

ВЛИЯНИЕ КОНТРОЛИРУЕМОГО ПЕРЕХОДА ОТ ГИПЕРГЛИКЕМИИ ДО ГИПОГЛИКЕМИИ НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ И АКТИВНОСТЬ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ АНТИКОАГУЛЯНТОВ И ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 ТИПА



© И.Р.Ярек-Мартынова¹, М.Ю.Мартынов², К.Г.Саркисова³, Е.О.Кокшарова¹, Е.Е.Мишина¹, А.Н.Ясаманова², М.В.Шестакова¹

¹ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии Минздрава России, Москва

²ФГБОУ ВО Российский национальный медицинский исследовательский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва

³ФГАУ ВО Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

ОБОСНОВАНИЕ. Гипогликемия у больных сахарным диабетом 1 типа (СД1) вследствие коррекции гипергликемии может являться фактором риска развития сердечно-сосудистых и цереброваскулярных осложнений. Одной из причин этих осложнений может быть активация тромбоцитарного и плазменного звена гемостаза при недостаточности физиологических антикоагулянтов.

ЦЕЛЬ. Оценка влияния контролируемого перехода от гипергликемии к эугликемии и затем к гипогликемии на индуцированную агрегацию тромбоцитов, активность физиологических антикоагулянтов и фактора Виллебранда у пациентов с СД1 без макро- и микрососудистых осложнений.

МЕТОДЫ. Обследовано 11 пациентов с СД1: 6 мужчин и 5 женщин (возраст $23,7 \pm 5,6$ лет, длительность СД $11,7 \pm 2,2$ года; уровень HbA_{1c} $9,12 \pm 2,19\%$). Показатели индуцированной агрегации тромбоцитов, физиологические антикоагулянты (протеин S, протеин C, АТ III) и фактор Виллебранда (ФВб) были изучены в ходе гиперинсулинемического (1 мЕд/кг/мин) гипогликемического клэмпа. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программы SPSS 22.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ. В период гипогликемии агрегация тромбоцитов на индукторы повышалась по сравнению с показателями на фоне гипергликемии и эугликемии, при этом на этапе эугликемии достоверной активации тромбоцитов не отмечалось, а повышение агрегации наблюдалось только при гипогликемии. Повышение агрегационной активности на фоне гипогликемии от исходной гипергликемии составило 23,9% для тромбина, 30,6% и 30,9% – для АДФ и арахидоновой кислоты и 69,4% и 70,8% – для коллагена и ристоцетина. При этом агрегация на коллаген, АДФ и арахидоновую кислоту оставалась в пределах верхних границ нормы, агрегация на тромбин превышала верхние границы нормы, а агрегация на ристоцетин оставалась достоверно ниже нижней границы нормы. Активность протеина S была выше в условиях гипогликемии по сравнению с эугликемией ($p=0,046$) и гипергликемией ($p=0,046$). Концентрация АТ-III на фоне гипергликемии была значительно выше нормы, затем достоверно снижалась при достижении эугликемии и сохранялась на этом уровне при гипогликемии (достоверно выше верхней границы нормы). Активность протеина C и ФВб не менялись достоверно при переходе от гипергликемии к эугликемии и к гипогликемии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. У пациентов с СД1 контролируемый переход от гипергликемии к эугликемии и затем к гипогликемии сопровождается достоверным повышением агрегации тромбоцитов и увеличением активности протеина S. Основное значение в повышении активности тромбоцитов имело быстрое развитие гипогликемии, а не собственно процесс снижения уровня глюкозы. Повышение активности свободного протеина S является компенсаторной реакцией, нивелирующей повышенную агрегацию тромбоцитов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сахарный диабет 1 типа; гемостаз; агрегация тромбоцитов; физиологические антикоагулянты; фактор Виллебранда; гиперинсулинемический гипогликемический клэмп

INFLUENCE OF HYPERINSULINEMIC – HYPOGLYCEMIC CLAMP ON INDUCED PLATELET AGGREGATION, ACTIVITY OF PHYSIOLOGICAL ANTICOAGULANTS AND VON WILLEBRAND FACTOR IN PATIENTS WITH TYPE I DIABETES

© Iwona R. Jarek-Martynowa¹, Mikhail Y. Martynov², Karina G. Sarkisova³, Ekaterina O. Koksharova¹, Ekaterina E. Mishina¹, Albina N. Yasamanova², Marina V. Shestakova¹

¹Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia



BACKGROUND. Intensive glycaemic control in patients with type 1 diabetes may lead to hypoglycaemia and thus increase the risk of cardiovascular and cerebrovascular events. Platelet activation and/or decreased activity of physiological anticoagulants during hypoglycaemia may play a role in the development of cardiovascular or cerebrovascular complications.

AIMS. To investigate induced platelet activity, the activity of physiological anticoagulants, and the von Willebrand factor in patients with type 1 diabetes with the hyperinsulinaemic–hypoglycaemic clamp.

MATERIALS AND METHODS. We examined 11 patients with type 1 diabetes without macro- and micro-vascular complications (6 males, 5 females, mean age 23.7 ± 5.6 years, A1C 9.7 ± 2.3%). Induced platelet aggregation, physiological anticoagulants (Protein S, Protein C, AT III) and the von Willebrand factor were studied at hyperglycaemic, euglycaemic, and hypoglycaemic stages during use of a hyperinsulinaemic (1 mU/kg/min) hypoglycaemic clamp.

RESULTS. Platelet aggregation to all agonists increased significantly during the hypoglycaemic stage, compared with the euglycaemic or hyperglycaemic stages. There was no difference in platelet aggregation between the euglycaemic and hyperglycaemic stages. Platelet aggregation to all agonists increased during the hypoglycaemic stage compared with the hyperglycaemic period: thrombin–23.9%, ADP–30.6%, arachidonic acid–30.9%, collagen–69.4% and ristocetin–70.8%. During hypoglycaemia aggregation to ADP, arachidonic acid and collagen remained within normal limits (upper quartile); aggregation to thrombin was significantly above normal limits and aggregation to ristocetin remained significantly below lower limits. Protein S activity was significantly increased during hypoglycaemia compared with euglycaemia ($p = 0.046$) and hyperglycaemia ($p = 0.046$). Antithrombin-III activity decreased significantly at the euglycaemic and hypoglycaemic stages, compared with the hyperglycaemic period, but still remained significantly elevated above the upper threshold. Protein C and vWf activity did not change significantly.

CONCLUSIONS. In patients with type 1 diabetes platelet aggregation and protein S activity increases significantly at the hypoglycaemic stage of the hyperinsulinaemic–hypoglycaemic clamp. Platelet activation is directly caused by hypoglycaemia and not by decreasing glucose levels. Increased protein S activity is a compensatory response to platelet activation.

KEYWORDS: type 1 diabetes; hemostasis; induced platelet aggregation; physiological anticoagulants; von Willebrand factor; hyperinsulinaemic hypoglycaemic clamp

Изменение гемостаза и дисфункция эндотелия имеют существенное значение в развитии сосудистых нарушений у пациентов с сахарным диабетом 1 типа (СД1) [1, 2]. У этих пациентов отмечаются сложные, подчас разнонаправленные изменения, отражающие дисбаланс тромбоцитарного и плазменного гемостаза и физиологических антикоагулянтов [3, 4, 5]. Влияние на состояние гемостаза также оказывают уровень глюкозы и степень компенсации углеводного обмена, особенности медикаментозной терапии [6, 7]. Изучение в динамике маркеров дисфункции эндотелия, локального воспалительного процесса и плазменного гемостаза у пациентов СД1 указывает на их нарастающие изменения по мере увеличения продолжительности заболевания [8]. У больных СД1 отмечаются изменения содержания физиологических коагулянтов, в первую очередь протеина S и протеина C, которые также коррелируют с длительностью заболевания, наличием и выраженностью осложнений [9, 10]. Характерны также изменения тромбоцитарного гемостаза [11]. В целом наблюдается прокоагулянтный сдвиг [5], что проявляется наличием в крови микрочастиц (фрагментов мембран) активированных тромбоцитов [12, 13], увеличением дисперсии среднего объема и гетерогенности тромбоцитов и количества тромбоцитов больших размеров [14].

Эпизоды гипогликемии могут сопутствовать интенсифицированной инсулинотерапии у больных СД1. Повторные эпизоды гипогликемии приводят к ухудшению эндотелий-зависимого расширения сосудов и к более быстрому нарастанию изменений комплекса интима-медиа, что позволяет рассматривать повторяющуюся гипогликемию как возможный фактор ускоренного развития атеросклеротического поражения сосудистой стенки [15]. Однократные и повторные эпизоды гипогли-

кемии как у больных СД1, так и у здоровых испытуемых приводят к увеличению в крови уровней сосудистых и межклеточных молекул адгезии, ингибитора активатора плазминогена, фактора роста сосудистого эндотелия [16, 17]. Гипогликемия у здоровых лиц и у больных СД1 оказывает многоплановое влияние на тромбоцитарный гомеостаз. Так, у здоровых лиц снижение уровня глюкозы крови сопровождается увеличением внутритромбоцитарного кальция и нарушением структуры митохондрий [18] и способствует повышению агрегации тромбоцитов [19]. Острая гипогликемия до уровня 1,7–2,9 ммоль/л у здоровых испытуемых сопровождается повышением чувствительности тромбоцитов к проагрегантам и реакцией высвобождения [20]. Гипогликемия также повышает чувствительность тромбоцитов к проапоптотической молекуле BH31-20, что запускает сигнальный путь апоптоза в митохондриях и вызывает клеточную гибель, которая усиливает внутрисосудистое свертывание и повреждение сосудистой стенки [18]. Повышение агрегации тромбоцитов при гипогликемии связывают со стрессовой реакцией, активацией симпатoadrenalовой системы и выбросом катехоламинов [21]. При этом первичная активация α -адренорецепторов тромбоцитов под влиянием катехоламинов sensibilizes другие рецепторы тромбоцитов и подготавливает их к активному взаимодействию с соответствующими агонистами [22].

ЦЕЛЬ

Целью настоящего исследования явилась оценка влияния контролируемого перехода от гипергликемии к эугликемии и затем к гипогликемии на индуцированную

агрегацию тромбоцитов, активность физиологических антикоагулянтов и фактора Виллебранда (ФВБ) у пациентов с СД1 без макро- и микрососудистых осложнений.

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

Дизайн исследования

Обследовано 11 пациентов с СД1: 6 мужчин и 5 женщин в возрасте $23,7 \pm 5,6$ лет с продолжительностью заболевания $11,7 \pm 2,3$ года без микро- и макрососудистых осложнений (табл. 1). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии соответствия

Из исследования исключались пациенты, у которых имелись указания:

1. на диабетическую ретинопатию при офтальмоскопии глазного дна в условиях мидриаза;
2. снижение клубочковой фильтрации менее 60 мл/мин/1,73 м²; наличие микроальбуминурии более 20 мг/л в утренней порции мочи;
3. перенесенные сердечно-сосудистые события по данным анамнеза и медицинской документации (ИМ, ОНМК);
4. нарушения сознания при гипогликемии или предыдущую серьезную реакцию на гипогликемию;
5. черепно-мозговую травму;
6. злоупотребление алкоголем или наркотическими средствами;
7. тромбоцитопатии и коагулопатии;
8. заболевания печени с нарушением ее функции в анамнезе;
9. прием антиагрегантов, антикоагулянтов и оральных контрацептивов.

Гликированный гемоглобин (HbA_{1c}) определялся в капиллярной крови методом высокоэффективной жидкостной катионной хроматографии на анализаторе «Dia

Таблица 1. Клиническая характеристика больных

Исследуемые показатели	Значения (M±SD)
Число больных, n	11
Мужчины/женщины	6/5
Возраст, лет	$23,7 \pm 5,6$
Индекс массы тела, кг/м ²	$26,4 \pm 4,4$
Длительность СД1, лет	$11,7 \pm 2,3$
Уровень HbA _{1c} , %	$9,12 \pm 2,19$
Уровень креатинина, мкмоль/л	$73,5 \pm 5,7$
Скорость клубочковой фильтрации (СКД-ЕП), мл/мин/1,73 м ²	$115,7 \pm 10,0$
АЛТ, ед/л	$18,3 \pm 9,7$
АСТ, ед/л	$14,0 \pm 6,0$
Общий холестерин, ммоль/л	$4,5 \pm 0,74$
ЛПНП, ммоль/л	$2,8 \pm 0,54$
ЛПВП, ммоль/л	$1,4 \pm 0,3$
ТГ, ммоль/л	$0,95 \pm 0,54$
Микроальбуминурия, мг/л	$13,8 \pm 8,6$

Stat» фирмы «Bio-Rad» (Германия). Уровень экскреции альбумина с мочой – методом иммунотурбидиметрии на биохимическом анализаторе «HITACHI 912» (Roche) с использованием диагностических наборов Tina-Quant A ALBUMIN.

Протокол гиперинсулинемического гипогликемического клэмпа

Протокол исследования включал контролируемый переход от гипергликемии к эугликемии и затем к гипогликемии с взятием крови в конце каждого этапа гликемии. В зависимости от варианта инсулинотерапии больные были разделены на 2 подгруппы: 1) пациенты, находившиеся на интенсифицированной инсулинотерапии в базис-болюсном режиме путем повторных ежедневных подкожных инъекций при помощи индивидуальных ручек-шприцов и 2) пациенты, находившиеся на постоянном подкожном введении инсулина ультракороткого действия с помощью инсулиновой помпы. В первой подгруппе гипергликемия достигалась посредством уменьшения дозы продленного инсулина перед сном. Во второй подгруппе гипергликемия достигалась путем снижения базальной скорости введения инсулина на 50% за 4 ч до проведения процедуры.

Гиперинсулинемический гипогликемический клэмп проводился пациентам, пришедшим натощак (8–12 ч без приема пищи). Исследование начиналось в 9.00. Контролируемая гликемия достигалась при помощи одномоментного введения генно-инженерного человеческого инсулина короткого действия с гиперинсулинемической скоростью (1 мЕд/кг/мин; часть пациентов требовали коррекции гипергликемии, ввиду чего дополнительно болюсно внутривенно вводился инсулин короткого действия (ИКД) 3–8Ед) и 20% раствор глюкозы. Контроль гликемии осуществлялся каждые 5 мин на этапе эугликемии и каждые 3–5 мин во время гипогликемии, с оценкой клинического состояния пациентов, в том числе переносимости гипогликемии.

Для оценки уровня глюкозы кровь бралась из локтевой вены в микроювету анализатора глюкозы НетоСие 201+. Первое взятие крови проводилось на фоне исходной гипергликемии ($15,0 \pm 2,9$ ммоль/л). Далее в течение 70–100 мин достигалась эугликемия (глюкоза $4,3 \pm 0,3$ ммоль/л), которая продолжалась 20–25 мин, в конце которой проводился забор крови (2-е взятие крови). Затем в течение 20–30 мин достигалась гипогликемия (глюкоза $2,4 \pm 0,2$ ммоль/л), которая в зависимости от ее переносимости продолжалась 20–30 мин, после чего также проводилось взятие крови (3-е взятие крови).

Анализ гемостаза включал исследование индуцированной агрегации тромбоцитов, активности протеинов С и S, концентрации антитромбина III и ФВБ.

Индукцированная агрегация тромбоцитов

Для исследования агрегации тромбоцитов забор крови проводился в вакуумные пробирки. В качестве антикоагулянта использовался гирудин в концентрации 15 мкг/мл фирмы Verum Diagnostica GmbH, Германия. Образцы исследовались в течение 15–20 мин после взятия крови. Агрегация тромбоцитов определялась методом импедансной агрегометрии в цельной крови in vitro на 5-канальном полуавтоматическом импедансном агрегометре Multiplate

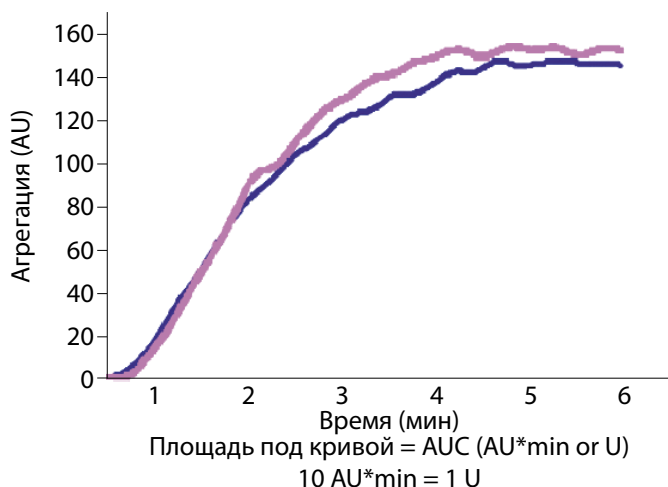


Рис. 1. Агрегационная кривая с использованием системы Multiplate. Примечания: AU – агрегация; AUC – площадь под кривой.

(Verum Diagnostica GmbH, Германия) с использованием реактивов фирмы Dynabyte GmbH, Германия. Исследовалась агрегация тромбоцитов на коллаген (COLtest), тромбин (TRAPtest), аденозиндифосфат – АДФ (ADFtest), ристоцетин (RISTOtest) и арахидоновую кислоту (ASPItest). При анализе агрегации рассчитывалась площадь под агрегационной кривой (рис. 1) как показатель, наиболее полно отражающий тромбоцитарную активность.

Антикоагулянты и фактор фон Виллебранда

Антикоагулянты и фВб определялись методом иммуноферментного анализа с измерением оптической плотности на анализаторе Multilabel Counter (Victor-2) фирмы PerkinElmer, США. Расчет концентрации проводился с помощью программного обеспечения MultiCalc. Забор крови осуществлялся в вакуумные пробирки с 3,8% р-ром цитрата натрия в качестве антикоагулянта. Кровь центрифугировалась при 2500 г в течение 15 мин, и образцы плазмы хранились при температуре -20°C в течение 2 мес.

Продолжительность исследования

Работа выполнена в 2017 г.

Этическая экспертиза

Локальный комитет по этике Первого МГМУ им И.М. Сеченова одобрил исследование. Выписка из протокола № 04-15 заседания локального комитета по этике от 15.04.2015.

Таблица 2. Индуцированная агрегация тромбоцитов (%)

Индукторы	Гипергликемия (15,0±2,9 ммоль/л)	Эугликемия (4,3±0,3 ммоль/л)	Гипогликемия (2,4±0,2 ммоль/л)
Коллаген	36.6 [21.5;69.2]	34.5 [21.2;106.2]	62.0* [31.2;121.2]
Тромбин	110.5 [82.2;139.0]	108.0 [88.7;116.7]	137.0** [92.0;147.5]
АДФ	60.5 [44.7;91.7]	53.0 [25.0;81.5]	79.0*** [50.7;108.2]
Арахидоновая кислота	68.0 [48.5;94.0]	64.5 [44.0;137.7]	89.0**** [58.2;134.7]
Ристоцетин	24.0 [11.5;50.0]	36.0 [5.0;57.0]	41.0**** [15.5;74.0]

Примечания: Агрегация на коллаген: $p_{1-3}=0,005^*$; $p_{2-3}=0,005^*$; $p_{1-2}=0,475$; Агрегация на тромбин: $p_{1-3}=0,047^{**}$; $p_{2-3}=0,007^{**}$; $p_{1-2}=0,169$; Агрегация на АДФ: $p_{2-3}=0,028^{***}$; $p_{1-2}=0,126$; $p_{1-3}=0,139$; Агрегация на арахидоновую кислоту: $p_{1-3}=0,017^{****}$; $p_{2-3}=0,168$; $p_{1-2}=0,284$; Агрегация на ристоцетин: $p_{1-3}=0,042^{****}$; $p_{2-3}=0,628$; $p_{1-2}=0,241$

Статистический анализ

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программы SPSS 22.0 for Windows. Описательные статистические данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала (Me [Q1;Q3]). Для сравнения результатов трех и более связанных групп по количественному признаку использовался непараметрический дисперсионный анализ (критерий Фридмана) с дальнейшим парным сравнением групп при помощи непараметрического теста Вилкоксона (W-кр). Критический уровень значимости (p) для проверки статистических гипотез при сравнении статистических показателей принимался менее 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Агрегация тромбоцитов

Агрегация с коллагеном (COLtest) приводит к активации фосфолипазы C с последующей секрецией тромбоцитарных гранул и синтезом тромбоксана A2. Исходно на фоне гипергликемии агрегация тромбоцитов на коллаген составила 36.6% [21.5; 69.2], что было достоверно ($p=0,028$) ниже нормы (N=46–117). В конце периода эугликемии достоверных изменений в агрегации тромбоцитов на коллаген по сравнению с гипергликемией не отмечалось ($p=0,48$, табл. 2). В конце периода гипогликемии агрегация на коллаген достоверно повышалась по сравнению с эугликемией ($p=0,005$) и по сравнению с гипергликемией ($p=0,005$) и достигала нормативных показателей (табл. 2).

Агрегация с тромбином (TRAPtest) отражает потенциальную способность тромбоцитов к агрегации. В качестве индуктора агрегации выступает белок TRAP-6, активирующий рецептор тромбина PAR-1. Агрегация на тромбин в состоянии гипергликемии составила 110.5% [82.2; 139.0] и не отличалась от нормативных показателей лаборатории (N=84–128). При анализе агрегации на фоне эугликемии достоверных отличий по сравнению с гипергликемией не отмечено ($p=0,17$, см. табл. 2). В конце периода гипогликемии отмечалось повышение агрегации тромбоцитов по сравнению с эугликемией ($p=0,027$) и с гипергликемией ($p=0,021$).

Действие АДФ (ADFtest) в качестве индуктора агрегации опосредуется через связывание с рецепторами P2Y12 тромбоцитов. Исходно на фоне гипергликемии агрегация тромбоцитов на АДФ составила 60.5% [44.7; 91.7], что было в пределах нижней ¼ нор-

Таблица 3. Уровень физиологических антикоагулянтов и фактора Виллебранда

	Гипергликемия (15,0±2,9 ммоль/л)	Эугликемия (4,3±0,3 ммоль/л)	Гипогликемия (2,4±0,2 ммоль/л)
Протеин С (%)	101.2 [82.8;117.4]	102.9 [83.4;119.7]	103.7 [84.2;130.8]
Протеин S (%)	76.3 [61.0;84.5]	77.6 [52.6;90.2]	93.6# [79.2;103.4]
АТ III (мкг/л)	493.3 [291.6;705.3]	414.9* [308.0;631.2]	426.9* [253.2;574.4]
ФВб (ед/мл)	0.56 [0.21;0.90]	0.61 [0.26;0.87]	0.49 [0.38;0.74]

Примечания: протеин S: $p_{1-3}=0,046^*$; $p_{2-3}=0,046^*$; антитромбин-III: $p_{1-3}=0,049^*$; $p_{2-3}=0,047^*$

мативных показателей лаборатории (N=57–113). На этапе эугликемии агрегация достоверно не изменялась по сравнению с гипергликемией (см. табл. 2). После достижения гипогликемии наблюдалось повышение агрегации по сравнению с эугликемией ($p=0,015$) и с гипергликемией ($p=0,028$, см. табл. 2), в то же время отличий от нормативных показателей не было достигнуто.

Агрегация с арахидоновой кислотой (**ASPItest**) сопровождается активацией фосфолипазы С и последующим образованием вторичных посредников, мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} и высвобождением эндогенной арахидоновой кислоты. Агрегация тромбоцитов на арахидоновую кислоту в состоянии гипергликемии составила 68.0% [48.5; 94.0], что было достоверно ниже ($p=0,031$) нормативных показателей лаборатории (N=71–115). В конце эугликемического периода достоверных отличий по сравнению с гипергликемией не отмечено ($p=0,24$, см. табл. 2). В конце периода гипогликемии агрегация тромбоцитов повышалась по сравнению с эугликемией ($p=0,028$) и с гипергликемией ($p=0,037$) (см. табл. 2).

Агрегация с ристоцетином (**RISTOtest**) вызывает vWF-и GpIb-зависимую агрегацию тромбоцитов. На фоне гипергликемии показатели агрегации на ристоцетин составили 24,0% [11,5;50,0] и были достоверно ниже ($p=0,0029$) нормативных значений (N=98–180). В конце периода эугликемии достоверных отличий от гипергликемии не отмечалось. При достижении гипогликемии различия с гипергликемией становились достоверными (см. табл. 2), однако показатели агрегации на ристоцетин, тем не менее, оставались значительно ниже нормы.

Физиологические антикоагулянты

Протеин S – это витамин К-зависимый гликопротеин с массой 70 кДа, который в основном синтезируется гепатоцитами, а также эндотелиальными клетками, клетками Лейдига в семенниках и мегакариоцитами. Функционально активным является свободный протеин S, который выступает как кофактор при активации протеина С [23]. Кроме этого, свободный протеин S самостоятельно проявляет антикоагулянтную активность, замедляя активацию X фактора [23]. На фоне гипергликемии активность свободного протеина S составила 76.3% [61.0; 84.5], что было в границах нижней $\frac{1}{4}$ нормативных показателей (N=60–150). В конце периода эугликемии активность свободного протеина S не менялась по сравнению с гипергликемией (табл. 3). В конце гипогликемии активность свободного протеина S достоверно повышалась по сравнению с эугликемией ($p=0,046$) и гипергликемией ($p=0,046$, табл. 3), выходя за верхние границы нормы.

Протеин С играет важную роль в процессе активации белков в каскаде свертывания крови. Его активирован-

ная форма в связи с протеином S гидролизует связанные с фосфолипидами факторы Va и VIIIa [24]. Исходно на фоне гипергликемии активность протеина С составила 101.2% [82.8;117.4] и не отличалась от нормативных показателей (N=70–130). В конце периода эугликемии и затем гипогликемии активность протеина С не менялась по сравнению с исходным состоянием (см. табл. 3) и оставалась в пределах нормативных значений.

Антитромбин III (АТ-III) – физиологический антикоагулянт, ингибитор всех сериновых протеаз (тромбин, факторы IXa, Xa, XIIa, калликреин, плазмин, урокиназа), вовлеченных в процесс свертывания крови [25]. Исходно концентрация АТ-III составила 493.3 мкг/л [291.6;705.3] и превышала верхние границы нормы на 70,3% (N – до 290 мкг/л, $p=0,0021$). В конце эугликемии и затем гипогликемии отмечалось снижение концентрации антитромбина III на 18–20% по сравнению с гипергликемией (см. табл. 3), которое, однако, было по-прежнему выше нормативных показателей.

Фактор Виллебранда является несущим белком для фактора VIII, образуя с ним комплексы и предотвращая его от преждевременного протеолитического расщепления [26]. Исходно концентрация ФВб составила 0.56 ед/мл [0.21; 0.90] ед/мл, что было в пределах нижней границы нормативных показателей (N=0,5–1,5 ед/мл). При достижении эугликемии и затем гипогликемии его активность не менялась по сравнению с исходным состоянием (см. табл. 3) и оставалась в пределах нижней границы нормативных показателей.

ОБСУЖДЕНИЕ

В выполненном исследовании показано, что у больных СД1 без макро- и микрососудистых осложнений отмечается сбалансированное реагирование гемостаза в ответ на контролируемое снижение уровня глюкозы плазмы от гипергликемии до эугликемии и затем до гипогликемии.

Исходно на фоне гипергликемии показатели агрегации на изучаемые агонисты были ниже или в пределах нормы, что свидетельствовало о достаточных компенсаторных механизмах. Физиологические антикоагулянты – протеин S и протеин С, а также ФВб были также в пределах нормы, в то время как показатели антитромбина III (АТ-III) существенно (на 70,3%) превышали верхние границы нормы. Развитие гипогликемии оказывало активирующее действие на тромбоцитарный гемостаз, и в период гипогликемии агрегация тромбоцитов на все агонисты повышалась по сравнению с показателями на фоне гипергликемии и эугликемии. Очень важным было то, что на этапе эугликемии активации тромбоци-

тов не отмечалось, а повышение агрегации наблюдалось только при гипогликемии. Полученные результаты указывают на то, что значение в повышении активности тромбоцитов имел факт быстрого развития гипогликемического состояния, а не собственно процесс снижения уровня глюкозы. Повышение агрегации на фоне гипогликемии от исходных показателей составило 23,9% для тромбина, 30,6% и 30,9% – для АДФ и арахидоновой кислоты и 69,4% и 70,8% – для коллагена и ристоцетина. При этом агрегация на коллаген, АДФ и арахидоновую кислоту оставалась в пределах верхних границ нормы, агрегация на тромбин превышала верхние границы нормы, а агрегация на ристоцетин оставалась достоверно ниже нижней границы нормы. Повышение агрегации было обусловлено стрессовой реакцией на гипогликемию. По данным Lingenfelser T. [21], быстрое развитие гипогликемии сопровождается выбросом норадреналина, адреналина и других катехоламинов, которые активируют α -адренорецепторы тромбоцитов [27, 28]. В свою очередь, активированные α -адренорецепторы повышают чувствительность других рецепторов тромбоцитов к соответствующим агонистам [22, 29]. Отдельно необходимо обратить внимание на показатели агрегации с ристоцетином. *In vitro* тромбоциты в присутствии ристоцетина связываются с фВб с помощью рецепторов гликопротеина Ib [30], что инициирует процесс активации и агрегации тромбоцитов [27, 31]. Низкая агрегация на ристоцетин была связана с низким уровнем фВб, что отражало сохранность эндотелиального слоя сосудистого русла.

При анализе физиологических антикоагулянтов установлено достоверное повышение активности свободного протеина S. Необходимо отметить, что повышение его активности наблюдалось только при гипогликемии и отсутствовало на этапе нормогликемии. Повышение активности свободного протеина S было обусловлено активацией тромбоцитов и может рассматриваться как компенсаторная реакция. Свободный протеин S имеет два механизма антикоагулянтного влияния. С одной стороны, активация тромбоцитов сопровождается выделением ими киназ, которые сразу же усиливают фосфорилирование свободного протеина S и тем самым повышают в 1,5–2,0 раза его кофакторную активность к протеину C [32]. Фосфорилированный протеин S обладает высоким сродством к отрицательно заряженным фосфолипидам и тем самым улучшает контакт активированного протеина C с мембраной за счет образования комплекса с ним. В свою очередь, активированный протеин C является основным ингибитором активации V и VIII факторов свертывания крови, необходимых для преобразования протромбина в тромбин и последующего формирования из фибриногена фибрина и образования сгустка. С другой стороны, кроме кофакторной активности в отношении протеина C, свободный протеин S проявляет антикоагулянтную активность посредством прямого торможения активации X фактора [23].

Интересной была динамика изменения концентрации АТ-III. АТ-III – основной ингибитор тромбина, активированных IX, X и XII факторов, плазмина [25, 33], активность

которых повышается у больных СД1 [24, 34]. Исходно на фоне гипергликемии концентрация АТ-III была значительно выше нормативных значений, затем достоверно снижалась при достижении нормогликемии и сохранялась на этом уровне при переходе к гипогликемии (оставаясь достоверно выше верхней границы нормы). Повышение концентрации АТ-III на фоне гипергликемии может рассматриваться как компенсаторное, направленное на равновесное состояние коагуляционного и антикоагуляционного потенциала крови. Полученные данные позволяют предположить, что повышенная активность АТ-III была реакцией на гипергликемию, а нормализация уровня глюкозы приводила к достоверному уменьшению его активности, но в пределах значений достоверно выше нормы.

Различий в концентрации антигена фВб, – интегрального маркера дисфункции эндотелия, при переходе от гипер- к нормо- и затем к гипогликемии не было установлено, что, вероятно, связано с сохранной функцией эндотелия, т.к. пациенты, включенные в исследование, не имели микро- и макрососудистых осложнений.

ВЫВОДЫ

Таким образом, полученные результаты позволяют предполагать, что у пациентов с СД1 без макро- и микрососудистых осложнений, даже при декомпенсации углеводного обмена ($HbA_{1c} = 9,12 \pm 2,19$) быстрое снижение уровня глюкозы от гипергликемии до гипогликемии сопровождается сбалансированной реакцией гемостаза с динамическим равновесием свертывающих и противосвертывающих систем. Повышение активности тромбоцитарного гемостаза компенсируется активацией свободного протеина S, сохранением повышенной концентрации АТ-III и отсутствием признаков потребления факторов свертывания.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Финансирование работы. Работа выполнена в рамках Государственного задания «Взаимодействие генетических, метаболических и воспалительных факторов развития и прогрессирования сосудистых осложнений сахарного диабета, в том числе и после хирургически индуцированной ремиссии сахарного диабета».

Конфликт интересов. Все авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с проведением исследования и публикацией данной статьи.

Участие авторов. И.Р. Ярек-Мартынова – анализ данных, написание текста; редактирование текста; М.Ю. Мартынов – концепция и дизайн исследования, статистическая обработка и анализ данных, интерпретация результатов; написание и утверждение итогового варианта текста рукописи; К.Г. Саркисова – сбор и обработка материала, статистическая обработка результатов исследования, анализ данных, написание текста; Е.О. Кокшарова – набор материала; Е.Е. Мишина – набор материала; М.В. Шестакова – концепция и дизайн исследования, анализ данных, интерпретация результатов; утверждение итогового варианта текста рукописи; А.Н. Ясаманова – анализ данных, редактирование текста.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- D'Addio F, Maffi P, Vezzulli P, et al. Islet transplantation stabilizes hemostatic abnormalities and cerebral metabolism in individuals with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2014;37(1):267-276. doi: 10.2337/dc13-1663
- Wisinski JA, Kimple ME. Platelet Dysfunction in Type 1 Diabetes: Stressing the Thromboxanes. *Diabetes*. 2016;65(2):349-351. doi: 10.2337/dbi15-0032
- Wieczorek I, Pell ACH, McIver B, et al. Coagulation and fibrinolytic systems in type 1 diabetes: effects of venous occlusion and insulin-induced hypoglycaemia. *Clin Sci (Lond)*. 1993;84(1):79-86. doi: 10.1042/cs0840079
- Hu H, Li N, Yngen M, et al. Enhanced leukocyte-platelet cross-talk in Type 1 diabetes mellitus: relationship to microangiopathy. *J Thromb Haemost*. 2004;2(1):58-64. doi: 10.1111/j.1538-7836.2003.00525.x
- Кособян Е.П., Ярек-Мартынова И.П., Мартынов М.Ю., и др. Роль эндотелиальной дисфункции в развитии цереброваскулярного поражения у пациентов с сахарным диабетом // *Сахарный диабет*. – 2012. – Т. 15. – №1. – С. 42-48. [Kosobyen EP, Yarek-Martynova IR, Martynov MY, et al. Endothelial dysfunction in development of cerebrovascular disorders in patients with diabetes mellitus. *Diabetes mellitus*. 2012;15(1):42-48. (In Russ.)] doi: 10.14341/2072-0351-5978
- Husted SE, Nielsen HK, Bak JF, Beck-Nielsen H. Antithrombin III activity, von Willebrand factor antigen and platelet function in young diabetic patients treated with multiple insulin injections versus insulin pump treatment. *Eur J Clin Invest*. 1989;19(1):90-94. doi: 10.1111/j.1365-2362.1989.tb00312.x
- Benedetti MM, Celleno R, Timi A, et al. Impaired endothelial anti-thrombotic activity following short-term interruption of continuous subcutaneous insulin infusion in type 1 diabetic patients. *Thromb Haemost*. 2017;98(09):635-641. doi: 10.1160/th07-03-0201
- Hunt KJ, Baker NL, Cleary PA, et al. Longitudinal Association Between Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Clotting Biomarkers With Subclinical Atherosclerosis in Type 1 Diabetes: An Evaluation of the DCCT/EDIC Cohort. *Diabetes Care*. 2015;38(7):1281-1289. doi: 10.2337/dc14-287777
- Schwarz HP, Scherthner G, Griffin JH. Decreased plasma levels of protein S in well-controlled type 1 diabetes mellitus. *Thromb Haemost*. 1987;57(2):240-246.
- Scherthner G, Vukovich T, Knöbl P, et al. The effect of near-normoglycaemic control on plasma levels of coagulation factor VII and the anticoagulant proteins C and S in insulin-dependent diabetic patients. *Br J Haematol*. 1989;73(3):356-359. doi: 10.1111/j.1365-2141.1989.tb07752.x
- Zaccardi F, Rizzi A, Petrucci G, et al. In Vivo Platelet Activation and Aspirin Responsiveness in Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2016;65(2):503-509. doi: 10.2337/db15-0936
- Sabatier F, Darmon P, Hugel B, et al. Type 1 And Type 2 Diabetic Patients Display Different Patterns of Cellular Microparticles. *Diabetes*. 2002;51(9):2840-2845. doi: 10.2337/diabetes.51.9.2840
- Salem MA, Adly AA, Ismail EA, et al. Platelets microparticles as a link between micro- and macro-angiopathy in young patients with type 1 diabetes. *Platelets*. 2015;26(7):682-688. doi: 10.3109/09537104.2015.1018880
- Malachowska B, Tomasik B, Szadkowska A, et al. Altered platelets' morphological parameters in children with type 1 diabetes – a case-control study. *BMC Endocr Disord*. 2015;15:17. doi: 10.1186/s12902-015-0011-8
- Gimenez M, Gilabert R, Monteagudo J, et al. Repeated episodes of hypoglycemia as a potential aggravating factor for preclinical atherosclerosis in subjects with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2011;34(1):198-203. doi: 10.2337/dc10-1371
- Gogitidze Joy N, Hedrington MS, Briscoe VJ, et al. Effects of acute hypoglycemia on inflammatory and pro-atherothrombotic biomarkers in individuals with type 1 diabetes and healthy individuals. *Diabetes Care*. 2010;33(7):1529-1535. doi: 10.2337/dc09-0354
- Joy NG, Tate DB, Younk LM, Davis SN. Effects of Acute and Antecedent Hypoglycemia on Endothelial Function and Markers of Atherothrombotic Balance in Healthy Humans. *Diabetes*. 2015;64(7):2571-2580. doi: 10.2337/db14-1729
- Hartley PS, Savill JS, Brown SB. Hypoglycaemia predisposes platelets to death by affecting calcium homeostasis and mitochondrial integrity. *Platelets*. 2007;18(2):103-112. doi: 10.1080/09537100600760822
- Hutton RA, Mikhailidis D, Dormandy KM, Ginsburg J. Platelet aggregation studies during transient hypoglycaemia: a potential method for evaluating platelet function. *J Clin Pathol*. 1979;32(5):434-438. doi: 10.1136/jcp.32.5.434
- Trovati M, Anfossi G, Cavalot F, et al. Studies on Mechanisms Involved in Hypoglycemia-Induced Platelet Activation. *Diabetes*. 1986;35(7):818-825. doi: 10.2337/diab.35.7.818
- Lingenfelter T, Overkamp D, Renn W, et al. Insulin-associated modulation of neuroendocrine counterregulation, hypoglycemia perception, and cerebral function in insulin-dependent diabetes mellitus: evidence for an intrinsic effect of insulin on the central nervous system. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(3):1197-1205. doi: 10.1210/jcem.81.3.8772600
- Blockmans D, Deckmyn H, Vermeylen J. Platelet activation. *Blood Rev*. 1995;9(3):143-156. doi: 10.1016/0268-960x(95)90020-9
- Castoldi E, Hackeng TM. Regulation of coagulation by protein S. *Curr Opin Hematol*. 2008;15(5):529-536. doi: 10.1097/MOH.0b013e328309ec97
- Kim HK, Kim JE, Park SH, et al. High coagulation factor levels and low protein C levels contribute to enhanced thrombin generation in patients with diabetes who do not have macrovascular complications. *J Diabetes Complications*. 2014;28(3):365-369. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2014.01.006
- Olson ST, Björk I. Regulation of thrombin by antithrombin and heparin cofactor II. In: Berliner LJ, editor. *Thrombin: Structure and Function*. New York: Plenum Press; 1992. p. 159-217.
- Chiu PL, Bou-Assaf GM, Chhabra ES, et al. Mapping the interaction between factor VIII and von Willebrand factor by electron microscopy and mass spectrometry. *Blood*. 2015;126(8):935-938. doi: 10.1182/blood-2015-04-641688
- Дёмина О.В., Ходонов А.А., Швец В.И., Варфоломеев С.Д. Агрегация тромбоцитов человека: молекулярно-кинетические механизмы и пути регуляции // *Биологические мембраны: журнал мембранной и клеточной биологии*. – 2002. – Т. 19. – №2. – С. 115-152. [Demina OV, Khodonov AA, Shvets VI, Varfolomeev SD. Human platelet aggregation process: molecular-kinetic mechanisms and the regulation ways. *Biological membranes. Membrane & cell biology*. 2002;19(2):115-152. (In Russ.)]
- Шатурный В.И., Шахиджанов С.С., Свешникова А.Н., Пантелеев М.А. Активаторы, рецепторы и пути внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах крови // *Биомедицинская химия*. – 2014. – Т. 60. – №2. – С. 182-200. [Shaturny VI, Shakhidzhanov SS, Sveshnikova AN, Panteleev MA. Activators, receptors and signal transduction pathways of blood platelets. *Biomed Khim*. 2014;60(2):182-200. (In Russ.)]
- Wallén NH, Goodall AH, Li N, Hjelm Dahl P. Activation of haemostasis by exercise, mental stress and adrenaline: effects on platelet sensitivity to thrombin and thrombin generation. *Clin Sci (Lond)*. 1999;97(1):27-35. doi: 10.1042/cs0970027
- Stel HV, Sakariassen KS, Scholte BJ, et al. Characterization of 25 monoclonal antibodies to factor VIII-von Willebrand factor: relationship between ristocetin-induced platelet aggregation and platelet adherence to subendothelium. *Blood*. 1984;63(6):1408-1415.
- Воронина Е.Н., Филипенко М.Л., Сергеевичев Д.С., Пикалов И.В. Мембранные рецепторы тромбоцитов: функции и полиморфизм // *Информационный вестник ВОГуС*. – 2006. – Т. 10. – №3. – С. 553-564. [Voronina EN, Filipenko ML, Sergeyevichev DS, Pikalov IV. Platelet membrane glycoprotein receptors: functions and polymorphism. *Informatsionnyi vestnik VOGIS*. 2006;10(3):553-564. (In Russ.)]
- Stavenhagen F, Gale AJ, Heeb MJ. Phosphorylation of protein S by platelet kinases enhances its activated protein C cofactor activity. *FASEB J*. 2013;27(7):2918-2925. doi: 10.1096/fj.12-225961
- Khan MS, Singh P, Azhar A, et al. Serpin Inhibition Mechanism: A Delicate Balance between Native Metastable State and Polymerization. *J Amino Acids*. 2011;2011:606797. doi: 10.4061/2011/606797
- Ceriello A, Esposito K, Ihnat M, et al. Simultaneous control of hyperglycemia and oxidative stress normalizes enhanced thrombin generation in type 1 diabetes. *J Thromb Haemost*. 2009;7(7):1228-1230. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03445.x

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ [AUTHORS INFO]

Ярек-Мартынова Ивона Рената, к.м.н. [Iwona R. Jarek-Martynowa, MD, PhD]; адрес: Россия, 117036, Москва, ул. Дм. Ульянова, д.11 [address: 11 Dm. Ulyanova street, 117036 Moscow, Russia];
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2244-9880>; eLibrary SPIN: 1597-4473; e-mail: iwonamj@mail.ru

Мартынов Михаил Юрьевич, д.м.н., профессор [Mikhail Y. Martynov, MD, PhD, Professor];
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2797-7877>; eLibrary SPIN: 8010-8340; e-mail: m-martin@inbox.ru

Саркисова Карина Григорьевна, аспирант [Karina G. Sarkisova, MD, PhD student];
<http://orcid.org/0000-0002-7657-4946>; SPIN-код: 9958-7718; e-mail: dr.karasarkisova@mail.ru

Кокшарова Екатерина Олеговна, н.с. [Ekaterina O. Koksharova, MD, research associate];
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9896-4681>; eLibrary SPIN: 6335-3438; e-mail: katekoksharova@gmail.com

Екатерина Евгеньевна Мишина, аспирант, н.с. [Ekaterina E. Mishina, MD, PhD student, research associate];
<http://orcid.org/0000-0002-5371-8708>; eLibrary SPIN: 2115-7697; e-mail: eka-mi@rambler.ru

Шестакова Марина Владимировна, д.м.н., профессор, академик РАН [Marina V. Shestakova, MD, PhD, Professor];
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3893-9972>; eLibrary SPIN: 7584-7015; e-mail: nephro@endocrincentr.ru

Альбина Николаевна Ясаманова, д.м.н., профессор [Albina N. Yasamanova, MD, PhD, Professor];
<http://orcid.org/0000-0002-4618-922X>; e-mail: allaser1@yandex.ru

ЦИТИРОВАТЬ:

Ярек-Мартынова И.Р., Мартынов М.Ю., Саркисова К.Г., Кокшарова Е.О., Мишина Е.Е., Шестакова М.В., Ясаманова А.Н. Влияние контролируемого перехода от гипергликемии до гипогликемии на агрегацию тромбоцитов и активность физиологических антикоагулянтов и фактора Виллебранда у больных сахарным диабетом 1 типа // *Сахарный диабет*. – 2018. – Т. 21. – №2. – С. 84-91. doi: 10.14341/DM9533

TO CITE THIS ARTICLE:

Jarek-Martynowa IR, Martynov MY, Sarkisova KG, Koksharova EO, Mishina EE, Shestakova MV, Yasamanova AN. Influence of hyperinsulinemic – hypoglycemic clamp on induced platelet aggregation, activity of physiological anticoagulants and von Willebrand factor in patients with type I diabetes. *Diabetes Mellitus*. 2018;21(2):84-91. doi: 10.14341/DM9533