

«Новый взгляд» на состояние антиоксидантной системы при различных сосудистых осложнениях сахарного диабета 2 типа

Н.А. ШЕМЯКИНА, А.В. ЕРМОЛИНА, Е.В. НАМОКОНОВ

Читинская государственная медицинская академия, ул. Горького, 39А, 672000, г. Чита, Российская Федерация

Дорожная клиническая больница на станции Чита-2 ОАО «РЖД», ул. Ленина, 4, 672010, г. Чита, Российская Федерация

Актуальность. В настоящее время остро стоит вопрос о более ранней диагностике и прогнозировании осложнений, связанных с диабетической макро- и микроангиопатией. Раннее выявление нарушений антиоксидантной системы, которые появляются уже на стадии доклинических проявлений, позволяют предотвратить или улучшить течение осложнений связанных с сахарным диабетом.

Цель. Оценить состояние антиоксидантной системы у пациентов с различными сосудистыми осложнениями СД 2 типа, такими как диабетическая ретинопатия (ДР) и ангиопатия сосудов нижних конечностей.

Материалы и методы. В исследовании принимали участие три группы пациентов, всего 75 человек в возрасте $55 \pm 6,0$ лет. Первая группа пациентов ($n=25$) включала больных СД 2 типа (инсулиннезависимый) с наличием диабетической ретинопатии. Во второй группе пациентов ($n=25$), течение СД 2 типа (инсулиннезависимый), протекало с развитием ангиопатии сосудов нижних конечностей. Третью группу составили 25 здоровых людей. Определение исследуемых показателей проводили ВЭЖХ методами, разработанными в нашей лаборатории.

Результаты и их обсуждение. Полученные данные свидетельствуют о том, что антиоксидантный потенциал плазмы (Cysfree/Cys-S-S-Cys) крови при сосудистых осложнениях СД 2 типа уменьшается и окислительно-восстановительное состояние GSH/GSSG изменяется в зависимости от различных видов сосудистых осложнений СД 2 типа.

Выводы. При развитии сосудистых осложнениях СД 2 типа страдает как антиоксидантный потенциал плазмы, так и непосредственно клетки, что выражается в значимом уменьшении восстановленных форм определяемых показателей. При прогрессировании заболевания и наличии диабетической ангиопатии коэффициенты Cysfree/Cys-S-S-Cys и GSH/GSSG достоверно отличаются от таковых в группе контроля. Опираясь на это, можно с уверенностью говорить о том, что у пациентов с СД 2 типа необходима полная оценка антиоксидантной системы, с изучением различных фракций не только глутатиона, но и цистеина для своевременной фармакологической коррекции и профилактики преждевременного развития осложнений.

Ключевые слова: цистеин, глутатион, антиоксидантная система, сахарный диабет.

"New Look" On Antioxidant Systems In Various Diabetes Mellitus Complications

N.A. SHEMYAKINA, A.V. ERMOLINA, E.V. NAMOCONOV

Chita State Medical Academy, Gor'kogo str., 39A, 672000, Chita, Russia

Road Clinical Hospital, Chita-2 Station JSC "Russian Railways", Lenin str., 4, 672010, Chita, Russia

Actuality. At the present time is an issue of earlier diagnosis and prognosis of complications related to diabetic macro- and microangiopathy. Early detection of violations of the antioxidant system, which appear at the stage of pre-clinical manifestations, will prevent or improve during the complications associated with diabetes mellitus.

The Aim. To assess the state of the antioxidant system in patients with various vascular complications of diabetes, such as diabetic retinopathy (DR) and angiopathy of legs.

Materials and methods. Three groups of patients were involved in the study, only 75 people at the age of $55 \pm 6,0$ years. The first group of patients ($n = 25$) included patients with type diabetes (non-insulin dependent) with the presence of diabetic retinopathy. In the second group of patients ($n = 25$), to have of angiopathy of legs. The third group consisted of 25 healthy people. Determination of the studied parameters was performed by HPLC methods developed in our laboratory.

Results and discussion. These data suggest that the antioxidant capacity of plasma (Cysfree / Cys-S-S-Cys) when the blood vascular complications of diabetes decreases and the redox state of GSH / GSSG varies depending on various types of vascular complications of diabetes.

Conclusions. With the development of vascular complications of diabetes suffers as the antioxidant capacity of plasma and cells directly, resulting in a significant decrease in the reduced forms of defined indicators. With the progression of the disease and the presence of diabetic angiopathy factors Cys free / Cys-S-S-Cys and GSH / GSSG was significantly different from those in the control group. Based on this, we can confidently say that in patients with diabetes require a full assessment of the antioxidant system, the study of the various factions, not only glutathione and cysteine for the timely pharmacological correction and prevention of premature morbidity.

Key words: cysteine, glutathione antioxidant system, diabetes mellitus.

В настоящее время отмечается увеличение числа больных страдающих сахарным диабетом (СД). Рост распространенности сахарного диабета приобрел характер эпидемии в конце XX–XXI веков. В Российской Федерации, по данным Федерального центра Государственного регистра сахарного диабета, на 01.01.2010 г. в РФ зарегистрировано 3 137 182 взрослых больных СД (из них СД 1 – 268 497 человек, СД 2 – 2 868 685 человек). По экспертным оценкам, численность больных СД в мире к 2030 году превысит 380 миллионов человек [3]. Диабетические ангиопатии во многом определяют клиническое течение заболевания, его прогноз и являются основной причиной инвалидизации и смертности в промышленно-развитых странах [4]. Раннее выявление нарушений антиоксидантной системы, которые появляются уже на стадии доклинических проявлений, позволят предотвратить или улучшить течение осложнений, связанных с сахарным диабетом [6].

Важную роль в патогенезе диабетической ангиопатии играют как накопление в тканях свободных радикалов, так и функциональная недостаточность антиоксидантных ферментов (каталаза, супероксиддисмутаза), с последующим развитием оксидативного стресса. Доказано, что активация этого процесса, приводящая к значительным расстройствам гомеостаза, может оказаться одной из основных причин неблагоприятного течения сахарного диабета. При неблагоприятных условиях формируются молекулы, содержащие активные формы кислорода (reactive oxygen species или ROS), которые повреждают липидный слой мембран клеток (lipidperoxydation или LPO) [5].

Защитные способности клетки определяются мощностью антиоксидантной системы, а восстановленный глутатион (GSH) является одним из наиболее важных антиоксидантов клетки [7].

Недавние исследования представили убедительные доказательства роли цистеина в синтезе GSH у различных видов животных и человека. Цистеин содержит сульфгидрильную группу (SH), без которой GSH не будет выполнять присущие ему функции [7].

Цистеин (Cys) легко окисляется в цистин (Cys-S-S-Cys) во внеклеточной жидкости. Этот процесс катализируют инсулин и фактор роста, которые усиливают захват цистеина клетками и, тем самым, увеличивают концентрацию внутриклеточного GSH [8].

Выявленные изменения позволят повысить качество диагностики, оценить степень тяжести СД, а также предложить методы эффективной патогенетической терапии. Впервые для выявления степени истощения антиоксидантной системы у пациентов с различными видами осложнения СД 2 типа, были вычислены коэффициенты Cysfree/Cys-S-S-Cys, GSH/GSSG, уровни общего и восстановленного цистеина плазмы и глутатиона в эритроцитах. Подобная оценка показателей в доступной литературе отсутствует.

Цель исследования – оценить состояние антиоксидантной системы у пациентов с различными сосудистыми осложнениями СД 2 типа, такими как диабетическая ретинопатия (ДР) и ангиопатия сосудов нижних конечностей.

Материалы и методы

В исследовании принимали участие три группы пациентов, всего 75 человек в возрасте 55±6,0 лет. Мужчин было 43 (57,4%), женщин 32 (42,6%). Первая группа пациентов (n=25) включала больных СД 2 типа с наличием диабетической ретинопатии. Во второй группе пациентов (n=25), течение СД 2 типа (инсулиннезависимый), протекало с развитием ангиопатии сосудов нижних конечностей. Длительность заболевания СД 2 типа в обеих группах составила ≥5 лет. Третью группу составили 25 здоровых людей.

Забор крови проводился в вакутайнеры с гепарином. Анализ проводился не позднее 3 часов с момента забора крови.

Определяли уровни общего и свободного глутатиона в эритроцитах, общего и свободного цистеина в плазме, ВЭЖХ методами, разработанными в нашей лаборатории [1, 2] с минимальными модификациями. По результатам рассчитывали соотношения восстановленного и окисленного глутатиона в эритроцитах и восстановленного и окисленного цистеина в плазме. Проводили вычисление окислительно-восстановительного потенциала плазмы (Cysfree/Cys-S-S-Cys) и коэффициента окислительно-восстановительного состояния клетки (GSH/GSSG) при данных осложнениях СД. Для выполнения исследований мы использовали спектрофотометрический детектор SPD-20A Prominence («Shimadzu», Япония), насос высокого

Таблица 1 / Table 1

Уровень различных фракций цистеина в плазме / Levels of various fractions of plasma cysteine

Показатели	Контроль	Диабетическая ретинопатия	Диабетическая ангиопатия нижних конечностей
Cys total, мкг/мл	26,5±2,5	40,2±7,4*	31,1±5,1* **
Cys free, мкг/мл	17,2±2,1	25,4±5,3*	14,5±5,3* **
Cys-S-S-Cys	8,1±1,5	15,3±3,5*	16,5±4,1* **
Cys free/Cys-S-S-Cys	2,1	1,7*	0,7* **

Примечание: * - достоверность различий по сравнению с контролем; ** - достоверность различий между 2 и 3 группами / Note: * - significance of differences compared with the control; ** - Reliability of differences between groups 2 and 3

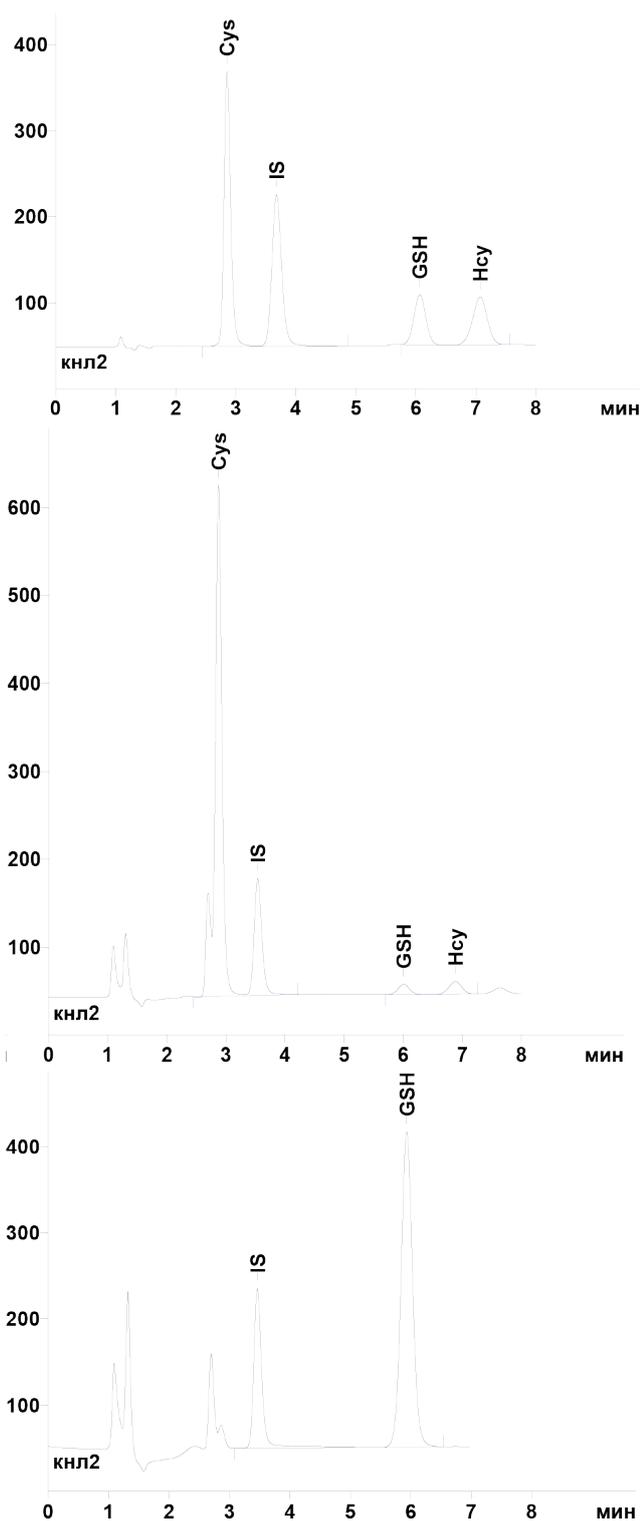


Рис. 1. Хроматограммы стандартов аминоктиолов по 50 нг каждого (1), экстракта плазмы (2, эквивалент 0.005 мл) и экстракта эритроцитов (3, эквивалент 0.0005 мл). Колонка 100 × 4.6 мм Luna (Phenomenex), C18(2), 5 мкм, около 5000 ТТ, УФ детекция при 330 нм, элюент ацетонитрил – 0.05 М лимонная кислота (15:85, v/v), скорость потока 1000 мкл/мин, давление 68 бар. Обозначения: Cys – цистеин, IS – внутренний стандарт (цистеамин), GSH – глутатион, Hcy – гомоцистеин / Chromatograms standards amino thiols 50 ng of each (1) plasma extract (2, 0.005 ml equivalent) and erythrocyte extract (3, 0.0005 ml equivalent). The column 100 × 4.6 mm Luna (Phenomenex), C18 (2), 5 microns, near 5,000 TT, UV detection at 330 nm, eluent: acetonitrile - 0.05 M citric acid (15:85, v/v), flow rate of 1000 m

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). Типичные представлены хроматограммы на рис. 1.

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, р-уровень значимости (*) < 0,05.

Результаты и обсуждение

В плазме преобладающим аминоктиолом является цистин (Cys-S-S-Cys), представляющий собой окисленную форму цистеина (Cys). Коэффициент Cys/Cys-S-S-Cys может служить индикатором антиоксидантного потенциала плазмы, а в целом для оценки его в различных органах и тканях достаточно оценить пул тиолы/дисульфиды [8].

Уровень общего цистеина в группе больных с диабетической ретинопатией составил - $40,2 \pm 7,4$ мкг/мл, при диабетической ангиопатии нижних конечностей - $31,1 \pm 5,1$ мкг/мл, что превышало данный показатель в контрольной группе на 52% и 23%, соответственно. Показатели свободного цистеина в группе больных с ретинопатией были выше на 47%, а при ангиопатии нижних конечностей ниже на 16% в сравнении со здоровыми лицами. Окисленный цистеин на фоне СД, осложненного диабетической ретинопатией повышался в сравнении с контрольной группой в 1,9 раза, а при ангиопатии нижних конечностей в 2,0 раза. Большой интерес представляло изменение коэффициента соотношения Cysfree/Cys-S-S-Cys, который в группе контроля был 2,1, при диабетической ретинопатии - 1,65; в группе с диабетической ангиопатией сосудов нижних конечностей составил всего 0,7.

Полученные данные свидетельствуют о том, что антиоксидантный потенциал плазмы (Cysfree/Cys-S-S-Cys) крови при сосудистых осложнениях СД 2 типа уменьшается, в зависимости от стадии процесса. Причем при начальных проявлениях микроангиопатии этот показатель в 2,4 раза больше, чем в группе с более тяжелым осложнением СД 2 типа (табл. 1).

В системе глутатиона также происходили существенные изменения. Глутатион является наиболее распространенным внутриклеточным антиоксидантом, нарушение регуляции которого приводит к различным патологическим состояниям [7, 8]. Существуют доказательства (in vitro и в клинических испытаниях) того, что изменение уровня глутатиона ведет к дисфункции β-клеток поджелудочной железы и принимает участие в патогенезе отдаленных осложнений сахарного диабета. Обычно около 99% внутриклеточного глутатиона существует в восстановленной форме [9,10].

Уровень общего глутатиона в эритроцитах в контрольной группе составил 788 ± 147 мкг/мл, в группе с

**Уровень различных фракций глутатиона в эритроцитах /
The level of the various fractions of glutathione in erythrocytes**

Показатели мкг/мл	Контроль	Диабетическая ретинопатия	Диабетическая ангиопатия нижних конечностей
GSH total, мкг/мл	788±147	631±70* **	433±35* **
GSH free, мкг/мл	752±146	576±67*	342±36* **
GSSH	36±10	55±11 *	91±17 * **
GSH/GSSG	20	11*	6* **

Примечание: * - достоверность различий по сравнению с контролем; ** - достоверность различий между 2 и 3 группами / Note: * - significance of differences compared with the control; ** - Reliability of differences between groups 2 and 3;

ДР этот показатель составил 631±70 мкг/мл, что было на 20% ниже по сравнению с контролем. В группе с ангиопатией сосудов нижних конечностей общий глутатион составил 433±35 мкг/мл, что на 45% было ниже исходного уровня. Уровень свободного глутатиона также снижался и составил 752±146 мкг/мл в группе контроля, в группе с ДР - 576±67 мкг/мл, что на 21,5% было ниже чем в контрольной группе. В группе с патологией сосудов нижних конечностей этот показатель был значительно снижен (на 46%) и составил 342±36 мкг/мл. Уровень окисленного глутатиона при диабетической ретинопатии увеличился (на 52%), при ангиопатии нижних конечностей резко возрастал (на 70%), что свидетельствовало об активации перекисного окисления липидов в условиях хронической гипергликемии.

Коэффициент GSH/GSSG, характеризует антиоксидантный потенциал клеток и тканей. В контрольной группе коэффициент составил – 20, в группе с ДР был в 2 раза меньше – 11, в группе с диабетической ангиопатией сосудов нижних конечностей - всего 6. Это доказывает истощение антиоксидантной системы внутри клетки, при прогрессировании осложнений сахарного диабета.

GSH и GSSG отражают не только окислительный стресс, но и изменения в окислительно-восстановительном процессе и дает возможность осуществлять

контроль за ним. Полученные данные показывают, что окислительно-восстановительное состояние GSH/GSSG изменяется в зависимости от различных видов осложнений СД 2 типа. Таким образом, тиол/дисульфид окислительно-восстановительное состояние, по сути, может играть центральную роль в регуляции функций клеток (табл. 2)

Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при развитии сосудистых осложнений СД 2 типа страдает как антиоксидантный потенциал плазмы, так и непосредственно клетки, что выражается в значимом уменьшении восстановленных форм определяемых показателей. При прогрессировании заболевания и наличии диабетической ангиопатии коэффициенты Cysfree/Cys-S-S-Cys и GSH/GSSG достоверно отличаются от таковых в группе контроля. Опираясь на это, можно с уверенностью говорить о том, что у пациентов с СД 2 типа необходима полная оценка антиоксидантной системы, с изучением различных фракций не только глутатиона, но и цистеина для своевременной фармакологической коррекции и профилактики преждевременного развития осложнений.

Список литературы

- Dutov AA, Nikitin DA, Fedotova AA. Determination of homocysteine and cysteine in plasma / serum by HPLC with UV detection and on solid phase extraction with polymer sorbent. "Biomedical Chemistry".2010; 56: 5: 609-615.
- Dutov AA, Nikitin DA, Tereshkov PP, Martynova AB, Sverkunova AB, Ermolina AB, Lukyanova YuL, Shemyakina NA. Simple HPLC analysis erythrocyte glutathione. Questions of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry. 2015; 6: 12-15.
- Hacheryan MC, Serebryakova OV, Bokalova SE, Prosyani VI, Serkin DM, Shamanic EP. Features of change of electrophysiological parameters in diabetic patients with diabetic polyneuropathy type-1. ENI Zabaikal'skii Medical Messenger. 2014; 4: 164-168.
- Bloch-Damti A, Basham N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. Bloch-Damti A, Basham N Antioxid Redox Signal. 2005; 7: 1553-1567.

References

- Dutov AA, Nikitin DA, Fedotova AA. Determination of homocysteine and cysteine in plasma, serum by HPLC with UV detection and on solid phase extraction with polymer sorbent. "Biomedical Chemistry".2010; 56: 5: 609-615.
- Dutov AA, Nikitin DA, Tereshkov PP, Martynova AB, Sverkunova AB, Ermolina AB, Lukyanova YuL, Shemyakina NA. Simple HPLC analysis erythrocyte glutathione. Questions of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry.2015; 6: 12-15.
- Hacheryan MC, Serebryakova OV, Bokalova SE, Prosyani VI, Serkin DM, Shamanic EP. Features of change of electrophysiological parameters in diabetic patients with diabetic polyneuropathy type-1. ENI Zabaikal'skii Medical Messenger. 2014; 4: 164-168.
- Bloch-Damti A, Basham N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress./ Bloch-Damti A, Basham N. Antioxid Redox Signal. 2005; 7: 1553-1567

5. Fang YZ, Yang S and Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. Fang YZ, Yang S and Wu G. Nutrition. 2002; 18: 872–879.
6. Gupta S, Tiekens K, Ruderman N. Inhibition of nitric oxide synthase activity by hyperglycemia in endothelial cells. Gupta S, Tiekens K, Ruderman N. Diabetes. 1994; 43: 100.
7. Jones DP. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. Jones DP. Methods Enzymol. 2002; 348: 93–112.
8. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. Lu SC. Current topics in cellular regulation. 2000; 36: 95–116.
9. Madar Z, Oren P, Pollack A. Inhibitory effect of lycopene on cataract development in diabetic sand rats and galactosemic rats (Abstract). Madar Z, Oren P, Pollack A. Diabetologia. 1995; 38: 276.
10. Meister A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. Meister A. Cancer Res. 1994; 54: 1969–1975.

Поступила 17.07.2016

Информация об авторах

1. Шемякина Надежда Анатольевна – ассистент кафедры общей хирургии Читинской государственной медицинской академии; e-mail: shemyakina86@list.ru
2. Ермолина Алена Владимировна – врач офтальмолог Дорожной клинической больницы на станции Чита-2 ОАО «РЖД», e-mail: ne-ni-ka@mail.ru
3. Намоконов Евгений Владимирович – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей хирургии Читинской государственной медицинской академии; e-mail: namokonovev@mail.ru

5. Fang YZ, Yang S and Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. Fang YZ, Yang S and Wu G. Nutrition. 2002; 18: 872–879.
6. Gupta S, Tiekens K, Ruderman N. Inhibition of nitric oxide synthase activity by hyperglycemia in endothelial cells Gupta S, Tiekens K, Ruderman N. Diabetes. 1994; 43: 100.
7. Jones DP. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. Jones DP. Methods Enzymol. 2002; 348: 93–112.
8. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. Lu SC. Current topics in cellular regulation. 2000; 36: 95–116.
9. Madar Z, Oren P, Pollack A. Inhibitory effect of lycopene on cataract development in diabetic sand rats and galactosemic rats (Abstract). Madar Z, Oren P, Pollack A. Diabetologia. 1995; 38: 276.
10. Meister A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. Meister A. Cancer Res. 1994; 54: 1969–1975.

Received 17.07.2016

Information about the Authors

1. Shemyakina Nadezhda – Assistant of the Department of General Surgery; e-mail: shemyakina86@list.ru
2. Ermolina Alena, Physician – Ophthalmologist, PHI Road Clinical Hospital. Chita-2, «Russian Railways»; e-mail: ne-ni-ka@mail.ru
3. Namokonov Evgeny – MD, Professor, Head of Department of General Surgery; e-mail: namokonovev@mail.ru