Раздел: ВНУТРЕННИЕ БОЛЕЗНИ

А.А. Чепрасова, С.С. Попов, А.Н. Пашков, О.В. Мячина

Соотношение пуриновых метаболитов при сахарном диабете 1 и 2 типа

ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России

Резюме. Одной из острых проблем биомедицины в настоящее время является сахарный диабет, распространенность которого в Российской Федерации и других странах постоянно растет. Гипергликемия приводит к нарушению углеводного, белкового и липидного обмена, а также к развитию энергетического дисбаланса.

Цель работы – исследование соотношения пуриновых метаболитов при сахарном диабете 1 и 2 типа.

В исследование было включено 120 человек, контрольную группу составили 20 условно здоровых мужчин и 20 женщин. Экспериментальные группы состояли из пациентов с сахарным диабетом 1 и 2 типа, по 20 мужчин и 20 женщин в каждой. Слюну собирали утром натощак. Содержание пуриновых метаболитов в слюне определяли хроматографическим методом.

Исследование показало, что пуриновые метаболиты в слюне элюируются в виде 6 различных фракций: аденозин (А), аденозинмонофосфат (АМФ), аденозиндифосфат (АДФ), гуанозиндифосфат (ГДФ), аденозинтрифосфат (АТФ), гуанозинтрифосфат (ГТФ). Выявлены значительные отклонения в содержании адениловых и гуаниловых метаболитов в слюне пациентов с сахарным диабетом 1 и 2 типа по сравнению с условно здоровыми донорами.

Соотношение пуриновых метаболитов слюны отражает энергетический обмен, а также развитие окислительного стресса и тканевой ишемии. Таким образом, исследование пуриновых метаболитов в слюне может быть полезным инструментом для диагностики и мониторинга сахарного диабета.

Ключевые слова: пуриновые метаболиты; нуклеотиды; нуклеозиды; сахарный диабет; слюна; хроматография.

Актуальность. Сахарный диабет (СД) – эндокринное заболевание с множеством метаболических нарушений, которые могут привести к повреждению тканей и развитию макро- и микрососудистых осложнений [1]. В данном исследовании особое внимание уделяется пуриновому обмену, так как нуклеотиды играют важную роль в биохимических и внутриклеточных процессах, включая репликацию и транскрипцию ДНК, клеточное дыхание и апоптоз, углеводный обмен и синтез липидов [2].

Известно, что при патологических состояниях, включая сахарный диабет, во внеклеточное пространство выходят пуриновые метаболиты. Например, аденозин накапливается в биологических жидкостях в ответ на метаболический стресс, повреждение тканей и воспаление. Внутриклеточный биогенез аденозина заключается в последовательном дефосфорилировании молекул АТФ, АДФ и АМФ [3]. АТФ играет большую роль в углеводном обмене, она представляет собой источник энергии для транспорта, слияния инсулинсодержащих везикул с мембраной β-клетки и последующей секреции инсулина [4]. Соотношение пуриновых метаболитов используется для оценки тяжести тканевой ишемии и окислительного стресса [5]. Продукты метаболизма пуринов могут быть определены в составе различных

жидкостей организма, включая слюну, и использованы для оценки изменений в обмене пуринов [6].

Целью данного исследования явилось определение соотношения пуриновых метаболитов (аденозин, аденозинмонофосфат, аденозиндифосфат, гуанозиндифосфат, аденозинтрифосфат, гуанозинтрифосфат) в слюне здоровых и больных сахарным диабетом 1 (СД1) и 2 типа (СД2).

Материал и методы исследования. Объектом данного исследования была слюна практически здоровых людей и пациентов с сахарным диабетом 1 или 2 типа.

В контрольную группу вошли 40 практически здоровых доноров, включая 20 мужчин (41,05±3,54 года) и 20 женщин (43,35±3,18 года). Первую основную подгруппу составили 40 человек с сахарным диабетом 1 типа, среди них 20 мужчин (43,7±3,21 гг.) и 20 женщин (42,05±2,66 гг.). Длительность заболевания составляла 6,7±1,32 года у мужчин и 15,85±2,43 года у женщин. Вторая основную подгруппа представлена 40 больными с сахарным диабетом 2 типа: 20 мужчин (62,60±1,92 гг.) и 20 женщин (62,85±2,78 гг.). Средняя продолжительность заболевания у мужчин составила 14,7±1,75 года, у женщин - 12,1±1,39 года.

Диагнозы был поставлены в соответствии с критериями Комитета экспертов ВОЗ по сахарному диабету (1999).

Из сопутствующих заболеваний регистрировались диабетическая нейропатия (34,7% - СД1, 19,2% - СД2), диабетическая ретинопатия (28,3% - СД1, 13,4% - СД2), диабетическая нефропатия (20,5% - СД1, 7,2% – СД2), артериальная гипертензия (18,1% - СД1, 15,9% - СД2), хроническая сердечная недостаточность (12% - СД1, 10,8% - СД2).

В исследовании не участвовали больные сахарным диабетом с такими заболеваниями, как острый инфаркт миокарда, злокачественные новообразования, нарушение мозгового кровообращения, а также острые инфекционные заболевания и вирусные гепатиты.

Слюну собирали утром до приёма пищи после полоскания полости рта. В ходе сбора биологической жидкости доноры в течение 10 минут держали в ротовой полости стоматологический тампон, далее его помещали в слюносборник (Sarstedt D-51588 Numbrecht), центрифугировали 10 минут при 3000 g. Полученный центрифугат использовали в исследовании.

Полученные образцы слюны были проанализированы с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии на автоматизированной системе FPLS® System (Швеция). Для проведенного исследования применялась колонка размером 10 х 200 мм с Q Sepharose Fast Flow.

К отцентрифугированной слюне (600 мкл) дважды приливали по 200 мкл охлажденной хлорной кислоты. Полученный раствор тщательно перемешивали, а далее центрифугировали 5 минут. После осаждения нуклеопротеидного комплекса надосадочную жидкость (600 мкл) нейтрализовали 1 Н раствором охлажденного гидроксида калия, далее центрифугировали 2-3 минуты

Полученный центрифугат (100 мкл) наносили на колонку. Перед внесением образца проводилось удаление неорганических солей из ионообменника сначала дистиллированной водой, а затем 1 Н раствором соляной кислоты. Уравновешивание системы производилось буферным раствором, состоящим из двух компонентов: А – 0,05 Н HCl; Б – 0,1 Н HCl + 0,5 М NaCl.

Время выхода буфера А составляло с 0 по 8 мин, буфера Б – с 9 по 31 мин.

Элюирование проходило со скоростью потока 1,5 мл/мин, регистрация при длине волны 260 нм.

Пуриновые метаболиты идентифицировали с помощью коммерческих препаратов нуклеозидов и нуклеотидов. Их содержание в слюне определялось путем измерения площади полученных пиков (%).

Для анализа полученных результатов использовалось программное обеспечение для статистического анализа STADIA 7.0 (InCo, Россия). Анализ количественных данных проводили при помощи параметрического критерия Стьюдента. Уровень значимости был установлен на уровне 5%.

Исследование было разрешено этическим комитетом ВГМУ им Н.Н. Бурденко, все испытуемые перед проведением клинического исследования подписали информированное согласие в соответствии с принципами Хельсинкской декларации ВМА (2013 г.) и Федерального закона «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» № 323-ФЗ от 21.11.2011 г.

Полученные результаты и их обсуждение. В ходе анализа полученных хроматограмм было установлено, что пуриновые метаболиты слюны условно здоровых людей и пациентов с сахарным диабетом элюируются в виде 6 фракций. Полученные пики пуринов отличались друг от друга. Общее количество всех высвобожденных пуринов в каждом образце слюны было принято за 100%, далее производился расчет каждой площади элюированных фракций (%).

Исследование пуриновых метаболитов в слюне выявило достоверные отклонения в содержании аденозина. Его содержание в слюне при СД1 и СД2 было повышено по сравнению с контрольной группой, гендерные отличия не наблюдались (рис. 1).

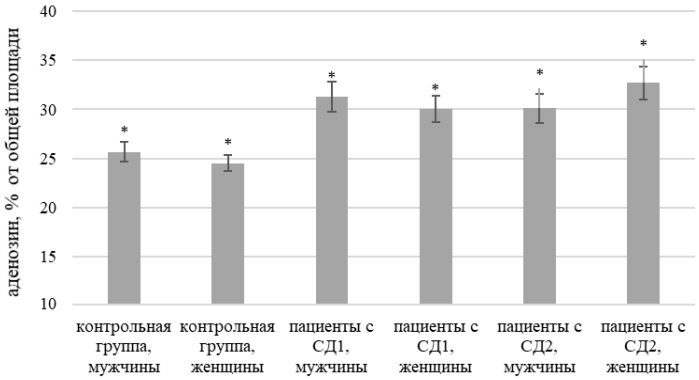

Рис. 1. Содержание аденозина в слюне в норме и при сахарном диабете 1 и 2 типа,
**- значимые отличия между практически здоровыми донорами и пациентами с сахарным диабетом 1 и 2 типа ($p \leq 0,05$)*

Многочисленные научные данные показывают важность аденозиновой системы в регуляции гомеостаза глюкозы путем модуляции секреции инсулина и чувствительности к инсулину в периферических метаболически активных тканях [9]. Сигнальные пути аденозина играют решающую роль в модуляции прогрессирования СД, в основном за счет вмешательства в функцию органов, регулирующих обмен веществ [5]. Также фосфорилирование аденозина до АМФ значительно нарушено в тканях органов при сахарном диабете из-за снижения активности аденозинкиназы, что приводит к увеличению концентрации аденозина в клетках. Внутриклеточное увеличение концентрации аденозина может привести к высвобождению его во внеклеточное пространство. Стоит отметить, что аденозин может предотвращать окислительный стресс путем индукции антиоксидантных систем (глутатионпероксидаза 1) в первичных эндотелиальных клетках человека, в свою очередь окислительный стресс может усиливать генерацию аденозина и передачу сигналов через аденозиновый рецептор [10].

Увеличение уровня АМФ, наряду со значительным увеличением содержания аденозина, позволяет предположить, что ускоренный повторный синтез мононуклеотидов является основной причиной увеличения пула мононуклеотидов у мужчин и женщин с СД1 и СД2 (таблица 1).

Таблица 1 - Содержание адениновых нуклеотидов в слюне в норме и при сахарном диабете 1 и 2 типа

Группы исследования		Показатели (% от общей площади)		
		АМФ	АДФ	АТФ
Контрольная группа	1 подгруппа - мужчины, n=20	18,85±0,76*^	28,35±1,31*^	6,68±0,28*^+
	2 подгруппа - женщины, n=20	21,36±1,03*^	30,93±1,22*^	9,22±0,51*^+
Пациенты с СД 1	1подгруппа - мужчины, n=20	24,32±1,18*	23,15±1,18*	4,22±0,22*
	2 подгруппа - женщины, n=20	25,21±1,22*	22,07±1,08*	4,55±0,25*
Пациенты с СД 2	1подгруппа - мужчины, n=20	24,45±1,16^	23,35±1,22^	4,11±0,17^
	2 подгруппа - женщины, n=20	26,41±1,27^	21,14±1,18^	4,03±0,21^

Примечание: *- значимые отличия между здоровыми мужчинами и мужчинами СД1, между здоровыми женщинами и женщинами СД1 ($p \leq 0,05$); ^- значимые отличия между здоровыми мужчинами и мужчинами СД2, между здоровыми женщинами и женщинами СД2 ($p \leq 0,05$); +- значимые отличия между женщинами и мужчинами в группах ($p \leq 0,05$).

Также при СД1 и СД2 происходило уменьшение содержания АДФ и АТФ в сравнении с контрольной группой (таблица 1), притом достоверных отличий между мужчинами и женщинами не наблюдалось ($p > 0,05$). Очевидно, что происходило нарушение энергетического обмена, что приводило к снижению уровня данных нуклеотидов, что можно использовать как дополнительный признак для оценки их функционального состояния при СД. Известно, что у больных сахарным диабетом вследствие нарушения липидного обмена наблюдаются функциональные и

структурные изменения мембранных рецепторов клеток. Данный процесс сопровождается снижением активности мембраносвязанного фермента Na+, K+-АТРазы и инсулинсвязывающего рецептора. Происходит уменьшение чувствительности клеток к инсулину. По литературным данным известно, что данные реакции сопровождаются снижением уровня аденозинтрифосфата и аденозиндифосфата при одновременном увеличении концентрации аденозинмонофосфата в крови [8]. Так как АМФ является компонентом пула аденилатов, то в физиологических условиях даже небольшие колебания в уровне АТФ приводят к изменению содержания АМФ.

В ходе исследования выявлено, что уровень гуанозиндифосфата и гуанозинтрифосфата при СД1 и СД2 были значительно ниже по сравнению с данными, полученными в контрольной группе (таблица 2).

Таблица 2 - Содержание гуаниновых нуклеотидов в слюне в норме и при сахарном диабете 1 и 2 типа

Группы исследования		Показатели (% от общей площади)	
		ГДФ	ГТФ
Контрольная группа	1 подгруппа -мужчины, n=20	3,53±0,18*^	2,13±0,11*^
	2 подгруппа - женщины, n=20	3,80±0,18*^	1,91±0,10*^
Пациенты с СД 1	1подгруппа -мужчины, n=20	2,44±0,16*	1,42±0,08*
	2 подгруппа - женщины, n=20	2,51±0,15*	1,53±0,06*
Пациентыс СД 2	1подгруппа -мужчины, n=20	2,2±0,14^	1,39±0,07^
	2 подгруппа - женщины, n=20	2,13±0,09^	1,4±0,08^

Примечание: *- значимые отличия между здоровыми мужчинами и мужчинами СД1, между здоровыми женщинами и женщинами СД1 ($p \leq 0,05$); ^- значимые отличия между здоровыми мужчинами и мужчинами СД2, между здоровыми женщинами и женщинами СД2 ($p \leq 0,05$); +- значимые отличия между женщинами и мужчинами в группах ($p \leq 0,05$)

Известно, что избыток АФК вызывает повреждение ДНК и пула клеточных нуклеотидов, приводя к разрывам нитей ДНК, а также к образованию специфических окисленных оснований в ДНК. Снижение уровня ГТФ могло быть связано с его окислением, которое происходит при чрезмерном образовании свободных радикалов, а именно гидроксильного радикала [10]. Известно, что АТФ стимулирует синтез гуаниновых мононуклеотидов, а ГТФ – синтез адениновых мононуклеотидов, то есть происходит взаимоподдержание и взаимоусиление двух подсистем метаболизма пуринов [4].

Выводы. Развитие гипергликемии при сахарном диабете 1 и 2 типа сопровождается нарушением пуринового обмена. В ходе исследования установлены достоверные отклонения содержания пуриновых метаболитов в слюне больных СД1 и СД2 в сравнении с условно здоровыми мужчинами и женщинами. Наблюдается снижение уровня АТФ, АДФ, ГТФ, ГДФ при одновременном увеличении концентрации А и АМФ, что говорит о развитии тканевой ишемии и окислительного стресса.

Литература / References.

1. Сахарный диабет / Михлиев, Ш. Ш. И др. // Science and Education, 4(5), 544–554. Retrieved from https://openscience.uz/index.php/sciedu/article/view/57552.

2. Классификация сахарного диабета: новый взгляд на проблему / Куденцова Л. А., Давыдов Д. В., Чернавский С. В., Стремоухов А. А. // Лечащий Врач. 2022; 5-6 (25): 84-90.

https://doi.org/10.51793/OS.2022.25.6.015.

3. Camici M, Garcia-Gil M, Tozzi MG. The Inside Story of Adenosine. Int J Mol Sci. 2018 Mar 9;19(3):784. https://doi.org/10.3390/ijms19030784. PMID: 29522447; PMCID: PMC5877645.

4. Aras Tosun D., Karadag Gurel A. Identification of Genetic Alterations in Periodontitis Patients with Poorly Controlled Type 2 Diabetes Mellitus. EADS. 2022;49(3):101-107. https://doi.org/10.52037/eads.2022.0041.

5. Pak ES, Cha JJ, Cha DR, Kanasaki K, Ha H. Adenosine receptors as emerging therapeutic targets for diabetic kidney disease. Kidney Res Clin Pract. 2022 Sep;41(Suppl 2):S74-S88. https://doi.org/10.23876/j.krcp.22.011. Epub 2022 Aug 22. PMID: 36239063; PMCID: PMC9590297.

6. Yao M, Xiao Y, Yang Z, Ge W, Liang F, Teng H, Gu Y, Yin J. Identification of Biomarkers for Preeclampsia Based on Metabolomics. Clin Epidemiol. 2022 Mar 19;14:337-360. https://doi.org/10.2147/CLEP.S353019. PMID: 35342309; PMCID: PMC8943653.

7. Sitek JD, Kuczeriszka M, Walkowska A, Kompanowska-Jezierska E, Dobrowolski L. Nonselective and A2a-Selective Inhibition of Adenosine Receptors Modulates Renal Perfusion and Excretion Depending on the Duration of Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. Pharmaceuticals (Basel). 2023 May 11;16(5):732. https://doi.org/10.3390/ph16050732. PMID: 37242515; PMCID: PMC10222446.

8. Supachoke Mangmool et all. Stimulation of adenosine A1 receptor prevents oxidative injury in H9c2 cardiomyoblasts: Role of Gβγ-mediated Akt and ERK1/2 signaling, Toxicology and Applied Pharmacology, Volume 451, 2022, 116175, ISSN 0041-008X, https://doi.org/10.1016/j.taap.2022.116175.

9. Нарушение энергетического метаболизма у больных с сахарным диабетом 1 типа, осложненным кетоацидозом в зависимости от наличия диастолической дисфункции левого желудочка / Муха Н.В. и др.// Забайкальский медицинский вестник. 2019. № 1. - С. 52-57.

10. Аблаев Н.Р., Батырбаева Д.Ж. Молекулярные механизмы развития сахарного диабета при дефиците витамина Д и хрома // Вестник КазНМУ. 2015. №3. – С. 186-197.

Abstract.

A.A. Cheprasova, S.S. Popov, A.N. Pashkov, O.V. Myachina

The ratio of purine metabolites in type 1 and type 2 diabetes mellitus

Voronezh State Medical University

One of the acute problems of biomedicine is currently diabetes mellitus, the prevalence of which is constantly growing in the Russian Federation and other countries. Hyperglycemia leads to a violation of carbohydrate, protein and lipid metabolism, as well as to the development of an energy imbalance.

The aim of the work is to study the ratio of purine metabolites in type 1 and type 2 diabetes mellitus.

The study included 120 people, the control group consisted of 20 conditionally healthy men and 20 women. The experimental groups consisted of patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus, 20 men and 20 women each. Saliva was collected in the morning on an empty stomach. The content of purine metabolites in saliva was determined by chromatographic method.

The study revealed that purine metabolites in saliva are eluted in the form of 6 different fractions: adenosine (A), adenosine monophosphate (AMP), adenosine diphosphate (ADP), guanosine diphosphate (GDF), adenosine triphosphate (ATP), guanosine triphosphate (GTP). Significant deviations in the content of adenylic and guanylic metabolites in the saliva of patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus compared with practically healthy individuals were revealed.

The ratio of purine metabolites of saliva is an important indicator of the physiological state of the body, reflects energy metabolism, the development of tissue ischemia and oxidative stress. Thus, the study of purine metabolites in saliva can be a useful tool for the diagnosis and monitoring of diabetes mellitus.

Keywords: purine metabolites; nucleotides; nucleosides; diabetes mellitus; saliva; chromatography.

Сведения об авторах: Чепрасова Анна Александровна – ассистент каф. биологии ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России, cheprasova_81@mail.ru; Попов Сергей Сергеевич – д.м.н., доцент, зав. каф.организации фармацевтического дела, клинической фармации и фармакогнозии ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России, popov-endo@mail.ru; Пашков Александр Николаевич – д.б.н., профессор каф. биологии ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России vgma-pashkov@yandex.ru; Мячина Ольга Владимировна – д.м.н., доцент, зав. каф. биологии ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России, biolog@vrngmu.ru.