Оксидативный стресс и тромбоцитарно-коагуляционный гемостаз у больных сахарным диабетом типа 1 с диабетической нефропатией

Ю.В. Нелаева, А.Ш. Бышевский, Р.Г. Алборов, М.В. Шестакова, А.А. Нелаева

Государственная медицинская академия (ректор – проф. Э.А. Кашуба), Тюмень
ГУ Эндокринологический научный центр (дир. – акад. РАН и РАМН И.И. Дедов) РАМН, Москва

Сахарный диабет (СД) – одна из наиболее важных проблем современной клинической медицины, что обусловлено его широким распространением, клиническим полиморфизмом, тяжестью осложнений [1]. Диабетическая нефропатия (ДН) является одной из главных причин инвалидизации и смертности больных СД типа 1. По данным Эндокринологического научного центра РАМН, у 30-40% больных, страдающих СД типа 1 на протяжении 25-30 лет, развивается ДН различной стадии [3,4]. Проведенные исследования показали, что СД ведет к дисфункции эндотелия сосудов, сопровождающейся нарушениями синтеза вазодилататоров, вазоконстрикторов и прокоагулянтов [2,6]. В то же время нарушения функции сосудистого эндотелия связаны с изменением содержания эндотелинов, фактора Виллебранда, тканевого активатора плазминогена и оксида азота (NO) [12-16]. Особую важность представляют исследования роли оксида азота в развитии различных патологических состояний, в том числе диабетической нефропатии [11]. Известно, что дефицит инсулина способствует возникновению гипероксидации, которая вызывает нарушение ряда важнейших биохимических процессов в клетках, что, в свою очередь, сопровождается структурными и функциональными изменениями их мембранных систем [5,8,10]. Ксантиноксидаза (КСО) рассматривается как один из наиболее важных ферментов, являющейся главной системой генерирования активных форм кислорода. Установлено, что индукция активности КСО протекает во всех случаях одновременно с индукцией активности синтазы оксида азота за счет активации экспрессии генов ее индуцибельной изоформы [7]. С другой стороны, велика роль оксидативного стресса в формировании эндотелиальной дисфункции. Известно, что СД ведет к гемокоагуляционным и реологическим нарушениям, получены многочисленные доказательства нарушения функций эндотелия сосудов, тромбоцитов и изменений активности свертывания крови [9]. В настоящее время придается большое значение роли изменения гемостаза в патогенезе диабетической нефропатии. Внутрисосудистая коагуляция крови, морфологическим маркером которой считаются депозиты фибрина и гиалина [5], является одним из факторов прогрессирования нефропатии. Вместе с тем, исследования, посвященные установлению связи между интенсивностью оксидантного стресса, эндотелиальной дисфункцией, тромбоцитарно-коагуляционным гемостазом и клиническими проявлениями диабетической нефропатии, требуют дальнейшего изучения.

Цель настоящей работы – установить клинико-патогенетическое значение изменения уровня оксида азота в мембранах тромбоцитов, активности КСО в сыворотке крови у больных СД типа 1 с диабетической нефропатией при различных клинических вариантах течения; связь оксидативного стресса в тромбоцитах с изменением их коагулоактивности.

Задачами исследования было изучение у больных СД типа 1 с диабетической нефропатией уровня NO_2 в мембранах тромбоцитов, активности КСО в сыворотке крови и агрегационной активности тромбоцитов наряду с показателями, характеризующими коагуляционный гемостаз. Кроме того, сопоставить изменение степени гипероксидации с тромбоцитарно-коагуляционным гемостазом у больных СД типа 1 с различными клиническими течениями диабетической нефропатии в динамике заболевания.

Материалы и методы

Обследовано 80 больных СД типа 1 на ранних стадиях диабетической нефропатии в состоянии субкомпенсации. В 1-ю группу вошли 38 человек больных СД типа 1 с нормоальбуминурией; 2-ю группу составили 42 больных СД типа 1 с микроальбуминурией (табл. 1). В качестве группы сравнения обследованы 30 практически здоровых лиц без отягощенного семейного анамнеза по сахарному диабету, сопоставимых по полу, возрасту.

Таблица 1

Характеристика больных СД

Показатель		1-я группа n=38	2-я группа n=42	3-я группа n=30	Всего
Пол	Ж	11(0,07)	18 (0,15)	26 (0,26)	55(0,48)
	М	19(0,16)	20 (0,17)	16 (0,13)	55(0,46)
Возраст, лет	25 – 30	9(0,06)	25 (0,23)	9 (0,09)	43(0,38)
	30 – 35	17(0,13)	9 (0,06)	13 (0,12)	39(0,31)
	35 – 40	4(0,04)	4 (0,03)	20 (0,18)	28(0,25)
Всего		30(0,23)	38(0,32)	42(0,39)	110(0,94)

В скобках после абсолютных величин приведены значения частоты признака (отношение числа анализируемых признаков к общему количеству значений в вариационном ряду).

Средняя длительность заболевания СД типа 1 с ДН составила 9,6±0,2 года. Длительность заболевания до 5 лет имели 30% обследованных, до 10 лет – 35%, до 15 лет – 22% и свыше 15 лет – 13% больных. Средняя суточная доза инсулина 38±0,9 ЕД. Все пациенты получали человеческие инсулины фирм Ново Нордиск и Эли Лили. СД был компенсирован на традиционной схеме двукратного введения инсулина у 35% больных, интенсифицированную схему инсулинотерапии получали 65% больных.

Клиническое и биохимическое обследование включало определение углеводного обмена по уровню базальной и постпрандиальной гликемии, гликированному гемоглобину (анализатор «1040»-Boehringer Mannheim) (табл. 2), тест на микроальбуминурию («Micral-Test» – Boehringer Mannheim). Выделение тромбоцитов проводили по методу К.В. Чурина и сотр. (1996), активность фермента ксантиноксидазы определяли по методу М. Дъячиной и сотр. (1973). Ввиду того, что прямое измерение содержания NO фактически невозможно из-за быстрой конверсии этого радикала в нитраты и нитриты под действием активного O_2, продукцию NO оценивали косвенным методом по содержанию нитритов (NO_2) во взвеси тромбоцитов с помощью реактива Грисса (по методу В.Б. Карнюка, 2000).

Для оценки тромбоцитарного звена гемостаза использовали фотометрический метод – лазерный агрегометр «Биола». При анализе агрегатограмм устанавливали значение максимальной агрегации (МА), максимальную скорость агрегации (тангенс угла наклона кривой агрегатограммы к оси абсцисс (tg a) и время ее достижения (Ttg a), определяли число тромбоцитов по З.А. Габбасову (1992) максимальное значение величины тромбоцитов, время его достижения и максимальную скорость достижения. В качестве индуктора агрегации применяли АДФ – 10,0 и 1,0, ммоль/л, для определения фактора Виллебранда использовали ристомицин в разведении 15 мг в 0,5 мл растворителя («Технология-Стандарт», Барнаул). Коагуляционное звено гемостаза оценивали, определяя активированное время рекальцификации (АВР), протромбиновое отношение (ПО), антитромбиновую активность (АА), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) (Г.Н.Детинкина и др., 1980), содержание фибриногена (В.П.Балуда, 1980), количественное определение фибринмономерных комплексов ортофенантролиновым тестом по методу В.А. Елыкомова, А.Г. Момоту (1987) с использованием реактивов «Технология-Стандарт» Барнаул, на полуавтомате «Тромбостат-2».

Результаты обработаны методом вариационной статистики с помощью пакета прикладных программ (SPSS), а также пакета анализа Microsoft Excel на ЭВМ PC (Pentium 4).

Результаты и их обсуждение

У больных СД типа 1 с нормоальбуминурией установлен достоверный рост активности ксантиноксидазы (КСО) ($p<0,05$), фермента, отражающего уровень окислительного метаболизма, в сравнении с контрольной группой, причем эта тенденция нарастает по мере прогрессирования ДН. Наряду с этим у больных СД типа 1 установлено снижение в клеточных мембранах тромбоцитов содержания NO_2 по сравнению с показателями контрольной группы ($p<0,05$), причем снижение уровня NO_2 достоверно ниже у пациентов СД типа 1 с микроальбуминурией (табл. 3). Анализ приведенных данных свидетельствует об ускорении липопероксидации у больных СД типа 1 с различными клиническими вариантами ДН. Что приводит к изменению уровня NO_2 в тромбоцитах у обследуемых пациентов и, вероятно, влияет на эндотелий сосудов. Подтверждением служит наличие сильной отрицательной корреляции у больных СД типа 1 с микроальбуминурией между уровнем КСО в сыворотке и содержанием NO_2 в тромбоцитах ($r=0,5053$, $p = 0,004$). По мере прогрессирования диабетической нефропатии ухудшается компенсация углеводного обмена (см. табл. 2).

Следующим этапом работы явилось изучение у больных СД с ДН агрегационной активности тромбоцитов и показателей коагуляционного звена гемо-

Таблица 2

Состояние углеводного обмена у больных СД

Показатель	Контрольная группа (n=30)	1-я группа (n=38)	2-я группа (n=42)
HbA1c, %	5,5±0,2	7,1±0,3*	7,5±0,3
Гликемия натощак, ммоль/л	3,5±0,2	6,1±0,3*	6,5±0,3
Постпрандиальная гликемия, ммоль/л (через 2 ч. после еды)	5,6±0,2	8,1±0,3	8,9±0,3**

* $p<0,05$ у больных с нормоальбуминурией с показателями здоровых;
** у больных с микроальбуминурией с показателями у больных с нормоальбуминурией.

Таблица 3

Содержание ксантиноксидазы и уровень нитритов у больных СД типа 1

Показатель	Контрольная группа (n=30)	1-я группа (n=38)	2-я группа (n=42)
КСО, нмоль/мин/мл	2,3±0,2	4,5±0,4*	5,0±1,0**
Белок, мг/мл	102±9,8	193,5±10,4*	172,0±7,4**
NO_2, нмоль/мл	23,1±2,7	11,9±1,5*	9,0±0,4**

* $p < 0,05$ у здоровых относительно показателей у больных СД типа 1 с нормоальбуминурией ;
** $p < 0,05$ у больных СД типа 1 с нормоальбуминурией относительно показателей больных СД типа 1 с микроальбуминурией.

стаза, а также выявление их связи с оксидативным стрессом.

В исследовании установлено, что у больных СД с отсутствием микроальбуминурии (1-я группа) достоверно уменьшается абсолютное количество тромбоцитов ($p<0,05$) в крови по сравнению с контролем, одновременно на 23% снижается агрегационная активность этих клеток крови в сравнении с показателями контрольной группы. У больных СД типа 1 с ДН на стадии МАУ (2-я группа) установлено снижение агрегационной активности на 33% в сравнении с показателями больных 1-й группы (табл. 4).

Таблица 4

Сравнительная характеристика показателей тромбоцитарного компонента гемостаза у больных СД типа 1

Показатель	Контрольная группа (n=30)	1-я группа (n=38)	2-я группа (n=42)
Количество тромбоцитов	323,4±14,4	267,2±8,2	287,5±6,4
Максимальное значение величины тромбоцита, фл	7,0±0,2	5,7±0,3*	5,0±0,3**
Время достижения максимальной величины тромбоцитов, с	65,5±2,3	70,3±0,5*	74,0±3,0**
Скорость достижения максимальной величины тромбоцитов (tg a)	13,6±0,6	11,6±0,8	8,0±0,7
Время достижения максимальной скорости величины тромбоцитов, с	35,0±0,8	34,9±0,8*	39,3±1,6**
Максимальная агрегация (МА),%	83,7±10,6	60,7±5,6*	50,1±3,5**
Время достижения максимальной агрегации, с.	237,0±2,6	235,7±4,5*	194,1±10,6**
Скорость достижения максимальной агрегации, tg a	266,0±4,1	163,9±5,6*	113,1±5,6**
Время достижения скорости максимальной агрегации, с	48,4±2,5	41,1±1,5*	37,9±1,6**
Спонтанная агрегация,%	6,9±0,2	5,7±0,3*	7,8±1,5**
Фактор Виллебранда (ФВ),%	105,7±5,5	123,5±2,5*	144,6±0,5**
Время достижения 1/2 МА (Т 1/2), с	118,5±9,1	118,1±5,6*	97,0±3,5**

* $p<0,05$ у здоровых относительно показателей у больных СД типа 1 с нормоальбуминурией;
** $p<0,05$ у больных СД типа 1 с нормоальбуминурией относительно показателей больных СД типа 1 с микроальбуминурией.

Анализ агрегатограмм свидетельствует о достоверном сокращении времени достижения 1/2 максимальной агрегации (1/2 МА) ($p<0,05$) у больных СД типа 1 (это связано с уменьшением максимальной агрегации) и снижении начальной скорости агрегации по сравнению с показателями здоровых, данные изменения более выражены у пациентов СД с МАУ. В то же время имеет место тенденция к увеличению спонтанной агрегации ($p<0,05$) в обеих группах. У больных СД типа 1 (1-я и 2-я группы) установлено достоверное снижение максимального значения величины тромбоцитов, увеличение времени достижения максимальной величины тромбоцитов в сравнении с контрольной группой при снижении начального времени достижения максимальной величины тромбоцитов. Данные изменения более выражены у пациентов 2-й группы. Время достижения максимальной величины тромбоцитов у больных СД типа 1 с нормоальбуминурией практически не отличается от показателей здоровых. У больных с диабетической нефропатией на стадии МАУ показатели времени достижения максимальной величины тромбоцитов достоверно выше в равнении с показателями больных СД типа 1 с нормоальбуминурией ($p<0,05$). Представляет интерес изучение уровня фактора Виллебранда, занимающего узловое место во взаимодействии трех звеньев гемостаза – сосудистого, тромбоцитарного и коагуляционного, играющего важную роль как в процессе адгезии тромбоцитов, так и активации свертывания крови. В работе установлено достоверное повышение показателя фактора Виллебранда у больных СД в зависимости от наличия микроальбуминурии – показатель фактора Виллебранда выше во 2-й группе по сравнению с показателями 1-й группы ($p<0,05$) (табл. 4). Принимая во внимание, что фактор Виллебранда является одним из маркеров повреждения сосудистой стенки, можно предположить, что повышение его уровня в плазме у больных СД типа 1 с ДН косвенно свидетельствует о нарушении эндотелия сосудов у данных больных. У

Таблица 5

Сравнительная характеристика коагуляционного компонента гемостаза у больных СД типа 1

Показатель	Контрольная группа (n=30)	1-я группа (n=38)	2-я группа (n=42)
ПО	0,89±0,3	0,91±0,2*	0,94±0,7*
АВР, с·	93,4±3,0	122,2±3,2*	103,5±1,2**
АЧТВ, с	43,2±0,8	61,2±1,2*	82,4±0,9**
АА,%	100	149,0±0,9*	142±1,8
ФГ, г/л	3,8±0,2	3,1±0,7	4,12±0,9
РКМФ, 10 г/л	3,8 ±0,1	5,7±0,4	9,1±0,1

* $p<0,05$ у здоровых относительно показателей у больных СД типа 1 с нормоальбуминурией;
** $p<0,05$ у больных СД типа 1 с нормоальбуминурией относительно показателей больных СД типа 1 с микроальбуминурией.

больных СД с микроальбуминурией сывороточный фактор Виллебранда тесно и значительно коррелировал с уровнем гликированного гемоглобина ($p<0,05$).

Результаты изучения гемокоагуляционных нарушений у больных СД типа 1 представлены в табл. 5. У больных СД типа 1 с нормоальбуминурией имеет место гипокоагуляция, о наличии которой свидетельствует удлинение активированного времени свертывания и частичного активированного времени свертывания, при одновременной активации противосвертывающих механизмов (рост общей антитромбиновой активности). Повышение уровня РКМФ свидетельствует о росте интенсивности внутрисосудистого свертывания на стадии гипокоагуляции потребления. У больных СД типа 1 с МАУ достоверно укорочено активированное время свертывания в сравнении с показателями у пациентов СД типа 1 без МАУ, кроме того, у пациентов с микроальбуминурией повышено содержание фибриногена. Это позволяет предполагать глубокие реологические нарушения у больных СД типа 1 с ДН на стадии МАУ.

Анализируя полученные данные, можно предположить, что у больных СД типа 1 по мере прогрессирования ДН преобладает вторая необратимая фаза агрегации, которая обусловлена влиянием комплекса нескольких агрегирующих агентов (АДФ, тромбина, коллагена и т. д.). Нельзя исключить и влияние поврежденной сосудистой стенки – условие, при котором агрегация практически всегда протекает как необратимый процесс и способствует внутрисосудистому тромбообразованию. Обнаруженное нами снижение уровня АДФ-индуцируемой агрегации тромбоцитов у наблюдавшихся больных можно объяснить тем, что с увеличением продолжительности заболевания в силу длительно существующей измененной агрегации и наклонности к адгезии происходит уменьшение числа тромбоцитов, обладающих физиологическим уровнем агрегационной активности. Это согласуется с тем фактом, что общее число тромбоцитов уменьшается при СД типа 1.

Таким образом, СД типа 1 с ДН, сопровождаясь изменением функциональной активности тромбоцитов, характеризуется одновременно нарушением коагуляционного гемостаза. Изучение состояния системы гемостаза выявило наличие признаков внутрисосудистого свертывания крови в стадии гипокоагуляции потребления, высокой активации сосудистого компонента. Выявленная у больных гиперфибриногенемия способствует возникновению синдрома дисссеминированоого внутрисосудистого свертывания на доклинической стадии, более выраженного у больных СД типа 1 с микроальбуминемией. Эти явления взаимосвязаны и взаимообусловлены, способствуют утяжелению заболевания, повышая риск развития сосудистых осложнений.

Выводы

1. Оксидативный стресс можно рассматривать как крайне неблагоприятный фактор, влияющий на сосудистый эндотелий у больных СД типа 1 с диабетической нефропатией.
2. У больных СД типа 1 в мембранах тромбоцитов установлено достоверное снижение содержания NO_2, что может играть определенную роль в патогенезе сосудистых осложнений СД посредством изменения функциональной способности тромбоцитов
3. Характер и выраженность нарушений тромбоцитарно-коагуляционного гемостаза у больных СД зависят от стадии диабетической нефропатии.

Литература

1. Балаболкин М.И. Диабетология. – М., Медицина, 2000.
2. Балаболкин М.М., Клебанова Е.М., Креминская В.М. // Сахарный диабет. – 1999 – Т.1.-№3. – С. 2 – 8.
3. Дедов И.И., Шестакова М.В. Диабетическая нефропатия. – М., Универсум Паблишинг, 2000.
4. Дедов И.И., Шестакова М.В., Максимова М.А. Методические рекомендации. – М., Медиа Сфера, 2002.
5. Зербино Д.Д., Лукасевич Л.Л. Диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови. – М., 1989.
6. Марков Х.М. // Вестн. РАМН. – 1996 – № 7. – С. 73-78.
7. Северина И.С. // Биохимия. – 1998. – Т. 62.-№ 7. – С. 929-947.
8. Северина И.С., Шестакова М.В. // Сахарный диабет. – 2001 – №9. – С. 285-287.
9. Шестакова М.В., Северина А.С. // Вестн. РАМН. – 1995.- №5. – С. 30-34.
10. Aydin A, Orhan H, Sayal A. et al.// Clin Biochem – 2001. – Vol. 34. – № 1. – P. 65 – 70.
11. Corbet J.,McDaniel M.// Diabetes – 1992. Vol. 41. – №1. – P. 897 – 903.
12. Derubertis F.R., Craven P.A.// Diabetes – 1994. Vol.43. – №1. – P.1- 8.
13. Kawagishi T., Matsuyoshi M., Emoto M. et al.// Arterioscler Thromb Vase Biol – 1999. – Vol. 19. – №10. – P. 9 – 16.
14. Kessler L., Wiesel M.L., Attali P. et al.// Diabetes Metab – 1998. – Vol. 24. – № 4. – P.27-36.
15. Trachtman H., Futterweit S., Crimmins D.L.// J Am Soc Nephrol – 1997. – Vol. 8. – № 8. P.76 – 82.
16. Trachtman H., Koss I., Bogart M. et al.// Res Commun Mol Pathol Pharmacol – 1998. – Vol. 100. – № 2. P.13 – 25.