

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ ПРЕПАРАТАМИ СУЛЬФОНИЛМОЧЕВИНЫ

А.К. Волковой*, Л.В. Недосугова*, И.А. Рудько**, А.А. Кубатиев**,
М.И. Балаболкин*

*ММА им. И. М. Сеченова, кафедра эндокринологии ФППО
**РМАПО МЗ РФ, кафедра общей патологии и патофизиологии

Завершившееся в 1998 г. исследование UKPDS убедительно доказало роль гипергликемии в развитии диабетических сосудистых осложнений при сахарном диабете (СД) 2 типа. Основной вывод этого крупнейшего клинического исследования - о необходимости поддержания нормогликемии для профилактики прогрессирования диабетических ангиопатий ставит перед практическими врачами вопрос о выборе эффективных средств для достижения этой цели не только с точки зрения их сахароснижающего эффекта, но и в плане возможного предупреждения с их помощью развития специфических диабетических осложнений.

Специфические сосудистые осложнения, или микроангиопатии, развиваются при СД 2 типа наряду с ускоренным прогрессированием атеросклероза, что сопровождается повышенным риском тромбозов, нарушения кровообращения и внезапной смерти. Основные причины этих острых ситуаций при СД 2 типа - это ослабление эндотелийзависимой релаксации [5], изменение сократимости гладкомышечной сосудистой стенки [6] и повышение функциональной активности тромбоцитов [8, 10]. Молекулярные механизмы этих нарушений в последние годы объясняют накоплением свободных радикалов кислорода, образующихся при самоокислении глюкозы и провоцирующих окислительный стресс [3]. Повреждение эндотелиальных клеток, изменение активности тромбоцитов и каскад реакций арахидоновой кислоты - основные эффекты свободных радикалов и продуктов их взаимодействия с липидами - гидроперекисей липидов [13]. Таким образом, существует определенная взаимосвязь между окислительным стрессом и склонностью к тромбозам у больных с диабетическими осложнениями.

Снизить риск прогрессирования диабетических осложнений можно за счет компенсации углеводного обмена с помощью эффективных сахароснижающих средств, как это было подтверждено в исследо-

вании UKPDS. Вместе с тем, вполне перспективной представляется возможность использования специфических препаратов, блокирующих процессы самоокисления глюкозы или «улавливающих» свободные радикалы, для снижения частоты и выраженности диабетических осложнений вне зависимости от степени компенсации углеводного обмена.

В этой связи нам показалось небезынтересным сравнить влияние на окислительный стресс и функциональную активность тромбоцитов двух производных сульфонилмочевины: глибенкламида (Манинил®), как самого эффективного сахароснижающего средства этого ряда, и гликлазида (Диабетона®), характеризующегося как наиболее активный гемоваскулярный препарат сульфонилмочевины, способный нивелировать действие свободных радикалов и снижать реактивность тромбоцитов вне зависимости от уровня гликемии [1, 9].

Материалы и методы

Под нашим наблюдением находились 16 больных (6 мужчин, 10 женщин), страдающих СД 2 типа. В зависимости от получаемой терапии больные были распределены на две группы, сопоставимые по ИМТ, возрасту, длительности заболевания и степени компенсации сахарного диабета. В исследование включались больные с идентичными изменениями на глазном дне, выявляемыми методом прямой офтальмоскопии, подтвердившим диагноз препролиферативной ретинопатии. В 1-ю группу (8 чел.) вошли больные, получавшие на момент включения в исследование диабетон в суточной дозе от 120 до 240 мг. Во 2-ю группу (8 человек) были включены больные, получавшие на момент начала исследования Манинил®-5 в суточной дозе 10-15 мг. Клинические характеристики больных представлены в табл. 1.

Перед началом исследования и через 2 месяца после достижения удовлетворительной компенсации углеводного обмена в соответствии с критериями European Diabetes Policy Group (1993) определяли уровень HbA1c на приборе DCA 2000 Analyzer (Bayer) методом латексного ингибирования иммуоагглютинации с помощью Hemoglobin A1c Reagent Kit. Липиды сыворотки крови определяли ферментативным методом с помощью наборов Boehringer-Mannheim. Агрегацию тромбоцитов исследовали как в богатой тромбоцитами плазме, так и в суспензии тромбоцитов

методом Born G. с графической регистрацией на люминоагрегметре PICA (Chrono-Log, Havertown P., USA). Богатую тромбоцитами плазму получали центрифугированием крови при 120g в течение 15 мин. Суспензию тромбоцитов получали центрифугированием богатой тромбоцитами плазмы с антикоагулянтом ACD при 640g в течение 7 мин. В качестве индукторов агрегации использовали АДФ (Sigma) в конечной концентрации 5 и 1мкМ, коллаген (Chrono-Log) 4мкг/мл, тромбин (Chrono-Log) 0, 5 ед/мл. Цитоплазматический Са определяли флюориметрическим методом по Tsien R. Флюоресценцию регистрировали на спектрофлюориметре "Hitachi – 2500F" (Япония).

Активность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембране тромбоцитов определяли по уровню базального и индуцированного тромбином (0,5 ед/мл) малонового диальдегида (МДА) спектрофотометрическим методом по J. Smith. Исследовали также синтез тромбоцитарного сосудосуживающего фактора – тромбоксана (TX) A2 по его стабильному метаболиту TX B2, который определяли иммуноферментным методом с помощью наборов фирмы "Amersham" (Великобритания).

В качестве контрольной группы обследовано 20 доноров (12 - женщин, 8 - мужчин) идентичного возраста.

Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента. С целью оценки достоверности различий применяли t-критерий Стьюдента для зависимых и независимых переменных (см. табл.).

но также и различий в функциональном состоянии тромбоцитов, как это видно из данных, представленных в табл. 2. Агрегация тромбоцитов больных на индукторы была достоверно повышена ($p < 0,05$) в обеих группах, а уровень цитоплазматического Са превышал уровень контроля более чем в 4 раза. Синтез тромбоксана A2 в тромбоцитах больных достоверно ($p < 0,001$) превышал уровень контроля без достоверной разницы между группами сравнения.

Удовлетворительной компенсации углеводного обмена в обеих исследуемых группах удалось добиться в среднем через 2 мес. наблюдения с помощью коррекции диетотерапии, физической нагрузки и изменения сахароснижающей терапии либо путем коррекции дозы ПСП, либо переводя больных на комбинированную сахароснижающую терапию. В 1-й группе больных, получавших гликлазид, компенсации удалось добиться увеличением дозы гликлазида до 240 мг/сут. у 2 человек (25%), в остальных случаях пришлось комбинировать прием гликлазида с ночной фоновой инсулинотерапией (3 больных), ли-

Таблица 1

Клиническая характеристика оцениваемых групп ($M \pm m$)

Параметры	Доноры (n-20)	Декомпенсация		Компенсация	
		1-я группа – гликлазид (n-8)	2-я группа – глибенкламид (n-8)	1-я группа – гликлазид (n-8)	2-я группа – глибенкламид (n-8)
Возраст, лет	62,4±1,8	61,95±2,1	63,1±1,81		
ИМТ, кг/м ²	26,9±0,4	29,7±0,86	30,3±1,1		
Длительность СД, лет	-	8,62±1,86	7,87±1,44		
Hb A1c, %	5,5±0,1	10,38±0,23	9,81±0,26	7,36±0,32**	7,03±0,3**
Холестерин, мг%	185,1±3,9	240,25±11,23	254,25±10,8	232,33±7,38*	207,91±4,3*
Триглицериды, мг%	83,6±3,7	118,5±10,9	132,25±9,26	116,6±9,54	126,7±5,5
ЛПНП, мг%	110,2±4,2	164,62±15,4	170,0±12,2	120,1±10,5*	149,0±3,3*
ЛПВП, мг%	61,17±2,2	43,06±4,37	44,57±2,52	44,4±2,58	50,16±1,46

* $p < 0,05$ по сравнению с исходным

** $p < 0,001$ по сравнению с исходным

Результаты и обсуждение

Как следует из представленных в табл. 1 данных, на момент начала исследования больные находились в состоянии декомпенсации углеводного и липидного обмена, при этом не отмечалось достоверного различия в уровне Hb A1c и концентрации липидов сыворотки крови в сравниваемых группах. Активизация процессов ПОЛ в мембране тромбоцитов больных СД проявлялась в 6-кратном превышении базального уровня МДА по сравнению с контролем ($p < 0,001$). Под влиянием тромбина тромбоциты больных образовывали в 3 раза больше МДА по сравнению с тромбоцитами доноров, при этом не выявлено никакой разницы в интенсивности этих процессов у больных 1-й и 2-й группы. Не отмече-

бо с Сиофором® в дозе 500-1000 мг/сут. (3 больных).

Во 2-й группе больных, получавших Манинил®-5, компенсации достигали, переводя больных на микронизированные формы Манинила® 1,75 мг и 3,5 мг. В 50% случаев (4 больных) к микронизированному Манинилу® был добавлен Сиофор® в суточной дозе 1000 мг.

Достижение компенсации углеводного обмена сопровождалось достоверным ($p < 0,001$) снижением HbA1c. При этом отмечалась и тенденция к снижению гипер- и дислипидемии. Не отмечено достоверной разницы в оцениваемых параметрах липидного и углеводного обмена между группами сравнения на фоне компенсации углеводного обмена (см. табл.1).

При достижении компенсации углеводного обмена получено достоверное снижение базального и индуцированного МДА, однако не удалось добиться

ся его нормализации ни на фоне монотерапии, ни на фоне комбинированного лечения (см. табл. 2). Функциональная активность тромбоцитов также менялась, что проявилось достоверным снижением амплитуды агрегации тромбоцитов на тромбин и коллаген ($p < 0,05$) в обеих группах, тенденцией к снижению агрегации на АДФ в 1-й группе по сравнению с достоверным ($p < 0,05$) снижением агрегации на АДФ во 2-й группе больных. Уровень цитоплазматического кальция, как базального, так и стимулированного тромбином и АДФ, также достоверно снижался в обеих группах ($p < 0,05$), равно как и концентрация тромбоксана B_2 .

ношении подавления свободнорадикального окисления.

Показано, что при сахарном диабете повышена функциональная активность тромбоцитов, что проявляется в повышенной агрегации [10]. При проведении нашего исследования мы ожидали увидеть различие в функциональной активности тромбоцитов больных, получавших глибенкламид и гликлазид. Однако нами выявлена одинаковая повышенная агрегация тромбоцитов в обеих исследуемых группах, достоверно превышающая донорскую, при декомпенсации углеводного обмена, вне зависимости от получаемой сахароснижающей терапии. На-

Таблица 2

Динамика показателей функциональной активности тромбоцитов у больных СД 2 типа на фоне лечения ($M \pm m$)

Параметры	Доноры (n-20)	Декомпенсация		Компенсация	
		1-я группа – гликлазид (n-8)	2-я группа – глибенкламид (n-8)	1-я группа – гликлазид (n-8)	2-я группа – глибенкламид (n-8)
Hb A1c, %	5, 5±0, 1	10, 38±0, 23**	9, 81±0, 26**	7, 36±0, 32**	7, 03±0, 3**
МДА (баз), нМ/10°тр.	1, 98±0, 15	7, 95±0, 49**	8, 21±0, 77**	5, 96±0, 69*	6, 3±0, 67
МДА (инд), нМ/10°тр.	4, 15±3, 8	12, 37±0, 25*	12, 52±0, 57*	10, 8±1, 29	9, 8±1, 02*
Агрегация на тромбин, %	83, 63±0, 62	93, 25±0, 7*	93, 75±0, 36	84, 33±1, 49**	86, 8±0, 76**
Агрегация на коллаген, %	56, 8±1, 49	76, 25±1, 6**	79, 25±1, 33**	66, 0±3, 6*	64, 4±2, 1*
Агрегация на АДФ 5мкМ, %	58, 1±1, 88	65, 25±2, 3*	68, 75±3, 9*	60, 5±2, 47	58, 0±2, 3*
Агрегация на АДФ 1 мкМ, %	17, 35±1, 15	32, 12±2, 08**	37, 37±3, 8**	23, 5±3, 7	31, 6±4, 7
Цитозольный Са (баз), нМ	132, 1±15, 4	653, 1±91, 0**	651, 1±81, 1**	275, 8±23, 7*	288, 9±16, 6**
Тромбин-инд. Са ²⁺ , нМ	577, 6±55, 5	1391, 3±161, 8*	1341, 4±155, 6*	845, 0±84, 8*	788, 2±146, 3*
АДФ-инд. Са ²⁺ , нМ	388, 5±70, 0	615, 1±67, 4**	672, 4±135, 3*	502, 2±106, 5*	434, 0±52, 8**
Тромбоксан B ₂ , пг/мл	32, 61±5, 17	106, 22±10, 58*	108, 9±8, 22*	64, 21±5, 3*	75, 13±4, 2*

Примечание. Достоверность различий:

1. Для декомпенсации: *, ** - $p < 0,05$ и $p < 0,001$ по сравнению с донорами.
2. Для компенсации: *, ** - $p < 0,05$ и $p < 0,001$ по сравнению с исходным.

Анализ полученных результатов дает основание утверждать, что компенсация углеводного обмена, действительно, способствует снижению окислительного стресса, как это признано сегодня большинством исследователей [4, 11]. Самоокисление глюкозы обуславливает образование свободных радикалов кислорода, усиливающих процессы перекисного окисления липидов плазмы и клеточных мембран. Отражением этого процесса является в первую очередь повышение концентрации базального и тромбининдуцированного МДА, являющегося конечным продуктом ПОЛ, в ходе циклооксигеназного каскада арахидоновой кислоты. Снижение уровня гликемии сопровождается и подавлением ПОЛ, что объективно доказывается достоверным снижением МДА, выявленным в обеих исследуемых группах. Вместе с тем следует отметить, что нами не отмечено никакой разницы между сравниваемыми группами, что не подтверждает данных O'Brien [15], выявивших антиоксидантный эффект гликлазида в от-

против, только при достижении компенсации мы получили достоверное снижение амплитуды агрегации тромбоцитов без существенных различий между сравниваемыми группами. Молекулярные механизмы повышения агрегации тромбоцитов при сахарном диабете на сегодняшний день остаются не вполне ясными, однако современные представления о физиологии тромбоцитов позволяют объяснить эти нарушения. Повышение функциональной активности тромбоцитов сопровождается повышением цитоплазматического кальция, что индуцирует биосинтез тромбоксана кровяными пластинками, который повышает тромбоцитарную агрегацию [19]. Участие цитоплазматического кальция в процессе активации тромбоцитов опосредуется несколькими механизмами. В первую очередь, это обусловлено активацией мембранных фосфолипаз C и A2, под влиянием которых инициируется синтез диацилглицерола и 1, 4, 5- инозитолтрифосфата (ИФ-3) в фосфолипидном слое мембраны тромбоцита, а также запускается циклооксигеназный механизм арахидонового каскада, приводящий к активации тромбок-

сансинтазы. ИФ-3 опосредует мобилизацию кальция из внутриклеточных депо [7]. В свою очередь истощение запасов внутриклеточного кальция инициирует так называемый "заместительный" вход кальция в клетку [16]. С другой стороны, чрезмерное поступление кальция в тромбоцит приводит к активации Са-чувствительной NO-синтазы и повышению синтеза оксида азота (NO) [17]. NO в свою очередь повышает продукцию цГМФ, что приводит к активации протеинкиназы С и блокаде "заместительного" входа кальция, а следовательно, к снижению внутриклеточного кальция и агрегационной способности тромбоцита [14, 20]. Нарушение этой сложной системы координации функциональной активности тромбоцитов при сахарном диабете связывают с развитием окислительного стресса вследствие гипергликемии [18]. Образующиеся свободные радикалы кислорода, активизируя процессы ПОЛ, изменяют фосфолипидный состав мембраны тромбоцита и, повышая активность фосфолипазы С, стимулируют образование ИФ-3, что, в свою очередь, приводит к повышению концентрации внутриклеточного Ca^{2+} за счет мобилизации его из внутриклеточных депо. С другой стороны, инсулинорезистентность, характерная для СД 2 типа, обуславливает снижение синтеза цГМФ за счет снижения активности NO-синтазы [18], что сопровождается неограниченным поступлением кальция в тромбоциты. Результатом этих нарушений и является более чем четырехкратное повышение содержания внутриклеточного кальция, коррелирующее с повышенной агрегацией тромбоцитов на различные индукторы, выявленной нами в обеих исследуемых группах.

Напротив, достижение компенсации углеводного обмена сопровождается достоверным снижением внутриклеточного кальция и агрегации тромбоцитов, что может быть связано как со снижением процессов ПОЛ в мембранах кровяных пластинок и соответствующим снижением образования ИФ-3, так и с повышением чувствительности к инсулину под действием препаратов сульфонилмочевины [4], в результате чего следует ожидать стимуляцию продукции цГМФ в тромбоцитах и подавление их функциональной активности.

Следует отметить, что снижение агрегации в ответ на тромбин и коллаген в обеих группах было достоверным ($p < 0,001$) при достижении компенсации углеводного обмена, тогда как в ответ на АДФ достоверность снижения агрегации выявлялась только во 2-й группе больных, получавших Манинил ($p < 0,05$). В отличие от тромбина АДФ не вызывает рецепторзависимого образования ИФ-3 в тромбоци-

тах, приводящего к мобилизации внутриклеточного кальция из эндоплазматического ретикулума, а повышает поступление внеклеточного Ca^{2+} путем открытия АДФ-зависимых неселективных кальциевых каналов [16]. Снижение поступления внеклеточного Ca^{2+} в тромбоциты под действием АДФ, выявленное нами на фоне компенсации углеводного обмена, обуславливает достоверное снижение агрегации тромбоцитов на данный индуктор во 2-й группе больных и свидетельствует о более выраженном повышении чувствительности к инсулину под действием глибенкламида, что может приводить к повышению продукции NO в тромбоцитах и индуцировать образование цГМФ, блокирующего кальциевые каналы.

Логичным итогом снижения уровня внутриклеточного кальция и процессов ПОЛ в мембране тромбоцитов является снижение синтеза тромбоксана B2 ($p < 0,05$), выявленного при компенсации углеводного обмена, без значимой разницы в оцениваемых группах.

Таким образом, проведенный сравнительный анализ не выявил преимуществ гликлазида перед глибенкламидом в отношении коррекции реovasкулярных изменений, развивающихся на фоне окислительного стресса. В этом отношении приходится согласиться с мнением А. Melander и соавт. [12], что, скорее всего, все препараты сульфонилмочевины способны улучшать агрегацию тромбоцитов не прямым эффектом, а опосредованно, за счет улучшения метаболического контроля. Наши результаты соответствуют выводам об отсутствии достоверной разницы между двумя препаратами по влиянию на функциональную активность тромбоцитов, сделанным S. Baba и соавт. [2] в ходе двойного слепого рандомизированного исследования, включавшего 289 пациентов. При проведении исследований [1, 9], свидетельствующих о преимуществах гликлазида перед другими препаратами сульфонилмочевины, не проводилось сравнительного анализа либо исследовались пациенты с впервые выявленным сахарным диабетом без выраженных сосудистых изменений. Наши результаты свидетельствуют, что отсутствие компенсации углеводного обмена вызывает прогрессирование гемореологических нарушений, являющихся основной причиной формирования диабетических ангиопатий, вне зависимости от вида получаемой сахароснижающей терапии. И, напротив, достижение компенсации углеводного обмена любыми средствами вызывает улучшение гемореологических показателей, снижая риск прогрессирования диабетических сосудистых осложнений.

Литература

1. Akanuma J., Kosaka K. et al. Long term comparison of oral hypoglycemic agents in diabetic retinopathy. Gliclazide vs other sulphonylureas. *Diabetes Res Clin Pract.* 1988, v. 5, p. 81-90.
2. Baba S., Nakagawa S. et al. Comparison of gliclazide and glibenclamide treatment in non-insulin-dependent diabetes. *J. Exp Med* 1983, Dec 141, Suppl 693-706.
3. Baynes J. W. Perspectives in diabetes. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, 1991, v. 40, p. 405-412.
4. Beck-Nielsen H., Hother-Hielsen O., Pedersen O. Mechanism of action of sulphonylureas with special reference to the extrapancreatic effect: an overview. *Diabet Med* 1988, v. 5, p. 613-620.
5. Cohen R. Dysfunction of vascular endothelium in diabetes mellitus. *Circulation* 1993, v. 87 (Suppl V), V67-V76.
6. Hattori Y., Kawasaki H. et al. Attenuated contractile response of diabetic rat aorta to caffeine but not to noradrenaline in Ca^{2+} -free medium. *Eur J Pharmacol.* 1994, v. 256, p. 215-219.
7. Heemskerk J. W. M., Sage S. O. Calcium signalling in platelets and other cells. *Platelets* 1994, v. 5, p. 295-316.
8. Ishii H., Umeda F., Hachimoto T., Nawata H. Changes in phosphoinositide turnover Ca^{2+} mobilization and protein phosphorylation in platelets from NIDDM patients. *Diabetes*, 1990, v. 39, p. 1562-1568.
9. Jennings P. E., Scott N. A. et al. Effects of gliclazide on platelet reactivity and free radicals in NIDDM patients: clinical assessment. *Metabolism*. 1992, v. 41 (suppl I), p. 36-39.
10. Levy S. B. Platelets and diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 1984, v. 311, p. 665-667.
11. Lyons T. J., Li W., Wells-Knecht M. C., Jokl R. Toxicity of mildly modified low-density lipoproteins to cultured retinal capillary endothelial cells and pericytes.
12. Melander A., Bitsen P.-O., Faber O., Groon L. Sulphonylurea antidiabetic drugs: an update of their clinical pharmacology and rational therapeutic use. *Drugs*, 1989, v. 37, p. 58-72.
13. Mullarkey C. J., Edelstein D., Brownlee M. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochim Biophys Res Commun*, 1990, v. 173, p. 932-939.
14. Nakashima S., Tohmatsu T. et al. Inhibitory action of cGMP on secretion, phosphoinositide hydrolysis and calcium mobilization in thrombin stimulated human platelets. *Biochim Biophys Res Commun*, 1986, v. 135, p. 1099-1104.
15. O'Brien R. S., Luo M. Antioxidant properties of sulphonylureas. *Diabetes* 1996, v. 45 (suppl I), p. 36-39.
16. Sage S. O., Merritt J. E., Hallam T. J., Rink T. J. Receptor-mediated calcium entry in fura-2-loaded human platelets with ADP and thrombin. *Biochem J.*, 1989, v. 258, p. 923-926.
17. Song K.-H. L. Q., Lantoin F., Devynck M.-A. Influence of authentic nitric oxide on basal cytosolic (Ca^{++})_i and Ca^{++} release from internal stores in human platelets. *Br J Pharmacol*, 1996, v. 119, p. 1361-1366.
18. Schaeffer G., Wascher T. S., Kostner G. M., Graer W. F. Alterations in platelet Ca^{2+} signalling in diabetic patients is due to increased formation of superoxide anions and reduced nitric oxide production. *Diabetologia*, 1999, v. 42, p. 167-176.
19. Siess W. Molecular mechanisms of platelets activation. *Physiol Rev* 1989, v. 69, p. 48-178.
20. Trovati M., Massucco P., Mattiello L. The insulin-induced increase of guanosine-3', 5'-cyclic monophosphate in human platelets is mediated by nitric oxide. *Diabetes*, 1996, v. 45, p. 768-770.