. Повышение активности этого

фермента у пациента еще до стадии микроальбуминурии позволяет предположить развитие ДН. Дефицит α_1 -протеиназного ингибитора плазмы крови имеет значение для выявления предрасположенности к активации протеолиза и развитию необратимых изменений, связанных с ДН. Прогностичность отрицательного результата (89%) позволяет дифференцировать больных, имеющих высокую и низкую активность показателей с наличием или отсутствием нефропатии, соответственно (табл. 46). Результаты изучения чувствительности и прогностичности подтверждают мультифакториальный генез нефропатии и дают возможность использовать изучаемые показатели для формирования групп риска развития данного осложнения. Изучение динамики показателей протеолиза у больных СД 1 типа без осложнений в течение года, выявило признаки стадии микроальбуминурии при высоких значениях активности АПФ и низкой активности α_1 -ПИ, что доказывает их значение как показателей риска нарушений функции почек.

Дисбаланс вазоактивных факторов находится в основе развития эндотелиальной дисфункции [Шестакова М.В. и др., 1995; Drexler H. et al., 1998; Repine C.J., 1999; Perticone F. et al., 1999; Беленков Ю.Н., 2000; Бондарь И.А., 2000; Коломоец Н.М., 2001]. Активация РАС, с усилением чувствительности эндотелия к ангиотензину II, способствует прогрессированию сосудистых осложнений при сахарном диабете 1 типа [Дедов И.И. и др., 2000]. Результаты исследования включены в схему патогенеза ДН с участием КК и РАС (рис. 13). Мы полагаем, что увеличение активности КК происходит на ранних этапах развития сахарного диабета. Известно, что под влиянием гипергликемии тонус приносящей артериолы почечного клубочка снижается, она «зияет» [Шестакова М.В., 2000], а стимуляция ККС приводит к еще большему расширению ее просвета. Это способствует усилению образования первичной мочи и полиурии (1 и 2 стадии ДН по С.Е. Mogensen (1983)). В более поздние сроки заболевания с развитием нефропатии (стадии микроальбуминурии и протеинурии: 3 и 4 стадии по С. Mogensen) повышается активность АПФ сыворотки крови, накапливается ангиотензин II, в результате чего происходит сужение выносящего почечного сосуда [Bader M., 2001; Дедов И.И., 2002]. На этом же этапе наблюдается угнетение ККС на фоне выраженного дефицита ингибиторов протеолиза. Дисбаланс вазоактивных

факторов, приводящий к изменению тонуса выносящей и приносящей артериол почечного клубочка и повышению внутриклубочкового давления, ускоряет развитие диабетической нефропатии у детей.



2 Рис. 13. Роль калликреин-кининовой и ренин-ангиотензиновой систем в патогенезе нефропатии при сахарном диабете 1 типа

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что ККС и РАС участвуют в развитии диабетической нефропатии при сахарном диабете 1 типа у детей. При впервые выявленном диабете обнаружена высокая активность калликреина плазмы крови, который играет ключевую роль в нарушении состояния протеолиза. С увеличением длительности заболевания и при развитии сосудистых осложнений активность калликреина снижается, но возрастает активность ангиотензин-превращающего фермента сыворотки крови больных. Нарушения в системе протеолиза наиболее выражены при диабетической нефропатии на стадии микроальбуминурии и особенно при развитии протеинурии. Содержание гликозилированного гемоглобина является чувствительным критерием компенсации заболевания. При увеличении уровня HbA_{1c} более 15% отмечается наиболее высокая активность ангиотензин-превращающего фермента. Коэффициент КК/АПФ, характеризующий преобладание ККС или РАС на разных

этапах заболевания, может быть использован в клинической практике для прогнозирования течения заболевания.

Активность α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина плазмы крови больных СД 1 типа, контролирующей активацию протеолиза, снижается при увеличении длительности заболевания и при развитии сосудистых осложнений. Активность обоих ингибиторов значительно связана со степенью компенсации углеводного обмена. Снижение активности α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина выявлено у больных с содержанием HbA_{1c} более 15%.

Активность ангиотензин-превращающего фермента и α_1 -протеиназного ингибитора на основании данных регрессионного анализа являются наиболее ранними признаками развития нефропатии при сахарном диабете 1 типа. Определение этих показателей позволяет прогнозировать развитие осложнения еще при отсутствии клинических признаков патологии почек.

Высокая активность ангиотензин-превращающего фермента относится к достаточно специфичным и чувствительным признаком диабетической нефропатии. Выявлена зависимость активности ангиотензин-превращающего фермента от I/D полиморфизма гена ACE. Больные с DD генотипом гена ACE характеризуются низкой активностью калликреина и ингибиторов протеолиза при нефропатии.

Глюкоза представляет собой основной фактор развития дисбаланса протеолитических систем при сахарном диабете. Длительная гипергликемия приводит не только к изменению структуры основных ферментов протеолиза, но также способствует активации ангиотензин-превращающего фермента и калликреина плазмы крови. Инсулин и каптоприл имеют значительное влияние на регуляцию процессов протеолиза при СД 1 типа и препятствуют дальнейшему прогрессированию дисбаланса между основными вазоактивными факторами. Инсулин приводит к увеличению активности α_1 -ПИ и в меньшей степени к повышению активности ферментов протеолиза. Каптоприл значительно снижает активность ангиотензин-превращающего фермента и калликреина в плазме крови больных диабетической нефропатией и повышает активность α_1 -протеиназного ингибитора и α_2 -макроглобулина, что связано его ингибиторным действием на другие протеолитические ферменты.

ВЫВОДЫ

1. При сахарном диабете 1 типа происходит увеличение активности калликреина на фоне снижения активности калликреиногена, что приводит к активации систем протеолиза плазмы крови. Декомпенсация заболевания характеризуется низкой активностью α_1 -протеиназного ингибитора плазмы крови. Развитие диабетической ретино- и нефропатии сопровождается угнетением активности калликреина и α_1 -протеиназного ингибитора.
2. Диабетическая нефропатия характеризуется увеличением активности ангиотензин-превращающего фермента и снижением отношения КК/АПФ, отражающем состояние систем протеолиза. Применение ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента у больных с диабетической нефропатией способствует снижению активности ангиотензин-превращающего фермента.
3. Активность ферментов и ингибиторов протеолиза плазмы крови больных сахарным диабетом 1 типа зависит от I/D полиморфизма гена ангиотензин-превращающего фермента. DD-генотип характеризуется высокой активностью ангиотензин-превращающего фермента
4. Инсулин, глюкоза и каптоприл не влияют на показатели протеолиза плазмы крови здоровых детей в условиях *in vitro*. Добавление глюкозы к плазме крови больных сахарным диабетом 1 типа способствует увеличению активности калликреина и ангиотензин-превращающего фермента. Инсулин повышает активность α_2 -макроглобулина и α_1 -протеиназного ингибитора. Каптоприл снижает активность ангиотензин-превращающего фермента и стимулирует ингибиторную активность плазмы крови больных в условиях *in vitro*.
5. Вклад показателей протеолиза в развитие диабетической нефропатии составляет 48%. Определение активности ангиотензин-превращающего фермента и α_1 -протеиназного ингибитора плазмы крови рекомендуются в качестве критериев риска развития нефропатии при сахарном диабете 1 типа у детей.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В качестве дополнительных критериев риска развития микроангиопатий сахарного диабета рекомендуется определять активность ангиотензин-превращающего фермента и активность α_1 -протеиназного ингибитора плазмы крови больных.
2. Больные с DD генотипом гена ACE и высокой активностью ангиотензин-превращающего фермента нуждаются в более тщательном наблюдении врача диабетолога с целью раннего выявления нарушений в системе протеолиза.
3. При назначении ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента больным с диабетической нефропатией целесообразно определять исходную активность ангиотензин-превращающего фермента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Аксенов К.В. Связь полиморфизма генов ренин-ангиотензиновой системы с развитием диабетической нефропатии у больных сахарным диабетом 1 типа в Удмурдской республике / К.В. Аксенов, Д.А. Чистяков, В.В. Носиков // Второй российский диабетологический конгресс «Сахарный диабет и сердечно-сосудистые осложнения», тезисы докладов, Москва.- 2002.- С. 35-36.
2. Алиджанова Х.Г. Дисбаланс протеиназно-ингибиторной системы при семейной гиперхолестеринемии / Х.Г. Алиджанова, О.Г. Оглобина, В.В. Кухарчук // Кардиология.- 1989.- № 7.- С.115-116.
3. Альтшулер Б.Ю. Методические аспекты определения ангиотензинпревращающего фермента / Б.Ю. Альтшулер, А.П. Ройтман, В.В. Долгов // Клиническая лабораторная диагностика.- 2000.- №12.- С.10-14.
4. Альтшулер Б.Ю. Клинико-диагностическое значение определения сывороточной активности ангиотензинпревращающего фермента / Б.Ю. Альтшулер, А.П. Ройтман, В.В. Долгов // Клиническая лабораторная диагностика.- 2001.- №7.- С. 23-26.
5. Альтшулер Б.Ю. Влияние гиперлипидемии на сывороточную активность ангиотензинпревращающего фермента / Б.Ю. Альтшулер, А.П. Ройтман // Клиническая лабораторная диагностика. - 2001.- № 10.- С. 30.
6. Акбашева О.Е. Активность протеолитических ферментов и их ингибиторов в плазме крови мышей при опухолевом росте / Акбашева О.Е., Суханова Г.А. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.- 1999.- Т.128, №7.- С.69-72.
7. Анализ аллельного полиморфизма А- и В-цепи DQ-HLA у больных инсулинзависимым сахарным диабетом и в контрольной группе русской популяции / Т.Л. Кураева, Д.К. Гаврилов, В.В. Носиков и др. // Проблемы эндокринологии. – 1997. – № 2. – С.11-12.
8. Ангельский А.Н. Патохимия нефропатии при диабете / А.Н. Ангельский // Клиническая лабораторная диагностика.- 1995.- №5.- С. 45-50.
9. Базис В.Ю. Возрастные особенности содержания α_1 -ингибитора протеаз в сыворотке крови в зависимости от фенотипа / В.Ю. Базис, Д.В. Стакишайтис // Педиатрия.- 1987.- № 6.- С.104.

10. Балаболкин М.И. Эндокринология / М.И. Балаболкин.- М.:”Универсум паблишинг”,1998 – 392 с.
11. Балаболкин М.И. Диабетология / М.И. Балаболкин. - М.: «Медицина» – 2000. – 627 с.
12. Балаболкин М.И. Состояние и перспективы борьбы с сахарным диабетом / М.И. Балаболкин // Проблемы эндокринологии. – 1997. – Т.43, №6. – С.3-9.
13. Балаболкин М.И. Патогенез ангиопатий при сахарном диабете / М.И. Балаболкин, В.М. Клебанова // Сахарный диабет.-1999.- № 2- С. 2-6.
14. Балаболкин М.И. Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений диабета / М.И. Балаболкин, В.М. Клебанова // Проблемы эндокринологии .- 2001.- № 6.- С. 29-34.
15. Белковый спектр и состояние липидного бислоя мембран эритроцитов у детей с инсулинзависимым сахарным диабетом (по данным электрофореза в полиакриламидном геле и флюоресцентного анализа) / М.В. Колосова, В.В. Новицкий, Е.А. Степовая и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2000. – Т.129. –№ 3. – С.306-309.
16. Белова Л.А. Ангиотензин-образующие ферменты / Л.А. Белова // Биохимия.- 2002.- вып. 12.- С. 1589-1599.
17. Беленков Ю.Н. Эндотелиальная дисфункция при сердечной недостаточности: возможности терапии ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента / Ю.Н. Беленков, В.Ю. Мареев, Ф.Т. Агеев // Кардиология.- 2000.- № 5.- С.100-104.
18. Беленков Ю.Н. Ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента в лечении сердечно-сосудистых заболеваний (Квинаприл и эндотелиальная дисфункция) / Ю.Н. Беленков, В.Ю. Мареев, Ф.Т. Агеев. // <http://www.ossn.ru/kniga/ED-IV-1.htm>
19. Бондарь И.А. Окислительная модификация белков при диабетических микроангиопатиях / И.А. Бондарь, В.В. Климонтов, И.А. Поршенников // Сахарный диабет. – 2000. - №3. – С.9-12.
20. Бондарь И.А. Клинические, метаболические, иммунологические особенности формирования поздних осложнений сахарного диабета / И.А. Бондарь: Автореф. дисс... д-ра мед. наук. – Новосибирск, 1997. – 44 с.

21. Ванюрихина Л.Т. Взаимосвязь сериновых протеаз трипсинового типа с системой гемостаза у больных сахарным диабетом / Л.Т. Ванюрихина, А.В. Орлова // *Врачебное дело.*- 1989.- № 7.- С. 88-90.
22. Бувальцев В.И. Дисфункция эндотелия как новая концепция профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний / В.И. Бувальцев// [medi.ru /doc/77/0301.html](http://medi.ru/doc/77/0301.html)
23. Венгеровский А.И. Лекции по фармакологии для врачей и провизоров./ А.И. Венгеровский. – Томск, 1998 – 480 с.
24. Вербовая Н.И. Роль гликолизированных продуктов метаболизма в формировании сосудистых осложнений сахарного диабета / Н.И. Вербовая, Е.А. Лебедева // *Проблемы эндокринологии.* – 1997. – Том.43, №1. – С.43-45.
25. Веремеенко К.Н. Определение α_2 -макроглобулина в сыворотке крови человека и его клиническое значение/ К.Н. Веремеенко, Л.И. Волохонская // *Лаб. дело.*- 1969.- № 7.- С. 394-397.
26. Веремеенко К.Н. Кининовая система / К.Н. Веремеенко.- Киев: Здоровья, 1977.- 183с.
27. Веремеенко К.Н. α_1 -Ингибитор протеиназ и его исследование в клинике / К.Н. Веремеенко // *Клин. медицина.* - 1985.- №12.- С.21-27.
28. Власов В.В. Введение в доказательную медицину / В.В. Власов. -М.: Медиа Сфера, 2001.- 392 с.
29. Влияние полиморфизма генов на эффективность медикаментозной терапии у больных сахарным диабетом 2 типа и сопутствующей артериальной гипертензией / М.А. Балаболкин, В.В. Носиков, Н.М. Горашко и др. // Тез. докл. Второго российского диабетологического конгресса «Сахарный диабет и сердечно-сосудистые осложнения».- Москва.- 2002.- С. 40.
30. Влияние длительной антигипертензивной терапии каптоприлом на доплерографические показатели внутривисцерального кровотока и функцию почек у больных артериальной гипертензией на фоне сахарного диабета / Р.С. Карпов, О.А. Кошельская, Е.В. Ефимова и др. // *Кардиология.*- 2002.- №2.- С.39-49.

31. Воронцов А.В. Диабетическая нефропатия: патогенез и лечение / А.В. Воронцов, М.В. Шестакова // Проблемы эндокринологии. – 1997. - №4 – С.37-42.
32. Галенок В.А. Гипоксия и углеводный обмен/ В.А. Галенок, В.Е. Диккер.- Новосибирск, 1985.- 56 с.
33. Гельман В.Я. Медицинская информатика: практикум (2-е изд.) / В.Я. Гельман.- СПб: Питер, 2000.- 480 с.
34. Гельцер Б.И. Протеиназы-ингибиторы и ренин в патогенезе сосудистой недостаточности при острой пневмонии / Б.И. Гельцер, А.Б. Коряков, Г.В. Бутовец. // Российский медицинский журнал.- 1992.- № 1.- С.4-6.
35. Гемопоз, гормоны, эволюция / В.В. Новицкий, Ю.А. Козлов, В.С. Лаврова, Н.М. Шевцова. . – Новосибирск: Наука, Сибпредприятие РАН, 1997. – 432 с.
36. Гольдберг Е.Д. Сахарный диабет / Е.Д. Гольдберг, В.А. Ещенко, В.Д. Бова - Томск: изд-во Томского ун-та, 1993.- 136 с.
37. Гомазков О.А. Кинины в физиологии и патологии сердечно-сосудистой системы / О.А. Гомазков, А.А. Дзизинский – Новосибирск, 1976.- 160 с.
38. Гомазков О.А. Соотношение кининазной и ангиотензин-конвертирующей активности в норме и при экспериментальной ишемии миокарда / О.А. Гомазков, Л.В. Шимкович, А.М. Чернух // Кардиология.- 1977.- т.17, №1, С. 103-108.
39. Гомазков О.А. Функциональная биохимия регуляторных пептидов / О.А. Гомазков.- М.: Наука, 1993.- 159 с.
40. Гомазков О.А. Роль ангиотензина II и ангиотензинпревращающего фермента в развитии эндотелиальной дисфункции и апоптоза / О.А. Гомазков // Вопросы медицинской химии.- 2000.- №5.- С.10-19.
41. Гомазков О.А. Пептиды в кардиологии. Физиология и биохимия. Патология. Информация. Анализ. / О.А. Гомазков.- М.: Материк Альфа, 2000.- 144 с
42. Голиков П.П. Экспресс-метод определения активности ангиотензинпревращающего фермента в сыворотке крови / П.П. Голиков, Н.Ю. Николаева // Клиническая лабораторная диагностика.- 1998.- №1.- С.11-13.

43. Грацианский Н.А. Предупреждение обострений коронарной болезни сердца. Вмешательства с недоказанным клиническим эффектом: ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента и антиоксиданты / Н.А. Грацианский // www.mediasphera.aha.ru/cardio/card-mn.htm.
44. Гришина Е.И. Состояние калликреин-кининовой системы у больных хроническими воспалительными заболеваниями печени / Е.И. Гришина, О.Я. Батак Н.И., Яблчанский // Росс. мед. журнал.- 1992, № 1.- С.9-11.
45. Давиденкова Е.Ф. Генетика сахарного диабета / Е.Ф. Давиденкова, И.С. Либерман - Л.: Медицина, 1988.- 160 с.
46. Дедов И.И. Государственный регистр сахарного диабета: распространенность инсулинзависимого сахарного диабета и его осложнений / И.И. Дедов, Ю.И. Сунцов, С.В. Кудрякова и др. // Проблемы эндокринологии. – 1997. – Том 43, №6. – С.10-13.
47. Дедов И.И., Фадеев В.В. Введение в диабетологию / И.И. Дедов, В.В. Фадеев. – М. Издательство «Берег». 1998 – 200 с.
48. Дедов И.И. Основные достижения по научным исследованиям направления «сахарный диабет» / И.И. Дедов // Вестник РАМН. - 1998. – №7. - С. 24-29.
49. Дедов И.И. Сахарный диабет в Российской Федерации: проблемы и пути решения / И.И. Дедов // Сахарный диабет. – 1998. - №1. – С.7-18.
50. Дедов И.И. Диабетическая нефропатия / И.И. Дедов, М.В. Шестакова.- М.: Универсум Паблишинг, 2000.- 237 с.
51. Дедов И.И. Осложнения сахарного диабета / И.И. Дедов // www.diabet.ru/Sdiabet/1999-03/4.htm
52. Дедов И.И. Сахарный диабет у детей и подростков / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, М.А. Максимова.- М.: Универсум Паблишинг, 2002.- 392с.
53. Дедов И.И. Федеральная целевая программа «Сахарный диабет» (Методические рекомендации) / И.И. Дедов.- М.: Медиа Сфера, 2002.- 88с.
54. Де Лиув П.В. Ренин-ангиотензиновая система / П.В. Де Лиув // Тер. Архив.- 1997.- №8.- С. 69-72.
55. Добронравов В.А. Эпидемиология диабетической нефропатии. Общие и региональные проблемы / В.А. Добронравов // Нефрология.- 2002.- №6.- С. 16-22.

56. Доценко В.Л. Возможное участие ангиотензинпревращающего фермента и лейкоцитарной эластазы в патогенезе инсулиннезависимого сахарного диабета / В.Л. Доценко, Т.Ю. Демидова, Е.А. Нешкова, и др. // www.medi.ru/doc/01-04/88.htm
57. Елисеева Ю.Е. Ангиотензинпревращающий фермент, его физиологическая роль / Ю.Е. Елисеева // Вопросы медицинской химии.- 2001.- №1.- С.10-14.
58. Есаян А.М. Тканевая ренин-ангиотензиновая система почки. Новая стратегия ренопротекции / А.М. Есаян // Нефрология.- 2002.- №3.- С.10-14.
59. Ефимов А.С. Диабетические ангиопатии / А.С. Ефимов. - М., 1989. - 288 с.
60. Затейщикова А.А. Эндотелиальная регуляция сосудистого тонуса: методы исследования и клиническое значение / А.А. Затейщикова, Д.А. Затейщиков // Кардиология.- 1998.- № 9.- С. 68-80.
61. Иванова О.В. Эндотелиальная дисфункция – важный этап развития атеросклеротического поражения сосудов (обзор литературы) / О.В. Иванова, Г.Н. Соболева, Ю.А. Карпов // Терапевтический архив. –1997. - №6. - С.75-78.
62. Изменение активности ангиотензинпревращающего фермента у больных пневмониями и хроническими обструктивными заболеваниями легких / Б.Ю. Альтшулер, А.П. Ройтман, В.В. Долгов и др. // Клиническая лабораторная диагностика.- 2001.- № 1.- С. 10-14.
63. Изменение активности ангиотензинпревращающего фермента у больных пневмониями и хроническими обструктивными заболеваниями легких / Б.Ю. Альтшулер, А.П. Ройтман, В.В. Долгов и др. // Вопросы медицинской химии.- 2002.- №2.- С. 204-214.
64. Казанская В.Ф. Ингибиторы – факторы регуляции протеолиза / В.Ф. Казанская // Биоорганическая химия.- 1994.- т. 20, № 5.- С. 485-491.
65. Карнаух В.И. Значение изменений белков-ингибиторов при нефротической форме гломерулонефрита у детей / В.И. Карнаух // Вопросы охраны материнства и детства.- 1983.- №2.- С.71
66. Карпов Р.С. Атеросклероз: патогенез, клиника, функциональная диагностика, лечение / Р.С. Карпов, В.А. Дудко. - Томск: STT, - 1998 - 432с.
67. Касаткина Э.П. Сахарный диабет у детей и подростков / Э.П. Касаткина. - М. – 1996 – 240 с.

68. Касаткина Э.П. Профилактика, скрининг и лечение поздних диабетических осложнений у детей и подростков / Э.П. Касаткина, Е.А. Одуд, Г.И. Сивоус // Актуальные вопросы детской и подростковой эндокринологии. Смоленск 1999. –С. 9-18.
69. Климов А.Н. Липиды, липопротеиды и атеросклероз / А.Н. Климов, Н.Г. Никульчева.- СПб: «Питер Пресс», 1995. – 240 с.
70. Кобалава Ж.Д. Новое во взглядах на артериальную гипертонию / Ж.Д. Кобалава // www.osp.ru/doc/01_02/56html.
71. Коломиец В.В. Роль ренин-ангиотензиновой системы в регуляции экскреторной функции почек у больных с хронической сердечной недостаточностью / В.В. Коломиец, К.А. Бобрышев // www.rgl.kiev.ua/01-12/20htm.
72. Коломоец Н.М. Эндотелиальная дисфункция и ее клиническое значение / Н.М. Коломоец // Военно-медицинский журнал.- 2001.- № 5.- С.15-19.
73. Колосова М.В. Общие закономерности и механизмы нарушений периферического звена эритрона при типовых патологических процессах в клинике детских болезней / М.В. Колосова: Дисс. ...д-ра мед.наук: Томск, 1999 .- 468 с.
74. Кондратьев Я.Ю. Полиморфные генетические маркеры и сосудистые осложнения сахарного диабета / Я.Ю. Кондратьев // Проблемы эндокринологии. - 1998. - №1.- С. 43-51.
75. Кондратьева Е.И. Клинико-генеалогические и иммуно-метаболические механизмы формирования сахарного диабета 1 типа и его осложнений у детей и подростков и их значение в выборе стратегии реабилитации / Е.И. Кондратьева: Автореф. дис. ...д-ра мед. наук: Томск, 2001.- 48 с.
76. Конькова Н.И. Современные представления о ренин-ангиотензиновой системе и ее роли в регуляции артериального давления (обзор литературы) / Н.И. Конькова, А.Н. Бургал, В.В. Длин // www.dialysis.ru/01-02.html.
77. Копылова О.Е. Состояние протеолиза в процессах пролиферации клеток тимуса и опухолей / О.Е. Копылова: Автореф. дис. ...канд. мед. наук: Томск, 1992.- 27 с.

78. Котова Т.С. α_1 -Ингибитор протеаз: характеристика биохимических и физиологических свойств и определение уровня при различных заболеваниях / Т.С. Котова, В.Ю. Базис, О.К. Атовмян // Тер. Архив.- 1986.- т. 58, № 4.- С. 77-80.
79. Кравец Е.Б. Взаимосвязь иммунологических показателей с секрецией β -клеток поджелудочной железы у детей, больных ожирением и сахарным диабетом / Е.Б. Кравец, Е.И. Кондратьева // Педиатрия. – 1994. – № 3. – С. 26-29.
80. Кравец Е.Б.. Гормонально-метаболические аспекты и иммунный статус при одирении у детей / Е.Б. Кравец, Ю.А. Князев - Томск: Изд-во Томского университета, 1989.- 57 с.
81. Кураева Т.Л. Иммунопатогенез и иммунотерапия сахарного диабета 1 типа / Т.Л. Кураева // Пробл. эндокринологии. – 1991. – Т.37. – № 1. – С.63-67.
82. Кутырина И.М. Применение ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента при первичных поражениях почек и диабетической нефропатии / И.М. Кутырина // www.consilium-medicum.com/media/consilium/02_07/134.shtml
83. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие для биологич. спец. вузов. / Г.Ф. Лакин– М.: Высш.школа, 1980.– 293 с.
84. Ланцберг Л.А. Об участии кининовой системы почек и крови в адаптации к физическим нагрузкам / Л.А. Ланцберг, А.А. Некрасова // Кардиология.- 1972.- т.12, №9.- С. 58-63.
85. Ласукова Т.В. Эпифиз и кинины в регуляции функции почек / Т.В. Ласукова // Современ. вопросы кардиологии, онкологии и психиатрии.- Томск, 1985.- С. 25-28.
86. Липидный обмен в семьях больных сахарным диабетом / Е.И. Кондратьева, Е.Б. Кравец, Г.А. Суханова и др. // Сахарный диабет.- 2000.- №3.- С.29-32.
87. Лисняк И.А. Природа ангиогенных факторов: обзор / И.А. Лисняк // Вопросы мед. химии.- 1990.- т. 36, вып. 1.- С.2-7.
88. Луковская Е.В. Влияние токоферола и каптоприла на перекисное окисление липидов и ренин-ангиотензиновую систему больных системной склеродермой / Е.В. Луковская // www.morion-kiev.ua.

89. Маколкин В.И. Динамика активности ангиотензин-превращающего фермента сыворотки крови под действием ингибиторов АПФ у больных с гипертонической болезнью / В.И. Маколкин, Е.П. Голикова, Н.Ю. Николаева // Кардиология.- 2001.- №10.- С.34-37.
90. Маланьина К.М. Эндотелиальная дисфункция у больных сахарным диабетом и артериальной гипертензией / К.М. Маланьина, А.В. Агафонов // Второй российский диабетологический конгресс «Сахарный диабет и сердечно-сосудистые осложнения», тезисы докладов.- Москва, 2002.- С. 40.
91. Машковский М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. - в 2-х т. т.1- Из. 10, новое.- Харьков.: Торсинг.- 1998.- 560 с.
92. Маянский Д.Н. Лекции по клинической патологии / Д.Н. Маянский, И.Г. Урсов - Новосибирск.- 1997.- 249 с.
93. Механизмы диабетической нефропатии при экспериментальном сахарном диабете / Н.П. Микаелян, Ю.А. Князев, А.Е. Гурина, и др. // Второй российский диабетологический конгресс «Сахарный диабет и сердечно-сосудистые осложнения», тезисы докладов.- Москва.- 2002.- С. 40.
94. Михайлов А.А. Современные аспекты лечения гипертонической болезни у лиц пожилого возраста / А.А. Михайлов // www.rmj.ru/doc/01_02/12htm.
95. Мониторинг основных эпидемиологических характеристик ИЗСД у детей г. Москвы / В.А. Петеркова, Л.Н. Щербачева, Ю.И. Сунцов и др.- Первый Российский диабетологический конгресс. Тезисы докладов. Москва.- 1998. – С.245.
96. Мравян С.Р. Патогенез артериальной гипертензии и побочные действия применяемых гипотензивных средств / С.Р. Мравян, А.П. Калинин // www.medi.ru/doc/01_12/67html
97. Мусаев С.Н. Состояние кининовой системы и ингибиторов сыворотки крови у здоровых детей и подростков / С.Н. Мусаев, М.А. Байрамов // Вопросы сердечно-сосудистой патологии: Баку.- 1983.- вып 6.- С.120-122
98. Нартикова В.Ф. Унифицированный метод определения активности α_1 -антитрипсина и α_2 -макроглобулина в сыворотке крови / В.Ф. Нартикова, Т.С. Пасхина // Вопросы медицинской химии.- 1979.- № 4.- С.494-499.

99. Наточин Ю.В. Диабет: функциональное состояние почки / Ю.В. Наточин // Сахарный диабет.- 2001.- № 1.- С. 22-26.
100. Нелаева А.А. Состояние перекисного окисления липидов в мембранах тромбоцитов у больных инсулинзависимым сахарным диабетом при кетоацидозе и коррекция витаминами-антиоксидантами / А.А. Нелаева, И.А. Трошина // Сахарный диабет. – 1999. – № 3. – С.25-29.
101. Распространенность сахарного диабета у населения Сибири и Дальнего Востока Первый Российский диабетологический конгресс / Ю.П. Никитин, Е.С. Малахина, Г.Р. Казека и др.- Тез. докл.- Москва.- 1998. – С. 232.
102. Обухова Г.Г. Компоненты кининовой системы и ингибиторы протеиназ сыворотки крови при геморрагической лихорадке с почечным синдромом / Г.Г. Обухова // Вопросы медицинской химии.- 1980.- №1.- С.118-120.
103. Осокин И.В. Иммунологические особенности инсулинзависимого сахарного диабета в детском возрасте / И.В. Осокин, И.И. Дедов, В.В. Яздовский // Пробл. эндокринолог. – 1992.– № 4.–С.30.
104. Оценка резервных возможностей калликреин-кининовой системы крови здоровых людей / В.В. Удут, Г.Т. Каиров, А.Б. Карпов и др. // Клиническая лабораторная диагностика.- 1998.- №7-8.- С.9-10.
105. Пасхина Т.С. Калликреин плазмы крови – новые функции / Т.С. Пасхина // Биохимия.- 1976.- в.6.- с.1347-1351.
106. Пасхина Т.С. Упрощенный пробирочный метод определения содержания калликреина и калликреиногена / Т.С. Пасхина, А.В. Кринская // Вопросы медицинской химии.- 1974.- Т.20.- вып 6, С.660-663.
107. Патофизиология: Учебник для медицинских вузов/ под ред. В.В. Новицкого и Е.Д. Гольдберга.- Томск: Изд-во Том. Ун-та, 2001., 716 с.
108. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы / А.Е. Платонов.- М.: изд-во РАМН, 2000.- 52 с.
109. Поиск полиморфных маркеров генов-кандидатов, ассоциированных с развитием диабетической нефропатии при диабете 1 типа / М.В. Шестакова, Н.М. Горашко, Д.А. Чистяков и др. // Второй российский диабетологический

конгресс «Сахарный диабет и сердечно-сосудистые осложнения», тезисы докладов, Москва.- 2002.- С. 40.

110. Полиморфизм гена ангиотензинпревращающего фермента и генетическая предрасположенность к диабетической нефропатии при инсулинзависимом сахарном диабете / Я.Ю. Кондратьев, Л.А. Чугунова, М.Ш. Шамхалова и др // Проблемы эндокринологии. – 1998. – Том 44, №4. – С.12-15.
111. Подзолков В.И. Эндотелины и их роль в генезе артериальных гипертензий / В.И. Подзолков, А.И. Удовиченко // Тер. архив.- 1996.- №5.- С.81-83.
112. Преображенский Ц.В. Артериальная гипертензия при сахарном диабете / Ц.В. Преображенский, Б.А. Сидоренко // www.rmj.ru/doc/01_02/45htm
113. Проценко А.В. Антипротеиназная активность α_2 -макроглобулина / Проценко А.В. // Укр. Биохим. Журнал .- 1984.- т. 56, № 5.- С. 546-549.
114. Проценко В.А. Ингибиторы протеолитических ферментов – протекторы клеточных повреждений / В.А. Проценко, С.И. Шпак // Успехи современной биологии.- 1988.- т. 106, вып. 2.- С.255-263.
115. Ракова Н.Г. Патогенез и лабораторная диагностика диабетической нефропатии (обзор литературы) / Н.Г. Ракова // Клиническая лабораторная диагностика.- 1998.- №4.- С.3-5.
116. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных / О.Ю. Реброва.- М: МедиаСфера, 2002.- 312 с.
117. Сергеева Т.В. Связь полиморфизма генов ренин-ангиотензиновой системы с гипертонической болезнью и инсулиннезависимым диабетом / Т.В. Сергеева, Ж..Д. Кобалава, Д.А. Чистяков // Клиническая медицина.- 2000.- Т.45, №7.- С. 23-33.
118. Серкова В.К. Динамика липидов крови, показатели перекисного окисления липидов крови и энергетический обмен под влиянием "Эссенциале" у больных сахарным диабетом / В.К. Серкова // Клиническая медицина.– 1986.– № 7.– С. 91-94.
119. Сидоренко В.А. Диапазон клинического применения ингибитора ангиотензинпревращающего фермента квинаприла / В.А. Сидоренко, Д.В. Преображенский // Кардиология. 1998, 3, с. 85-90.

120. Сидоренко Б.А. Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента: тактика клинического применения и перспективы использования / В.А. Сидоренко, Д.В. Преображенский // Кардиология.- 1999.- № 5.- С.85-95.
121. Современные подходы к ранней диагностике и лечению специфических осложнений сахарного диабета у детей и подростков / Э.П. Касаткина, Е.А. Одуд, Г.И. Сивоус и др. // <http://www.diabet.ru/Sdiabet/1999-02/6.htm>
122. Состояние калликреин-кининовой системы и ингибиторов протеиназ при физической нагрузке и инфракрасном лазерном облучении / С.М. Зубкова, Н.И. Варакина, Л.В. Михайлик и др. // Вопр. курортологии, физиотерапии и леч. физ. культуры.- 1995.- № 6.- С.9-11.
123. Степанов В.А. Анализ ассоциаций полиморфизма гена ангиотензин-превращающего фермента с коронарным атеросклерозом, уровнем липидов и давлением крови / В.А. Степанов, В.П. Пузырев, Р.С. Карпов // Сибирский медицинский журнал. – 1998 - Том.13, №3-4. – С.20-25.
124. Стратегия поиска маркеров генетической предрасположенности к сосудистым осложнениям сахарного диабета на примере диабетической нефропатии / Я.Ю. Кондратьев, М.В. Шестакова, Л.А. Чугунова и др // Сахарный диабет. - 1998. - №1. – С.22 – 25.
125. Суровкина М. Клиническое значение изменений активности калликреин-кининовой системы / Суровкина М. // Врач.- 1995.- №3.- С 7-10.
126. Сунцов Ю.Н. Государственный реестр сахарного диабета: эпидемиологическая характеристика сосудистых осложнений сахарного диабета / Ю.Н. Сунцов, Н.С. Шишкина, Л.Л. Болотская // Второй российский диабетологический конгресс «Сахарный диабет и сердечно-сосудистые осложнения»- тезисы докладов.- Москва.- 2000.- С. 7.
127. Суханова Г.А. Регуляция брадикинином метаболизма клеток лимфоидных органов / Г.А. Суханова: Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. – Томск, 1993.- 34с.
128. Токаева Л.К. Взаимосвязи между компонентами калликреин-кининовой системы у здоровых людей / Л.К. Токаева, Т.Д. Царева / Кинины и кининовая система крови М., 1979.- С.103-104.

129. Тюрин Ю.Н. Анализ данных на компьютере / Ю.Н. Тюрин, А.А., Макаров.- М.: ИНФРА-М, Финансы и статистика, 1995.- 398с.
130. Уорд А.М. α_1 -Антитрипсин / Иммунохимия в клинической и лабораторной практике / А.М. Уорд.- М.: Медицина.- 1981.- С. 186-196.
131. Факторы риска быстрого развития почечной недостаточности у больных с диабетической нефропатией / М.В. Шестакова, Ю.А. Дирочка, М.Ш. Шахмалова и др. // www.diabet.ru/doc/01_03/htm
132. Ферстер Э. Методы корреляционного и регрессионного анализа / Э.Ферстер, Б. Ренц.- М.: Финансы и статистика, 1983.- 390 с.
133. Флетчер Р. Клиническая эпидемиология основы доказательной медицины / Р. Флетчер, С. Флетчер, Э. Вагнер. - М.: Медиа Сфера, 1999. - 352 с.
134. Шафер М.Ж. Клеточные (тромбоциты и эритроциты) аспекты взаимосвязи артериальной гипертонии и ишемической болезни сердца, влияние ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента / М.Ж. Шафер: Автореф.дис. ... д-ра мед. наук: Томский НИИ Кардиологии.- Томск: 1999.- 47с.
135. Шахмалова М.Ш. Роль генетических факторов в развитии диабетической нефропатии / Чугунова Л.А., Шестакова М.В. и др. // Актуальные проблемы современной эндокринологии - С-Петербург.- 2001.-С. 235.
136. Шварц Г.А. Фармакологическая регуляция активности кининовой системы организма: обзор / Г.А. Шварц // Хим.-фармац. журнал.- 1979.- т.13, № 2.-С. 7-19.
137. Шестакова М.В. Проблема артериальной гипертонии при сахарном диабете / М.В. Шестакова // Кардиология.- 1999, № 6.- С. 59-65.
138. Шестакова М.В. Артериальная гипертония при сахарном диабете: эпидемиология, патогенез и стандарты лечения / М.В. Шестакова // www.diabet.ru/Sdiabet/1999-03/4.htm
139. Шестакова М.В. Артериальная гипертония и сахарный диабет: механизмы развития и тактика лечения / М.В. Шестакова // www.diabet.ru/Sdiabet/1999-03/4.htm

140. Шестакова М.В. Ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента и патология почек: непревзойденный нефропротективный эффект / М.В. Шестакова // www.consilium-medicum.com/media/consilium/02_03/134.shtml
141. Шестакова М.В. Диабетическая нефропатия: эволюция представлений о механизмах развития, профилактике и лечении / М.В. Шестакова // www.consilium-medicum.com/media/consilium/01_11/541.shtml
142. Шляхто Е.В. Блокирование ренин-ангиотензиновой системы при артериальной гипертензии: фармакогенетический подход / Е.В. Шляхто, Конради А.О. // http://www.consilium-medicum.com/media/gyper/02_03/81.shtml
143. Шумилов С.П. Гомеостаз кининов и физическая работоспособность / С.П. Шумилов, Е.А. Грабовская // Биоритмы пищеварительной системы и гомеостаз.- Томск.- 1994.- С.393-385.
144. Шхвацабая И. К. Кининовая система почек в патогенезе гипертонической болезни / И.К. Шхвацабая, А.А. Некрасова, Н.А. Чернова и др // Тер. Архив.- 1973.- т.43, № 10.- С.71-77.
145. Чернова Н.А. Некоторые компоненты кининовой системы крови и почек при гипертонических состояниях / Н.А. Чернова: Автореф.дис. ... канд. мед. наук: М.: 1971.- 17с.
146. Чернов Ю.Н. Ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента: особенности клинического применения / Ю.Н. Чернов, Г.А. Батищева, В.М. Провоторов // medi.ru/doc/7290112.htm
147. Чистяков Д.А. Локус генетической предрасположенности к диабету 1 типа (Сообщение 1) / Д.А. Чистяков, И.И. Дедов // Сахарный диабет. – 1999. - №3. – С. 52-55.
148. Эндогенный активатор ангиотензинпревращающего фермента / Ю.Е. Елисеева, Л.В. Павлихина, Т.В. Шавгулидзе и др. // Вопросы медицинской химии.- 1994.- № 3.- С.35-37.
149. Эндотелиальная дисфункция у больных с дебютом ишемической болезни сердца в раннем возрасте / В.А. Алмазов, О.А. Беркович, М.Ю. Ситникова и др. / Кардиология.- 2001.- №5.- С. 26-27.

150. Эндотелиальный фактор релаксации в развитии диабетической нефропатии / М.В.Шестакова, И.С. Северина, И.И. Дедов и др. // Вестник Российской Академии мед.наук. –1995. - №5. –С. 30-34.
151. Эритроциты и злокачественные образования / В.В. Новицкий, Е.А. Степовая, В.Е. Гольдберг и др.- Томск: “СТТ”, 2000.- 288 с.
152. Юшков П.В. Морфогенез ангиопатий при сахарном диабете / П.В. Юшков, К.В. Опаленов // Сахарный диабет .- 2001, № 1.- С.53-56.
153. Яровая Г.А. Калликреин-кининовая система крови и ингибиторы протеолиза плазмы крови при различных нефропатиях у детей / Г.А. Яровая, Н.А. Коровина, М.Н. Магомедова // Вопросы медицинской химии.- 1994.- № 3.- С.16-18.
154. Яровая Г.А. Калликреин-кининовая система: новые факты и концепции (обзор) / Г.А. Яровая // Вопросы медицинской химии.- 2001.- № 1.- С.5-10.
155. Adam A. Kinins: their nature and their potential role in the cardiovascular effects of angiotensin converting enzyme inhibition / A. Adam, C. Blais, G. Loute // Nephrologie.- 2000.- Vol.21, №4.- P 163-72.
156. Angiotensin converting enzyme inhibition therapy is associated with lower vitreous vascular growth factor concentration in patients with proliferative diabetic retinopathy / I.M. Hogeboom van Buggenum, B.C.P. Polak, J.W.M. Reichert-Thön, et al. / Diabetologia .-2002.-Vol. 45.-P. 203-209.
157. Angiotensin converting enzyme inhibition and arterial endothelial function in adults with Type 1 diabetes mellitus / R. McFarlane, R.J. McCredie, M.A. Bonney et al. // Diabet Med.- 1999.- Vol. 16, № 1.- P. 62-6.
158. Association of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism with lipid profiles in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus / K.Kobayashi , S. Amemiya, M. Mochizuki, et al // Horm. Res.- 1999.- Vol. 51, №4.- P. 201-4
159. Atkinson M.A. Mechanism of disease; the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus / M.A. Atkinson, N.K. Maclaren //N. Engl. J. Med. 1994 – Vol.333. -.P.1428-1436.
160. Bach J.F. Complications of Diabetes / J.F. Bach.- Ed. R. Van Schilfgaarde.– Orlando, 1986. – P. 67-69.

161. Bader M. Molecular interactions of vasoactive systems in cardiovascular damage / M. Bader // *J. Cardiovasc/ Pharmacol.*- 2001.- Vol. 38, №11.-P. 7-9.
162. Becker J. Diabetes Complication in the prepubertal and Adolescend Age Groups./J. Becker // *J.D.F. Bulletin 3.* –1996. – Vol.41- Sept.- P. 34-35.
163. Bogard van den J.P.H. эндотелиальная дисфункция предшествует микроальбуминурии у пациентов с сахарным диабетом / J.P.H. Bogard van den // www.rmj.ru/t3/n9/endo.htm
164. Bristow C.L. Specific activity of alpha1proteinase inhibitor and alpha 2 macroglobulin in human serum: application to insulin-dependent diabetes mellitus / C.L. Bristow, F. Di Meo, R.R. Arnold // *Clin. Immunol. Immunopathol.*- 1998.- Vol. 89, №3.- P.247-59.
165. Butler R. DD angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with endothelial dysfunction in normal humans / R. Butler, A.D. Morris, B. Burchell // *Hypertension.*- 1999.- May, vol.33 (5).- P.1164-8.
166. Campbell D.J. Towards understanding the kallikrein-kinin system: insights from measurement of the kinin peptide / D.J. Campbell // *Braz. J. Med. Biol. Res.*- 2000.- Vol. 33, №6.- P. 665-77.
167. Chen I., Insulin resistance and atherosclerosis / I. Chen, M. Gerald // *Diabetes Reviews.* – 1997. – Vol. 5, N 4. – P.331-342.
168. Chin J. H. Inactivation of endothehal-derived relaxing factor by oxidized lipoproteins / J.H. Chin, S. Azhar, B.B. Ilorffman // *J. Clin. Invest.* – 1992. – Vol. 89, N 1. – P. 10-18.
169. Creen A. Trends in the epidemiology of IDDM durin 1970-2020 in Fyn County, Denmark / A. Creen, A.K. Sjolie, O. Eshoj // *Diabetes Care.* – 1996. – Vol. 19 – N 8. – P. 810-806.
170. Cryer P.E. International mortality trends for IDDM reflect differing health care systems / P.E. Cryer // *Internathional Diabetes Monitor.* – 1996. – Vol. 8. – N 3. – P. 6-8.
171. C-antineutrophil cytoplasmic antibody positivity in vasculitis patients is associated with the Z allele of alpha-1-antitrypsin, and P-antineutrophil cytoplasmic antibody positivity with the S allele / M.E. Griffith, J.U. Lovegrove, G. Gaskin et al. // *Nephrol. Dial. Transplant.*- 1996.- Vol. 11, №3.- P.438-43.

172. Dawson K. The chronic complications of diabetes / K. Dawson, D. Daneman // *Diabetes Care Without Compromise*", 1998.- P. 32-38.
173. Decreased matrix degradation in diabetic nephropathy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition on the expression and activities of matrix metalloproteinases / S.V. Mc Lennan, D.J. Kelly, A.J. Cox et al. // *Diabetologia*.- 2002.- Vol. 45.- P. 286-275
174. Diabetes mellitus. General information. Diabetes Statistics // NIH Publication. – 1998. – P. 96-3926.
175. Diabetic nephropathy in children and adolescents / F. Chiarelli, A. Casani, A. Verotti et al. // *Acta paediatr. Suppl.*- 1998.- Vol.42, №5- P.425-435.
176. Diabetes – renal function – what are the special problems? / E. Ritz, G. Miltenberger- Miltenyi, K. Stanton et al. // *Basis. Res. Cardiol.*- 1998.- Vol. 93, Suppl. 2.- P.125-130.
177. DNA polymorphisms in the ACE gene, serum ACE activity and the risk of nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus / M.B. Freire, D.J. van Dijk, A. Erman et al. // *Nephrol. Dial. Transplant.*- 1998.- Vol. 13, №10.- P.2553-8.
178. Donaghue K. Autonomic neuropathy: diagnosis and impact on the health in adolescents with diabetes / K. Donaghue // *Horm. Res.*- 1998.- Vol. 50.- P. 33-37.
179. Dogra G. Endothelium dependent and independent vasodilatation studied at normoglycaemia in Type 1 diabetes mellitus with and without microalbuminuria / G. Dogra, L. Rich, K. Stanton // *Diabetologia*.- 2001.- Vol. 44.- P. 593-601
180. Drexler H. Endothelial dysfunction in human disease / H. Drexler, B. Horning // *J Mol. Cell Cardiol.*- 1999.- Vol. 31, №1.-P. 51-60
181. Dzau V.J. Theodor Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathology of vascular disease: a unifying hypothesis / V.J. Dzau // *Hypertension*.- 2001. – Vol.37, №4. – P.1047-1052.
182. Emanuelli C. Role of the kallikrein-kinin system in the maturation of cardiovascular phenotype / C. Emanuelli, P. Madeddu // *Am. J. Hypertens.*- 1999.- Vol. 12, №10.- P. 988-99.
183. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy / C.D.A. Stehouwer, J. Lambert, A.J. Danker et al. // *Cardiovasc. Resc.*-1997.- Vol. 34 (1), №4.- P. 55-68.

184. Evaluation of risk for the development of nephropathy in patients with IDDM: insertion/deletion angiotensin converting enzyme gene polymorphism, hypertension and metabolic control / U. Barnas, A. Schmidt, H.P. Kiener et al. // *Diabetologia.*- 1997.- Vol. 40.- P. 327-331.
185. Galabov P. Ultrastructural localization of angiotensin II-like immunoreactivity (A II-LI) in the vegetative networks of the spinal cord of the guinea pig / P. Galabov // *J. Auton. Nerv. Syst.*- 1992.- Vol. 40.- P. 215-222.
186. Gardner S.G. Rising incidence of insulin-dependent diabetes in the under-fives in the Oxford Region 1985-1995 / S.G. Gardner, P.A. Sawtell, S.S. Weeks // *Diabet. Med.* – 1996. – Vol.13. – Sup. 7. – P.17.
187. Gene-polymorphisms of angiotensin converting enzyme and endothelial nitric oxide synthase in patients with erectile dysfunction / J.K. Park, W. Kim, S.W. Kim et al. // *Int. J. Impot. Res.*- 1999.- Vol. 11 (5).- P. 273-6.
188. Genetic variants of the renin-angiotensin system, diabetic nephropathy and hypertension / G. Ringel, J. Beige, R. Kurz et al. // *Diabetologia.*- 1997.- Vol. 40.- P.193-199.
189. Gilbert R.E. ACE inhibition reduces retinal overexpression of vascular endothelial growth factor and hyperpermeability in experimental diabetes / R.E. Gilbert, D.Z. Kelly // *Diabetologia.*- 2000.- Vol. 43, №11.- P.1260-7
190. Goonasekera C.D.A. Vascular endothelium and nitric oxide in childhood hypertension / C.D.A. Goonasekera, M.J. Dillon // *Pediatr. Nephrol.*-1998.- Vol. 12.- P.676-689.
191. Green A. Trends in the epidemiology of IDDM during 1970-2020 in Fyn County, Denmark / A. Green, A.K. Sjolie, O. Eshoj // *Diabetes Care.* – 1996. – Vol. 19 – N 8. – P. 810-806.
192. Griesbacher T. Kallikrein-kinin system in acute pancreatitis: potential role of B(2)-bradykinin antagonists and kallikrein inhibitors / T. Griesbacher // *Pharmacology.*- 2000.- Vol. 60 №3.- P.113-20.
193. Gulmann C. Renal arterioles in patients with Type 1 diabetes and microalbuminuria before and after treatment with antihypertensive drugs / C. Gulmann, S. Rudberg, P. Osterby // *Virchows. Arch.*-1999.- Vol.434.- P. 523-528.

194. Haider A. An evidence-based review of ACE inhibitors in incipient diabetic nephropathy / A. Haider, P. Oh, P.M. Peloso // *Can. J. Clin. Pharmacol.*- 2000.- № 7 (2).- P. 115-9.
195. Harris M.I. Medical care for patients with diabetes. Epidemiologic aspects / M.I. Harris // *International Diabetes Monitor.* – 1996. – Vol. 8., N 3. – P. 14-15.
196. Hollenberg N.K. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue. Evidence from comparative pharmacological interruption of the rennin system / N.K. Hollenberg, D.L. Naomi, N.D.L. Fisher // *Hypertension.* - 1998.- Vol.32.- P. 387-392.
197. HOPE Study Investigators. Effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients / *New England Journal of Medicine.*- 2000.- Vol. 342. P. 145-153.
198. HOPE Study Investigators. Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: result of HOPE study and MICRO-HOPE substudy.- *Lancet.*- 2000.- Vol. 355: P.253-259.
199. Imboden H. Localization of angiotensinogen in multiple cell types of rat brain / Imboden H., J. Harding, U. Hilgenfeld // *Brain Res.*- 1987.- Vol. 410.- P. 74-77.
200. Imig D.G. Renal endosomes contain angiotensin peptides, converting enzyme, and AT (1A)0 receptors / D.G. Imig, G.L. Navar, L.X. Zou // *Am.J. Physiol.*- 1999. - Vol.277, №8 (2 Pt. 2).- P.303-311.
201. Increased superoxide anion formation in endothelial cells during hyperglycemia: an adaptive response or initial step of vascular dysfunction / Graier W.F., Posch K., Fleischhacker E. et al. // *Diabetes Res. Clin. Pract.*- 1999.- Vol. 45, №9.- P.153-60
202. Induction of functional bradykinin b(1)-receptors in normotensive rats and mice under chronic angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment / M.E. Martin-Castano, J.P. Schanstra, F. Neau et al. // *Circulation.*- 2002.- Vol. 5, №2, P. 627-32.
203. Insulin down-regulates the inducible nitric oxide synthase pathway: nitric oxide as cause and effect of diabetes? / R.B. Stevens, D.E. Sutherland, J.D. Ansie et al. // *J. Immunol.* – 1997, Dec. – Vol. 9. – N 11. – P.5329-5335.
204. Interactions of the kallikrein-kinin and renin-angiotensin systems in experimental diabetes / J.P. Vora, T.T. Oyama, M.M. Thompson et al. // *Diabetes.*- 1997.- Vol. 46(1), №1.- P.107-12.

205. Is heterozygote alpha 1-antitrypsin deficiency a risk factor in the etiology of aortic aneurysm? / T. Hernandez-Richter, H.M. Schardey, U. Klueppelberg et al. // *Chirurg.*- 1997.- Vol. 68, №5.- P.513-6.
206. Kaplan A.P. Activation and control mechanisms of the plasma kinin-forming system and its relationship to coagulation and fibrinolysis / A.P. Kaplan // *J. Invest. dermatol.*- 1976.- v.67,№5 .- P. 635-637.
207. Katori M. Preventive role of renal kallikrein-kinin system in the early phase of hypertension and development of new antihypertensive drugs / M. Katori, M. Majima // *Adv. Pharmacol.*- 1998.- Vol. 44.- P.147-224.
208. Kim S. Molecular and Cellular Mechanisms of Angiotensin II- Mediated Cardiovascular and Renal Diseases / S. Kim, H. Iwao // *Pharmacol. Rev.*- 2000.- Vol.52, №3.- P.11-34.
209. Kininogen and prekallikrein increases in the blood of streptozocin-diabetic rats are normalized by insulin in vivo and in vitro / A.M. Rothschild, V.L.Melo, M.L. Reis et al. // *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol.*- 1999.- Vol. 360.- P. 217-220.
210. Kinins in humans / A.M. Duncan, A. Kladias, G.L. Jennings et al. // *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp. Physiol.*- 2000.- Vol. 278, №4.- P. 897-904.
211. Klein R. Epidemiology of proliferative diabetic retinopathy / R. Klein, B.E. Klein, S.E. Moss // *Diabetes Care.* – 1992. – Vol.15. – P.1875-1891.
212. Kshirsagar A.V. Effect of ACE inhibitors in diabetic and nondiabetic chronic renal disease: a systematic overview of randomized placebo-controlled trials / A.V. Kshirsagar // *American Journal of Kidney Diseases.*- 2000.- Vol. 35.- P.695-707.
213. Laakso M. Epidemiology of macrovascular disease in diabetes / M. Laakso, S. Lehto // *Diabetes Reviews.* – 1997. – Vol. 5, N 4. – P.294-315.
214. Lack of synergism between long-term poor glycaemic control and three gene polymorphism of the renin-angiotensin system on risk of developing diabetic nephropathy in Type 1 diabetic patients / L. Tarnow, T. Kjeld, E. Knudsen et al // *Diabetologia.*-2000.- Vol. 43.- P. 794-799.
215. Lahiri D.K. Method of isolating DNA / D.K. Lahiri, S. Bye., J.I. Nunberg // *J.of Biochemical and Biophysical methods.*-1992.-Vol.25.- P.193-205.

216. Localization of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II, angiotensin II receptors subtypes, and vasopressin in the hypothalamus / O. Jören, H. Imboden, W. Hauser et al. // *Brain Res.*- 1997.- Vol. 757.- P. 218-227.
217. Majima M. Effect of chronic blockade of the kallikrein-kinin system on the development of hypertension in rats / M. Majima, M. Katori // *Hypertension.*- 2001.- Vol.38(4).-P.21-24.
218. Maguire G.A. A continuous monitoring spectrophotometric method for the measurement of angiotensin converting enzyme in human serum / G.A. Maguire, C.P. Price // *Ann. Clin. Biochem.*- 1985.- Vol. 22.- P. 204-210.
219. Manley H.J. Role of angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with renal disease / H.J. Manley // *Am. J. Health Syst. Pharm.*- 2000.- Vol 57, №1.- Suppl 1.- P. 12-8.
220. Margolius H.S. Kallikrein, kinins and the kidney: what is going on in there / H.S. Margolius // *J. Lab.clin.med.*- 1978.- Vol.91, №5.- P.717-720.
221. Margolius H.S. Kallikreins, kinins and cardiovascular diseases: a short review / H.S. Margolius // *Biol. Res.*- 1998.- Vol. 31, №3.- P.135-41.
222. Maximal coronary flow reserve and metabolic coronary vasodilation in patients with diabetes mellitus / P.J. Nahser, R.E. Brown, H. Oskarsson et al. // *Circulation.* - 1995.- Vol. 91.- P. 635 – 640.
223. Medical Encyclopedia // www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003567.htm
224. Meta-analysis of association of insertion/deletion polymorphism of angiotensin I-converting enzyme gene with diabetic nephropathy and retinopathy / T. Fujisawa, H. Ikerami, Y. Kawaguchi et al. // *Diabetologia.*- 1998.- Vol. 41.- P. 47-53.
225. Mogensen C.E. The stages in diabetic renal diseases. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy / C.E. Mogensen, C.K. Christensen, E. Vittinghus // *Diabetes.*- 1983.- Vol. 32, №4.- P. 64-78.
226. Mogensen C.E. Microalbuminuria, blood pressure and diabetic renal disease: origin and development of ideas / C.E. Mogensen // *Diabetologia.* -1999.- Vol. 42.- P. 263-285.
227. Mombouli J.V. ACE inhibition, endothelial function and coronary artery lesions. Role of kinins and nitric oxide / J.V. Mombouli // *Drugs.* - 1997.- Vol. 54, Suppl 5.- P.12-22.

228. Monbouli G.V. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy / G.V. Monbouli, P.M. Vanhoutte // *J. Mol. Cell Cardiol.*- 1999.- Vol. 31, №1.- P. 61-74.
229. Navar L.G. Intrarenal angiotensin II augmentation in angiotensin II dependent hypertension / Navar L.G., Harrison-Bernard L.M. // *Hypertens. Res.*- 2000.- Vol.23, №4.- P. 291-301.
230. Nitric oxide and the renin-angiotensine system: contributions to blood pressure in young rat / M. Chabit, I. Blazy, J. Gogusev et al. // *Pediatr. Nephrol.*- 1997.- 11.- P.617-622.
231. Nordt T.K. Endothel und endogene Fibrinolyse / T.K. Nordt, C. Bode // *Z. Kardiol.*- 2000.- Vol. 89.-P.219-226.
232. Noorchasm N. Immunology of IDDM / N. Noorchasm, W. Kwok, Rabinovich A. // *Diabetologia.* - 1997.- Vol. 40.- P. 50-57.
233. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus / P. Dandona, K. Thusu, S. Cook et al. // *Lancet.* – 1996. – Vol. 347. – N 899. – P. 444-445.
234. Oxidative stress could precede endothelial dysfunction and insulin resistance in Indian Mauritius with impaired glucose metabolism / N.K. Gopaul, M.D. Manraj, A. Hebe et al. // *Diabetologia.*- 2001.- Vol. 44.- P. 706-712.
235. Pepine C.J. Clinical implications of endothelial dysfunction / C.J. Pepine // *Clin Cardiol.* - 1999.- Vol. 22, №6.- P. 795-9.
236. Perticone F. ACE-gene polymorphism and endothelial dysfunction in normal humans / F. Perticone, R. Ceravolo // *Hypertension.*- 1999.- Vol. 33, №5.- P.1164-8.
237. Plasma concentrations of C-reactive protein is increased in Type 1 diabetic patients without clinical angiopathy and correlates with markers of endothelial dysfunction: evidence of chronic inflammation / C.G. Schalkmijk, D.C.W. Poland, W. Dijk van et al. // *Diabetologia.* -1999.- Vol. 42.- P. 351-357.
238. Prediction of IDDM in general population: Strategies based on combination of autoantibody markers / P.J. Bingley, E. Bonifacio, A.J.K. Williams et al. // *Diabetes.* – 1997. – Vol.4, N 11. – P.1701-1710.
239. Prevalence and correlations of early microvascular complications in young type I diabetic patients: role of puberty / E. Boggetti, G. Calori, F. Meschi et al. // *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* – 1997. - Nov-Dec;10, N 6. – P.587-592.

240. Relationship between glomerular hyperfiltration and ACE insertion/deletion polymorphism in type 1 diabetic children and adolescents / B. Bouhanick, Y. Gallois, S. Hadjadj et al. // *Diabetes Care.*- 1999.- Vol. 22, № 4.- P.618-22.
241. Possible protective effects of kinins and converting enzyme inhibitors in cardiovascular tissues / H. Nolly., R. Miatello, M.T. Damiani et al. *Immunopharmacology.*- 1997.- Vol. 36(2-3), №6.- P.185-91.
242. Remme W.J. Modulation of the renin-angiotensin-aldosterone system – pivotal in heart failure treatment / W.J. Remme // *Z. Kardiol.*- 1999.- Vol. 88, №4.- P. 230-237.
243. Robinson N. The relationship between social deprivation and mortality in people with diabetes / N. Robinson, C.E. Lloyd, L.K. Stevens // *Diabet. Med.* – 1996. – Vol. 13. – Sup. 7. – P.37.
244. Role of endothelial kinins in control of coronary nitric oxide production / X. Zhang, G.A. Scicli, X. Xu et al. // *Hypertension.*- 1997.- Vol. 30(5), №11.- P. 1105-11.
245. Ruschitzka F. Angiotensin converting enzyme inhibitors and vascular protection in hypertension / F. Ruschitzka, G. Noll, T.F. Luscher // *J. Cardiovasc. Pharmacol.*- 1999 .-Vol. 34, Suppl 1.- P. 3-12.
246. Sawicki P.T. Do ACE inhibitors offer specific benefits in the antihypertensive treatment of diabetic patients / P.T. Sawicki // *Diabetologia.* -1998.- Vol. 41.- P. 598-602.
247. Serum alpha 1 antitrypsin and pulmonary emphysema / A. Shahid, A.A. Siddiqui, S. Aziz et al. // *J. Pak. Med. Assoc.*- 1996.- Vol. 46, №5.- P.102-106.
248. Serum alpha-1-antitrypsin concentration during normal and diabetic pregnancy / B. Lisowka-Myiak, C. Sytowicz, B. Wolf et al. // *Eur. J. Gynecol Reprod. Biol.*- 2001.- Vol. 99 (1), №11.- P. 53-6.
249. Sobrevia L. Dysfunction of the endothelial nitric oxide signaling pathway in diabetes and hyperglycaemia / L. Sobrevia, G.E. Mann // *Exp. Physiol.*- 1997.- Vol. 82.- P. 423- 452.
250. Stasisaitis D. Does alpha-1-proteinase inhibitor play a protective role in coronary atherosclerosis / D. Stasisaitis, V. Basy, R. Benetis // *Med. Sci. Monit.*- 2001.- № 7(4).- P.701-11.

251. Stenvinkel P. Short-term treatment with ramipril normalizes renal haemodynamics and the natriuretic response to a sodium load in Type 1 diabetic patients / P. Stenvinkel, J. Bolinger, A. Alvestrand // *Acta. Diabetol.*-1997.- Vol. 34.- P. 10-17.
252. The Eurodiab Ace Study Group and the Eurodiab Ace Substudy 2 Study Group Familial risk of Type 1 diabetes in European children // *Diabetologia.*-1998.- Vol. 41.- P. 1151-1156.
253. The EURODIAB IDDM Complications Study Group Different risk factors of microangiopathy in patients with Type 1 diabetes mellitus of short versus long duration / B. Karamanos, M. Porta, M. Songini et al. // *Diabetologia.*- 2001.- Vol. 43.- P. 348-355.
254. The influence of the angiotensin converting enzyme inhibitor lisinopril on the glomerular metabolism of the proteolytic enzymes of diabetic rats / C. Könen, C. Lang, H.P. Kempe, E. Werle et al. // *Acta Diabetol.*- 2000.- Vol. 37.- P.185-188.
255. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animals models in hypertension research / M. Bader, J. Peters, O. Baltatu et al. // *J. Mol. Med.*- 2001.- Vol. 79.-P.76-102.
256. Urinary protein excretion rate is the best independent predictor of ESRF in nondiabetic proteinuric chronic nephropathies. «Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia» (GISEN) / P. Ruggenetti, A. Perna, L. Mosconi et al. // *Kidney Int.*- 1998.- Vol.53, №5.- P. 1209-1216.
257. Vascular endothelial cells and renin-angiotensin system / H. Rakugi, Y. Nakamura, M. Ohishi, et al. // *Rinsho. Byori.*- 1998.- Vol. 46, №11.- P.1135-41.
258. Vascular factors and metabolic interaction in the pathogenesis of diabetic neuropathy / N.E. Cameron, S.E.M. Eaton, M.A. Cotter et al. // *Diabetologia.*-2001.- Vol. 44.- P. 1973-1988.
259. Vanhoutte P.M. Endothelial dysfunction and inhibition of angiotensin converting enzyme / P.M. Vanhoutte // *Eur Heart J.*- 1998.- Vol. 19, №11.- P. 17-15.
260. Willa A. Endothelium in insulin resistance and diabetes / A. Willa, J. Manuel, A. Mark // *Diabetes Reviews* – 1997 – Vol. 5. – N 4. –P.343-352.
261. Wong P. Dual effects of bradykinin on prostaglandin metabolism: relationship to the dissimilar vascular action of kinins / P. Wong, A.D. Terragno // *Prostaglandins.*- 1977.- v.6.- P. 113-1125.

262. World Health Organization/International Diabetes Federation Europe, Diabetes care and research in Europe: the St Vincent Declaration // Diabet. Med. – 1990. – Vol. 7. – 360 p.
263. Worldwide increase in incidence of the Type 1 Diabetes – the analysis of the data on published incidence trends / P. Okahamo, S. Vaananen, M. Karvonen et al. // Dabetologia.-1999.- Vol. 42.- P. 1395-1403.
264. Young R. Nerve function and metabolic control in teenage diabetes / R. Young // Diabetes.- 1983.- Vol. 32.- P. 142-147.
265. Zuccollo A. The involvement of kallikrein-kinin system in diabetes type I (insulitis) / A. Zuccollo, M. Navarro, M. Frontera // Immunopharmacology.- 1999.- Vol. 45 (1-3), №12.- P.69-74.