УДК : 613. 379 – 008.64

Шемякина Н.А., Намоконов Е.В.

РОЛЬ ГЛИКОТОКСИНОВ В РАЗВИТИИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ МАКРОАНГИОПАТИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Читинская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Чита, Россия

Актуальность. *Самыми опасными последствиями глобальной эпидемии сахарного диабета 2 типа являются его системные сосудистые осложнения. Необходимы поиски новых патобиохимических звеньев развития диабетической макроангиопатии нижних конечностей. Раннее выявление нарушений, которые появляются уже на стадии доклинических проявлений, позволят предотвратить или улучшить течение осложнений связанных с сахарным диабетом.*

Целью исследования *было изучение содержания гликотоксинов у больных сахарным диабетом 2 типа, осложненным сосудистой макроангиопатией нижних конечностей, с последующей коррекцией выявленных нарушений.*

Материалы и методы. *В исследовании принимали участие три группы пациентов, всего 60 человек в возрасте 55±6,0лет. Мужчин было 53 (87,3%), женщин 7 (12,7%). Первая группа пациентов (группа сравнения, n=20), включала больных СД 2 типа (инсулиннезависимый) без проявлений макроангиопатии нижних конечностей. Во второй группе пациентов (основная, n=20), течение СД 2 типа (инсулиннезависимый), протекало с развитием макроангиопатии нижних конечностей. Третью группу составили 20 здоровых людей. Определение исследуемых показателей производили ВЭЖХ методами. С целью коррекции выявленных нарушений у больных основной группы применяли N-acetylcysteini в суточной дозировке 600 мг в течение 7 дней.*

Результаты исследований и обсуждение. *Полученные данные свидетельствуют об активации полиолового пути распада глюкозы. Концентрация глиоксаля, метилглиоксаля и малонового диальдегида увеличивается еще на стадии доклинических проявлений. При развитии диабетической макроангиопатии нижних конечностей изучаемые параметры увеличиваются в среднем в 5-7 раз. Применение в комплексной терапии N- acetylcysteini уменьшает проявления карбонильного и оксидативного стрессов, за счет кратного уменьшения конечных продуктов гликирования.*

Ключевые слова, *сахарный диабет, глиоксаль, метиглиоксаль, малоновый диальдегид, N-acetylcysteini.*

Shemyakina N.A., Namokonov E.V.

THE ROLE OF GLYCOTOXINES IN DEVELOPMENT OF DIABETIC MACROANGIOPATHY OF LOWER LIMBS IN PATIENTS WITH SUGAR DIABETES OF TYPE II

State Medical Academy, Chita

Actuality .*The most dangerous consequences of the global epidemic of type II diabetes are its systemic vascular complications. The search of new links of pathobiochemical progress of lower extremities' diabetic macroangiopathy is needed. Early detection of disorders that appear already at the preclinical stage will help prevent or improve the course of complications associated with diabetes mellitus.*

The purpose of research is to investigate the level of advanced glycation end products in complicated and uncomplicated type II diabetes. The results point on activation of the polyol path decomposition of glucose.

Materials and methods. *The study involved three groups of patients, a total of 60 people aged 55 ± 6 years. The men were 53 (87.3%), women 7 (12.7%). The first group of patients (comparison group, n = 20) included patients with type 2 diabetes (non-insulin-dependent) without manifestations of lower extremity macroangiopathy. In the second group of patients (primary, n = 20), the course of type 2 diabetes (insulin-independent) proceeded with the development of macroangiopathy of the lower limbs. The third group consisted of 20 healthy people.Determination of the studied parameters was performed by HPLC methods. In order to correct the revealed disorders, N-acetylcysteini was used in the patients of the main group at a daily dosage of 600 mg for 7 days.*

Results and discussion. *The concentration of glyoxal, methylglyoxal and malondialdehyde increases at the stage of pre-clinical looses. Inspected parameters increased on average 5-7 times during the progress of*

lower extremities' diabetic macroangiopathy. The practice of N-acetylcysteini in complex therapy reduces carbonyl and oxidative stress by multiple reduction of glycation end products.
Keywords: *glyoxal, methylglyoxal, malondialdehyde, diabetes, complications of diabetes.*

Введение. В Российской Федерации, как и во всех странах мира, отмечаются высокие темпы роста заболеваемости сахарным диабетом (СД), причем на долю СД 2 типа приходится большая часть, которая составляет около 3,7 млн. человек. Самыми опасными последствиями глобальной эпидемии СД 2 типа являются его системные сосудистые осложнения – нефропатия, ретинопатия, поражение магистральных сосудов сердца, головного мозга, периферических сосудов нижних конечностей (макроангиопатия). Именно эти осложнения являются основной причиной инвалидизации и смертности больных СД [1,3]. Так при диабетической ангиопатии нижних конечностей происходят однотипные изменения в микроциркуляторном русле на уровне обменных капилляров и венул, клетки эндотелия и перицитов которых подвергаются функциональным и структурным изменениям при необратимом формировании конечных продуктов гликирования (КПГ). Основной причиной является длительное нарушение биологической функции эндоэкологии - гипергликемия и непосредственное взаимодействие гликотоксинов - глиоксаля (Go), метилглиоксаля (MGo) и малоновогодиальдегида (MDA) (бифункциональных реагентов) с аминокислотными остатками лизина и аргинина плазматических мембран клеток эндотелия и перицитов [3].При формировании макроангиопатии (МАП) количественное определение КПГ является диагностически важным методом оценки прогноза и риска развития осложнений. При этом MGo и MDA способны быть диагностическими тестами, которые отражают гликирование не только интегральных белков плазматических мембран клеток эндотелия и перицитов, но и аминофосфолипидов в составе миелина. При диабетической МАП происходит поражение только терминалей на уровне безоболочечных (безмиелиновых) частей аксонов, которые окружают клетки Шванна. Результатом действия MGo и MDA может быть формирование сегментарной димиелинизации аксонов [9].

Цель исследования: изучить содержание глитоксинов в сыворотке крови у больных сахарным диабетом 2 типа, осложненным сосудистой ангиопатией нижних конечностей с последующей коррекцией выявленных нарушений.

Материалы и методы. В исследовании принимали участие три группы пациентов, всего 40 человек в возрасте 55±6,0лет. Мужчин было 53(87,3%), женщин 7(12,7%). Первая группа пациентов (группа сравнения, n=20), включала больных СД 2 типа (инсулиннезависимый) без проявлений макроангиопатии нижних конечностей. Во второй группе пациентов (основная, n=20), течение СД 2 типа (инсулиннезависимый), протекало с развитием макроангиопатии нижних конечностей. Из них, у 15 пациентов с макроангиопатией нижних конечностей 1 степени (компенсация), характеризующейся наличием перемежающейся хромоты через 1000 метров и более, пальпаторно - пульсация сохранена, лодыжечно-плечевой индекс (ЛПИ) - 0,9-1,0 и у 5 пациентов со 2 степенью недостаточности кровообращения IIA (субкомпенсация), характеризующейся перемежающейся хромотой через 200-1000м, ЛПИ ≤ 0,6. Трофические нарушения подразделяли по классификации раневых дефектов (по Вагнеру); в виде трофических язв различной локализации. Длительность заболевания СД 2 типа в обеих группах составила ≥5лет. Целевой уровень HbA1c ≤ 8%.

Контрольную группу составили 20 практически здоровых мужчин и женщин. Участники исследования были ознакомлены с целью и дизайном исследования и ими были подписаны информированные согласия на участие.

Наряду со стандартной терапией, которая включала в себя: достижение и поддержание индивидуальных целевых показателей углеводного обмена (прием таблетированныхсахароснижающих препаратов из группы сульфонилмочевины и бигуанидов), антимикробные средства (антибиотики широкого спектра действия в достаточной дозировке, метронидазол), гиполипедемическая терапия (статины), разгрузку пораженной конечности (лечебно-разгрузочная обувь, индивидуальная разгрузочная повязка, кресло-каталка), первичную об-

работку раневого дефекта ферментным или механическим путем, использование современных атравматичных перевязочных средств, соответствующих стадии раневого процесса, пациенты основной группы получали препарат N-acetylcysteini (NAC), в суточной дозе 600 mg однократно, внутривенно, в течение 7 дней. Данный препарат был использован с учетом его антиоксидантных свойств.

Забор крови проводился в вакутайнеры с гепарином. Анализ проводился не позднее 3 часов с момента забора крови. Определяли уровни Go, MGo и MDA в плазме, ВЭЖХ методами. Исследуемые показатели изучали в динамике до начала терапии, на 3-и и 7-е сутки от начала лечения. Для выполнения исследований мы использовали спектрофотометрический детектор SPD-20A Prominence («Shimadzu», Япония), насос высокого давления LC-20AT Prominence («Shimadzu», Япония), ручной инжектор 7725i Rheodyne (США) с петлей на 100 мкл, компьютерная хроматографическая программа «Мультихром» версия 3,2 («Амперсанд», Москва).

Для всех расчетов в работе использовали программу «Statistic - 10». Числовые данные приведены в виде среднего (M) и стандартного отклонения (SD). Для статистической обработки использовали критерий Вилкоксона, p-уровень значимости (*)<0,05.

Результаты и обсуждение. Первичные продукты перекисного окисления липидов – это нестабильные гидроперекиси, в дальнейшем превращающиеся в различные вторичные продукты, в частности, стабильные (конечные) альдегиды – малоновый диальдегид (MDA) и 4-гидрокси-2,3-алкенали (HAKs) с различной длиной алифатической цепи. Эти альдегиды обладают высокой реакционной способностью, образуя перекрестные химические связи с белками [4,5] и ДНК [6,7]. Два низкомолекулярных α-кетоальдегида – метилглиоксаль и глиоксаль – в основном имеют эндогенное происхождение и образуются при метаболических превращениях глюкозы и окислительной деградации липидов [8,10]. Основной мишенью для химической атаки альдегидов являются первичные аминогруппы (NH_2) аминокислот, пептидов, белков, ДНК. Результатом является их доказанная токсичность и мутагенность. Нами проведено исследование различных видов альдегидов у пациентов, страдающих сахарным диабетом 2типа, с осложненным и неосложненным течением. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1

Концентрация Go, MGo и MDA в сыворотке крови больных (M±SD)

Показатели, нг/мл	**Контроль (n=20)**	**Группа сравнения (n=20)**	**Основная группа (n=20)**
MDA	46,3 ± 15,8	98,5±16,3*	69,5±7,5* **
Go	16±6	24±2,6*	190±29* **
MGo	23±8	37,5±4,5 *	312±45* **

Примечание: * - достоверность различий по сравнению с контролем; **- достоверность различий между основной и группой сравнения.

Содержание MDA в группе сравнения было больше чем в группе контроля в 2 раза (на 112%), а при развитии у пациентов диабетической макроангиопатии нижних конечностей отмечалось повышение на 30% по отношению к группе контроля и снижение на 28% по отношению к группесравнения. Выявлено увеличение уровня Go в группе сравнения на 50%(в 1,5 раза) в сравнении с показателями контрольной группы. В основной группе данный показатель был повышен в 7 и 11 раз по отношению к пациентамгруппы сравнения и контрольной группы соответственно. Содержание MGo в группе сравнения составило 37,5±4,5нг/мл ($p \leq 0,05$), а в основной группе пациентов - 312±45 нг/мл ($p \leq 0,05$), что превысило значение того же показателя в группе контроля в 13раз и в 1,6 раз больше, чем у пациентов без диабетической макроангиопатии нижних конечностей.

Данные свидетельствуют об активации полиолового пути распада глюкозы. В физиологических условиях по полиоловому пути происходит метаболизм не более 1% глюкозы. В превращениях глюкозы, задействованы два фермента: вначале альдоредуктаза восстанавливает глюкозу до сорбитола с образованием НАДФ$^+$ и увеличением НАДФ$^+$/НАДФН, снижает активность глютатионредуктазы и подавляет восстановление глутатиона. На фоне сахарного диабета 2 типа, формировании резистентности к инсулину, активность полиолового пути увеличивается на порядок, что и приводит к формированию большого количества глиоксаля и метилглиоксаля, которые начинают «замусоривать» межклеточную среду, т.к. клетки способны детоксицировать их медленнее, чем образовывать.

На втором этапе исследования, изучили уровень исследуемых показателей в динамике при использовании в комплексной терапии NAC. NAC оказывает антиоксидантное действие, обусловленное наличием SH-группы, способной вступать во взаимодействие и нейтрализовать электрофильные окислительные токсины. Способствует повышению синтеза глутатиона, который является важным антиоксидантным фактором внутриклеточной защиты и обеспечивает поддержание функциональной активности и морфологической целостности клетки. А так же участвует в активации глиоксалазной системы, направленной на распад MGo донетоксических форм. Сульфгидрильная группа (SH) N-ацетилцистеина ответственна за его метаболическую активность, ацетильная группа делает молекулу более устойчивой к окислению и деструкции пищеварительными ферментами[2]. Препараты, содержащие гуанидиновые, амино- и тиоловые группы, способны связывать и удалять карбонильные соединения[3]. Они способны связать глиоксаль, метилглиоксаль, малоновый диальдегид с образованием нетоксичных гетероциклических веществ. Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2

Концентрация Go, MGo, MDA при комбинированной терапии NAC у пациентов с диабетической макроангиопатией нижних конечностей (M±SD)

Показатели, нг/мл	**Контроль (n=20)**	**Дни исследования**		
		1 сутки	3 сутки	7 сутки
Go	16,2±6	37,2±8*	58,5±8* **	37,3±11* ***
MGo	23,4±8	312±45*	312±32*	67±13* *** ****
MDA	46,3±15,8	69,2±7,5*	61,5±8*	41,5±9 *** ****

Примечание: * - достоверность различий по сравнению с контролем; **- достоверность различий между 1 и 3 сутками; ***- достоверность различий между 3 и 7 сутками, ****- достоверность различий между 1 и 7 сутками.

Величина Go достоверно увеличивается к третьим суткам до 58,5±8мкг/мл (на 56%) ($p \leq 0,05$) и к седьмым суткам уменьшается до исходных цифр. Наиболее значимые изменения происходят с уровнем метилглиоксаля, к третьим суткам показатель не изменяется, но к седьмым суткам количество кратно уменьшается в 5раз и становится равным 67±13мкг/мл($p \leq 0,05$). Достоверная динамика уменьшения уровня и малонового диальдегида к третьим суткам до 61,5±8мкг/мл (на 12%) ($p \leq 0,05$) и к седьмым уменьшается до 41,5±9мкг/мл (на 41%)($p \leq 0,05$), данная величина сопоставима с таковой в группе контроля. Применение предложенной нами схемы позволяет максимально уменьшить количество кетоальдегидов.

Выводы. До настоящего времени, в большинстве работ отмечается лишь процентное увеличение количества КПГ. Нам удалось определить уровень Go, MGo и MDA в сыворотке

методом ВЭЖХ и выяснить, как изменяются данные показатели при наличии осложнений СД 2 типа. Прогностически важным следует считать повышение уровня альдегидов на стадии доклинических проявлений, когда при отсутствии объективных данных (наличие болей, трофических язв) концентрация конечных продуктов гликирования в сыворотке уже выше в среднем 1,5-2раза. При наличии же осложнений содержание кето-альдегидов увеличивается в 5-7 раз. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что для предотвращения развития сосудистых осложнений при СД 2 типа, необходимо своевременное определение кетоальдегидов в сыворотке крови и фармакологическая коррекция, направленная на уменьшение данных показателей. Представленные данные, свидетельствуют о том что, NAC уменьшает проявления карбонильного и оксидативного стрессов, за счет кратного уменьшения конечных продуктов гликирования.

Литература:

1. Дедов И.И. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом : клинические рекомендации / И.И. Дедов, М.В. Шестакова. – М., 2015. – 5 с.
2. Дутов А.А. Фармакокинетика и фармокодинамика N-ацетилцистеин: фармакокинетические параметры и влияние на концентрацию эндогенных аминотиолов / А.А.Дутов, Д.А. Никитин. – М., 2016. - № 2. – С. 34 - 38.
3. Титов В.Н. Артериосклероз и атеросклероз. Патология дистального и проксимального отделов артериального русла. Патогенез диабетической микроангиопатии / В.Н. Титов, Ю.К. Ширяева // Клиническая лабораторная диагностика. - 2011. - № 4. - С. 3 – 14.
4. Bloch-Damti A. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress / A. Bloch-Damti, N. Basham // Antioxid Redox Signal. - 2005. - Vol. 7. - P. 1553 - 1567.
5. Esterbauer H Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal / H. Esterbauer, KH Cheeseman // Methods in Enzymology. - 1990. - V. 186. - P. 407 – 421.
6. Marnett L.J. Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde / L.J. Marnett // Mutation Research. - 1999. - V. 424. - P. 83 – 95.
7. Nair U. Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adducts types and levels in humans / U.Nair, J.Nair // Free Radical Biology and Medicine. – 2007. - V.43. - P. 1109 – 1120.
8. Shangari N The cytotoxic mechanism of glyoxal involves oxidative stress / N. Shangari, PJ. O'Brien // Biochem. Pharmacol. – 2004. - V. 68. - P. 1433 – 1442.
9. Sugimoto K. Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy / K.Sugimoto, M. Yasujima, S. Yagihashi // Curr. Pharm. Des. - 2008. - V. 14. - P. 953 - 961.
10. Thornalley PJ. Endogenous α-oxoaldehydes and formation of protein and nucleotide advanced glycationendproducts in tissue damage / PJ.Thornalley // Novartis Found. Symp. – 2007. - V. 285. - P. 229 – 246.

Referens

1. Dedov I. I. Algorithms of specialized medical care for patients with diabetes : clinical guidelines / I. I. Dedov, M. V. Shestakova. – M., 2015. – 5 p.(in Russia)
2. Dutov A. A. Pharmacokinetics and farmakodinamika N-acetylcysteine: the pharmacokinetic parameters and the effect on the concentration of endocannabinoids / A. A. Dutov, D. A. Nikitin. – M., 2016. - N. 2. – P. 34 - 38.(in Russia)
3. Titov V. N. Arteriolosclerosis and atherosclerosis. Pathology of the distal and proximal arterial bed. The pathogenesis of diabetic microangiopathy / V. N. Titov Yu. Shiryaev K. // Clinical laboratory diagnostics. - 2011. - N. 4. - P. 3 – 14.(in Russia)
4. Bloch-Damti A. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress / A. Bloch-Damti, N. Basham // Antioxid Redox Signal. - 2005. - Vol. 7. - P. 1553 - 1567.
5. Esterbauer H Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal / H. Esterbauer, KH Cheeseman // Methods in Enzymology. - 1990. - V. 186. - P. 407 – 421.

6. Marnett L.J. Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde / L.J. Marnett // Mutation Research. - 1999. - V. 424. - P. 83 – 95.
7. Nair U. Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adducts types and levels in humans / U.Nair, J.Nair // Free Radical Biology and Medicine. – 2007. - V.43. - P. 1109 – 1120.
8. Shangari N The cytotoxic mechanism of glyoxal involves oxidative stress / N. Shangari, PJ. O'Brien // Biochem. Pharmacol. – 2004. - V. 68. - P. 1433 – 1442.
9. Sugimoto K. Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy / K.Sugimoto, M. Yasujima, S. Yagihashi // Curr. Pharm. Des. - 2008. - V. 14. - P. 953 - 961.
10. Thornalley PJ. Endogenous α-oxoaldehydes and formation of protein and nucleotide advanced glycationendproducts in tissue damage / PJ.Thornalley // Novartis Found. Symp. – 2007. - V. 285. - P. 229 – 246.