

На правах рукописи

ФОКИНА АНАСТАСИЯ СЕРГЕЕВНА

**ВЛИЯНИЕ КОНТРОЛЯ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА НА
ТЕЧЕНИЕ НЕЙРОПАТИИ И СОСТОЯНИЕ
МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ
ДИАБЕТОМ 2 ТИПА**

3.1.19. Эндокринология

3.1.24. Неврология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научные руководители:

Зилов Алексей Вадимович

кандидат медицинских наук, доцент

Строков Игорь Алексеевич

кандидат медицинских наук

Официальные оппоненты:

Гурьева Ирина Владимировна

доктор медицинских наук, профессор, заведующая сектором реабилитации и профилактики инвалидности вследствие эндокринной патологии и формирования здорового образа жизни ФГБУ «Федеральное бюро медико-социальной экспертизы» Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации

Камчатнов Павел Рудольфович

доктор медицинских наук, профессор кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики лечебного факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» ____ 2022 года, в ____ часов на заседании диссертационного совета 21.1.045.01 в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России по адресу: 117292, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д.11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России или на сайте <https://www.endocrincentr.ru/>

Автореферат разослан «_____» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Мазурина Наталия Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Актуальность работы определяется высоким прогрессирующим ростом распространенности сахарного диабета 2 типа в мире. Согласно последним данным Международной Федерации Диабета (IDF), в настоящий момент численность пациентов с сахарным диабетом (СД) во всем мире составляет 537 млн. человек, из них две трети трудоспособного возраста. В Российской Федерации – около 7,4 млн., причем в каждом втором случае СД не диагностирован. По имеющимся прогнозам, к 2045 году СД будут страдать примерно 785 млн. человек [IDF diabetes atlas. 10th ed., 2021]. При отсутствии действенных превентивных мер, прогнозируемое увеличение количества пациентов с СД остро ставит задачу не только адекватной коррекции гликемии, но и предотвращения развития осложнений, а также их лечения.

Диабетическая периферическая нейропатия (ДПН) представляет собой уникальное нейродегенеративное заболевание периферической нервной системы и является одним из наиболее частых и грозных осложнений СД. По данным мировой литературы распространенность ДПН среди пациентов с СД представлена в очень широком диапазоне (5-100%) [Karlsson P. et al., 2021]. Столь большой разброс полученных результатов может быть обусловлен отсутствием четкого определения понятия диабетической нейропатии, многообразием ее проявлений, использованием различных диагностических методов и критериев постановки диагноза (особенно, если не применяются электрофизиологические методы, позволяющие выявлять субклиническую форму ДПН), а также различиями между исследуемыми группами пациентов. Таким образом, ориентироваться можно только на результаты исследований, проведенные с участием большого количества пациентов, в которых использовались международные критерии диагностики ДПН и, обязательно включающие в себя результаты электронейромиографии (ЭНМГ) [Дедов И.И., Шестакова М.В. Сахарный диабет, 2019].

Всё больше доказательств находит и тот факт, что изменения со стороны периферической нервной системы, соответствующие самой ранней (субклинической) стадии диабетической нейропатии, выявляются уже на стадии нарушения толерантности к глюкозе (НТГ) [Stino A.M., 2017].

Для выявления ранних признаков нейропатии (на субклинической стадии) у пациентов с СД необходимо применять наиболее чувствительные методы диагностики [Tesfaye S. et al., 2010]. К таким современным методикам относится анализ плотности интраэпидермальных нервных волокон (ПИНВ) и их морфологических изменений, а также лазерная конфокальная микроскопия (КМР) нервных волокон роговицы. Диагностическая и предиктивная ценность данных методик очень высока, - полученные показатели достоверно отражают состояние тонких немиелинизированных нервных волокон, позволяют в динамике оценивать происходящие в них изменения, а следовательно, появляется возможность максимально раннего назначения лечения, направленного на восстановление их структуры.

Следует отметить, что в настоящее время в России нет достаточного количества обобщенных данных о ранней (субклинической/бессимптомной) стадии ДПН, так как не проводилась оценка её нейрофизиологических и морфологических признаков. Также отсутствуют проспективные исследования, направленные на изучение морфологических изменений периферической нервной системы в динамике. До сих пор многие вопросы остаются неизученными, например: насколько обратимы изменения, возникающие в нервном волокне и, обратимы ли они в принципе, при стойкой длительной нормализации углеводного обмена?

Таким образом, лучшее понимание патогенеза ДПН при помощи изучения морфологической структуры нервных волокон, в дальнейшем будет иметь решающее значение для успешного разрешения всех вопросов, касающихся данного заболевания: от профилактики до его лечения.

Цель исследования

Охарактеризовать субклиническую стадию диабетической периферической нейропатии, используя функционально-морфологические методы, изучить возможность обратимости выявленных нарушений на фоне улучшения гликемического контроля.

Задачи исследования

1. Оценить распространенность ДПН у пациентов с СД 2-го типа, находящихся в многопрофильном стационаре, используя клинические и электрофизиологические методы диагностики (электронейромиография).

2. Провести сравнительную оценку состояния тонких интраэпидермальных нервных волокон методом пункционной биопсии кожи («панч»-биопсия) и тонких нервных волокон роговицы с применением метода конфокальной микроскопии у пациентов с СД 2-го типа и субклинической стадией нейропатии.
3. Изучить основные параметры макро- и микроциркуляции (в т.ч. жесткость артерий и функцию эндотелия) у пациентов СД 2-го типа и субклинической стадией нейропатии.
4. Проанализировать влияние улучшения гликемического контроля ($HbA1c \leq 6,5\%$) на состояние тонких и толстых нервных волокон, состояние микроциркуляции у пациентов с СД 2-го типа и субклинической стадией нейропатии.

Научная новизна

Впервые в диссертационном исследовании в России были применены, оценены и объединены все актуальные и современные методы по диагностике диабетической периферической нейропатии у пациентов с СД 2-го типа.

Продemonстрировано значение современных микроскопических методов, применяющихся для морфологической оценки нейропатии тонких волокон, с целью раннего выявления поражения периферических нервов при СД 2-го типа.

Впервые проведена комплексная оценка основных параметров макро- и микроциркуляции у пациентов с СД 2-го типа и субклинической нейропатией методом цифровой капилляроскопии, а также новой технологии определения скорости распространения пульсовой волны и функции эндотелия.

Впервые в пилотном исследовании изучено влияние улучшения гликемического контроля на параметры микроциркуляции, на электрофизиологические характеристики толстых волокон и морфологические показатели тонких волокон периферических нервов у пациентов с СД 2-го типа и субклинической стадией диабетической нейропатии.

Теоретическая и практическая значимость работы

1. Выявлена высокая распространенность субклинической стадии диабетической периферической нейропатии у пациентов с СД 2-го типа, в том числе и при небольшой длительности течения СД.
2. Оценка состояния тонких нервных волокон методом «панч»-биопсии и конфокальной микроскопии роговицы в сочетании с исследованием состояния микроциркуляции является прогностически значимой моделью, позволяющей выделить среди пациентов с СД 2-го типа и субклинической нейропатией, нуждающихся в более интенсивном наблюдении/лечении.
3. Результаты нашей работы показывают, что нейрофизиологическое обследование является оптимальным для диагностики ДПН на субклинической стадии.
4. Приближение параметров углеводного обмена к физиологической норме ($HbA1c \leq 6,3\%$) у пациентов с СД 2-го типа и субклинической стадией нейропатии способно приводить к возможности реинервации тонких нервных волокон и улучшения состояния системы микроциркуляции.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Показана высокая частота встречаемости всех форм диабетической периферической нейропатии у пациентов с СД 2-го типа (75%): симптомная нейропатия выявлялась у 38% пациентов, субклиническая стадия нейропатии (бессимптомная) – у 37%.
2. Несмотря на поиск новых диагностических методов для выявления ДПН на субклинической стадии, электронейромиография по-прежнему является «золотым стандартом», и может использоваться в научно-клинических исследованиях.
3. Метод пункционной биопсии кожи с определением плотности интраэпидермальных нервных волокон является информативным для раннего выявления субклинической формы ДПН, однако, в силу инвазивности процедуры, его повсеместное применение ограничено.
4. Изменение хода и структуры тонких безмиелиновых нервных волокон при субклинической ДПН возможно анализировать при помощи неинвазивного метода конфокальной микроскопии роговицы, используя авторские коэффициенты и алгоритмы подсчёта.
5. Комплексное определение параметров макро- и микроциркуляции позволяет максимально рано выявлять признаки сосудистых поражений при СД 2-го типа.

6. Оптимизация и удержание гликемического контроля (не менее 5 месяцев) может способствовать процессу реинервации тонких нервных волокон при ДПН.

Апробация работы

Официальная апробация диссертационной работы состоялась на научной конференции кафедры эндокринологии №1 Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет) 10 февраля 2022г.

Материалы и основные положения диссертации были представлены на XII Международном конгрессе «Метаболический синдром, сахарный диабет 2 типа и атеросклероз» (С.-Петербург, 2017), 27^{ом} ежегодном заседании Европейской ассоциации по изучению диабета (Португалия, 2017), 78^й научной сессии Американской диабетологической ассоциации (США, 2018).

По теме диссертационной работы опубликовано 7 научных работ, в том числе 6 публикации в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на русском языке в объеме 147 страниц машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, главы результатов собственного исследования, их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Диссертация иллюстрирована 40 таблицами, 49 рисунками. Библиографический указатель включает 241 источник отечественной и зарубежной литературы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Данная работа состоит из двух последовательно выполненных исследований: первое – одномоментное открытое поперечное исследование - скрининг когорты пациентов с СД 2-го типа с целью изучения распространенности всех стадий ДПН и определения факторов риска ($n = 109$); второе – динамическое проспективное контролируемое исследование – оценка влияния стойкой длительной нормализации гликемии (в течение 5-ти месяцев) на функциональные и структурные изменения нервного волокна, а также состояние микроциркуляции у

пациентов с СД 2 типа и субклинической стадии ДПН (n = 40). Полученные результаты были сравнимы с показателями группы контроля.

Этап I. Одномоментное открытое поперечное исследование (скрининг), n=109

В исследование по распространенности и изучению факторов риска развития ДПН у пациентов с СД 2-го типа были включены пациенты, находящиеся в многопрофильном стационаре Университетской Клинической Больницы №2 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Критерии включения:

1. пациенты обоих полов в возрасте от 40 до 75 лет;
2. наличие СД 2-го типа;
3. наличие или отсутствие неврологической симптоматики

Критерии исключения:

1. СД 1-го типа;
2. декомпенсация сопутствующих соматических заболеваний;
3. синдром диабетической стопы (СДС);
4. наличие кардиостимулятора (в связи с неоднократным проведением электрофизиологического исследования)

Проведение исследования было одобрено Межвузовским комитетом по этике (протокол № 10-11 от 17.11.2011г.). Все пациенты получали подробную информацию о проводимом исследовании и давали письменное информированное согласие на участие.

Протокол исследования

В соответствии с критериями включения и исключения в исследование было набрано **109 пациентов** с СД 2-го типа независимо от наличия или отсутствия нейропатической симптоматики. Контрольная группа наблюдения составила 10 человек без СД, соотносимых с основной группой по полу и возрасту.

Диагноз СД 2-го типа подтверждался на основании материалов первичной документации, на основе анамнестических данных и особенностей клинической картины заболевания.

Всем пациентам с СД 2-го типа был проведен композитный неврологический тест с использованием клинических диагностических шкал TSS и NIS-LL + 7 ЭНМГ-характеристик состояния периферических нервов ног.

Диагностика артериальной гипертензии (АГ) проводилась согласно рекомендациям ВНОК стандартными методами с учетом анамнеза заболевания, измерения АД. Всем пациентам проводилось ЭКГ-исследование.

Этап 2. Динамическое проспективное контролируемое исследование, n=40

Основными задачами данного исследования было провести клинικο-морфологическую оценку состояния тонких нервных волокон, оценить состояние макро- и микроциркуляции, а также оценить возможность обратимости выявленных нарушений на фоне улучшения гликемического контроля у пациентов с СД 2-го типа и субклинической (бессимптомной) стадией ДПН.

Критерии включения:

1. пациенты с СД 2-го типа с подтвержденной субклинической стадией ДПН

Критерии исключения:

1. периферические нейропатии недиабетической этиологии;
2. заболевания роговицы глаза

Протокол исследования

Наличие субклинической стадии ДПН было подтверждено при ЭНМГ-обследовании: выявлены изменения не менее 2-х показателей в 2-х и более двигательных и чувствительных периферических нервах ног, при отсутствии позитивной и выраженной негативной неврологической симптоматики.

- Всем пациентам проводилось клинικο-лабораторное обследование: исследование микроциркуляции ногтевого ложа пальца руки, определение скорости распространения пульсовой волны и эндотелиальной функции, а также измерение АД и пульса.
- Для исследования состояния тонких нервных волокон и сосудистого обеспечения кожи была выполнена перфорационная биопсия кожи голени с последующим иммуногистохимическим анализом плотности нервных волокон (маркер PGP 9.5) в эпидермисе и дерме, а также количественная оценка содержания эндотелиальных клеток в капиллярах кожи (маркер CD 34).
- Для оценки состояния тонких нервных волокон роговицы была проведена лазерная конфокальная микроскопия роговицы.

В основную группу наблюдения ($n = 40$) вошли пациенты с СД 2-го типа, достигшие целевого уровня гликированного гемоглобина ($HbA1c \leq 6,5\%$) и, находившиеся в целевом диапазоне гликемии в течение всего периода наблюдения (5 месяцев).

В качестве контроля полученных результатов использовались показатели, оцененные у десяти ($n = 10$) условно здоровых добровольцев из **контрольной группы**, соотносимые с группой наблюдения по основным клинико-демографическим характеристикам.

У большинства пациентов, включенных в исследование, было подтверждено наличие АГ, по поводу которой проводилось сходное медикаментозное лечение: ингибиторы АПФ или сартаны (87%), β -блокаторы (50%), диуретики (60%), антагонисты кальциевых каналов (24%). В связи с наличием дислипидемии почти половина обследованных пациентов (48%) получала терапию статинами.

Основные характеристики пациентов представлены в таблице 1.

Таблица 1. Антропометрические и клинические характеристики участников исследования

Параметры	n = 40
Возраст, годы [95-й% ДИ]	56,5 [51,3;61,0]
Пол (м/ж)	8/32
Длительность СД 2, годы [95-й% ДИ]	2,5 [1,0;5,0]
Наличие АГ, n (%)	35 (88%)
Длительность АГ, годы [95-й% ДИ]	10,0 [5,0;12,5]
Курение, n (%)	4 (10%)
Терапия статинами, n (%)	19 (48%)
ИМТ, $\text{кг}/\text{м}^2$	$32,6 \pm 4,0$
HbA1c, исходно	6,5 [6,3;6,7]
HbA1c, через 5 мес.	6,3 [6,1;6,5]
Общ.Хс (до 6,2 ммоль/л)	5,4 [4,6;6,0]
ЛПНП (0-3,3 ммоль/л)	$3,2 \pm 0,96$

Параметры	n = 40
САД, исходно, мм рт.ст.	120,8± 12,7
САД, через 5 мес., мм рт.ст.	121,1± 13,5
ДАД, исходно, мм рт.ст.	74,6 ± 13,6
ДАД, через 5 мес., мм рт.ст.	73,8 ± 8,0
ЧСС, уд/мин	74 ± 8
ЧСС через 5 мес., уд/мин	72 ± 7

Примечание: СД 2 – сахарный диабет 2-го типа, АГ – артериальная гипертензия, ИМТ – индекс массы тела, HbA1c – гликированный гемоглобин, Общ. Хс – общий холестерин, ЛПНП – липопротеиды низкой плотности, САД – систолическое артериальное давление, ДАД – диастолическое артериальное давление, ЧСС – частота сердечных сокращений

Клинические методы исследования

Всем пациентам проводилась диагностика диабетической нейропатии: 1) оценка клинических симптомов (жалоб), 2) определение клинических признаков поражения периферических нервов (осмотр и оценка внешнего вида нижних конечностей (st.localis), оценка состояния периферической чувствительности).

Для оценки различных видов поверхностной (температурной, вибрационной, тактильной, болевой) и глубокой чувствительности (определение мышечно-суставного чувства), оценки сухожильных рефлексов (коленного, ахиллова), силы в различных группах мышц рук и ног, применялись стандартные методики.

Клинические симптомы и признаки поражения периферических нервов оценивали при помощи диагностических шкал:

- шкала TSS (Total Symptoms Score) - оценка выраженности нейропатических симптомов за последние 24 часа
- шкала NIS LL (Neuropathy Impairment Score Low Limbs) - шкала нейропатических нарушений в ногах, с оценкой мышечной силы, сухожильных рефлексов и состояния чувствительности различных модальностей.

Лабораторные исследования

Исследования выполнялись на базе межклинической биохимической лаборатории ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет).

Динамический контроль уровня глюкозы крови проводился при помощи индивидуального глюкометра «Contour TS» («Bayer», Германия), соответствующий ГОСТ Р ИСО 15197-2015 по аналитической и клинической точности.

Биохимические анализы сыворотки крови выполнялись на биохимическом анализаторе «Hitachi» («Boehringer Mannheim», Япония) по стандартной методике производителя.

Определение гликированного гемоглобина проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на анализаторе «Diastat» («BioRad», США). В качестве значения «нормы» принят уровень HbA1c до 6,0% (согласно ВОЗ, 2011).

Инструментальные методы исследования

1. Электронейромиография (ЭНМГ)

Исследование проводилось на базе клиники нервных болезней УКБ №3 ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет).

С целью объективизации состояния соматических нервных волокон (двигательных и чувствительных) был применен нейрофизиологический метод стимуляционной электронейромиографии на приборе «Viking IV P» Nicolet Biomedical (США). Оценка двигательных нервов проводилась путем стимуляции малоберцового (n.peroneus) и большеберцового нервов (n.tibialis) с анализом амплитуды М-ответа, скорости распространения возбуждения (СРВ) и резидуальной латентности (РЛ). В качестве сенсорного нервного волокна был исследован икроножный нерв (n.suralis) с последующим анализом амплитуды S-ответа и СРВ.

Исследование проводилась на базе клиники нервных болезней им. А.Я. Кожевникова ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский Университет).

2. Исследование микроциркуляции крови

Исследование проводилось на базе НКЦ ОАО «РЖД».

Для исследования параметров микроциркуляции применялся цифровой капилляроскоп «Капилляроскан-1» компании «Новые энергетические технологии» (Россия), который позволяет получить изображения капилляров ногтевого ложа руки с увеличением, достигающим 125 и 400 раз. Высокоскоростная видеокамера прибора (до 100 кадров в секунду) позволяет достаточно точно определять скорость кровотока в различных отделах капилляров. Обработка первичной информации проводилась при помощи программного обеспечения, позволяющего просматривать записанные изображения, оценивать плотность капиллярной сети, измерять диаметры капилляров во всех отделах: артериальном, переходном, венозном, определять величину перикапиллярной зоны.

3. Исследование скорости распространения пульсовой волны (СРПВ), эндотелиальной функции и артериального давления

Исследование проводилось на аппарате «Тонокард» (Россия), конструктивной особенностью которого является использование высокочувствительных датчиков, располагаемых в проекции плечевой артерии и артерии запястья.

После того как манжеты, соединенные датчиками, закреплены на руке, в компьютер вводится точно измеренное расстояние между ними (L). Время (t), за которое пульсовая волна проходит это расстояние, определяется автоматически. СРПВ вычисляется как отношение L/t . Каждому пациенту проводилось шесть последовательных измерений СРПВ.

Эндотелиальная функция (ЭФ) определялась следующим образом: в течение 30-ти секунд с помощью манжеты, наложенной на запястье и соединенной с датчиком, производился автоматический замер амплитуд пульсовых волн артерий запястья. Затем в манжету, расположенную на плече, подавался воздух под давлением, превышающем САД на 30-40 мм рт.ст.

По окончании 3-ехминутной гиперемии в течение 60-ти секунд проводился повторный замер амплитуд пульсовых волн на артериях запястья. ЭФ определялась как отношение амплитуд пульсовых волн до и после пережатия, выраженное в процентах.

Двукратное измерение АД проводилось автоматически на другой руке через две минуты после пробы с гиперемией.

4. Биопсия кожи

Исследование проводилась на базе нейрохирургического отделения клиники нервных болезней УКБ №3 ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет).

Для обнаружения ранних признаков сенсорной нейропатии и выявления поражения тонких немиелинизированных нервных волокон применялась методика прямой визуализации интраэпидермальных нервов – пункционная биопсия кожи.

В процессе обследования, при помощи специального инструмента “панча”, выполнялась перфорационная (инвазивная) биопсия кожи на боковой поверхности латеральной лодыжки под местной анестезией 1% лидокаином (глубина перфорации составляет 3 мм, наложение швов не требовалось). Полученный образец включал в себя эпидермис и поверхностные слои дермы (сосочковый и сетчатый).

В дальнейшем, выявление нервных волокон в биоптатах осуществлялось посредством иммуногистохимических методик.

5. Лазерная конфокальная микроскопия роговицы

Исследование проводилась на базе ФГБНУ «НИИ Глазных болезней» (отдел патологии оптических сред глаза).

Для проведения лазерной конфокальной микроскопии роговицы (КМР) использовался Гейдельбергский томограф (*HRT III*) с применением специального роговичного модуля RostockCornea (RC; HeidelbergEngineering, Heidelberg, Germany).

В исследовании применён оригинальный алгоритм анализа и интерпретации конфокальных снимков, разработанного в ФГБНУ «НИИ ГБ» (Изобретение №2014145271).

Новый подход к морфометрическому анализу нервных волокон роговицы (НВР) основан на объективном описании направленности НВР и алгоритме вычисления коэффициентов анизотропии направленности (упорядоченности) НВР ($K_{\Delta L}$) и симметричности направленности НВР (K_{sym}). Для дальнейшей обработки полученных результатов использовалось авторское программное обеспечение Liner 1.2S [Аветисов С.Э. и др., 2015]. Данный метод может быть использован в диагностике ряда системных нейропатий (в том числе ДПН), а также как критерий локального состояния иннервации роговицы.

Морфологические методы оценки нейропатии тонких волокон

Исследование проводилось на кафедре патологической анатомии им. акад. А.И. Струкова ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет).

В морфологическое исследование состояния интраэпидермальных нервных волокон и интрадермальных сосудов вошло 50 биоптатов кожи: 40 пациентов основной группы с СД 2-го типа и субклинической ДПН (исходно и через 5 месяцев наблюдения) и 10 биоптатов кожи от группы здорового контроля.

- *морфометрический метод*: в качестве маркера нервных волокон были использованы антитела к нейропептиду PGP 9.5. PGP 9.5 широко распространён в периферической нервной системе и является неспецифическим панаксональным маркером.

Проводилась морфометрия гистологических срезов биоптатов кожи с оценкой среднего количества нервных окончаний, окрашенных PGP 9.5, и сосудов микроциркуляторного русла, окрашенных CD34 (маркер эндотелия сосудов), в пяти полях зрения при увеличении $\times 200$ на микроскопе AXIOImagerA2 CarlZeissc использованием установленной морфометрической программы.

- *иммуногистохимический метод*: иммуногистохимическое исследование выполнялось по стандартной методике с последующей полуколичественной и количественной оценкой результатов реакций: PGP 9.5 оценивали по среднему количеству положительно окрашенных нервных окончаний в коже в 5 полях зрения при увеличении $\times 200$ и $\times 400$. Маркер PGP 9.5 экспрессировался в виде коричневого окрашивания нервных волокон.

Оценка иммуногистохимической экспрессии CD 34 осуществлялась путем подсчета положительно окрашенных эндотелиальных клеток в капиллярах кожи, а количество капилляров – по среднему числу положительно окрашенных капилляров в 5-ти полях зрения при

увеличении $\times 400$. Маркер CD 34 экспрессировался в виде коричневого окрашивания эндотелия сосудов.

Статистический анализ

Статистический анализ проведен с использованием стандартного пакета статистических программ («Microsoft Excel», Origin 6.1, IBM SPSS 22).

Распределения ряда параметров были приближены к нормальному, эти данные представлены в виде «среднее \pm стандартное отклонение». Параметры, распределения которых были отличны от нормального, описывались как средняя \pm 95-ти% доверительный интервал (ДИ) и в виде Me [25%; 75%], где Me – медиана, а 25 и 75 – первый и третий квартили. Для сравнения таких величин использовались непараметрические критерии: для сравнения зависимых групп использовался непараметрический критерий Вилкоксона, для сравнения независимых групп – критерий Манна-Уитни. Для сравнения независимых групп по количественным показателям использовался Т-критерий независимых выборок, для сравнения связанных групп – Т-критерий для парных выборок.

Частотные показатели сравнивались при помощи критерия Хи-квадрат, при ожидаемой частоте менее 5, использовался точный критерий Фишера.

При сравнении трех и более независимых выборок при соблюдении однородности дисперсий (критерий Ливиня) применялся однофакторный дисперсионный анализ, при несоблюдении этого условия – ранговый критерий Краскала-Уоллиса для k -выборок, затем проводились попарные сравнения.

Для определения взаимозависимости двух переменных использовались коэффициенты корреляции по смешанным моментам Пирсона или ранговой корреляции Спирмена. Значимыми во всех случаях считались различия при $p \leq 0,05$. Связь между истинно числовыми показателями анализировали при помощи расчета коэффициента корреляции (r) и построения рисунка совместного распределения. Результаты исследований представлены в виде таблиц или диаграмм.

В исследовании проводился многофакторный анализ с использованием модели пропорциональных рисков Кокса. Эта модель позволяет оценить вероятность наступления события (в нашем случае возникновения ДПН на момент обследования) с учетом влияния различных независимых (не коррелирующих между собой) факторов. Величина $\exp(B)$ соответствует спрогнозированному изменению риска возникновения ДПН при изменении независимой переменной на 1. Также, приведена значимость каждого фактора в риске возникновения ДПН и доверительный интервал для оценки $\exp(B)$. Методику прогнозирования развития ДПН создавали при помощи многомерного линейного

регрессионного анализа. Точность методики оценивали при помощи ROC-кривой.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

I. Изучение распространенности стадий ДПН и определение факторов риска её развития у пациентов с СД 2 типа

1.1. Распространенность ДПН у пациентов с СД 2-го типа

Проведенное когортное исследование 109-ти пациентов с СД 2-го типа, наблюдающихся в многопрофильном стационаре (клинический центр Сеченовского Университета), выявило высокую распространенность ДПН, составившую **75%** ($n = 83$, из них 34% мужчин и 66% женщин) (рис.1).

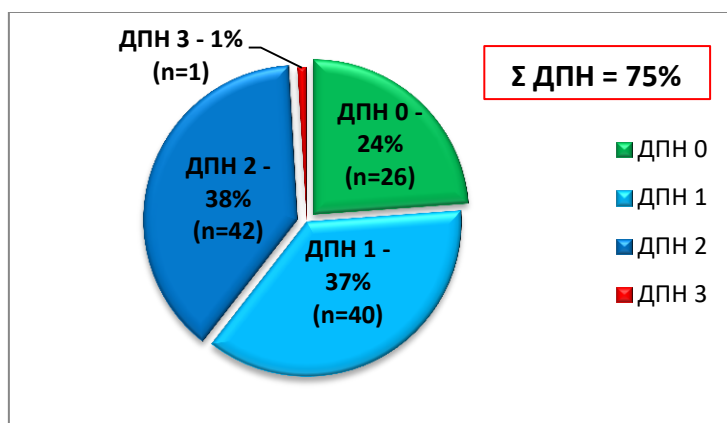


Рисунок 1. Различия стадий диабетической периферической нейропатии среди обследованных пациентов с СД 2-го типа ($n = 109$)

Примечание: ДПН 0 – отсутствие клинических признаков периферической нейропатии, ДПН 1 – субклиническая стадия ДПН, ДПН 2 – клиническая стадия ДПН, ДПН 3 – тяжелая стадия ДПН

Краткая характеристика пациентов приведена в таблице 2.

Таблица 2. Распределение пациентов по полу, возрасту, длительности СД 2-го типа и наличию/отсутствию ДПН

Параметры	Общая группа $n = 109$	Мужчины $n = 35$	Женщины $n = 74$
Возраст, годы	$58,5 \pm 8,6$	$55,9 \pm 8,6$	$59,7 \pm 8,5$
Ме длительности СД 2-го типа, годы	5 [2; 9]	5 [2; 7]	5 [2; 9]
Пациенты с ДПН, n (%)	83 (75)	28 (34)	55 (66)
Пациенты без ДПН, n (%)	26 (24)	7 (23)	19 (77)

Примечание: Ме [25%75%], где Ме – медиана, а 25 и 75 – первый и третий квартили

II. Оценка влияния факторов риска на развитие и прогрессирование ДПН при СД 2-го типа

При статистической обработке полученных данных выявлена достоверная взаимосвязь между длительностью СД 2-го типа ($p = 0,002$), возрастом пациентов ($p = 0,010$), а также средним показателем компенсации углеводного обмена (HbA1c) ($p < 0,001$) и утяжелением стадий ДПН (рис.2-4).

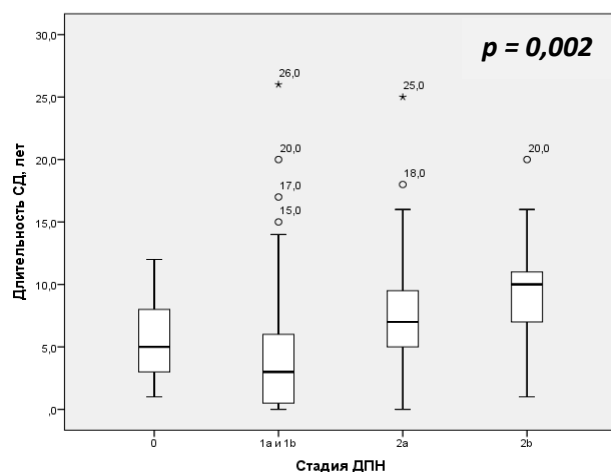


Рисунок 2. Длительность СД 2-го типа и стадии диабетической периферической нейропатии

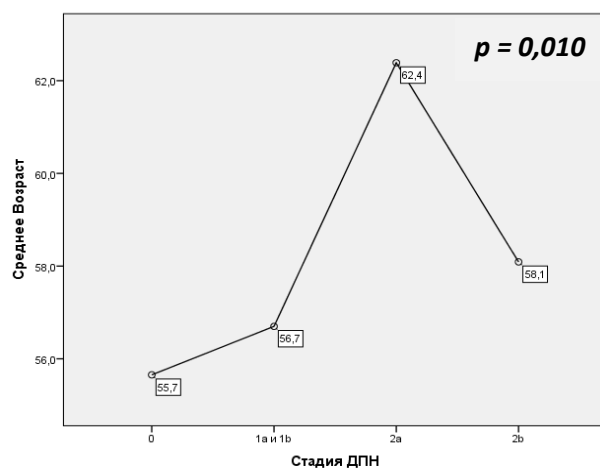


Рисунок 3. Соотношение медианы (Me) возраста и стадий ДПН среди пациентов с СД 2-го типа

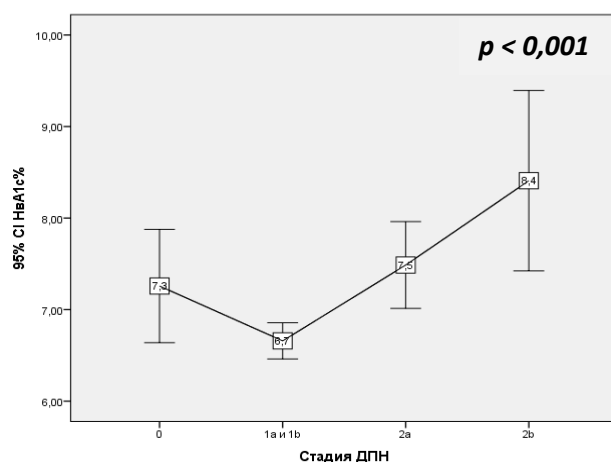


Рисунок 4. Среднее соотношение показателя нормализации углеводного обмена (HbA1c, %) и стадии диабетической периферической нейропатии

Для выявления независимых факторов, ассоциированных с наличием ДПН у пациентов с СД 2-го типа, был проведен многофакторный анализ (табл.3).

Таблица 3. Независимые факторы, ассоциированные с наличием ДПН у пациентов с СД 2-го типа на момент обследования

Показатель	<i>p</i>	Exp(B)	95%-й ДИ для Exp(B)
Пол	0,637	-	-
ИМТ	0,326	-	-
HbA1c	0,000	0,7	[0,51; 0,98]
Наследственность	0,294	-	-
Самоконтроль	0,525	-	-
Курение	0,135	-	-
Алкоголь	0,730	-	-
Физическая активность	0,179	-	-
ОНМК в анамнезе	0,698	-	-
Креатинин	0,303	-	-
Диаб.нефропатия (ХБП С2)	0,000	8,26	[3,76; 18,15]
Ретинопатия	0,342	-	-

Примечание: ИМТ - индекс массы тела, HbA1c – гликированный гемоглобин, ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения, ХБП – хроническая болезнь почек, стадия С2 – незначительно сниженная функция почек (СКФ 60-89 мл/мин/1,73м²)

Из таблицы следует, что значимый вклад в изменение риска возникновения ДПН вносит изменение уровня HbA1c и наличие диабетической нефропатии (ХБП С2), при которой риск ДПН увеличивается в 8 раз (от 3,8 до 18-ти).

III. Характеристика субклинической стадии ДПН у пациентов с СД 2 типа

3.1. Результаты пункционной биопсии кожи

В группе пациентов с СД 2-го типа и ДПН-1 показатель атрофии эпидермиса был статистически значимо выше, чем в контрольной группе здоровых лиц ($p \leq 0,042$) (рис.5).

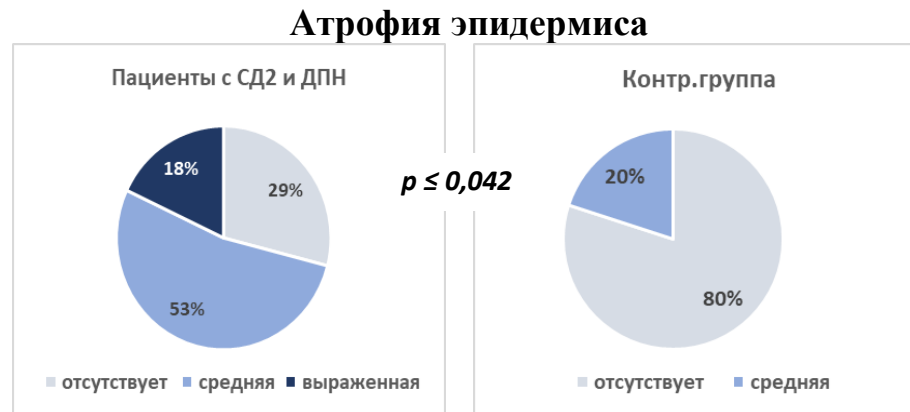


Рисунок 5. Выраженность атрофии эпидермиса у пациентов с СД 2-го типа и субклинической стадией ДПН и в контрольной группе здоровых лиц

В собственно дерме пациентов с СД 2-го типа и субклинической стадией ДПН статистически значимые отличия были выявлены по менее выраженному показателю ангиогенеза по сравнению с группой контроля ($p = 0,001$) (рис.6).

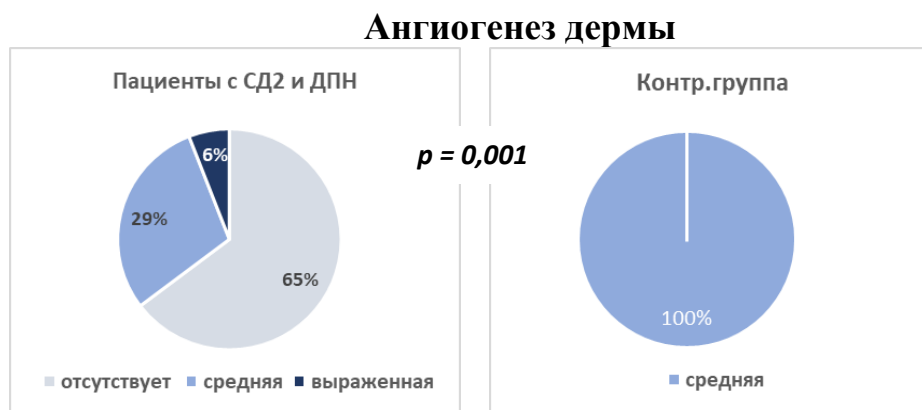


Рисунок 6. Выраженность ангиогенеза собственно дермы у пациентов с СД 2-го типа и субклинической стадией ДПН и в контрольной группе здоровых лиц

Ангиогенез в коже оценивался по экспрессии маркера CD-34 в цитоплазме клеток эндотелия сосудов, фибробластов и макрофагов в дерме.

Экспрессия CD-34 в контрольной группе здоровых лиц была высокой во всех исследуемых клетках по сравнению с группой пациентов с СД 2-го типа и ДПН-1 (рис.7).

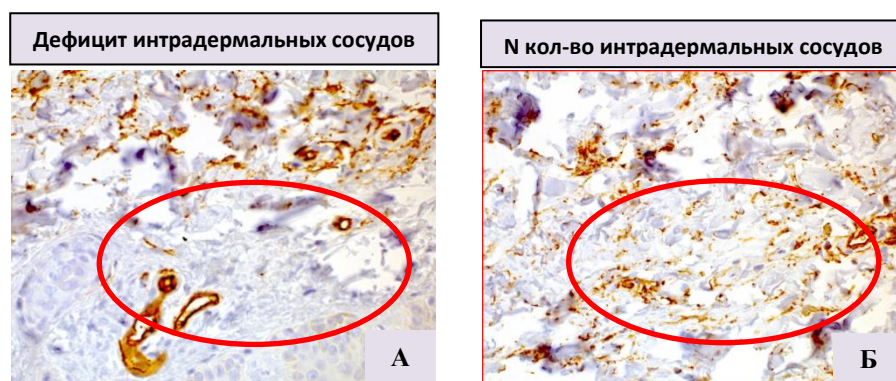


Рисунок 7. Иммуногистохимическое исследование маркера CD-34 (выявляется в виде коричневого окрашивания эндотелия сосудов) в биоптатах кожи пациента с СД 2-го типа и субклинической стадией ДПН (А) и условно здорового добровольца (Б) (увеличение x400). Иммунопероксидазная реакция.

У пациентов с СД 2-го типа и субклинической стадией ДПН количество нервных волокон в собственно дерме статистически значимо ниже по сравнению с контрольной группой здоровых лиц ($p = 0,016$) (Рис.8-9).

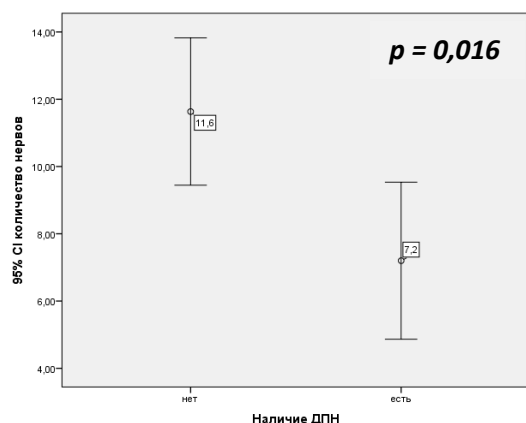


Рисунок 8. Сравнение количества тонких нервных волокон в собственно дерме у пациентов с СД 2-го типа и субклинической стадией ДПН и условно здоровых добровольцев (маркер PGP 9.5)

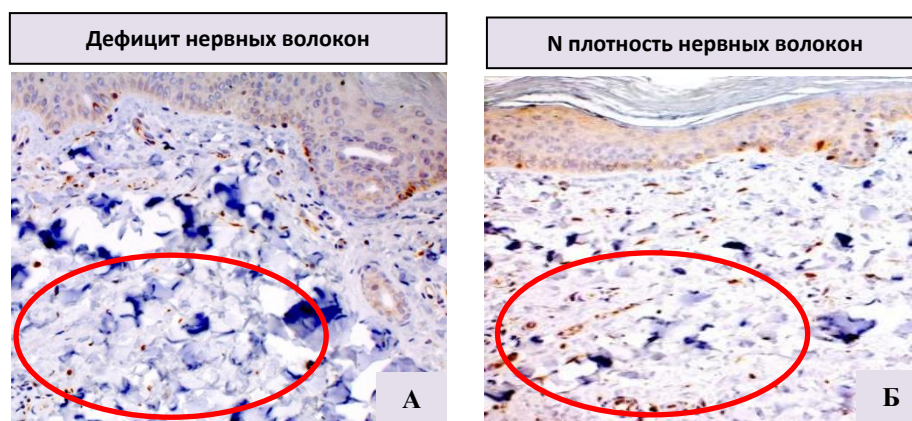


Рисунок 9. Иммуногистохимическое исследование маркера PGP 9.5 (выявляется в виде коричневого окрашивания нервных волокон) в биоптатах кожи пациента с СД 2-го типа и субклинической стадией ДПН (А) и условно здорового добровольца (Б). Иммунопероксидазная реакция.
Примечание: А/Б – увеличение x400

3.2. Результаты конфокальной микроскопии роговицы

По сравнению с контрольной группой здоровых лиц при субклинической ДПН количество нервных волокон роговицы (НВР) было уменьшено, коэффициенты анизотропии направленности НВР ($K_{\Delta L}$) и симметричности направленности НВР (K_{sym}) составили $3,13 \pm 0,81$ и $0,88 \pm 0,1$, соответственно (при норме $K_{\Delta L}$ $3,45 \pm 0,85$ и K_{sym} $0,84 \pm 0,11$, соответственно) (рис.10).

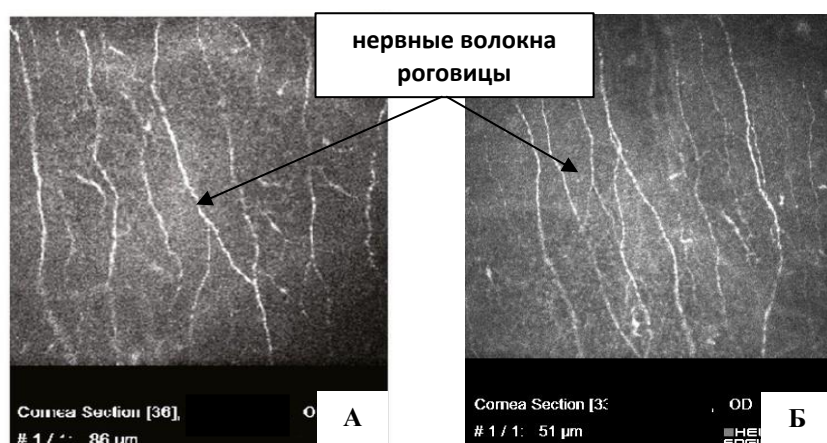


Рисунок 10. Конфокальные снимки нервных волокон роговицы пациента с СД 2-го типа и субклинической стадией ДПН (А) и условно здорового добровольца (Б)

3.3. Результаты капилляроскопии

При исследовании было выявлено, что у ВСЕХ пациентов из групп наблюдения отмечается выраженная извитость капилляров (вследствие утолщения БМ), обеднение капиллярной сети, неравномерность калибра капилляров.

Также обращает на себя внимание выраженное сужение артериального отдела капилляров, расширение венозного отдела, увеличение зоны перикапиллярного пространства (что свидетельствует о наличии перикапиллярного отёка), а также наличие сладж-феномена (рис. 11).

Кроме того, отмечалось снижение скорости капиллярного кровотока во всех отделах по сравнению с показателями контрольной группы здоровых лиц.

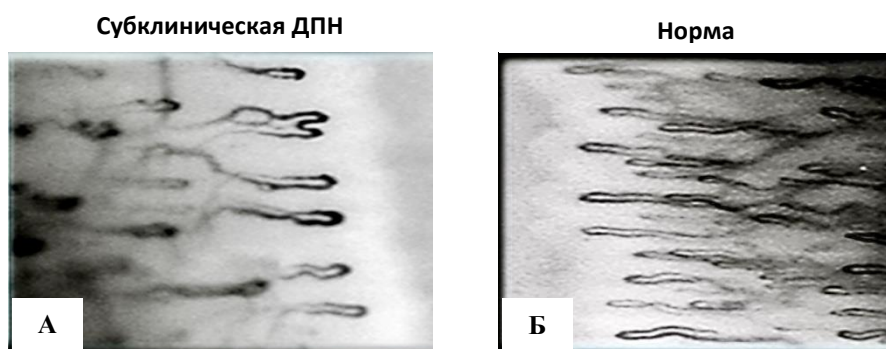


Рисунок 11. Состояние микроциркуляторного русла у пациента с СД 2-го типа и субклинической стадией ДПН (А) и здорового добровольца (Б) (увеличение $\times 125$)

IV. Сравнительный анализ эффективности нормализации гликемии в течение 5-ти месяцев у пациентов с сахарным диабетом 2 типа и субклинической стадией диабетической периферической нейропатии

4.1. Результаты ЭНМГ

На фоне улучшения показателей гликемии и их стабилизации в течение 5-ти месяцев, по данным ЭНМГ было выявлено статистически значимое улучшение показателя амплитуды S-ответа икроножного нерва ($p = 0,010$).

Полученные результаты отражают возможное восстановление аксонального транспорта по нервному волокну, а значит вероятную обратимость процесса.

4.2. Результаты биопсии кожи

Через 5 месяцев наблюдения на фоне снижения и удержания гликемии в пределах целевых значений в основной исследуемой группе пациентов отмечено улучшение морфологии кожного лоскута, в частности выявлено достоверное уменьшение гиперкератоза эпидермиса ($p = 0,025$) (рис.12).



Рисунок 12. Изменение структуры эпидермиса (уменьшение степени выраженности гиперкератоза) у пациентов с СД 2-го типа и субклинической стадией ДПН на фоне улучшения гликемического контроля в течение 5-ти месяцев

В собственно дерме выявлено достоверное увеличение количества нервных волокон в 1,5 раза, проявляющееся в виде усиления экспрессии маркера PGP 9.5 ($p = 0,004$) (рис.13).

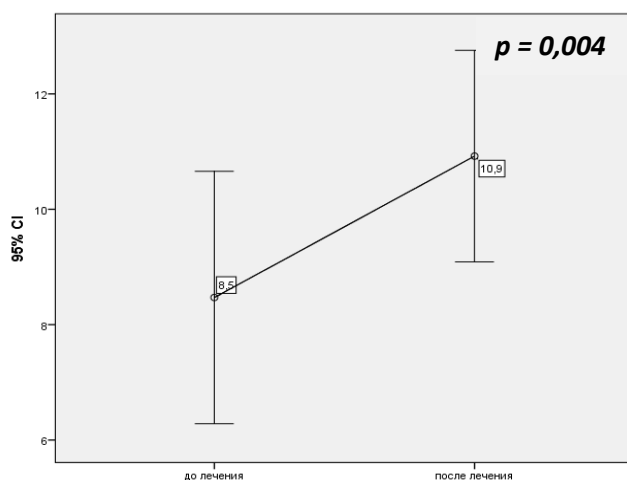


Рисунок 13. Среднее количество нервных окончаний (маркированных PGP 9.5) в кожном лоскуте у пациентов с СД 2-го типа и субклинической стадией ДПН исходно и через 5 месяцев на фоне улучшения гликемического контроля

Также в собственно дерме отмечается статистически значимое усиление ангиогенеза, проявляющееся усилением экспрессии маркера CD-34 ($p = 0,007$), и достоверное увеличение среднего количества капилляров на единицу площади кожного лоскута ($p \leq 0,049$) (рис.14-15).

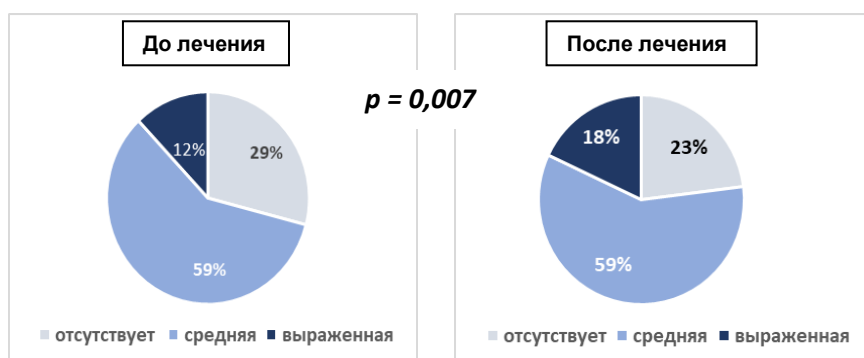


Рисунок 14. Изменение степени выраженности ангиогенеза (усиление) у пациентов с СД 2-го типа и субклинической стадией ДПН на фоне улучшения показателей гликемии в течение 5-ти месяцев

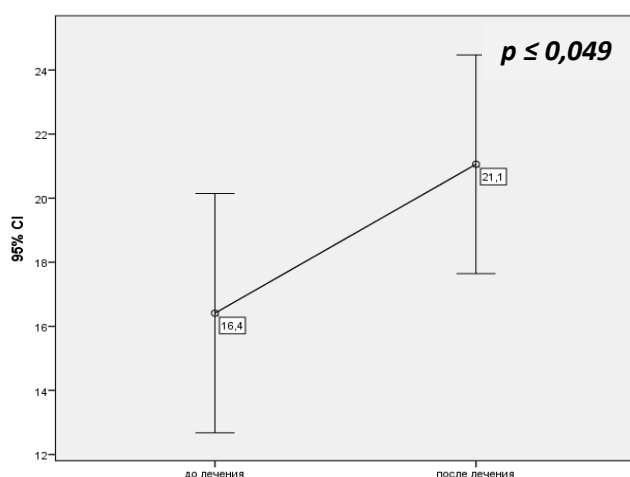


Рисунок 15. Динамика среднего количества капилляров на единицу площади кожного лоскута пациентов с СД 2-го типа и субклинической стадией ДПН исходно и через 5 месяцев на фоне улучшения гликемического контроля

4.3. Результаты конфокальной микроскопии

В исследуемой группе пациентов с СД 2-го типа и субклинической стадией ДПН на фоне достижения и длительного удержания целевого уровня HbA1c, приближенного к норме ($HbA1c \leq 6,3\%$), отмечено уменьшение выраженности извитости тонких нервных волокон роговицы ($p \leq 0,05$) и исчезновение клеток воспалительного характера (клеток Лангерганса) (рис.16).

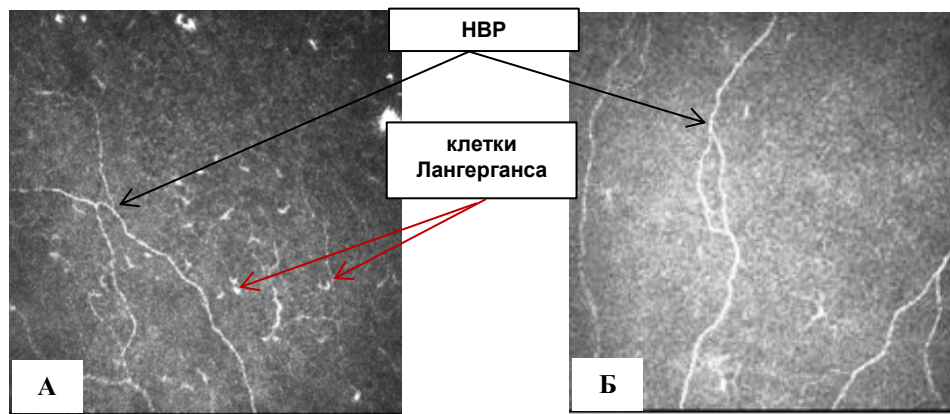


Рисунок 16. Конфокальные снимки нервных волокон роговицы (НВР) пациента с СД 2-го типа и субклинической стадией ДПН исходно (А) и на фоне улучшения гликемического контроля в течение 5-ти месяцев (Б)

Через 5 месяцев наблюдения было отмечено уменьшение выраженности извитости НВР и незначительное изменение показателей коэффициентов анизотропии и симметричности направленности НВР (роза-диаграмма приобрела более вытянутую форму, приближенную к норме) (рис.17).

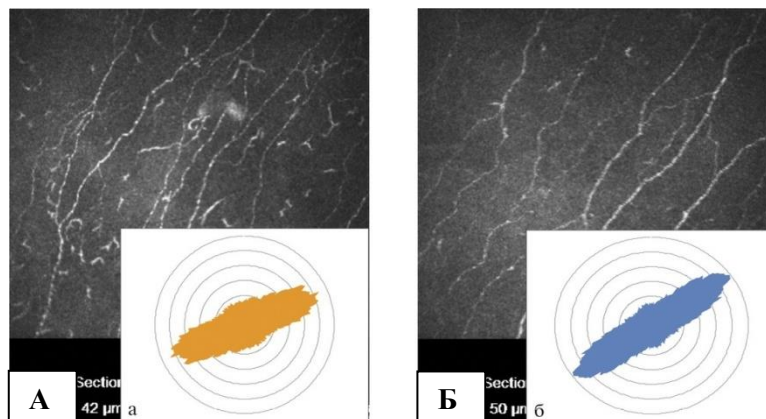


Рисунок 17. Состояние нервных волокон роговицы пациента с СД 2-го типа и субклинической стадией ДПН исходно (А) и через 5 месяцев на фоне улучшения гликемического контроля (Б)

4.4. Результаты капилляроскопии

На фоне достижения и удержания целевых значений гликемии в течение 5-ти месяцев у пациентов из исследуемой группы отмечено увеличение диаметров капилляров в артериальном отделе (АО) ($p = 0,007$) (рис.18).

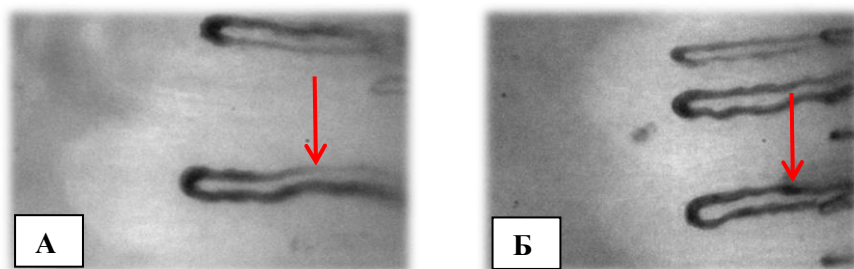


Рисунок 18. Динамика состояния артериального отдела капилляра пациента с СД 2-го типа и субклинической стадией ДПН исходно (А) и через 5 месяцев на фоне улучшения гликемического контроля (Б)

Кроме того, выявлено достоверное увеличение средней скорости капиллярного кровотока ($p = 0,040$) (рис.19).

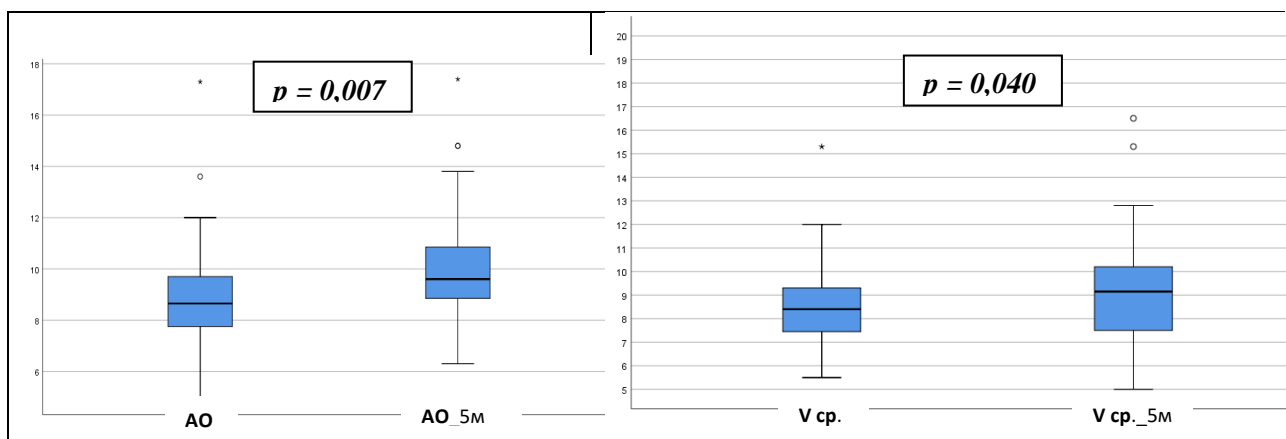


Рисунок 19. Изменение средних диаметров артериальных отделов (АО) капилляров и средней скорости капиллярного кровотока (V ср.) у пациентов с СД 2-го типа исходно и через 5 месяцев

ВЫВОДЫ

1. По данным проведенного исследования распространенность диабетической периферической нейропатии среди пациентов с длительностью СД 2-го типа не более 10 лет, находящихся в многопрофильном стационаре, составила 75%. Одинаково часто встречается как клиническая (симптомная) стадия ДПН – 38%, так и субклиническая стадия ДПН - 37% обследуемых пациентов.
2. Субклиническая стадия диабетической периферической нейропатии у пациентов с СД 2-го типа характеризуется:
 - по данным пункционной биопсии кожи - изменением морфологических показателей в структуре кожного лоскута (атрофия эпидермиса ($p \leq 0,042$), гиперкератоз и гиалиноз базальной мембраны эпидермиса); снижением плотности интраэпидермальных нервных волокон ($p = 0,016$); уменьшением скорости ангиогенеза ($p = 0,001$).
 - по данным конфокальной микроскопии роговицы – снижением плотности нервных волокон роговицы, изменением их хода и структуры; снижением коэффициента анизотропии (упорядоченности) и увеличением коэффициента симметричности направленности.
3. У всех обследованных пациентов с СД 2-го типа и субклинической стадией нейропатии выявлены изменения показателей микроциркуляции (сужение артериального отдела капилляров, расширение венозного отдела капилляров, наличие перикапиллярного отека, ухудшение показателей СРПВ и ЭФ).
4. На фоне улучшения и удержания гликемического контроля в пределах целевых значений приближенных к норме ($HbA1c \leq 6,5\%$) в течение 5-ти месяцев, в группе пациентов с СД 2-го типа и субклинической стадией нейропатии отмечено: увеличение амплитуды S-ответа по икроножному нерву ($p = 0,010$) по данным ЭНМГ; достоверное улучшение показателей микроциркуляции в виде расширения артериального отдела капилляров ($p = 0,007$) и увеличении скорости капиллярного кровотока ($p = 0,040$) по данным цифровой капилляроскопии; улучшение морфологии кожного лоскута ($p = 0,025$), увеличение плотности интраэпидермальных нервных волокон в 1,5 раза ($p = 0,004$), а также увеличение количества интрадермальных сосудов на единицу площади ($p = 0,007$) на основании результатов биопсии кожи; уменьшение выраженности извитости тонких нервов роговицы по данным КМР ($p \leq 0,05$). Все это позволяет говорить о возможности развития реинервации и улучшении системы микроциркуляции.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Диагностика ДПН на субклинической стадии должна включать не только клиническое, но и нейрофизиологическое обследование.
2. В рамках клинических исследований, у пациентов с СД 2-го типа на стадии субклинической ДПН с целью выявления раннего поражения тонких нервных волокон возможно использование пункционной биопсии кожи и/или конфокальной микроскопии роговицы в качестве основных диагностических методик.
3. Необходимо проведение дальнейших исследований по определению клинической ценности цифровой капилляроскопии как дополнительного метода диагностики микрососудистых осложнений у пациентов с СД 2 типа.
4. Максимальное приближение гликемического контроля к физиологическим значениям глюкозы у пациентов с СД 2 типа и субклинической стадией ДПН свидетельствует о возможной обратимости нарушений периферической нервной системы при раннем вмешательстве.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Фокина А.С.**, Зилов А.В., Строков И.А. и др. Анализ влияния длительной нормализации гликемического контроля на течение субклинической диабетической периферической нейропатии у пациентов с сахарным диабетом 2 типа // РМЖ. – 2022. - №3. – С. 28-33.
2. Аветисов С.Э., Н.А. Черненкова, З.В. Сурнина, Л.Т. Ахмеджанова, **А.С. Фокина**, И.А. Строков И.А. Возможности ранней диагностики диабетической полинейропатии на основе исследования нервных волокон роговицы // Вестник офтальмологии. - 2020. - Т. 136, № 5-2. - С. 155-162.
3. **Фокина А.С.**, И.А. Строков, Т.А. Демура. Диагностика диабетической периферической нейропатии. Методы ее раннего выявления // РМЖ. - 2017. - № 9 (25). - С. 572-578.
4. **Фокина А.С.**, И.А. Строков, А.В. Зилов, К.И. Строков. Алгоритм персонифицированного лечения дистальной симметричной сенсорно-моторной полиневропатии у больных сахарным диабетом 2 типа // Эффективная фармакотерапия. - 2017. - № 29. - С. 30-38.
5. **Фокина А.С.**, И.А. Строков, А.В. Зилов. Актовегин® в лечении субклинической дистальной симметричной сенсорно-моторной полиневропатии у больных сахарным диабетом 2-го типа // Медицинский совет. – 2016. - № 11. - С. 80-85.
6. Строков И.А., **А.С. Фокина**, А.В. Зилов. Актовегин в лечении неврологических осложнений сахарного диабета // Эффективная фармакотерапия. - 2015. - № 43. - С. 20-27.
7. Аветисов С.Э., Н.А. Черненкова, З.В. Сурнина, Л.Т. Ахмеджанова, **А.С. Фокина**, И.А. Строков. Диагностика диабетической полинейропатии на основе исследования нервных волокон роговицы // Точка зрения. Восток - Запад. - 2020. - № 3. - С. 16-18.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ	артериальная гипертензия
АД	артериальное давление
ДПН	диабетическая периферическая нейропатия
Кво/ао	коэффициент ремоделирования капиллярного русла
КМР	конфокальная микроскопия роговицы
НВР	нервные волокна роговицы
РЛ	резидуальная латенция
САД	систолическое артериальное давление
СД	сахарный диабет
СДС	синдром диабетической стопы
СРВ	скорость распространения возбуждения
СРПВ	скорость распространения пульсовой волны
Δ СРПВ	соотношение скорости распространения пульсовой волны до и после пережатия
ПИНВ	плотность интраэпидермальных нервных волокон
ЭКГ	Электрокардиограмма
ЭНМГ	электронейромиография
ЭФ	эндотелиальная функция
HbA1c	гликированный гемоглобин
NIS LL	Neuropathy Impairment Score Low Limbs-Шкала невропатических нарушений в ногах
TSS	Total Symptom Score
$K_{\Delta L}$	коэффициент анизотропии направленности нервных волокон роговицы
K_{sym}	коэффициент симметричности направленности нервных волокон роговицы