

УДК 616.379-008.64:616-005.1-08

Н.В.Исакова, Н.Н.Цыбиков, Е.В.Фефелова

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ И МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 ТИПА С НЕОСЛОЖНЕННЫМ И ОСЛОЖНЕННЫМ ТЕЧЕНИЕМ

Читинская государственная медицинская академия (ректор - заслуженный врач РФ, д.м.н., профессор А. В. Говорин)

Резюме. У 64 больных СД 1 типа с осложненным и неосложненным течением изучена функциональная активность тромбоцитов и моноцитов, концентрация оксида азота в этих клетках. Установлено, что содержание NO в тромбоцитах и моноцитах при неосложненном СД 1 типа оказалось сниженным, а при присоединении осложнений - повышенным. Функциональная активность клеток, оцененная методом хемилюминесценции, у больных значительно повышалась, особенно выражено - при развитии диабетических осложнений. Показано, что при СД 1 типа наблюдается вторичное снижение агрегационной функции тромбоцитов, обусловленное потреблением кровяных пластинок в кровотоке.

Сахарный диабет (СД) является серьезной медико-социальной проблемой, что обусловлено его высокой распространностью, сохраняющейся тенденцией к росту числа больных. При длительном течении диабета и сохранении гипергликемии развиваются диабетические ангиопатии (ДА), являющиеся наиболее частой причиной ранней инвалидизации и смерти пациентов с сахарным диабетом. Патогенез ДА сложен и недостаточно изучен [3]. Одним из факторов развития ДА является дисфункция эндотелия, которая проявляется изменением активности NO-синтетазы и нарушением выработки оксида азота (NO). Однако NO синтезируется не только эндотелиоцитами, но и моноцитами и тромбоцитами. Исследованиями последних лет показано, что именно NO, который образуется в островках поджелудочной железы и макрофагах, принадлежит основная роль в механизмах деструкции и гибели \square -клеток [7]. В связи со сказанным, представляются интересными исследования роли тромбоцитов, в которых обнаружены две изоформы NOS: конститутивная эндотелиальная и индуциальная. Оказалось, что абсолютная генерация NO тромбоцитами на порядок выше продукции NO лейкоцитами [2]. Синтез NO тромбоцитами усиливается при агрегации тромбоцитов. Не исключено,

что одним из патогенетических механизмов развития и прогрессирования ДА является повышение функциональной активности клеток крови.

ЦЕЛЬЮ нашего исследования явилось изучение функциональной активности тромбоцитов и моноцитов у больных сахарным диабетом 1 типа с неосложненным и осложненным течением.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Под нашим наблюдением находилось 64 больных СД 1 типа в возрасте от 18 до 48 лет. Из них 32 мужчины и 44 женщины. Длительность заболевания составляла от 3 мес. до 20 лет. У 30 больных не выявлено признаков диабетических ангиопатий (1-я группа), у 34 имелись ангиопатии: диабетическая ангиоретинопатия, нефропатия, нейропатия (2-я группа). В обследование не включались пациенты, получавшие препараты-донаторы NO (нитраты, нитропруссид натрия и др.). Контрольную группу составили 23 здоровых человека, сопоставимых по возрасту и половому составу, без отягощенного семейного анамнеза по СД.

Из локтевой вены забирали 10 мл крови с ЭДТА. На соответствующих градиентах плотности выделяли тромбоциты и мононуклеары.

Определение концентрации стабильного метаболита NO - нитрита измеряли в сыворотке и в 15 часовой культуре клеток [2].

Функциональную активность клеток оценивали по интенсивности хемилюминисцентного ответа этих клеток в ответ на введение латекса [6]. При этом определяли максимальную интенсивность свечения (I_{max}), выраженную в условных единицах (у.е.) и значение S - световую сумму за время проведения анализа.

Для оценки тромбоцитарного звена гемостаза использовали агрегометр "Биола". При этом записывалась спонтанная агрегация тромбоцитов, а также агрегация под воздействием АДФ и ристомицина в окончательной дозе 10 мкг/мл. При анализе агрегограмм учитывались степень и скорость агрегации по кривой среднего размера агрегатов (CPA) и по кривой светопропускания (СП).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ "Biostat". При сравнении использовался критерий Стьюдента, различия считались значимыми при $p < 0,05$. Результаты представлены в виде $M \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. При исследовании сыворотки крови (рисунок 1) отмечается усиление генерации NO у больных СД 1 типа (концентрация нитритов $32,92 \pm 1,2$ мкмоль/л) по сравнению со здоровыми людьми

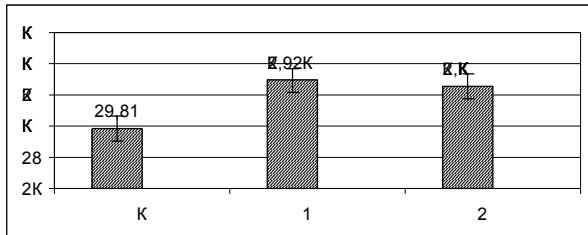


Рис.1. Содержание нитритов в сыворотке крови у больных СД 1 типа.

Примечание. Здесь и на рис. 2 и 3: К-контроль, 1- больные СД без микроангиопатий, 2-больные СД с микроангиопатиями, * - достоверное различие с контролем, ** - достоверное различие между группами больных СД.

($29,81 \pm 0,8$ мкмоль/л). Причем концентрация NO не зависела от длительности заболевания и наличия осложнений.

Концентрация нитритов в супернатанте культуры тромбоцитов в контрольной группе составила $13,46 \pm 0,4$ мкмоль/л, у больных СД 1 группы - $11,72 \pm 0,6$ мкмоль/л ($p < 0,05$). У больных, имеющих осложнения в виде диабетических микроангиопатий, отмечалось достоверное повышение генерации NO (концентрация нитритов $17,13 \pm 1,2$ мкмоль/л) по сравнению с контролем и больными 1 группы (рисунок 2).

При определении генерации NO мононуклеарами отмечались те же закономерности: в контрольной группе концентрация нитритов - $13,23 \pm 0,5$ мкмоль/л, у больных СД 1 группы - $10,92 \pm 0,4$ мкмоль/л, во 2 группе больных СД - $15,14 \pm 0,5$ мкмоль/л (рисунок 3). Интенсивность генерации NO мононуклеарами снижалась сильнее, чем тромбоцитами.

NO является частью многокомпонентной системы регуляции сосудистого тонуса. При СД и наличии гипергликемии, дислипидемии, окислительного стресса и нарушений цитокинового статуса данная система претерпевает сложные изменения, что приводит к преобладанию вазоконстрикции и прогрессированию диабетических ангиопатий [1]. В связи с этим повышенный уровень NO у больных с ангиопатиями может противостоять действию мощных вазоконстриктор-

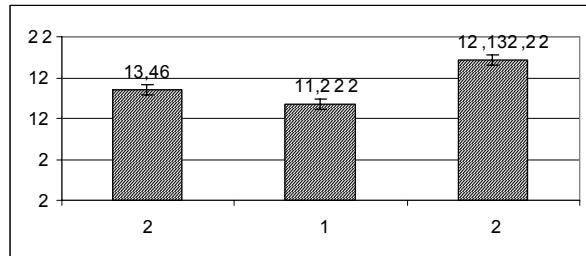


Рис. 2. Концентрация нитритов в супернатанте 15-часовой культуры тромбоцитами у больных СД 1 типа.

ных факторов, таких как тромбоксан и эндотелин-1, продукция которых у больных с диабетическими микроангиопатиями значительно возрастает [4].

На наш взгляд уровень NO плазмы определяется его генерацией эндотелиоцитами, тромбоцитами и мононуклеарами. При развитии диабетических микроангиопатий эндотелиоциты в результате развивающейся их дисфункции практически не вырабатывают NO, и регуляцию сосудистого тонуса начинают выполнять тромбоциты и мононуклеары, вырабатывая NO.

Для определения функциональной активности клеток мы исследовали интенсивность их хемилюминесцентного свечения, основу которого составляют кислородзависимые реакции. Интенсивность хемилюминесценции тромбоцитов больных СД-1 превышала таковую кровяных пластинок здоровых людей в 6-9 раз (Таблица 1), особенно у больных СД-1 с неосложненным течением заболевания ($P < 0,001$). Принимая во внимание результаты исследования, можно предположить, что функциональная активность кровяных пластинок связана с уровнем NO. Это подтверждается наличием корреляционной связи между значениями хемилюминесцентного свечения тромбоцитов и уровнем NO ($r = +0,62$; $p < 0,05$).

Функциональная активность моноцитов у больных СД-1 оказалась также повышенной и продолжала нарастать при развитии микроангиопатий (Таблица 2). Повышение функциональной

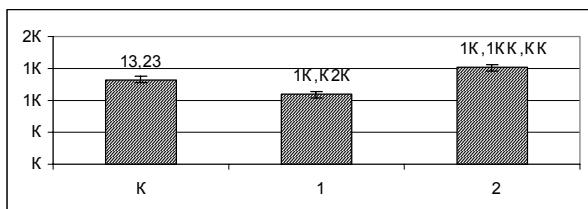


Рис. 3. Концентрация нитритов в супернатанте 15-часовой культуры мононуклеаров у больных СД 1 типа.

Таблица 1
Функциональная активность тромбоцитов у больных СД-1

Изучаемые показатели	Здоровые	Больные СД-1	
		1 группа	2 группа
I_{max}	$0,19 \pm 0,08$	$1,19 \pm 0,01^1$	$1,71 \pm 0,06^{2,3}$
S	$51,0 \pm 3,1$	$61,69 \pm 2,11^1$	$64,81 \pm 5,12^3$

Примечания: 1 - $P < 0,001$ у здоровых и больных СД-1 без осложнений; 2 - $P < 0,001$ у больных СД-1 без осложнений и с микроангиопатиями; 3 - $P < 0,001$ у здоровых и больных СД-1 с микроангиопатиями.

Таблица 2

Функциональная активность моноцитов у больных СД-1

Изучаемые показатели	Здоровые	Больные СД-1	
		1 группа	2 группа
I_{max}	1,071±0,1	2,78±0,1 ¹	3,39±0,3 ^{2,3}
S	51,0±4,1	60,29±1,12 ¹	64,81±5,12 ³

Примечания те же, что и к таблице 1.

активности фагоцитирующих клеток может быть связано с высоким уровнем NO ($r=+0,8$; $p<0,05$).

Следующим этапом работы явилось изучение у больных СД агрегационной активности тромбоцитов. Степень агрегации по кривой среднего размера агрегатов у больных СД-1 без микроангиопатий ($1,26\pm0,23$) практически не отличалась от показателей здоровых ($1,23\pm0,24$), в то время как при СД-1, сопровождающемся сосудистыми осложнениями, достоверно усиливалась ($2,3\pm0,51$). Скорость агрегации по кривой среднего размера агрегатов у больных СД-1 с осложненным течением ($0,61\pm0,15$) также увеличивалась по сравнению со здоровыми ($0,42\pm0,01$). При исследовании агрегации тромбоцитов по кривой светопропускания максимальные показатели степени и скорости агрегации отмечались у больных СД-1 с микроангиопатиями ($3,38\pm0,3$ и $3,94\pm0,52$ соответственно). При неосложненном СД-1 степень агрегации ($4,7\pm0,8$) превышала почти в четыре раза таковые контрольной группы ($1,19\pm0,05$), а показатели скорости агрегации существенных отличий не имели ($2,35\pm0,6$ и $2,43\pm0,6$).

Эти факты свидетельствуют о высокой агрегационной активности тромбоцитов, более выраженной при осложнении диабета микроангиопатиями.

При анализе АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов (Таблица 3) у больных СД-1 без

Таблица 4

Ристомицин-индуцированная агрегация тромбоцитов ($M\pm m$) у больных СД-1 с микроангиопатиями и без микроангиопатий

Изучаемые показатели	Здоровые	Больные СД-1	
		1 группа	2 группа
СРА. Степень агрегации, ед.	6,84±0,99	4,96±0,56 ¹	5,88±0,44 ³
СРА. Скорость агрегации, ед/мин.	8,53±0,55	7,05±0,51 ¹	6,62±0,55 ³
СП. Степень агрегации, %	67,68±1,36	78,58±1,2 ¹	70,51±0,63 ^{2,3}
СП. Скорость агрегации, %/мин.	40,88±1,65	65,17±1,08 ¹	55,73±0,53 ^{2,3}

Примечания те же, что и к таблице 1.

Таблица 3

АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов ($M\pm m$) у больных СД-1 с микроангиопатиями и без микроангиопатий

Изучаемые показатели	Здоровые	Больные СД	
		1 группа	2 группа
Средний размер агрегатов. Степень агрегации, ед.		7,92±0,44	6,33±0,19 ¹
Средний размер агрегатов. Скорость агрегации, ед/мин.		18,06±0,84	15,08±0,53 ¹
Светопропускание. Степень агрегации, %		39,53±1,02	32,35±0,61 ¹
Светопропускание. Скорость агрегации, %/мин.		61,02±1,58	56,42±1,4 ¹

Примечания те же, что и к таблице 1.

осложнений выявили снижение агрегации тромбоцитов по всем изучаемым параметрам.

Однако такое явление не означает, что при СД-1 снижается активность тромбоцитов, а является результатом того, что часть их уже в кровотоке спонтанно агрегировала, поэтому снижалась их способность склеиваться между собой *in vitro*. У больных СД-1, имеющих микроангиопатии, показатели скорости и степени агрегации достоверно повышаются по сравнению с таковыми у больных СД-1 без осложнений.

Особый интерес представляет изучение агрегации тромбоцитов на действие ристомицина, ибо последний способен оказывать своё влияние только при наличии фактора фон Виллебранда (vWF), а также в присутствии на кровяных пластинках рецепторов к данному белку. Повышение уровня vWF в крови является надежным маркером повреждения эндотелиальных клеток [5].

Наши наблюдения показали (Таблица 4), что если судить по светопропусканию, то агрегация тромбоцитов у больных СД-1 на ристомицин явно увеличивалась ($P<0,001$). При этом особенно резко возрастала степень агрегации при неосложненном течении СД-1 по сравнению с данными здоровых и 2-ой группы обследуемых. Кроме того, отмечалось снижение степени и скорости агрегации тромбоцитов, определяемых по средним размерам агрегатов у больных СД-1 как при наличии микроангиопатий, так и без них ($P<0,001$). При наличии микроангиопатий агрегационная активность снижается по сравнению с больными СД-1 без осложнений ($P<0,001$).

Анализируя полученные данные, можно предположить, что у больных СД-1 по мере прогрессирования ангиопатий преобладает необратимая фаза агрегации, которая обусловлена влиянием комплекса нескольких агрегирующих агентов (АДФ, коллагена и др.) на фоне поврежденной сосудистой стенки. Эти обстоятельства практически всегда приводят к необратимой агрегации и способствуют внутрисосудистому тромбообразованию.

ВЫВОДЫ:

1. Содержание оксида азота в тромбоцитах и моноцитах при неосложненном течении СД 1 типа оказалось сниженным, а при наличии осложнений - повышенным, что может инициировать развитие сосудистых осложнений диабета.
2. Функциональная активность моноцитов и тромбоцитов, определенная методом хемилюминесценции, при СД 1 типа повышена более значительно при развитии микроангиопатий.
3. У больных СД-1 наблюдается вторичное, обусловленное потреблением кровяных пластинок, снижение агрегационной способности тромбоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин М. И. Роль гликирования белков, окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений при сахарном диабете // Сахарный диабет. - 2002. № 4. -С. 8-16.
2. Голиков П.П. Оксид азота в клинике неотложных заболеваний.-М.: ИД Медпрактика-М, 2004.-180 с.
3. Ефимов А.С. Диабетические ангиопатии.-М.-1989.-288 с.
4. Колесник Ю. М., Орловский М. А. Панкреатические островки: некоторые аспекты морфологии, физиологии и процессов деструкции при сахарном диабете типа 1 // Пробл. эндокринологии. -2004. -T.50, №2. -С. 3-9.
5. Корякина Л.Б., Андреева Е.О., Кузнецова Э.Э. и др. Эндотелий (функциональные особенности, дисфункция, способы ее коррекции) // Тромбоз, гемостаз и реология.-2005. №4. -С.3-11.
6. Митерева Д.Е., Агафонова В.Е. Модификация метода хемилюминисцентного анализа для оценки активности фагоцитов цельной крови сенсибилизованных животных // Клин. лаб. диагност. -2004.-№3.-С.47-50.
7. Титович Е. В., Кураева Т. Л. Маркеры разрушения \square -клеток на этапах развития сахарного диабета типа 1 // Сахарный диабет. -2002. -№2. -С. 18-22.