Обмен гликозаминогликанов у больных сахарным диабетом с диабетической нефропатией

И.В. Моругова, Ш.З. Загидуллин

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа

Проблема сосудистых осложнений сахарного диабета (СД) является одной из наиболее актуальных и сложных в современной эндокринологии. Несмотря на общность механизмов развития микроангиопатий при СД, безусловно, существуют отличия в патогенезе поражения сосудов и зависимость от морфофункциональных особенностей пораженного органа. Установлено, что пусковым фактором развития микроангиопатий являются гипергликемия и индуцированные ею метаболические нарушения: неферментативное гликирование, окислительный и карбонильный стресс, активация полиолового шунта и активности протеинкиназы С, гиперлипидемия, нарушения в системе гемостаза, изменение обмена коллагена и протеогликанов. Наиболее грозным сосудистым осложнением СД является диабетическая нефропатия (ДН) как ведущая причина смерти больных СД 1 типа и третья по частоте после сердечно-сосудистых осложнений и опухолей у больных СД типа 2 [4].

Изучение патогенеза развития ДН и гломерулосклероза выявило изменение состава гликозаминогликанов (ГАГ) и протеогликанов в базальных мембранах клубочков и сосудистой стенке [5]. Данные гистологической находки позволили выдвинуть гипотезу о нарушении синтеза гепарансульфатпротеогликана (перлекана).

Протеогликаны – комплексные соединения, состоящие из ГАГ и белков, являются важнейшими биохимическими компонентами мезангия и базальных мембран. Они обеспечивают нормальную проницаемость почечного фильтра, отрицательный заряд эндотелия, регулируют пролиферацию мезангиальных и гладкомышечных клеток и в целом сосудистое и клубочковое ремоделирование. ГАГ – гетерогенная группа веществ, различающихся по структуре, локализации и функциям. В почках присутствуют 3 вида сульфатированных ГАГ – гепарансульфат (ГС), хондроитинсульфат (ХС) и дерматансульфат (ДС). ГС является одним из основных компонентов гломерулярной базальной мембраны, а ХС и ДС локализованы в мезангиальном матриксе. Синтез протеогликанов в почечном клубочке осуществляют мезангиальные клетки [8, 9].

Ряд авторов указывают на нарушение синтеза ГАГ в клубочках почек [1, 5, 10], другие – на повышение протеолиза [1]. Обнаружено также изменение структуры ГС и нормального состава ГАГ в базальных мембранах клубочков. Накопленные данные, касающиеся определения ГАГ в моче, неоднозначны и не позволяют сделать вывод о связи экскреции ГАГ с развитием ДН. Целью настоящего исследования явилось изучение содержания ГАГ и их фракций в сыворотке крови и моче у больных СД с разной длительностью СД, в том числе на разных стадиях ДН.

Объем и методы исследования

Нами было обследовано 138 человек, из них 116 больных СД. Возраст больных был от 16 до 65 лет, длительность СД от 0,5 до 42 лет. Больных СД типа 1 – 70, СД типа 2 – 46, из них 32 получали пероральные сахароснижающие препараты и 14 человек были инсулинозависимы. У 15 больных углеводный обмен был компенсирован, у 11 была субкомпенсация, 90 больных не компенсированы. Контрольную группу составили 22 практически здоровых человека в возрасте от 20 до 45 лет.

Всем больным проводилось общеклиническое обследование: общий анализ крови, мочи, биохимический анализ крови с определением общего белка, билирубина, креатинина, липидного спектра сыворотки крови – общий холестерин (ОХ), триглицериды (ТГ), холестерин липопротеидов высокой плотности (ЛПВП). Холестерин липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и холестерин липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) подсчитывали по формуле Фридвалда, рассчитывался коэффициент атерогенности по Климову. Содержание глюкозы крови определяли в капиллярной крови глюкозоксидазным методом. Клубочковая фильтрация рассчитывалась по формуле Кокрофта и Голи. У всех обследованных лиц (больных СД и лиц контрольной груп-

Таблица 1

Клинико-лабораторная характеристика больных СД с ДН (M±m)

Показатель	Группы больных		
	1-я (n=54)	2-я (n=46)	3-я (n= 16)
Пол, м/ж	22/32	18/28	5/11
Возраст, лет	39,5±2,11	40,3±2,32	46,7±3,2
Длительность СД, лет	4,6±0,96	11,8±1,17	21,1±2,6
Вес, кг	75,2±2,42	70,7±2,16	69,4±3,5
ИМТ	27±1,0	25,8±0,88	25,5±1,1
Гликемия (среднесуточная), ммоль/л	10,7±0,68	10,2±0,69	9,0±1,4
МАУ, мг/сут	8,44±1,07	123,5±10,87	918±240,9
Креатинин крови, мкмоль/л	74,1±2,04	78,9±3,18	85,4±5,3
Скорость клубочковой фильтрации, мл/мин	113,8±5,40	101,9±5,35	88,2±8,2
Общий холестерин, ммоль/л	4,9±0,25	4,6±0,20	5,6±0,41
Триглицериды, ммоль/л	1,8±0,19	1,8±0,22	1,7±0,50
α-Холестерин, ммоль/л	1,55±0,12	1,6±0,09	1,9±0,27
ЛПНП, ммоль/л	2,1±0,19	2,0±0,16	2,9±0,42
ЛПОНП, ммоль/л	0,82±0,09	0,81±0,1	0,53±0,09
Коэффициент атерогенности, ед	2,06±0,22	2,0±0,24	2,4±0,42

пы) отсутствовали другие не связанные с СД заболевания почек по данным анамнеза и лабораторно-инструментальных методов обследования. В обследование не включались больные с нарушением азотовыделительной функции почек.

В зависимости от наличия и выраженности ДН больных распределили на 3 группы: в 1-ю группу вошли больные с нормальной экскрецией альбумина с мочой (до 30 мг/сут), во 2-ю – пациенты с микроальбуминурией (МАУ) до 300 мг/сут, в 3-ю – больные с клинически выраженной диабетической нефропатией с МАУ более 300 мг/сут и протеинурией 0,5 г в сутки и более (табл. 1).

ГАГ определяли в суточной моче и сыворотке крови методом гельфильтрации с последующей анионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе с получением фракций гиалуроновой кислоты (ГК), хондроитинсульфатов (ХС) и гепарансульфатов (ГС), количество которых определяли путем реакции с карбазолом по методу Дише [3]. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ STATISTICA 6.0 для Windows с использованием вычисления t-критерия Стьюдента и коэффициента эмпирической корреляции Пирсона.

Результаты и их обсуждение

Исследование показало, что у больных СД в сравнении с контролем снижено суммарное содержание ГАГ в сыворотке крови и в моче. Снижение ГАГ наблюдалось во всех группах больных и не зависело от стадии ДН (табл. 2, 3).

Уровень ГАГ сыворотки крови коррелировал с возрастом ($r=0,77$, $p<0,05$) в группе больных с выраженной стадией ДН ($r=0,75$, $p<0,05$), ИМТ ($r=0,62$, $p<0,05$), уровнем гликемии ($r=0,82$, $p<0,05$) в группе больных с ДН в стадии МАУ.

Анализ данных фракционного состава ГАГ свидетельствует, что уменьшение содержания ГАГ в сыворотке крови связано с уменьшением фракции гиалуроновой кислоты (ГК) и хондроитинсульфата (ХС). Снижение ГК и ХС наблюдалось даже на стадии нормоальбуминурии, эта тенденция сохранялась и на стадии МАУ и на протеинурической стадии. Показатели содержания ГК и ХС в разные стадии ДН не отличались. Иная тенденция наблюдалась при анализе уровня ГС в сыворотке крови. Его содержание было повышено у больных СД с нормоальбуминурией в сравнении с контрольной группой и продолжало снижаться в стадии МАУ и в выраженной стадии ДН достигло уровня здоровых лиц, достоверно отличаясь от уровня лиц 1-й группы.

Для выяснения характера изменений состава ГАГ в разные стадии ДН нами было подсчитано процентное соотношение различных фракций в суммарном количестве ГАГ в сыворотке крови (см. рисунок). У здоровых лиц основными фракциями ГАГ сыворотки крови являются ГК и ХС; ГС составляет лишь 1/10 часть в общей сумме ГАГ. У больных СД с нормальной экскрецией белка с мочой изменился состав и соотношение ГАГ, увеличилась фракция ГС в 2,7 раза за счет уменьшения фракции ГК и ХС. Эта тенденция сохранялась в стадиях МАУ и протеинурии, причем у больных 3-й группы за счет ХС.

Несмотря на многочисленные исследования, касающиеся экскреции ГАГ и их фракций с мочой, нет единого мнения по этому вопросу [1, 7]. Полученные нами данные свидетельствуют о снижении выделения как общего количества ГАГ, так и фракций ГК и ХС. Экскреция ГС не отличается от экскреции у здоровых лиц. Однако выделение ГС было достоверно выше у больных СД

Таблица 2

Содержание ГАГ в сыворотке крови больных СД с разными стадиями ДН (M+m)

Показатель, мкг/мл	Группы обследованных лиц				p
	контроль	1-я	2-я	3-я	
ГК	7,97±0,47	3,70±0,18*	3,92±0,23*	4,4±0,65*	0,0001
ХС	7,82±0,58	4,23±0,37*	3,52±0,22*	3,05±0,40*	0,00001
ГС	1,9±0,10	2,98±0,21*	2,58±0,25*	1,88±0,30	1-к<0,001 2-к<0,05 1-3<0,03
Суммарные ГАГ	17,69±0,94	10,90±0,52	10,01±0,45	10,32±0,66	0,000001

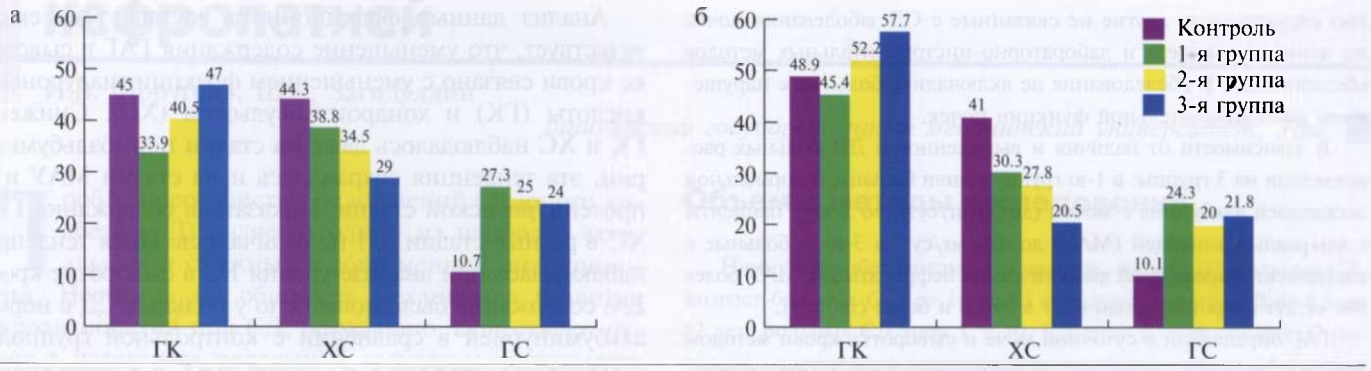
* Достоверно в сравнении с контролем

Таблица 3

Содержание ГАГ в моче обследованных лиц и контрольной группы (M+m)

Показатель, мкг/мл	Группы обследованных лиц				p
	контроль	1-я	2-я	3-я	
ГК	1,75±0,13	0,73±0,05*	0,77±0,06*	0,98±0,17*	0,0001
ХС	1,46±0,13	0,49±0,05*	0,41±0,04*	0,31±0,03*	0,00001 2-3< 0,05
ГС	0,36±0,07	0,39±0,03	0,295±0,03	0,28±0,04	1-2<0,01 1-3<0,05
Суммарные ГАГ	3,57±0,31	1,6±0,10*	1,51±0,12*	1,57±0,17*	0,00001

* Достоверно в сравнении с контролем



Содержание фракций гликозаминогликанов (%) в сыворотке крови (а) и в моче (б) обследованных лиц.

е НАУ в сравнении со 2-й и 3-й группами больных, т.е. снижалось с прогрессированием ДН. Снижение фракции ХС в моче было в 2,7 раза меньше, чем в контроле, и прогрессивно уменьшалось в стадии МАУ и протеинурии – в 4,7 раза ($p<0,05$). Анализ процентного соотношения фракций ГАГ показал, что в моче, как и в крови здоровых лиц, преобладали фракции ГК и ХС. В 1-й группе больных СД процент содержания ГК не отличался от контрольных значений; с прогрессированием ДН экскреция ГК возрастала. Иная тенденция прослеживается с экскрецией ХС. Уже при НАУ процентное содержания ХС уменьшается за счет увеличения фракции ГС и продолжает уменьшаться во 2-й и 3-й группах (см. рисунок).

Для выяснения возможных причинно-следственных связей полученных изменений нами проведен корреляционный анализ указанных показателей. Выяснено, что на уровень ГАГ сыворотки крови может влиять возраст больных СД, о чем свидетельствует положительная корреляция возраста и суммарного содержания ГАГ у больных 3-й группы ($r=0,77$, $p<0,05$), а также положительная корреляция уровня ГК и возраста ($r=0,48$, $p<0,05$). Выделение ХС с мочой уменьшается с увеличением стажа СД, что может косвенно свидетельствовать о нарушении обмена ГАГ с прогрессированием СД ($r= -0,81$, $p<0,05$). На уровень ГАГ сыворотки крови влияет вес и ИМТ больных ($r=0,6$ и $r=048$ соответственно, $p<0,05$). Экскреция суммарных ГАГ с мочой зависит от ИМТ: чем выше ИМТ, тем больше выделение ГАГ с мочой ($r=0,68$, $p<0,05$). Корреляция веса и ИМТ отмечена и с содержанием ГС сыворотки крови ($r=0,75$, $r=0,62$ соответственно, $p<0,05$) и мочи ($r=0,6$ и $r=0,55$ соответственно $p<0,05$), а также ГК мочи ($r=0,65$ и $r=0,68$ соответственно, $p<0,05$). Установлена роль гипергликемии как фактора прогрессирования микроангиопатий, в том числе ДН. Однако отсутствуют данные о связи гликемии с обменом ГАГ. Влияние гликемии на обмен ГАГ неоднозначно. Так, уровень ХС сыворотки положительно коррелирует с гликемией как в стадии НАУ ($r=0,86$), так и МАУ ($r=0,67$), а ГС ($r=0,73$) и общее содержание ГАГ ($r=0,82$) в стадии МАУ. В стадии протеинурии эта связь не прослеживается, т.е. невелируется влияние глюкозы на обмен ГАГ. Обратная тенденция наблюдается в стадии НАУ: чем выше уровень гликемии, тем меньше выделение ХС с мочой ($r= -0,87$, $p<0,05$).

Полученные данные позволяют заключить, что изменения различных фракций ГАГ взаимообусловлены и связаны. Об этом свидетельствуют результаты корреляционного анализа. Так, содержание ГС в сыворотке крови коррелирует с уровнем ГК и ХС ($r=0,67$ и $r=0,51$ соответственно, $p<0,05$). Для ГС мочи аналогичные связи отсутствуют Содержание ГС мочи было лишь связано с функциональным состоянием почек у больных 3-й группы с выраженной стадией ДН и отрицательно коррелировало с уровнем креатинина ($r=-0,88$, $p<0,05$) и зависило от СКФ ($r=0,87$, $p<0,05$).

Установлено, что именно ГС является гликозаминогликаном, который несет в себе анионные участки, обеспечивающие отрицательную заряженность базальной мембраны капилляров (БМК), определяя ее зарядоселективность, поэтому наблюдаемое нами увеличение гепарансульфата в сыворотке крови даже при нормальной экскреции белка с мочой направлено, очевидно, на стабилизацию БМК с целью увеличения ее отрицательного заряда. Этот компенсаторный механизм, по-видимому, истощается с прогрессированием ДН. Это подтверждается тем, что с нарастанием протеинурии уменьшается экскреция всех фракций ГАГ.

Литература

1. И.А. Бондарь, В.В. Климонтов, Г.А. Пауль, А.Б. Пупышев, С.М. Амбросова // Сахарный диабет – 2002. – № 1. – С.46-49.
2. И.И. Дедов, М.В. Шестакова Диабетическая нефропатия. – М., Универсум Паблишинг, 2000.
3. А.Н. Зимницкий, С.А. Башкатов Гликозаминогликаны в биохимических механизмах адаптации организма к некоторым физиологическим и патологическим состояниям. – М., 2004.
4. М.В. Шестакова // Материалы IV Всероссийского Конгресса эндокринологов. – С.-Пб., 2001. – С.237.
5. Hadad S.I., Michelacci Y.M., Schor N. // Biochim.Biophys. Acta. – 1996. – Vol. 21, №1, – p. 18-28.
6. Makino H., Ikedo S., Hasamoto T., Ota Z. Heparan sulphate proteoglycans are lest in patients with diabetic nephropathy. Nephron 1992, 61: 415-421.
7. McCarthy K.I., Abrahamson D.R., Bynum K.R./ Stgofen Pl., Cauchman G.R. //Histochem. Cytochem. 1994, 42: 473-484.
8. Thomas G.J., Mason R.M., Davies M. //Arch. Biochem. Biophys. – 1990. – Vol. 278, № 1. – P. 11-20.
9. Thomas G.J., Mason R.M., Davies M. Biochem. J. – 1991. – Vol. 277, Pt. 1. – P. 81-88.
10. Yokoyama H., Sato K., Okudaria M., Morita C., Takahashi C., Suzuki D. Sakai H., Iwamoto I. // Kidney Int. 1999, 56, 2, 650-58.