***И.А. Образцова*[1], *С.С. Попов*[1], *А.Н. Веревкин*[1], *А.А. Пашкова*[1], *Е.Д. Крыльский*[2]**

Активность глутатионовой антиоксидантной системы у пациентов с диабетической нейропатией при сахарном диабете 2 типа

[1] *ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России;* [2] *ФГБОУ ВО ВГУ*

Резюме. В настоящее время сахарный диабет является одним из наиболее распространенных неинфекционных заболеваний человека. В этой связи, значительную проблему для практического здравоохранения приобретают осложнения диабета, среди которых ключевая роль по тяжести течения принадлежит диабетической нейропатии. Ведущим механизмом развития данного осложнения считается окислительный стресс. В связи с этим целью настоящей работы стал анализ активности ферментов глутатионовой антиоксидантной системы у больных диабетической нейропатией при проведении базисной терапии. Материалы и методы. В исследование были включены 45 пациентов с диабетической нейропатией находившиеся на лечении в эндокринологическом отделении БУЗ ВО «Воронежского областного клинического центра специализированных видов медицинской помощи». Клинико-биохимические показатели анализировались при поступлении пациентов в стационар и перед выпиской. Концентрацию восстановленного глутатиона, активность глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и глутатионтрансферазы определяли спектрофотометрически. Результаты исследования. После проведенной терапии наблюдалось изменение биохимических показателей в сторону значений, характерных для нормы. При этом происходило возрастание исследуемых показателей антиоксидантной системы, что свидетельствует об усилении защитной способности организма. Были выявлены корреляционные взаимосвязи между биохимическими параметрами крови и окислительным метаболизмом.

Ключевые слова: диабетическая нейропатия, антиоксидантная система, глутатион.

Актуальность. В настоящее время диабетом страдают примерно 381 миллион человек во всем мире, и их число быстро растет. По оценкам Всемирной организации здравоохранения, к 2030 году осложнения этого заболевания могут стать основной причиной смертности [1]. Одним из частых осложнений как диабета 1-го, так и 2-го типа является диабетическая нейропатия (ДН). Считается, что ключевым патологическим фактором повреждения периферических нервов является гипергликемиея. Точный механизм возникновения нейропатии при диабете до сих пор не выяснен, однако считается, что основной причиной является окислительный стресс, возникающий в результате индуцированного гипергликемией образования свободных радикалов. Окислительный стресс приводит к микроскопическим повреждениям сосудов, затрудняющим кровоснабжение периферических нервов. Некоторые провоспалительные цитокины, включая IL-6 и TNF-α, также повышаются при гипергликемии и способствуют повреждению нервных клеток [2]. Именно цитокины могут быть причиной развития болевых реакций, которые опосредованы наличием рецепторов фактора некроза опухоли-1 на окончаниях аксонов сенсорных нейронов. Эти рецепторы отвечают за восприятие механических, термических и химических раздражителей. При стимуляции TNF-α ноцицепторы запускают связанный с болью внутриклеточный сигнал через киназу А тропомиозинового рецептора [3].

Важную роль в защите организма от окислительного стресса выполняет глутатионовая антиоксидантная система как часть общей реакции на стрессовое воздействие. Дисбаланс между активными формами кислорода и антиоксидантами является важным звеном в патогенезе инсулинорезистентности и осложнений диабета, поскольку сигнальные пути, опосредованные инсулином, не стимулируются должным образом в условиях окислительного стресса.

Целью настоящей работы стал анализ активности глутатионовой антиоксидантной системы у больных ДН при проведении базисной терапии.

Материал и методы исследования. В исследование были включены пациенты с диабетической нейропатией находившиеся на лечении в эндокринологическом отделении БУЗ ВО «Воронежского областного клинического центра специализированных видов медицинской помощи» в период с 2018 по 2020 гг. Работа была одобрена этическим комитетом ВГМУ им Н.Н. Бурденко (протокол от 27.02.2018 № 1). Перед проведением клинического исследования получено информированное согласие всех пациентов в соответствии с принципами, изложенными в Хельсинкской Декларации Всемирной медицинской ассоциации (64th WMA GeneralAssembly, Fortaleza, Brazil, October 2013) и Федеральном законе Российской Федерации № 323-ФЗ от 21.11.2011 г. «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».

В исследование были включены 45 пациентов в возрасте от 57 до 77 лет с диабетической нейропатией. Контрольную группу (n=86) составили практически здоровые лица с нормальными показателями биохимического и общего анализа крови. Диагноз был поставлен на основании клинической картины заболевания, биохимического анализа крови. Критериями исключения из исследования являлись: острый инфаркт миокарда, злокачественные новообразования, острое нарушение мозгового кровообращения. Клинико-биохимические показатели анализировались при поступлении пациентов в стационар и перед выпиской.

В качестве стандартной терапии использовали следующую схему лечения, указанную в табл. 1.

Таблица 1 – Схема лечения

Показатель	Лечение
Гипогликемические пероральные препараты	Бигуаниды (метформин — 500-1500 мг 1 раз вечером) Препараты сульфонилмочевины (Гликлазид — 30-90 мг 1 р/д) Ингибиторы дипептидилпептидазы-4 (Вилдаглиптин — 50-100 мг 1-2 р/д, Алоглиптин — 12,5-25 мг 1 р/д)
Антигипертензивные препараты	АПФ-блокаторы (Эналаприл -5-20 мг 1-2 р/д, Лизиноприл 5-20 мг 1 р/д), В-адреноблокаторы (Бисопролол — 2,5-10 мг 1 р/д, Метопролола сукцинат — 50-100 мг 1 р/д)
Гиполипидемические препараты	Статины (Аторвастатин — 20-40 мг 1 р/д)
Диуретики	Тиазидные диуретики (Индапамид 2,5 мг 1 р/д)
Сартаны	Антагонист рецепторов ангиотензина 11 (Лориста 50-100 мг 1 раз в день)
Метаболическое средство	Препарат, регулирующий липидный и углеводный обмен (тиоктовая кислота 600 мг 1 раз в сутки)

В ходе клинического исследования использовали сыворотку крови больных. Кровь для исследования забиралась в пробирки типа «вакутейнер» в утреннее время натощак из локтевой вены.

Концентрацию восстановленного глутатиона (GSH) определяли спектрофотометрически при длине волны 412 нм по реакции с реактивом Эллмана [5]. Активность ферментов оценивали спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Измерение активности глутатионпероксидазы (ГП, КФ 1.11.1.9) проводили по сопряженной ферментативной реакции в среде следующего состава: 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4), содержащий 1 мМ ЭДТА, 0,12 мМ НАДФН, 0,85 мМ GSH, 0,37 мМ H2O2, 1 ЕД/мл глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.6.4.2). Контрольная проба не содержала GSH. Активность ГР определяли в среде спектрофотометрирования, содержащей 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4), 1 мМ ЭДТА, 0,16 мМ НАДФН и 0,8 мМ окисленного глутатиона. Активность глутатионтрансферазы (ГТ, КФ 2.5.1.18) определяли с помощью метода, основанного на оценке скорости образования глутатион-5-2,4-ди- нитробензола в реакции GSH с 1-хлор-2,4-динитробензолом, в среде следующего состава: 0,1 М калий-фосфатный буфер (pH 7,4), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ 1-хлор-2,4-динитробензол, 5 мМ GSH.

Результаты анализировали с помощью программ SPPS Statistics с использованием одновыборочного критерия Колмогорова-Смирнова для анализа нормальности распределения значений переменных. Значения показателей в группах сравнивали с помощью t-критерия Стьюдента или критерия Манна-Уитни. Для выявления корреляционных взаимосвязей между изучаемыми переменными использовали коэффициент корреляции Пирсона для значений с нормальным распределением и коэффициент корреляции Спирмена для непараметрических показателей. В настоящей работе приводятся значения средней (0,30-0,69) и сильной (>0,70) степени корреляции. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Полученные результаты и их обсуждение. Общая характеристика и биохимические показатели крови пациентов, включенных в исследование, представлены в табл. 2.

Таблица 2 – Основные характеристики, биохимические показатели крови и параметры неврологического статуса пациентов с диабетической нейропатией, получавших стандартное лечение *(среднее значение ± SD)*

Показатель	До лечения	После лечения	p
Возраст, лет	67±10	-	-
Длительность СД типа 2, лет	10±5	-	-
Концентрация глюкозы натощак, ммоль/л	12,86±3,38	7,18±0,80	<0,001
Концентр.глюкозы через 2 ч после ПГТТ, ммоль/л	17,05±3,66	9,31±1,38	<0,001
HbA1c, %	8,90±1,94		
ИМТ, кг/м^2	33±2		
АсАТ, Ед/л	23,33±4,73	18,44±4,62	<0,001
АлАТ, Ед/л	24,28±3,10	21,36±4,70	0,003
Билирубин общий, мкмоль/л	13,20±3,49	11,25±3,31	0,009
Мочевина, ммоль/л	6,24±1,65	5,31±1,56	0,015
Креатинин, мкмоль/л	90,22±12,90	76,81±13,44	<0,001
Холестерин, ммоль/л	6,82±1,01	6,11±1,00	0,004
Триглицериды, ммоль/л	2,20±0,50	1,75±0,39	<0,001
Амилаза, Ед/л	137,19±59,31	111,47±53,46	0,036

При первичном обращении у пациентов были выявлены основные клинические признаки диабетической нейропатии: боли в стопах различной интенсивности, онемение, парестезии, зябкость стоп, судороги в мышцах голеней и стоп. Отмечалось снижение периферической чувствительности – вибрационной, болевой, тактильной и температурной. Концентрация глюкозы в сыворотке крови обследуемых пациентов натощак и после перорального глюкозотолерантного теста (ПгТТ) была значительно выше показателей, характерных для нормы, что объективно свидетельствует о нарушении метаболизма углеводов и развитии сахарного диабета. Помимо этого, для участников исследования были характерны повышенные уровни общего билирубина, холестерина и активности амилазы в сыворотке крови. Выявлено также снижение СРВ при развитии патологии, что может быть связано с процессами демиелинизации нервных волокон.

После проведенной терапии наблюдалось снижение уровня глюкозы натощак в 1,79 раза ($p<0,001$). При этом, уровень глюкозы через 2 часа после проведения ПгТТ уменьшался в 1,83 раза ($p<0,001$) по сравнению с данными до лечения. При этом их концентрация не достигала показателей, характерных для нормы.

В ходе исследования было установлено изменение функционального состояния глутатионовой антиоксидантной системы. Так, активность ГП и ГР в сыворотке крови больных, выраженная в виде Е/мл сыворотки, возрастала в 1,35 раза ($p<0,05$) (рис. 1).

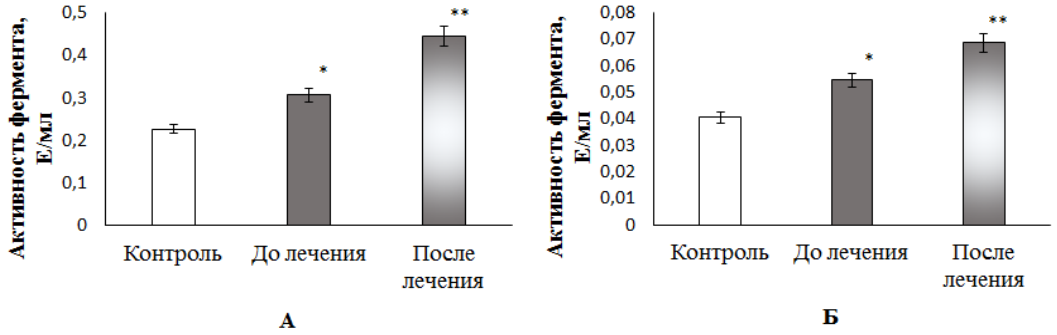

Рис. 1. Активность глутатионпероксидазы (А) и глутатионредуктазы, выраженная в виде Е/мл сыворотки, в исследуемых группах; ** - $p<0,05$ по сравнению с контрольной группой; ** - $p<0,05$ по сравнению с группой с диабетической нейропатией*

Повышение активности ГП может быть связано с тем, что данный фермент является индуцибельным и его активность стимулируется АФК [6]. Повышенная продукция радикалов может стимулировать активность ГП для борьбы с избыточным перекисным повреждением. Согласно другому механизму, при диабете в тканях может задерживаться селен и тем самым повышать активность селензависимой ГП [7]. Другим фактором, который может вносить вклад в повышение активность ГП, являются увеличение содержания гидропероксида, продукта пероксидного повреждения липидов [8].

Содержание GSH в сыворотке крови больных диабетической нейропатией снижалось в 2,0 раза ($p<0,05$) по сравнению с контрольной группой (рис. 2А). Известно, что GSH является наиболее распространенным клеточным антиоксидантом,

который играет важную роль в антиоксидантной защите, регулируя окислительно-восстановительное состояние и нейтрализуя свободные радикалы. Гипергликемическое состояние косвенно приводит к истощению GSH через полиоловый путь, который потребляет НАДФН, необходимый также для регенерации GSH [9].

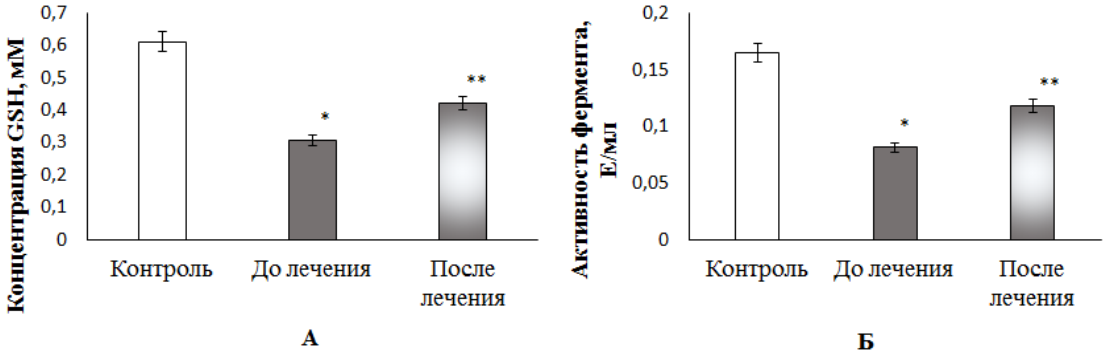

Рис. 2. Содержание восстановленного глутатиона (А) и активность глутитон-трансферазы, выраженная в виде Е/мл сыворотки, в исследуемых группах

** - p<0,05 по сравнению с контрольной группой; ** - p<0,05 по сравнению с группой с диабетической нейропатией*

При этом активность ГТ, выраженная в виде Е/мл сыворотки, снижалась в 2,02 (p<0,05) раза, по сравнению с контрольной группой (рис. 2Б). Вероятно, активность данного фермента снижалась вследствие уменьшения основного субстрата данной реакции – GSH.

Проведение базисной терапии способствовало увеличению активности ферментов глутатионовой системы, а также росту содержания GSH. Так активность ГП и ГР, выраженная в виде Е/мл сыворотки, возрастала в 1,45 и 1,26 раза, соответственно (рис. 1). Активация антиоксидантных ферментов, при проводимой терапии, свидетельствует об усилении защиты клеток. При этом, содержание глутатиона возрастало в 1,37 раза (p<0,05) по сравнению с данными при патологии (рис. 2А). Вероятно, нормализация уровня глюкозы способствовала снижению интенсивности генерации АФК и, в том числе, уменьшению расходования НАДФН, необходимого для регенерации данного тиола. Кроме того, усиление активности ГП/ГР-системы также способствовало росту содержания GSH. Наблюдаемый эффект может также быть обусловлен снижением АФК под действием липоевой кислоты, которая может непосредственно нейтрализовать радикалы как в гидрофобной, так и в гидрофильной среде. Известно также, что липоевая кислота способна активировать сигнальный путь Nrf2/ARE, что будет способствовать увеличению уровня ГР и как следствие росту концентрации GSH [10].

На фоне этого происходило возрастание активности ГТ. Активность данного фермента, выраженная в виде Е/мл сыворотки крови, увеличивалась в 1,45 раза (p<0,05) (рис. 2Б). Снижение интенсивности свободнорадикальных процессов при проведении базисной терапии, могло способствовать восстановлению активности

фермента. Росту активности также способствовало увеличение доступности восстановленного глутатиона.

Анализ корреляционных связей показал, что для больных ДН, проходивших стандартное лечение, была характерна положительная взаимосвязь между параметрами гликемии, биохимическими показателями крови, и уровнем антиоксидантов (табл. 3). В частности, уровень глюкозы натощак и ПгТТ коррелировали с активностью АсАТ ($p<0,001$), амилазы ($p<0,01$), концентрацией билирубина ($p<0,01$) и мочевины ($p<0,01$). Активность ГП коррелировала с уровнем глюкозы натощак ($p<0,05$), холестерином ($p=0,002$) и концентрацией GSH ($p<0,05$). При этом была выявлена отрицательная корреляция между активностью ГТ, концентрацией глюкозы через 2 ч после ПГТТ ($p<0,05$) и активностью АлАТ ($p<0,05$) (табл. 3).

Таблица 3. Взаимосвязь клинико-биохимических показателей в сыворотке крови и уровнем исследуемых антиоксидантов у пациентов с диабетической нейропатией, получавших стандартное лечение.

Переменная	Корреляция, r (Пирсона)	p
Концентрация глюкозы натощак	АсАТ, r=0,438	<0,001
	Билирубин, r=0,306	0,009
	Мочевина, r=0,357	0,003
	Амилаза, r=0,364	0,002
Концентрация глюкозы через 2 ч после ПГТТ	АсАТ, r=0,411	<0,001
	Билирубин, r=0,323	0,006
	Мочевина, r=0,333	0,005
	Амилаза, r=0,317	0,007
Активность ГП	Глюкоза натощак, r=0,420	0,017
	Холестерин, r=0,518	0,002
	GSH, r=0,440	0,024
Активность ГТ	Концентрация глюкозы через 2 ч после ПГТТ, r=-0,339	0,046
	АсАТ, r=-0,444	0,009
GSH	Глюкоза натощак, r=0,372	0,047

Полученные данные подчёркивают системное влияние концентрации глюкозы на показатели неврологического статуса больных ДН, а также свидетельствуют о наличии стойкой взаимосвязи между степенью нарушения метаболических процессов и выраженностью неврологического дефицита в условиях гипергликемии. Выявленная положительная корреляция между уровнем глюкозы, активностью ГП и содержанием GSH подтверждает ведущую роль гликемии в изменении антиоксидантного статуса.

Выводы. Таким образом, в ходе исследования было установлено, что проводимая терапия способствует изменению метаболизма углеводов и биохимических показателей крови в сторону контрольных значений. При этом, также наблюдается повышение активности антиоксидантных ферментов – ГП, ГР, ГТ и концентрации GSH, что свидетельствует об усилении защитного потенциала организма. Проведенный корреляционный анализ свидетельствует о наличие тесной взаимосвязи между биохимическими параметрами крови и компонентами глутатионовой антиоксидантной системы при ДН.

Литература / References.

1. Velasco MB, Rodríguez DC, Montalbán AIR, Jiménez SV, Martínez IFV. An update on the diagnosis, treatment and prevention of diabetic peripheralneuropathy. Angiologia. 2017; 69 (3): 174-181. doi: 10.1016/j.angio.2016.06.005
2. Akter N. Diabetic peripheral neuropathy: Epidemiology, physiopathology, diagnosis and treatment. Delta Medical College Journal. 2019; 7 (1): 35-48. doi: 10.3329/dmcj.v7i1.40619
3. Wheeler MA, Heffner DL, Kim S, Espy SM, Spano AJ, Cleland CL, Deppmann CD. TNF-α/TNFR1 signaling is required for the development and function of primary nociceptors. Neuron. 2014; 82 (3): 587-602. doi: 10.1016/j.neuron.2014.04.009.
4. Гехт Б. М. Теоретическая и клиническая электромиография. – Л.: Наука; 1990.
5. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Analytical Biochemistry. 1968; 25: 192-205. doi: 10.1016/0003-2697(68)90092-4.
6. Mena P, Maynar M, Gutierrez JM, Maynar J, Timon J, Campillo JE. Erythrocyte free radical scavenger enzymes in bicycle professional racers. Adaptation to training. Int J Sports Med 1991; 12: 563-566. doi: 10.1055/s-2007-1024734.
7. Matkovics B, Varga SI, Szabo L, Witas H. The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolism enzymes. Horm Metab Res 1982; 14: 77-79. doi: 10.1055/s-2007-1018928.
8. Bellisola G, Galassini S, Moschini G, Poli G, Perona G, Guidi G. Selenium and glutathione peroxidase variations induced by polyunsaturated fatty acids oral supplementation in humans. Clin Chim Acta 1992; 205: 75-85. doi: 10.1016/s0009-8981(05)80002-6.
9. Garg SS, Gupta J. Polyol pathway and redox balance in diabetes. Pharmacological Research. 2022; 182: 106326 (1-7). doi: 10.1016/j.phrs.2022.106326
10. Zhang J, Zhou X, Wu W, Wang J, Xie H, Wu Z. Regeneration of glutathione by α-lipoic acid via Nrf2/ARE signaling pathway alleviates cadmium-induced HepG2 cell toxicity. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2017; 51: 30-37. doi: 10.1016/j.etap.2017.02.022

Abstract.

I.A. Obraztsova1, S.S. Popov1, A. N. Verevkin2, A.A. Pashkova1, E.D. Kryl'skii2

GLUTATHIONE ANTIOXIDANT SYSTEM ACTIVITY IN DIABETIC NEUROPATHY PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS.

[1]Voronezh State Medical University; [2]Voronezh State University

Diabetes mellitus is one of the most common non-infectious human diseases. In this regard, a significant problem for practical health care acquire complications of diabetes, among which the key role in severity and course belongs to diabetic neuropathy. Oxidative stress is considered to be the leading mechanism of development of this complication. In this regard, the aim of this work was to analyze the activity of glutathione antioxidant system enzymes in patients with diabetic neuropathy under baseline therapy. Materials and Methods. The study included 45 patients with diabetic neuropathy treated in the endocrinology department of the BUZ VO "Voronezh Regional Clinical Center for Specialized Medical Care". Clinical and biochemical parameters were analyzed at the patients' admission to the hospital and before discharge. The concentration of reduced glutathione, activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione transferase were determined spectrophotometrically. Results of the study. After the conducted therapy was observed a change of biochemical indices in the direction of values characteristic for norm. At the same time, there was an increase in the studied indicators of antioxidant system, which indicates an increase in the protective ability of the organism. Correlations between blood biochemical parameters and oxidative metabolism disorders were revealed.

Keywords: diabetic neuropathy, antioxidant system, glutathione.

Сведения об авторах: Образцова Ирина Андреевна — аспирант каф.поликлинической терапии ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России, e-mail: obraztsova311@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, e-mail: popov-endo@mail.ru; Веревкин Алексей Николаевич – к.б.н., доцент каф.медицинской биохимии, молекулярной и клеточной биологии ФГБОУ ВО ВГУ, e-mail: wer.all@mail.ru; Пашкова Анна Александровна – д.м.н., профессор, зав.каф.поликлинической терапии ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России, zuikova-therapia@vrngmu.ru; Крыльский Евгений Дмитриевич – к.б.н., доцент каф. медицинской биохимии, молекулярной и клеточной биологии ФГБОУ ВО ВГУ, e-mail: evgenij.krylsky@yandex.ru