

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

ОДИНОКОВА ОЛЬГА АЛЕКСАНДРОВНА

**КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ ПАРАМЕТРОВ
ОКИСЛИТЕЛЬНОГО/КАРБОНИЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ
САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА**

03.01.04 – Биохимия

14.01.02 – Эндокринология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:
д.б.н., профессор Ланкин В.З.,
д.м.н. Недосугова Л.В.

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	31
2.1. Характеристика обследованных пациентов	31
2.2. Клинические и биохимические методы исследования	43
2.3. Статистическая обработка результатов	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	50
3.1. Окислительный стресс и укорочение теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови у пациентов с впервые выявленным диабетом 2 типа	50
3.2. Влияние природных дикарбониллов на активность антиоксидантных ферментов <i>in vitro</i>	53
3.3. Модификация белков и деструкция ДНК в результате процессов окислительного и карбонильного стресса при СД2.....	55
3.4. Подавление процессов свободнорадикального окисления в результате проведения эффективной сахароснижающей терапии у пациентов СД2.....	64
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	71
ВЫВОДЫ	73
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	75
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	76
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	78

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Сахарный диабет – хроническое прогрессирующее заболевание, распространенность которого на земном шаре с каждым годом неукоснительно растет. По данным Международной Федерации Диабета (IDF) в 2017 году в мире зарегистрировано 425 млн. человек, страдающих сахарным диабетом. Причем, к 2045 году, по прогнозам ученых, эта цифра увеличится до 629 млн. больных [122]. Около 10% пациентов страдают сахарным диабетом 1 типа, у остальных – сахарный диабет 2 типа (СД2).

Также следует учитывать, что только один из двух, страдающих сахарным диабетом 2 типа, знает о своей болезни, поэтому, реальная цифра количества больных сахарным диабетом гораздо выше.

Летальность от сахарного диабета в 2015 году превысила 5 млн. человек, что больше суммарной летальности от синдрома приобретенного иммунодефицита (1,5 млн.), туберкулеза (1,5 млн.) и малярии (0,6 млн.) [121]. Поэтому, в настоящее время сахарный диабет по праву называют «неинфекционной эпидемией».

Сахарный диабет является фактором риска возникновения атеросклероза, причем, основной причиной смертности пациентов с сахарным диабетом 2 типа (СД2) являются сердечно-сосудистые осложнения, развивающиеся вследствие прогрессирования атеросклероза (по данным ВОЗ более 75% пациентов с диабетом умирают в результате сердечно-сосудистых катастроф) [4,9,72,89,91,92,152]. Поскольку прогрессирование атеросклероза сопровождается развитием окислительного стресса [137], достаточно давно было высказано предположение о том, что и при СД2 возможна активация свободнорадикальных процессов [159]. Это представляется тем более вероятным, поскольку автоокисление глюкозы при гипергликемии может способствовать образованию активных форм кислорода (АФК) и органических свободных радикалов, являющихся мощными повреждающими факторами в организме [49]. Несмотря на то, что интенсификация

свободнорадикальных процессов в присутствии возрастающих концентраций глюкозы была продемонстрирована экспериментально [49], наличие окислительного стресса при СД2 было постулировано лишь на основании косвенных показателей, главным образом, на основании регистрации повышенного уровня вторичного продукта свободнорадикального окисления липидов – малонового диальдегида (МДА) в плазме крови больных [172].

Тем не менее, реакция с 2-тиобарбитуровой кислотой (2-ТБК), обычно используемая для анализа содержания МДА, обладает низкой специфичностью, поскольку с 2-ТБК в условиях определения могут реагировать различные вещества плазмы крови, отличные от МДА [137]. В связи с этим, в англоязычной литературе при таких определениях предлагается использовать термин не МДА, а thiobarbituric acid-reactive substances – TBARS. Таким образом, только увеличенный уровень TBARS не может рассматриваться в качестве абсолютно корректного критерия наличия окислительного стресса при СД2. В связи с этим, в имеющихся до настоящего времени публикациях, постулирование наличия окислительного стресса у больных СД2 основывается, главным образом, на теоретических предположениях или данных, которые не могут однозначно свидетельствовать о развитии признаков окислительного стресса, таких, как увеличение уровня TBARS и изопростанов, увеличение генерирования АФК, образование нитро-производных белков и т.п. При окислительных превращениях глюкозы в крови больных СД2, прежде всего, накапливаются низкомолекулярные реакционно-способные карбонильные соединения, отличные от МДА, что рассматривается как проявление карбонильного стресса. Действительно, образующиеся при СД2 природные дикарбонилы, такие, как глиоксаль (гомолог МДА) и метилглиоксаль (изомер МДА), могут модифицировать структуру и нарушать нормальное функционирование белков, а образование разнообразных свободных радикалов при соокислении липидов и глюкозы может вызывать окислительную деструкцию молекул дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК, в частности, вызывать укорочение

длины теломерных повторов ДНК, что может рассматриваться как проявление преждевременного старения). Очевидно, что любое логичное теоретическое предположение для того, чтобы оно стало научным фактом, необходимо подтвердить конкретными экспериментальными данными.

Исходя из вышеизложенного, нам представлялось важным в рамках комплексного исследования больных СД2 с нарушениями углеводного обмена провести одновременное изучение параметров, характеризующих выраженность окислительного и карбонильного стресса, т.е. показателей, ответственных за окислительную модификацию белков и окислительный катаболизм молекул ДНК с целью получения возможно более убедительных и неопровержимых доказательств развития окислительного и карбонильного стресса при СД2.

Кроме того, представлялось необходимым исследовать информативность ряда параметров, характеризующих выраженность окислительного и карбонильного стресса, для оценки эффективности терапии СД2. Исходя из выше изложенного, тема настоящей работы представляется весьма актуальной в связи с чрезвычайной теоретической и практической важностью проблемы.

Степень разработанности темы

Теоретическое обоснование возможности развития окислительного стресса при сахарном диабете было сделано в обзоре [159]. С использованием модели аллоксанового диабета на экспериментальных животных было показано, что бета-клетки поджелудочной железы весьма чувствительны к действию АФК, причем резистентность морских свинок к действию аллоксана объяснима высоким уровнем активности антиоксидантных ферментов в панкреасе этих животных [26]. В последующие годы было установлено, что в плазме крови больных СД2 повышен уровень TBARS [172], что было трактовано как проявление признаков окислительного стресса, хотя только этот критерий не может быть признан в качестве абсолютного доказательства наличия окислительного

стресса. Таким образом, назрела необходимость комплексного исследования параметров окислительного стресса при СД2.

Цель исследования

Изучить информативность параметров окислительного и карбонильного стресса при сахарном диабете и возможность их использования для оценки эффективности сахароснижающей терапии.

Задачи исследования

1. Исследовать параметры окислительного стресса: содержание МДА, активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГП), а также длину теломерных повторов у практически здоровых людей и больных с впервые выявленным СД2 .
2. Исследовать показатели окислительной модификации белков и окислительной деструкции ДНК у больных с ИБС без нарушений углеводного обмена и больных СД2 с нарушениями углеводного обмена.
3. Исследовать влияние природных дикарбониллов, образующихся при окислительных превращениях глюкозы (глиоксаль, метилглиоксаль) на активность СОД эритроцитов человека в условиях *in vitro*.
4. Исследовать возможность использования показателей окислительного/карбонильного стресса для оценки эффективности терапии больных СД2 с нарушениями углеводного обмена.
5. Исследовать корреляционные зависимости между уровнем гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) и показателями, характеризующими выраженность окислительного и карбонильного стресса (МДА, ок-ЛНП, активность СОД) у больных СД2.

Научная новизна

Впервые проведено комплексное исследование ключевых параметров окислительного и карбонильного стресса у больных СД2 с выраженными нарушениями углеводного обмена с целью получения корректных доказательств того, что свободнорадикальные реакции играют важную роль в этиологии и патогенезе СД2. Кроме того, впервые проведено комплексное

исследование окислительной модификации белков и окислительной деструкции ДНК при СД2 с целью выявления наиболее информативных показателей для оценки эффективности терапии этого заболевания. Впервые при исследовании одной и той же группы больных СД2 с выраженными нарушениями углеводного обмена было установлено наличие окислительных модификаций белковых молекул в плазме крови пациентов, а именно: увеличение уровня модифицированного апопротеина В-100 липопротеидов низкой плотности (ЛНП) и снижение содержания восстановленных белковых тиолов. Впервые в качестве еще одного параметра, свидетельствующего о наличии окислительной модификации белков при СД2 использовали обнаруженное нами снижение активности ключевого антиоксидантного фермента эритроцитов – СОД, поскольку в модельных экспериментах *in vitro* было установлено, что снижение активности СОД может быть вызвано модификацией молекул этого фермента природными дикарбонилами – глиоксалем и метилглиоксалем, образующимися при окислительных превращениях глюкозы в процессе диабетической гипергликемии. При исследовании этой же группы больных СД2 также было выявлено увеличение окислительного катаболизма молекул ДНК, заключающегося в снижении длины теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови и увеличении содержания конечного продукта окислительной деструкции ДНК – 8-гидрокси-гуанина (8-охо-dG) в плазме крови и моче больных. Исследование, в котором одновременно изучали столь большое число информативных параметров, однозначно свидетельствующих о значительной окислительной модификации белков и деструкции молекул ДНК при СД2 проведено впервые. У больных СД2 выявлено наличие положительной корреляции между уровнем HbA_{1c} и величиной активности СОД эритроцитов ($r=0,65$; $p<0,0001$). Показано, что в процессе сахароснижающей терапии больных СД2 с использованием бигуанидов, препаратов сульфонилмочевины и инсулинотерапии, снижается содержание окислительно модифицированных липопротеидов низкой плотности (ок-

ЛНП) в плазме крови, что может быть использовано в качестве информативных параметров для оценки эффективности проводимой терапии.

Теоретическая значимость

В диссертационной работе при выполнении комплексного исследования выявлено наличие окислительной модификации белков и окислительной деструкции ДНК у больных СД2 при использовании разнообразных объективных параметров, что позволяет уточнить механизмы поражения стенки сосудов при этом заболевании.

Практическая значимость

Впервые было проведено столь комплексное исследование, и по всем параметрам можно сказать, что окислительный и карбонильный стресс при сахарном диабете имеет место. Обнаруженное повышение уровня окислительно модифицированных ЛНП в плазме крови больных СД2 является наиболее корректным показателем, свидетельствующим о наличии окислительного стресса, что может быть использовано в качестве дополнительного критерия тяжести заболевания. Выявленная корреляция между активностью СОД и уровнем HbA_{1c} в эритроцитах больных СД2 может служить основой для разработки принципиально нового метода диагностики и определения тяжести СД2, причем этот метод выгодно отличается простотой осуществления, отсутствием необходимости дорогостоящей аппаратуры и возможностью длительного хранения замороженных образцов.

Методология и методы исследования

В работе были использованы разнообразные современные биохимические методы, методы молекулярной биологии и иммунохимические методы. Об окислительной модификации белков при СД2 судили на основании увеличения степени карбонильной модификации молекул апопротеина В-100 частиц ЛНП, снижения активности СОД и снижения концентрации восстановленных тиолов. Об окислительной деструкции молекул ДНК судили на основании снижения длины теломерных

повторов и увеличении содержания конечного продукта окислительной деструкции ДНК - 8-гидроксигуанидина.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты диссертационного исследования были получены с использованием современных методов с применением высокоточного оборудования. Объем выборки и количество проведенных исследований позволили получить достоверные результаты при статической обработке данных.

Результаты работы были доложены на: Международной заочной научно-практической конференции «Наука и образование в XXI веке» (Тамбов, 2013); VIII Всероссийском диабетическом конгрессе с Международным участием «Сахарный диабет – пандемия XXI века» (Москва, 2018).

Личный вклад автора

Самостоятельно проведен анализ литературных источников по теме работы, сформулированы цель и задачи исследования, участие в выборе методов исследования. В исследование было набрано 158 пациентов, проведен анализ их историй болезни. Проведен осмотр и обследование пациентов, больные были разделены на группы. Проведено измерение активности антиоксидантных ферментов, интерпретация полученных данных, систематизация и статистическая обработка результатов. Подготовлены публикации по результатам выполненной работы.

Сведения о внедрении

Материалы исследования используются в практической работе I и II эндокринологических отделений ГКБ №67 им. Л.А. Ворохобова ДЗМ, эндокринологического отделения ФКУЗ ЦКБ МВД России, а также в качестве лекционного и практического материала на кафедре эндокринологии лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Объем и содержание работы

Диссертация изложена на 99 страницах, состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 216 источников (отечественных – 45, иностранных – 171). Работа иллюстрирована 23 рисунками и содержит 8 таблиц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Сахарный диабет – хроническое прогрессирующее заболевание, распространенность которого по всему миру растет с каждым годом [122].

Эпидемия сахарного диабета 2 типа способствовала проведению многочисленных исследований, касающихся изучению механизма развития этого заболевания.

В последние десятилетия основными патогенетическими звеньями сахарного диабета 2 типа считали генетически детерминированное снижение чувствительности периферических тканей к инсулину или инсулинорезистентность [2,7,65,109], и недостаточность инсулярного аппарата поджелудочной железы [2,13,68,216].

В современных условиях основными факторами риска, способствующими развитию инсулинорезистентности, являются малоподвижный образ жизни и ожирение [206].

На ранних стадиях нормальная толерантность к углеводам поддерживается за счет увеличения выработки инсулина β -клетками поджелудочной железы, что приводит к гиперинсулинемии [83,86,168].

Гиперинсулинемия в свою очередь усугубляет прогрессирование инсулинорезистентности за счет феномена «down regulation» [64], приводя к стимуляции секреции инсулина по закону «плюс-минус» взаимодействия. Эти два взаимоотягивающих механизма приводят к постпрандиальной гипергликемии, проявляющейся в нарушенной толерантности к глюкозе.

Недостаточность секреторных возможностей β -клеток для преодоления инсулинорезистентности приводит к манифестации СД2 (рис.1).

Резистентность периферических тканей (печеночной, мышечной и жировой) к действию инсулина является одним из ключевых патогенетических механизмов развития СД2: не происходит подавления выработки глюкозы печенью даже после приема пищи, снижается утилизация глюкозы мышечной и жировой тканью, что усугубляет гипергликемию [46,85,133].



Рисунок 1 – Роль инсулинорезистентности и недостаточности инсулярного аппарата β -клеток в манифестации сахарного диабета 2 типа

В этих условиях в жировой ткани происходит усиление липолиза в жировой ткани и повышение уровня свободных жирных кислот (СЖК) в плазме крови. Свободные жирные кислоты используются как альтернативный источник энергии, активируют глюконеогенез в печени, нарушают секрецию инсулина и повышают инсулинорезистентность [146,173]. Окисление СЖК ведет к увеличению содержания АФК, которые усиливают свободнорадикальные процессы [111,131].

Знания о патогенезе СД2 расширились за счет «бигормональной теории» природы заболевания, выявившей роль нарушения секреции глюкагона в развитии СД2 [98]. У пациентов СД2 не происходит подавления секреции глюкагона α -клетками поджелудочной железы после приема пищи, что усугубляет существующую гипергликемию [110]. Регуляция секреции инсулина и глюкагона также происходит за счет синтезируемых в клетках кишечника инкретинов [107]: глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) и глюкозозависимого инсулиотропного полипептида (ГИП). Было установлено, что ГПП-1 подавляет секрецию глюкагона в условиях гипергликемии [3], а ГИП стимулирует высвобождение глюкагона при гипогликемии и нормальном уровне глюкозы крови, но не влияет на выработку глюкагона при гипергликемии [112]. Нарушение секреции кишечных инкретинов у пациентов с СД2 дополнительно обуславливает базальную и постпрандиальную гипергликемию [97].

Также известно, что кишечные инкретины способны регулировать функцию α - и β -клеток поджелудочной железы через нервную систему [69,169]. У пациентов с СД2 в условиях гипергликемии отмечается дисбаланс нейротрансмиттеров [3,41,60].

Повышение уровня глюкозы крови вызывает увеличение экспрессии белка натрий-глюкозного-котранспортера 2 типа (НГЛТ-2, за счет которого осуществляется реабсорбция до 90% глюкозы из фильтруемой мочи в проксимальных канальцах), что усугубляет существующую гипергликемию [87,181].

Восемь вышеуказанных патогенетических механизмов, лежащих в основе развития СД2 в литературе получили название «зловещего октета» [85]. Однако в настоящее время изучение патогенеза СД2 продолжается, и установлена роль еще трех факторов в возникновении и прогрессировании СД2.

Была установлена достоверная связь между развитием СД2 и состоянием микрофлоры кишечника [10,51,195]. Патологическая микробиота вызывает развитие воспаления, снижение секреции ГПП-1, нарастание инсулинорезистентности [73,211]. Развивающееся системное воспаление при СД2 сопровождается «стрессом эндоплазматического ретикулума», заключающегося в нарушении распада поврежденных белков в клетке [209]. Дисфункция β -клеток поджелудочной железы при СД2 также приводит к уменьшению выработки амилина, что приводит к ускорению опорожнения желудка и увеличению абсорбции глюкозы в тонком кишечнике [155,208].

Современные представления о патофизиологических механизмах развития СД2 представлены на рисунке 2.

Основные механизмы развития диабета становятся более понятными, но смертность при СД2 остается на достаточно высоком уровне, причиной чего являются сердечно-сосудистые заболевания, развитие которых обусловлено прогрессированием диабетической микро- и макроангиопатии.

В многочисленных исследованиях была доказана ключевая роль гипергликемии в повреждении микро- и макрососудистого русла в генезе сосудистых осложнений [88,89,102,180,202].

Наряду с повышением уровня глюкозы крови важными патогенетическими механизмами в развитии сердечно-сосудистых заболеваний при сахарном диабете 2 типа являются: гиперинсулинемия, инсулинорезистентность, дислипидемия, эндотелиальная дисфункция, нарушение реологических свойств крови и гемостаза.

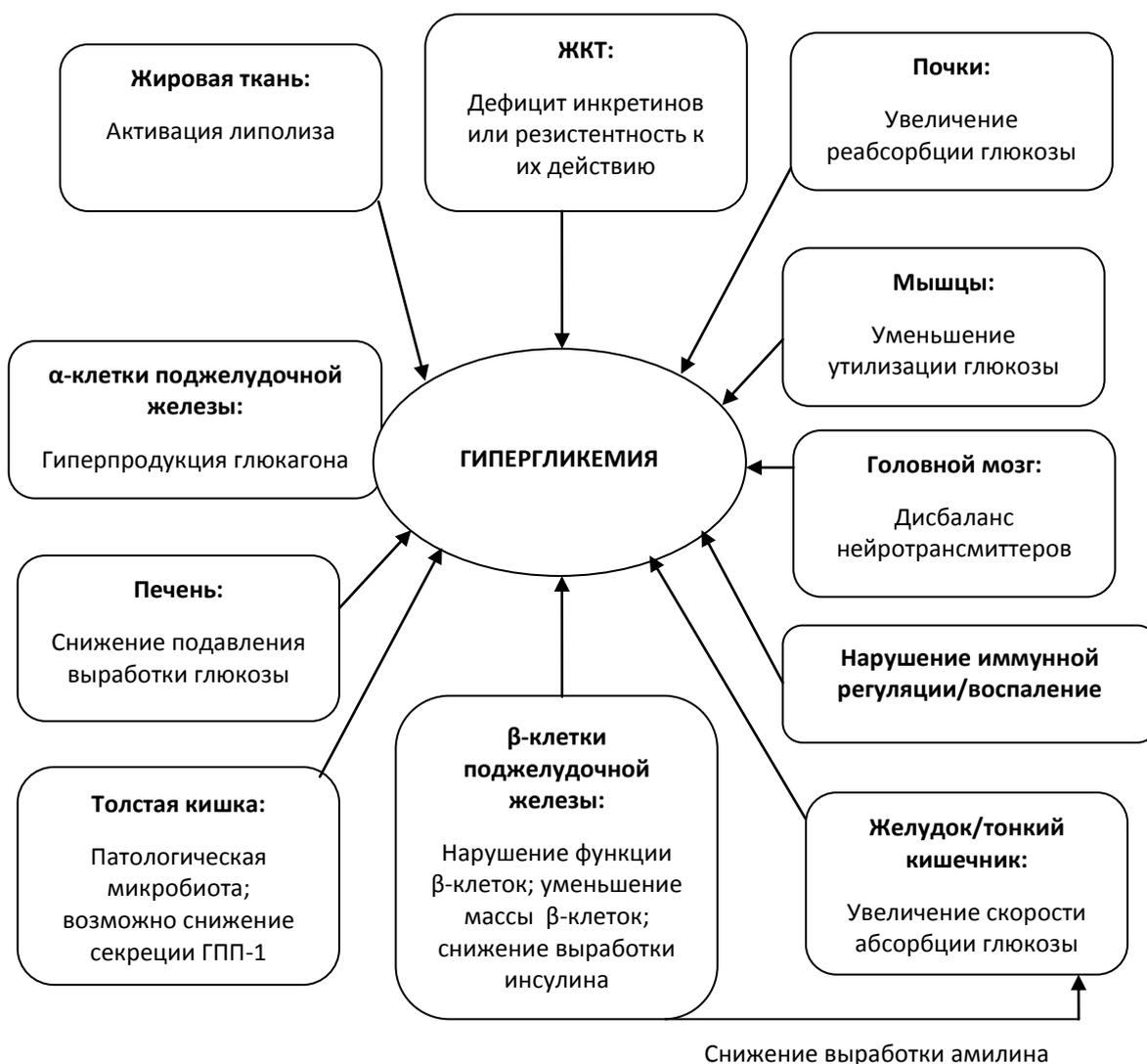


Рисунок 2 – Современные представления о патогенезе сахарного диабета 2 типа [3]

Нарушения в системе гемостаза у пациентов с СД2 проявляются в виде повышения уровня фибриногена, ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1) [16]. В условиях гипергликемии происходит активация свертывающей системы крови, появляется тенденция к тромбообразованию [103].

Под воздействием гипергликемии происходит отложение иммунных комплексов в базальной мембране, пролиферация клеток эндотелия, повышение проницаемости сосудистой стенки, снижение кровотока, что приводит к развитию эндотелиальной дисфункции, которая также

усугубляется за счет связывания оксида азота (NO), являющегося мощным вазодилататором [20,42,114,160].

По современным представлениям гипергликемия, инсулинорезистентность, нарушение секреции инсулина вызывают повреждения микро- и макрососудистого русла вследствие избыточной продукции свободных радикалов и/или их неадекватного удаления, т.е. в результате развития окислительного стресса [6,14,80,161].

Окислительный стресс – это процесс повреждения клеток организма в результате образования АФК. Впервые понятие окислительного стресса было введено Гельмутом Сисом (Helmut Sies) в 1985 году. В настоящее время окислительный стресс рассматривается в качестве одного из основных патогенетических механизмов развития ряда патологических состояний, таких как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца (ИБС), гипертоническая болезнь, нейро-дегенеративные заболевания, а также в качестве причины преждевременного старения организма [11,18,27,90,93,120,141,162,215].

Важным защитным механизмом, лежащим в основе неспецифического иммунитета, является образование свободных радикалов на нормальном уровне [179]. При этом повышение образования АФК запускает развитие многих патологических процессов, в т.ч. аутоиммунных, и в настоящее время рассматривается как одна из причин роста опухолевых клеток [18].

Негативное воздействие АФК на организм нивелируется за счет работы антиоксидантной системы, которая представляет собой совокупность защитных механизмов, обеспечивающих поддержание постоянства внутренней среды организма [54].

В состав антиоксидантной системы входит ферментативное и неферментативное звено (рис. 3) [18,36,81,186].



Рисунок 3 – Антиоксидантная система организма человека

Ферментативное звено антиоксидантной системы состоит из супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы [31].

СОД – ключевой фермент антиоксидантной системы. В организме человека существует 3 типа СОД: СОД 1 локализуется в цитоплазме клеток, СОД 2 – в митохондриях, СОД 3 является внеклеточной формой фермента. СОД обладает самой высокой каталитической активностью. Это индуцируемый фермент: при активации ПОЛ его синтез увеличивается [31].

Каталаза – антиоксидантный фермент, содержащийся в пероксисомах, является катализатором в реакции инактивации перекиси водорода путем ее разложения до молекулярного кислорода и воды.

Глутатионпероксидаза – фермент, содержащий в качестве кофермента селен, главным образом, содержится в клетках печени, эритроцитах, надпочечниках и дыхательных путях. ГП катализирует реакцию восстановления глутатионом перекиси водорода и органических гидропероксидов. Восстановление окисленного глутатиона происходит с помощью глутатионредуктазы.

Неферментативное звено представлено соединениями белковой и низкомолекулярной природы (витамины А, С и Е, убихинон, каротиноиды, глутатион, церулоплазмин, сывороточные пептиды и т.д.) [18,100,101,178].

Жирорастворимые витамины А и Е локализируются в биологических мембранах, в то время как водорастворимый витамин С обеспечивает защиту в межклеточной жидкости. В настоящее время антиоксидантное действие витамина С 100% доказано [54].

Следует отметить, что существование человека в условиях современной цивилизации неизбежно приводит к постоянному появлению стрессовых ситуаций и, в конечном счете, к возникновению патологических процессов в различных органах и тканях. Негативное влияние различных факторов окружающей среды (ультрафиолетовое и радиационное излучение, табачный дым, загрязнение воздуха выбросами промышленных предприятий и транспорта и др.) приводит к увеличению образования свободных радикалов как внутри, так и вне клетки [18,36,136].

В литературе различают внутри- и внеклеточные виды стресса [18,164,165,173,174,185]. Оксидативные и нитрозативный стресс являются внутриклеточными процессами, карбонильный стресс – внеклеточным.

При окислительном стрессе (оксидативном стрессе – англ. oxidative stress) происходит образование активных форм кислорода, которые представлены свободными радикалами и пероксидами [18,28,78,151,179].

Один из наименее реактивных представителей АФК супероксид может спонтанно или в присутствии переходных металлов превращаться в более агрессивные формы – например, гидроксильный радикал, который вызывая окисление липидов, белков, ДНК приводит к повреждению клеток [78,106].

Большинство АФК постоянно образуются в клетке, но их уровень настолько невелик в нормальных условиях, что их действие инактивируется за счет работы антиоксидатной системы [18,106].

Таким образом, АФК, образующиеся в качестве побочных продуктов метаболизма, не приводят к повреждению клеток. В то время как уровень

АФК, превышающий протективные возможности клеток, неизбежно приводит к серьезным нарушениям (например, истощению АТФ) и повреждению клетки [26,151,163]. При этом если внутреннее содержимое клетки успеет деградировать до нетоксичных продуктов распада, клетка погибает в результате апоптоза [142]. Если воздействие окислительного стресса значительно, развивается некроз, клеточное содержимое высвобождается в окружающую среду, что может привести к повреждению окружающих клеток и тканей.

В норме образование АФК происходит постоянно. АФК и другие прооксиданты участвуют в синтезе различных биологически активных веществ, обмене коллагена, регуляции проницаемости клеточных мембран, а также обеспечивают антибактериальное действие [18,36].

Другим видом внутриклеточного стресса является нитрозативный стресс. Он развивается за счет деструктивного воздействия активных форм азота, образующихся при реакции оксида азота с активными формами кислорода внутри клетки [163].

Образующиеся в этих реакциях пероксинитрит, нитрозатин и др. соединения являются сильными окислителями, которые способны вызвать повреждения различных молекул, в т.ч. ДНК и белков [129,163].

В настоящее время активно продолжается изучение механизмов развития карбонильного стресса, в отличие от других видов стресса являющегося внеклеточным процессом [18,32,71,183,194,207]. При этом происходит образование и накопление активных карбонильных соединений: альдегидов, кетонов, карбоновых кислот, углеводов и др. Наиболее распространены из них: малоновый диальдегид, глиоксаль, метилглиоксаль, 4-гидроксиноненаль и др. [18,38,71,194]. Строение молекул некоторых из этих соединений представлено на рисунке 4.

Основным результатом развития карбонильного стресса является гликирование белков [170,171,183]. Присоединение альдегида к белку, т.е. карбонилирование белка, приводит к изменению его рецепторных свойств:

происходит изменение активности ферментов, изменяется сродство рецепторов к лигандам за счет образования аддуктов альдегидов с рецепторными белками. Также альдегиды могут приводить к образованию поперечных сшивок между полипептидными цепями, приводя к агрегации белков и соответственно к потере их свойств, в т.ч. растворимости [82].

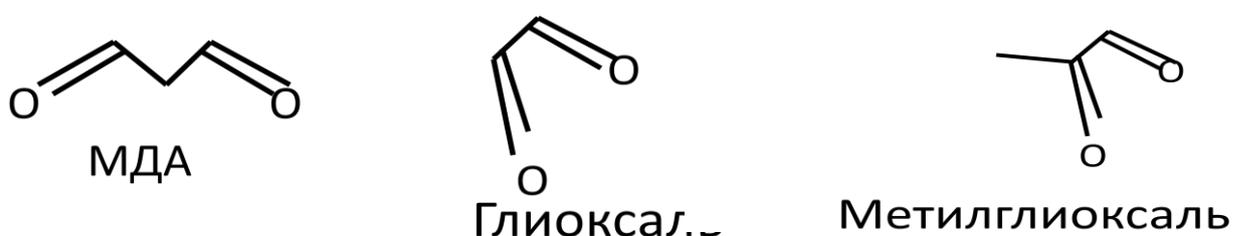


Рисунок 4 – Строение молекул основных активных карбонильных соединений

В связи с тем, что внеклеточные защитные системы не настолько эффективны, как внутриклеточные, воздействие карбонильного стресса на аминокислоты и белки внеклеточного матрикса значительно, в т.ч. оно затрагивает молекулы коллагена и эластина [18,79,156,189].

В норме в организме человека существует система катаболизма и утилизации альдегидов [36,59,82,158,197]. Однако, нарушение равновесия между процессами образования и деструкции продуктов карбонильного стресса приводит к проявлениям цитотоксического и генотоксического действия этих альдегидов.

Т.о., карбонильный стресс, являющийся внеклеточным процессом, наряду с основными внутриклеточными видами стресса, играет важную роль в повреждении клеток и тканей и развитии патологических процессов.

Следует отметить, что карбонильный стресс возникает гораздо раньше и развивается активнее и быстрее у людей с нарушениями углеводного обмена [146,210].

У пациентов с СД2 нарушения углеводного обмена часто сочетаются с нарушениями липидного обмена [25,40,45], что связано с распространением

ожирения, гиперинсулинемии, инсулинорезистентности у этих больных. При СД2 повышается уровень холестерина, преимущественно за счет холестерина, входящего в состав ЛПНП, который откладывается в атеросклеротических бляшках, тем самым способствуя прогрессированию атеросклероза [19,29,135].

В развитии атеросклероза принимают участие 2 класса липопротеидов – липопротеиды низкой плотности и липопротеиды высокой плотности (ЛПВП). ЛПНП – наиболее атерогенный класс липопротеидов крови. Они образуются из секретируемых печенью липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) в процессе липолиза [95]. В качестве белкового компонента ЛПНП содержит в своем составе аполипопротеин В-100 (апоВ-100), который обеспечивает стабильность структуры частицы и ее рецепторное связывание с клетками [192]. В противовес ЛПНП, ЛПВП обладают антиатерогенными свойствами.

Основной функцией ЛПНП является транспорт холестерина, главным образом, в виде эфира холестерина, из печени в периферические ткани, где происходит их рецепторный обратный захват.

В норме ЛПНП необходимы в организме, однако при патологии они приносят слишком много холестерина, что приводит к развитию атеросклероза.

ЛПВП в свою очередь обеспечивают обратный захват избыточного холестерина через протеинкиназа С-зависимый механизм, далее переносят этот холестерин в печень, где происходит его катаболизм с образованием желчных кислот [19].

Показано, что атерогенные ЛПНП являются липопротеидами, наиболее чувствительными к процессам свободнорадикального окисления [19,44,187,191], в то время как ЛПВП почти не подвержены окислительным модификациям, и кроме того могут защищать ЛПНП от процесса окисления и удалять метаболиты окисления из ЛПНП [175]. Содержание холестерина в ЛПНП находится в прямой зависимости с риском развития атеросклероза и

ИБС, а уровень холестерина в ЛПВП – в обратной [147]. Однако, почти в 30% случаев развитие ИБС происходит при уровне холестерина, близком к норме. [75,184].

Следовательно, уровень холестерина не может быть объективным критерием риска развития атеросклероза.

Существует несколько теорий механизмов развития атеросклероза. Взаимодействие апоВ-100 частицы ЛПНП с протеогликанами внеклеточного матрикса и их последующее накопление в сосудистой стенке приводят к изменениям структуры частиц [214], а в дальнейшем к их слиянию и образованию крупных липидных включений [48].

Также имеет место теория атерогенеза, заключающаяся в воспалительном или механическом повреждении стенки сосуда. При воспалении происходит увеличение проницаемости стенки сосудов для ЛПНП, что способствует отложению липидов в сосудистой стенке, адгезии тромбоцитов, лейкоцитов и макрофагов, последние из которых превращаются в «пенистые клетки» за счет перегрузки липидами [190].

Было показано, что активация свободнорадикального окисления ЛПНП в плазме крови приводит к их окислительной модификации, что значительно повышает их атерогенность, т.е. способность проникать в интиму сосудов и захватываться макрофагами с образованием «пенистых клеток», способствуя образованию зоны липоидоза – первичного предатерогенного повреждения стенки сосуда [19,24,32,63,117,204]. Окислительно модифицированные ЛПНП эффективнее захватываются макрофагами, чем нативные ЛПНП, т.к. этот процесс происходит с помощью «скевенджер-рецепторов» [146].

Таким образом, свободнорадикальная теория атерогенеза подтверждает важную роль перекисного окисления липидов (ПОЛ) в этиологии и патогенезе атеросклероза [8,15].

Основным субстратом ПОЛ являются полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), которые в присутствии кислорода могут легко окисляться до гидропероксидов [28,30,39,115,134,143,167]. Активные формы кислорода,

такие как супероксидный анион-радикал ($O_2^{\bullet-}$), пероксид водорода (H_2O_2), гипохлорная кислота ($HOCl$) и образующийся при распаде этих соединений гидроксил-радикал ($HO\bullet$), могут выступать в качестве первичных индукторов процессов ПОЛ [28,116,134].

Липогидропероксиды, являющиеся первичными продуктами окисления, достаточно лабильны, поэтому, при ПОЛ происходит накопление образующихся вторичных продуктов окисления [96,143,215], таких, как α,β -ненасыщенных альдегидов (4-гидроксиноненаль и др.) [127], малонового диальдегида [96,128], продуктов взаимодействия карбонильных соединений с аминоксодержащими соединениями – флуоресцирующих шиффовых оснований [127,143] и сложных соединений, образующихся при полимеризации окисленных липидов и белков [24,96,116].

Так как первичные и вторичные продукты окисления обладают выраженной цитотоксичностью [11,28,143,215], в организме существуют регуляторные механизмы, ограничивающие накопление этих токсических веществ – эту роль выполняют ферментативное и неферментативное звено антиоксидатной системы [18,123,134].

В конце концов, «пенистые клетки», перегруженные липидами, погибают в результате апоптоза, выделяя в окружающую среду различные биологически активные вещества (ИЛ-1 и др.), которые способствуют хемотаксису моноцитов, пролиферации макрофагов, а также миграции гладкомышечных клеток и их пролиферации [37]. Т.о., становится очевидной важная роль окЛНП в процессах атерогенеза.

На протяжении многих лет известно, что сахарный диабет является фактором риска развития и прогрессирования атеросклероза [8,15,35,137]. В основе этого лежит механизм, связанный с нарушениями углеводного обмена и развитием окислительного стресса при гипергликемии.

В первую очередь гипергликемия приводит к усилению утилизации глюкозы в периферических тканях [46,85]. За счет активизации аэробного гликолиза увеличивается концентрация конечного продукта гликолиза –

ацетилКоА, повышается скорость обменных процессов, а также образование АФК, что приводит к развитию окислительного стресса [137].

Было установлено, что окислительный стресс оказывает деструктивное действие на ДНК: у пациентов с СД2 с нарушениями углеводного обмена отмечено снижение длины теломерных повторов [105] и увеличение содержания 8-гидрокси-гуанина [104].

Теломеры представляют собой концевые участки линейной молекулы ДНК, состоящие из повторяющейся шестинуклеотидной последовательности TTAGGG [199]. Они защищают хромосомы от слияния и обеспечивают стабильность генома [57].

Известно, что с возрастом при каждом митотическом делении длина теломерной ДНК сокращается вследствие неполной репликации концевых участков [108,213]. Когда длина теломер становится угрожающе короткой, клетка вступает в апоптоз и погибает [150,188,201].

Установлено, что длина теломер и скорость их укорочения – это генетически детерминированные показатели, однако на них оказывают влияние и внешние факторы [58].

В проведенных ранее исследованиях было установлено, что для пациентов с СД2 и нарушенной толерантностью к глюкозе характерно ускоренное укорочение теломер [56,138,144,153,198,200,212].

В настоящее время свободнорадикальная теория старения является общепринятой, а укорочение длины теломерных повторов в хромосомах форменных элементов крови рассматривается как непосредственное проявление старения клеток и организма [113].

Также установлено, что процессы биологического старения ускоряются при наличии сердечно-сосудистых заболеваний и/или увеличении риска сердечно-сосудистой смерти [12,126].

Показано, что одним из факторов, вызывающих укорочение теломеров является окислительный стресс, сопровождающийся генерированием большого количества АФК [49,50,77,205]. Интенсификация

свободнорадикальных реакций в процессе окислительного стресса приводит к окислительной деструкции ДНК, причем в большей степени теломерной, нежели геномной, и накоплению конечного продукта распада нуклеиновых кислот – 8-гидрокси-гуанина [154].

Образующиеся свободные радикалы при окислительном стрессе приводят к разрушению ДНК и активации PARP – поли(АДФ-рибоза)-полимеразы, которая ингибирует глицеральдегидфосфат дегидрогеназу.

Таким образом, вследствие инактивации одного из ключевых ферментов гликолиза, он блокируется на стадии триозофосфатов, а глюкоза окисляется по 4 альтернативным путям [67]: полиоловому пути, пути активации протеинкиназы С через стадию диацилглицерола, пути повышению образования конечных продуктов неферментативного гликирования и образования глюкозаминов (рис. 5).

Активация полиолового пути происходит в 2 этапа [24]. На первом этапе происходит восстановление глюкозы до сорбитола с помощью фермента альдозоредуктазы. При этом в качестве кофактора выступает никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН).

Увеличение соотношения НАДФ⁺ к восстановленной форме НАДФН снижает активность глутатионредуктазы, одного из ключевых ферментов антиоксидантной системы, приводя к подавлению восстановления глутатиона [24,67,120,145].

На втором этапе происходит окисление сорбитола до фруктозы с помощью фермента сорбитол дегидрогеназы, что сопровождается восстановлением никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺). Таким образом, активация полиолового пути окисления глюкозы приводит к развитию окислительного стресса.

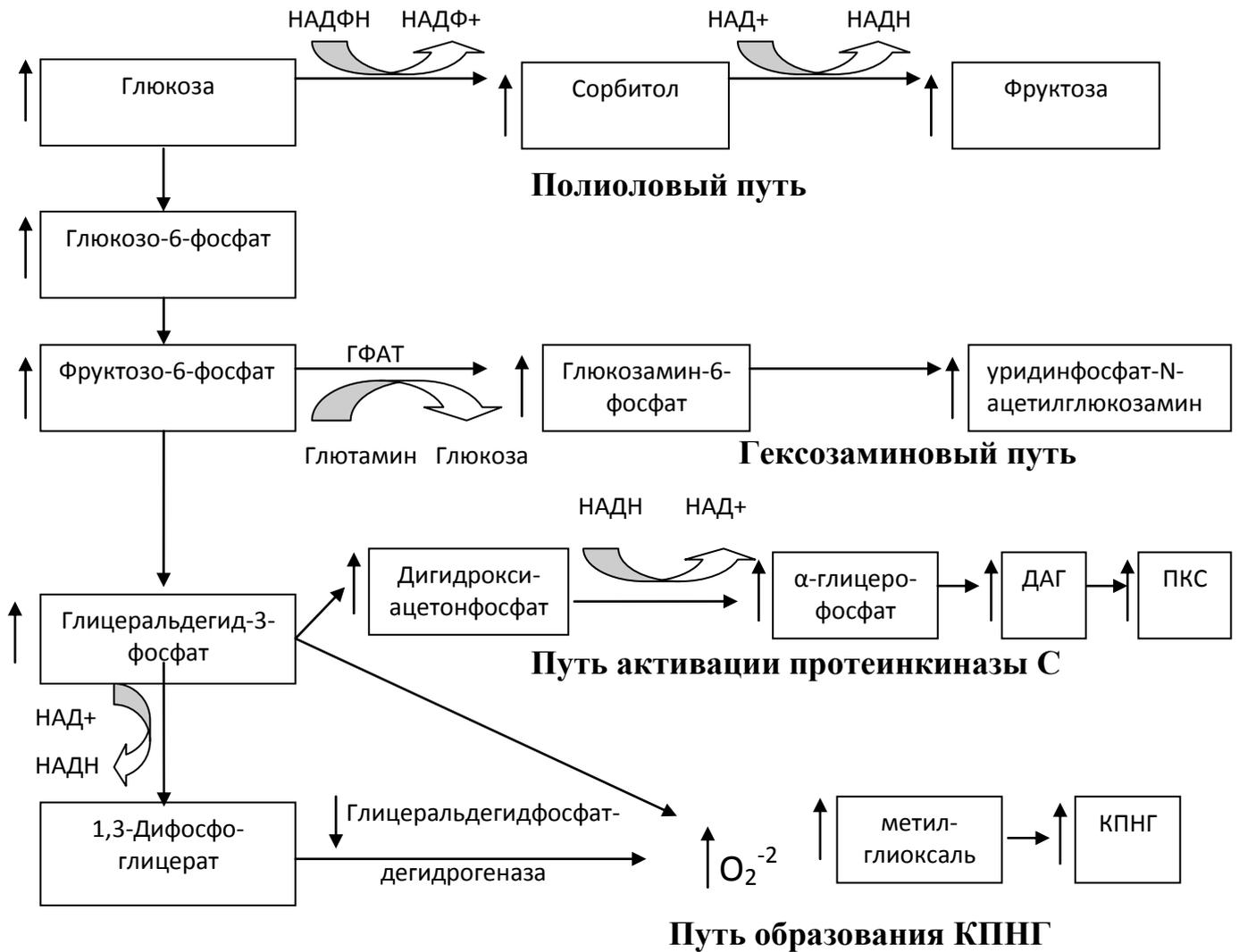


Рисунок 5 – Альтернативные пути окисления глюкозы [67]

Гексозаминовый путь окисления глюкозы также происходит в 2 этапа [24]. На первом этапе фруктозо-6-фосфат превращается в глюкозамин-6-фосфат. Реакция катализируется ферментом фруктозо-6-фосфат амидотрансфераза. На втором этапе происходит образование конечного продукта гексозаминового пути – уридинфосфат-N-ацетилглюкозамина из глюкозамин-6-фосфата. Уридинфосфат-N-ацетилглюкозамин может принимать участие в O-гликировании белков по остаткам серина и треонина [67].

Накопление интермедиатов гликолиза – триозофосфатов приводит к их модификации с образованием α -глицерофосфата, являющегося

предшественником диацилглицерола (ДАГ), повышающего активность протеинкиназы С (ПКС). Протеинкиназа С – фермент, осуществляющий различные сигнальные передачи в клетках, в т.ч. ПКС способствует снижению образования мощного вазодилатора NO, экспрессии тканевых факторов роста, приводящей к пролиферации клеток стенок сосудов, увеличению прокоагулянтной активности клеток эндотелия [67,120,130,182].

Таким образом, усугубляется эндотелиальная дисфункция. Также избыток тризофосфатов приводит к образованию α -оксальдегидов (метилглиоксаля, глиоксаля и др.) [32,94,99,149,207].

Гипергликемия также может приводить к усилению процессов неферментативного гликозилирования белков, при котором также образуются низкомолекулярные дикарбонилы [157]. Из ациклической формы глюкозы может обратимо образовываться шиффово основание. В свою очередь основание Шиффа может быть субстратом для образования продуктов Амадори, которые свою очередь могут превращаться в конечные продукты неферментативного гликирования (КПНГ) [5,43,66,67,120,132,157], а также низкомолекулярные дикарбонилы [32,62].

Гомолог МДА глиоксаль и структурный изомер МДА метилглиоксаль весьма токсичные продукты и наряду с МДА могут вызывать повреждение тканей [119].

Т.о., у пациентов с СД2 резко возрастает неферментативное гликозилирование белков плазмы крови [17,66,70,132,157], причем в первую очередь происходит модификация апоВ-100 частицы ЛПНП. Было показано, что глиоксаль-модифицированные ЛПНП поглощаются сквенджер-рецепторами макрофагов даже более интенсивно, чем МДА-модифицированные ЛПНП [50,146], что приводит к образованию «пенистых клеток» и повреждению стенок сосудов.

Таким образом, окислительный стресс при атеросклерозе сопровождается образованием большого количества вторичных продуктов окисления (МДА, 4-гидроксиноненаль и др.) и модификацией ЛПНП. У

пациентов с СД2 в процессе автоокисления глюкозы низкомолекулярные диальдегиды (глиоксаль, метилглиоксаль и др.) вызывают гликирование белков с образованием КПНГ, которые в свою очередь сами могут быть источниками АФК [33]. Схема путей образования альдегидных интермедиатов в процессе автоокисления глюкозы представлена на рисунке 6.

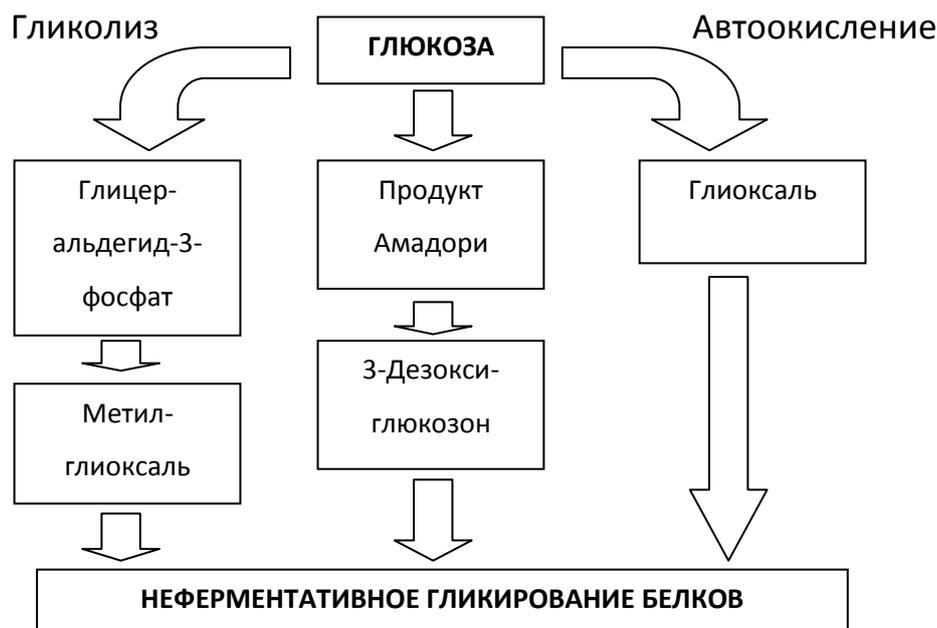


Рисунок 6 – Схема путей образования альдегидных интермедиатов в процессе автоокисления глюкозы

Образовавшиеся АФК приводят к окислению ЛПНП и их последующей атерогенной модификации (рис. 7) [24,33].

Таким образом, для пациентов СД2 с нарушениями углеводного обмена характерно более быстрое прогрессирование атеросклероза за счет накопления продуктов карбонильной природы и соответственно развития карбонильного стресса (рис. 8) [24].

Следовательно, данные, приведенные в литобзоре, не позволяют сделать однозначный вывод о наличии окислительного стресса при сахарном диабете 2 типа, поскольку полученные в предшествующих исследованиях данные преимущественно базировались на определении МДА. Тем не менее, используемый в этих работах метод не является специфичным (определяется не только МДА, а сумма продуктов, реагирующих с 2-ТБК).

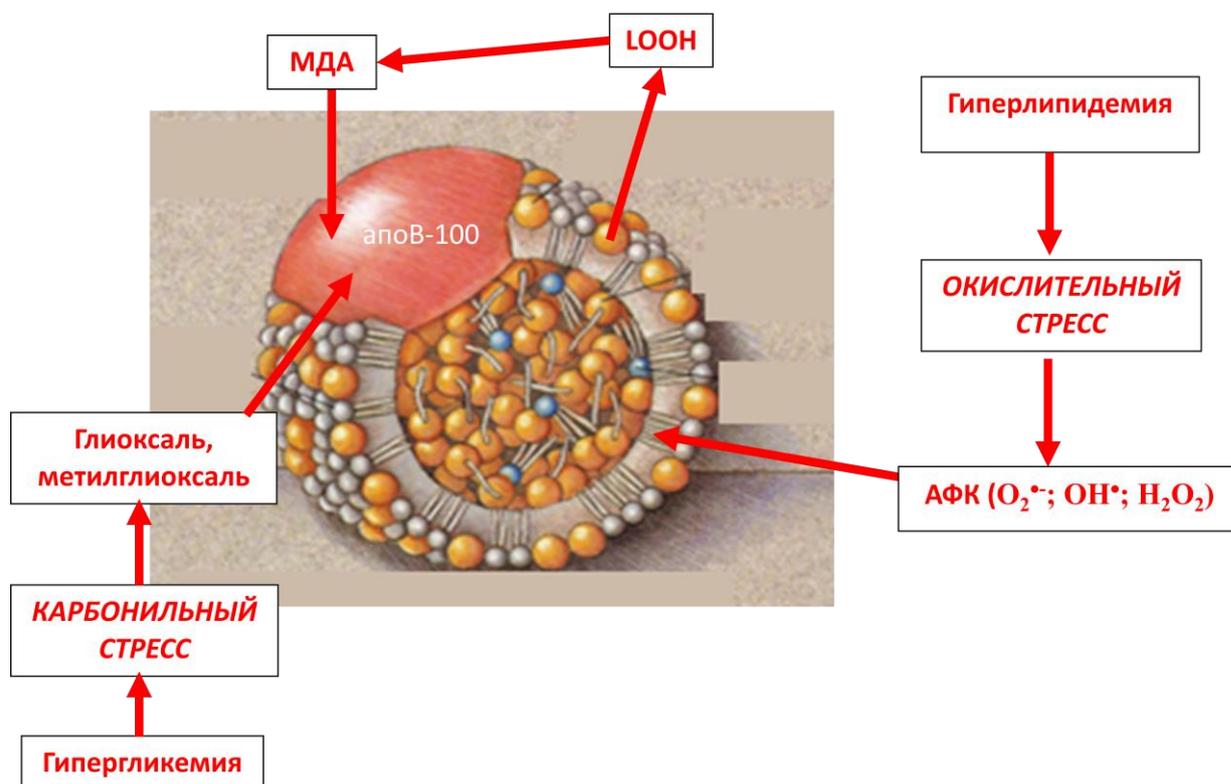


Рисунок 7 – Окислительная модификация ЛНП при окислительном и карбонильном стрессе

Следует отметить также, что МДА – это не первичный продукт свободнорадикального окисления, а вторичный минорный продукт окислительной деструкции органических гидропероксидов, что затрудняет использование этого теста для выявления окислительного стресса (стехиометрия между уровнем гидропероксидов и МДА отсутствует, значительная часть МДА быстро расходуется на cross-links реакции с природными аминосоединениями).

Таким образом, давно назрела необходимость проведения комплексного исследования, направленного на выяснение механизмов окислительной модификации белков и окислительной деструкции ДНК при сахарном диабете, что позволило бы получить корректные данные об участии окислительных процессов в патогенезе сахарного диабета 2 типа.

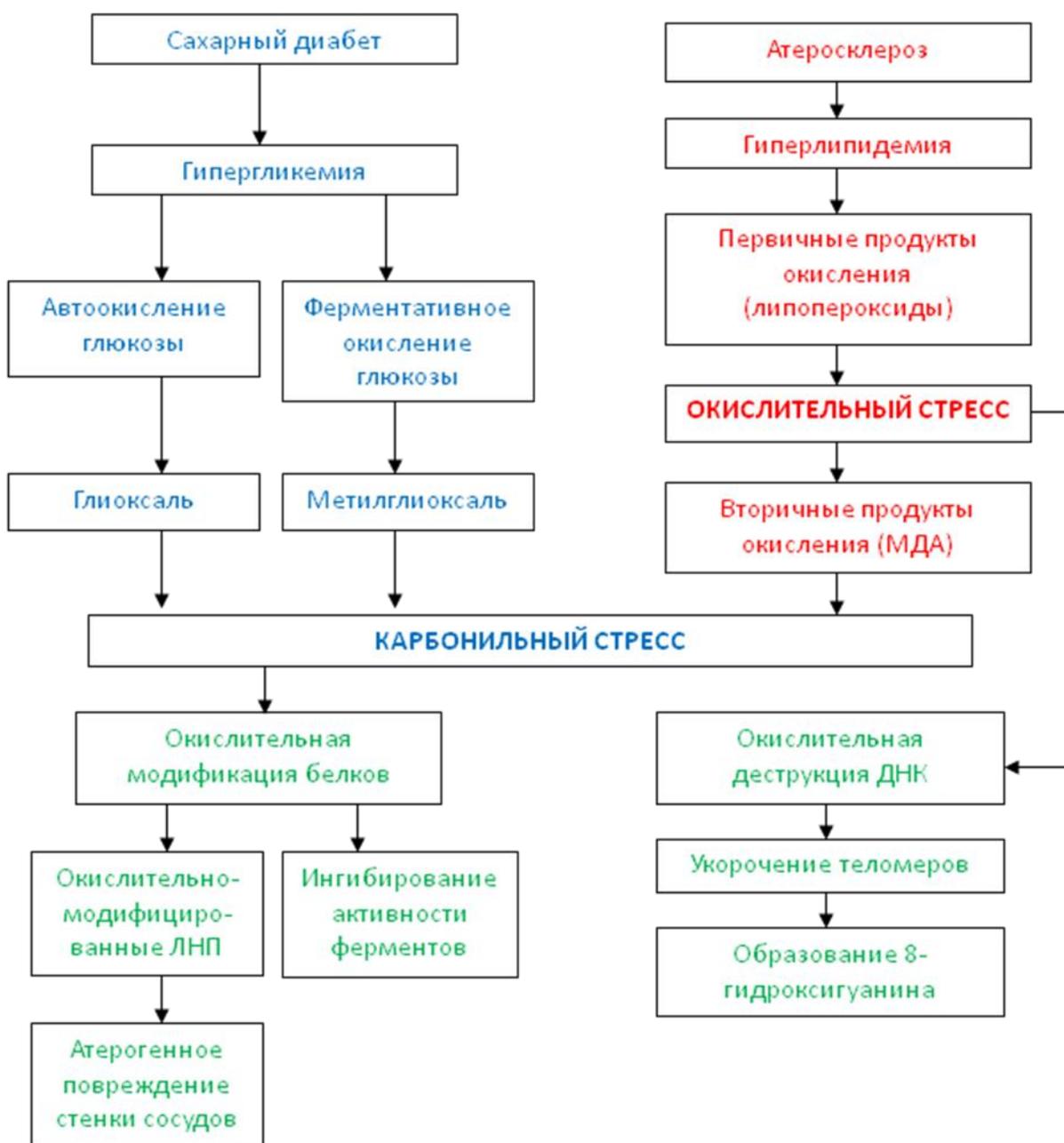


Рисунок 8 – Патогенетические последствия окислительного и карбонильного стресса

Кроме того, до начала настоящей работы не было исследовано действие природных дикарбониллов, образующихся при окислительном метаболизме глюкозы (глиоксаль, метилглиоксаль) на активность ключевых антиоксидантных ферментов, таких как СОД.

Решению этих теоретически и практически важных вопросов и посвящена настоящая диссертация.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Базой для проведения настоящих исследований послужили кафедра эндокринологии лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России на базе ГБУЗ ГКБ № 67 имени Л.А. Ворохобова ДЗМ, а также в Отдел биохимии свободнорадикальных процессов НИИ кардиологии имени А.Л. Мясникова ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава РФ.

2.1. Характеристика обследованных пациентов

Всего в исследовании принимали участие 158 пациентов. Из них: 66 пациентов с сахарным диабетом 2 типа (у 41 больного диагноз установлен впервые и 25 пациентов с длительным анамнезом заболевания), и 92 пациента составили группу контроля для различных блоков исследования: 67 практически здоровых людей, не имеющих нарушений углеводного и липидного обменов без артериальной гипертензии и ИБС; и 25 пациентов с ИБС и гипертонической болезнью, но без установленного диагноза сахарного диабета 2 типа или каких-либо других нарушений углеводного обмена (табл. 1).

Таблица 1 – Группы обследованных пациентов (n=158)

Пациенты с СД2 с нарушениями углеводного обмена, $HbA_{1c} \geq 10\%$ (n=66)		Пациенты с ИБС и гипертонической болезнью без нарушений углеводного обмена (n=25)	Практически здоровые люди без нарушений углеводного и липидного обмена (n=67)
Пациенты с впервые выявленным СД2 (n=41)	Пациенты с длительным анамнезом СД2 (n=25)		

В первой части нашего исследования мы изучали параметры окислительного/карбонильного стресса у практически здоровых людей без нарушений углеводного и липидного обмена и пациентов СД2 с выраженными нарушениями углеводного обмена.

В основную группу были включены 16 пациентов с впервые выявленным СД2 с декомпенсацией углеводного обмена (9 мужчин/7 женщин; возраст 55,4 лет \pm 1,4; индекс массы тела (ИМТ) 30,7 кг/м² \pm 1,2), не получавших ранее сахароснижающую терапию, и высоким уровнем гликированного гемоглобина (HbA_{1c}=10,7% \pm 1,4) и имеющие на момент диагностики заболевания макрососудистые осложнения. У всех пациентов в анамнезе ИБС и гипертоническая болезнь, а также выраженные нарушения липидного обмена (табл. 2).

Критерии включения в основную группу

1. Мужчины и женщины в возрасте от 40 до 70 лет.
2. Диагноз сахарного диабета 2 типа установлен впервые при поступлении в стационар в соответствии с критериями ВОЗ (1999-2013), рекомендованными Алгоритмами специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом 2017 г.
3. Уровень HbA_{1c} на момент включения в исследование \geq 10%.
4. Наличие макрососудистых осложнений (установленный диагноз ИБС, гипертонической болезни или дислипидемии в соответствии с рекомендациями Российского Кардиологического Общества).
5. Подписанное и датированное информированное согласие.

Критерии исключения из основной группы

1. Поражение почек (снижение СКФ MDRD < 45 мл/мин/1,73 м²).
2. Выраженное нарушение функции печени (уровень АЛТ и АСТ более чем в 2 раза, превышающий верхнюю границу нормы).

3. Перенесенный инфаркт миокарда или ОНМК менее чем за 6 месяцев до включения в исследование.
4. Злоупотребление алкоголем (в пересчете на чистый спирт – более 40 мл ежедневно).
5. Психические заболевания.
6. Онкологические заболевания.

Пациентам из основной группы, давшим согласие на участие в исследовании, были объяснены его цели и задачи. До включения в исследование пациенты получили необходимые знания по диете, режиму питания и физических нагрузок, навыкам самоконтроля уровня глюкозы крови, сведения об острых и отдаленных осложнениях сахарного диабета.

Контрольную группу составили 67 практически здоровых людей (30 мужчин/37 женщин; 53,8 лет \pm 3,7) без признаков ИБС и гипертонической болезни, а также без каких-либо клинических проявлений СД2 (HbA_{1c}=5,5% \pm 0,1). У пациентов не было отмечено нарушение липидного обмена (табл. 2).

Критерии включения в контрольную группу

1. Мужчины и женщины в возрасте от 40 до 70 лет.
2. Нормальный углеводный обмен в соответствии с критериями ВОЗ (1999-2013), рекомендованными Алгоритмами специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом 2017 г.
3. Уровень HbA_{1c} на момент включения в исследование <6,0%.
4. Подписанное и датированное информированное согласие.

Критерии исключения из контрольной группы

1. Поражение почек (снижение СКФ MDRD < 45 мл/мин/1,73 м²).
2. Выраженное нарушение функции печени (уровень АЛТ и АСТ более чем в 2 раза, превышающий верхнюю границу нормы).

3. Перенесенный инфаркт миокарда или ОНМК менее чем за 6 месяцев до включения в исследование.
4. Злоупотребление алкоголем (в пересчете на чистый спирт – более 40 мл ежедневно).
5. Психические заболевания.
6. Онкологические заболевания.

Пациентам из контрольной группы, давшим согласие на участие в исследовании, были объяснены его цели и задачи.

Группы пациентов, сравнение которых мы проводили в первой части исследования, были сопоставимы по полу и возрасту.

Таблица 2 – Характеристика пациентов первой части исследования

Показатель	Пациенты из основной группы	Пациенты из контрольной группы
	9 мужчин/7 женщин	30 мужчин/37 женщин
Возраст, лет	55,4±1,4	53,8±3,7
Индекс массы тела (ИМТ), кг/м ²	30,7±1,2	28,5±1,1
НbA _{1c} , %	10,7±1,4	5,5±0,1
Общий ХС, ммоль/л	5,81 (4,78-6,86)	4,21 (4,78-6,86)
ХС-ЛНП, ммоль/л	3,72 (2,68-4,37)	2,32 (2,68-4,37)
ХС-ЛВП, ммоль/л	1,00 (0,85-1,12)	1,07 (0,85-1,12)
Коэффициент атерогенности, %	4,78 (4,19-5,44)	2,93 (4,19-5,44)
Гипертоническая болезнь	100%	0%
ИБС	100%	0%

На втором этапе нашей работы мы расширили количество параметров окислительного и карбонильного стресса, при этом проводилось сравнение

группы больных с ИБС без нарушений углеводного обмена с группой больных СД2 с декомпенсацией углеводного обмена.

Для этого в исследование были включены 50 пациентов СД2 с выраженными нарушениями углеводного обмена ($HbA_{1c}=10,7\% \pm 0,3$), из которых 25 пациентам диагноз СД2 был установлен впервые и 25 больных с анамнезом СД2 от 5 до 15 лет (в среднем 10 лет).

Пациенты из первой группы с впервые выявленным СД2 (14 мужчин/11 женщин; возраст $54,1 \text{ лет} \pm 2,4$; индекс массы тела $31,6 \text{ кг/м}^2 \pm 1,25$), имеющие высокий уровень HbA_{1c} ($11,4\% \pm 0,45$), ранее не получали сахароснижающую терапию. У всех пациентов были диагностированы макрососудистые осложнения. У 64% пациентов из этой группы в анамнезе ИБС и у 72% – гипертоническая болезнь. Все пациенты имели выраженные нарушения липидного обмена. См. табл. 3.

Критерии включения в группу пациентов с впервые выявленным СД2

1. Мужчины и женщины в возрасте от 40 до 70 лет;
2. Диагноз СД2 установлен впервые при поступлении в стационар в соответствии с критериями ВОЗ (1999-2013), рекомендованными Алгоритмами специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом 2017 г.;
3. Уровень HbA_{1c} на момент включения в исследование $\geq 10\%$;
4. Наличие макрососудистых осложнений (установленный диагноз ИБС, гипертонической болезни или дислипидемии в соответствии с рекомендациями Российского Кардиологического Общества);
5. Подписанное и датированное информированное согласие.

Критерии исключения из исследования пациентов с впервые выявленным СД2

1. Поражение почек (снижение СКФ MDRD $< 45 \text{ мл/мин/1,73 м}^2$).

2. Выраженное нарушение функции печени (уровень АЛТ и АСТ более чем в 2 раза, превышающий верхнюю границу нормы).
3. Перенесенный инфаркт миокарда или ОНМК менее чем за 6 месяцев до включения в исследование.
4. Злоупотребление алкоголем (в пересчете на чистый спирт – более 40 мл ежедневно).
5. Психические заболевания.
6. Онкологические заболевания.

Пациентам с впервые выявленным СД₂, давшим согласие на участие в исследовании, были объяснены его цели и задачи. До включения в исследование пациенты получили необходимые знания по диете, режиму питания и физических нагрузок, навыкам самоконтроля уровня глюкозы крови, сведения об острых и отдаленных осложнениях сахарного диабета.

При поступлении в стационар в связи с декомпенсацией углеводного обмена пациентам с СД₂ назначали инсулинотерапию в интенсифицированном режиме. В дальнейшем проводился перевод на различные схемы сахароснижающей терапии. 19 пациентам были назначены ПССП: монотерапия метформином (1 пациент), монотерапия препаратами СМ (2 пациента), комбинация метформина и препаратов СМ (12 пациентов); комбинация препаратов СМ и ингибиторов НГЛТ-2 (1 пациент) и комбинация препаратов СМ, метформина и ингибиторов НГЛТ-2 (3 пациента). Двум пациентам было рекомендовано проведение инсулинотерапии в базис-болюсном режиме в амбулаторных условиях. У 4 пациентов компенсация углеводного обмена была достигнута на комбинированной сахароснижающей терапии: препараты СМ + метформин + инсулин (2 пациента); ингибитор ДПП-4 + метформин + инсулин (2 пациента) и ингибитор НГЛТ-2 + инсулин (1 пациент).

Пациенты с анамнезом СД₂ в среднем 10 лет (от 5 до 15 лет) (12 мужчин/13 женщин; возраст 68,4 лет ± 2,0; ИМТ 32,4 кг/м² ± 0,79), несмотря

на получаемую сахароснижающую терапию, имели высокий уровень HbA_{1c} (10,1%±0,34). У всех пациентов были диагностированы макрососудистые осложнения. 88% больных страдали ИБС, у 96% выявлена гипертоническая болезнь. Также у всех пациентов были обнаружены нарушения липидного спектра (табл. 3).

Критерии включения в основную группу пациентов с СД2 с анамнезом заболевания в среднем 10 лет

1. Мужчины и женщины в возрасте от 40 до 70 лет.
2. Диагноз СД2, установленный в соответствии с критериями ВОЗ (1999-2013), рекомендованными Алгоритмами специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом 2017 г.
3. Анамнез заболевания от 5 до 15 лет.
4. Уровень HbA_{1c} на момент включения в исследование $\geq 10\%$.
5. Наличие макрососудистых осложнений (установленный диагноз ИБС, гипертонической болезни или дислипидемии в соответствии с рекомендациями Российского Кардиологического Общества).
6. Подписанное и датированное информированное согласие.

Критерии исключения из группы пациентов с СД2 с анамнезом заболевания в среднем 10 лет

1. Поражение почек (снижение СКФ MDRD < 45 мл/мин/1,73 м²).
2. Выраженное нарушение функции печени (уровень АЛТ и АСТ более чем в 2 раза, превышающий верхнюю границу нормы).
3. Перенесенный инфаркт миокарда или ОНМК менее чем за 6 месяцев до включения в исследование.
4. Злоупотребление алкоголем (в пересчете на чистый спирт – более 40 мл ежедневно).
5. Психические заболевания.
6. Онкологические заболевания.

Пациентам с СД2 с анамнезом заболевания в среднем 10 лет, давшим согласие на участие в исследовании, были объяснены его цели и задачи. До включения в исследование пациенты получили необходимые знания по диете, режиму питания и физических нагрузок, навыкам самоконтроля уровня глюкозы крови, сведения об острых и отдаленных осложнениях сахарного диабета.

Независимо от проводимой до госпитализации терапии, все пациенты поступили с декомпенсацией углеводного обмена. В связи с этим им была назначена инсулинотерапия в интенсифицированном режиме. При снижении уровня гликемии пациентов переводили на различные схемы сахароснижающей терапии. 6 пациентам было рекомендовано продолжить проведение инсулинотерапии в базис-болюсном режиме. 12 пациентам был назначен прием ПССП: комбинация метформина и препаратов СМ (9 пациентов), комбинация метформина, препаратов СМ и ингибиторов ДПП-4 (1 пациент), комбинация метформина, препаратов СМ и ингибиторов НГЛТ-2 (1 пациент) и комбинация метформина, ингибиторов ДПП-4 и ингибиторов НГЛТ-2 (1 пациент).

Группу сравнения для этого блока исследования составили 25 пациентов (16 мужчин/9 женщин; 62 лет \pm 1,8) без каких-либо клинических проявлений СД2 ($HbA_{1c}=4,6\% \pm 0,05$). Все пациенты из этой группы страдали гипертонической болезнью и ИБС (табл. 3).

Критерии включения в группу сравнения

1. Мужчины и женщины в возрасте от 40 до 70 лет.
2. Нормальный углеводный обмен в соответствии с критериями ВОЗ (1999-2013), рекомендованными Алгоритмами специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом 2017 г.
3. Уровень HbA_{1c} на момент включения в исследование $<6,0\%$.

4. Установленный диагноз ИБС, гипертонической болезни или дислипидемии в соответствии с рекомендациями Российского Кардиологического Общества.
5. Подписанное и датированное информированное согласие.

Критерии исключения из исследования пациентов из группы сравнения

1. Поражение почек (снижение СКФ MDRD < 45 мл/мин/1,73 м²).
2. Выраженное нарушение функции печени (уровень АЛТ и АСТ более чем в 2 раза, превышающий верхнюю границу нормы).
3. Перенесенный инфаркт миокарда или ОНМК менее чем за 6 месяцев до включения в исследование.
4. Злоупотребление алкоголем (в пересчете на чистый спирт – более 40 мл ежедневно).
5. Психические заболевания.
6. Онкологические заболевания.

Всем пациентам из группы сравнения, давшим согласие на участие в исследовании, были объяснены его цели и задачи. Все группы пациентов были сопоставимы по полу и возрасту.

В третьей части нашей работы мы исследовали наиболее информативные параметры окислительного и карбонильного стресса у пациентов СД2 с нарушениями углеводного обмена и возможность их применения для оценки эффективности сахароснижающей терапии.

Для этого была набрана группа из 16 **пациентов с впервые выявленным СД2** с декомпенсацией углеводного обмена (9 мужчин/7 женщин; возраст 55,4 лет ± 1,4; ИМТ 30,7 кг/м² ± 1,2), не получавших ранее сахароснижающую терапию, с высоким уровнем HbA_{1c} (HbA_{1c} = 10,7% ± 1,4) и имеющие на момент диагностики заболевания макрососудистые осложнения. У всех пациентов в анамнезе ИБС и гипертоническая болезнь, а также выраженные нарушения липидного обмена (табл. 2).

Таблица 3 – Характеристика пациентов второй части исследования

Показатель	Пациенты с впервые выявленным СД2 (n=25)	Пациенты с СД2 с анамнезом заболевания в среднем 10 лет (n=25)	Пациенты из группы сравнения (n=25)
	14 мужчин/11 женщин	12 мужчин/13 женщин	16 мужчин/9 женщин
Возраст, лет	54,1±2,4	68,4±2,0	62±1,8
Индекс массы тела (ИМТ), кг/м ²	31,6±1,25	32,4±0,79	27,8±0,92
HbA _{1c} , %	11,4±0,45	10,1±0,34	4,6±0,05
Общий ХС, ммоль/л	5,36±0,23	5,26±0,34	5,07±0,27
ХС-ЛНП, ммоль/л	3,10±0,22	3,57±0,24	2,75±0,23
ХС-ЛВП, ммоль/л	1,10±0,12	1,20±0,07	1,27±0,07
Триглицериды, ммоль/л	2,78±0,31	2,38±0,39	1,75±0,17
Гипертоническая болезнь	72%	96%	100%
ИБС	64%	88%	100%

Критерии включения в исследование

1. Мужчины и женщины в возрасте от 40 до 70 лет.
2. Диагноз СД2 установлен впервые при поступлении в стационар в соответствии с критериями ВОЗ (1999-2013), рекомендованными Алгоритмами специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом 2017 г.
3. Уровень HbA_{1c} на момент включения в исследование $\geq 10\%$.
4. Наличие макрососудистых осложнений (установленный диагноз ИБС, гипертонической болезни или дислипидемии в соответствии с рекомендациями Российского Кардиологического Общества).
5. Подписанное и датированное информированное согласие.

Критерии исключения из исследования

1. Поражение почек (снижение СКФ MDRD < 45 мл/мин/1,73 м²).
2. Выраженное нарушение функции печени (уровень АЛТ и АСТ более чем в 2 раза, превышающий верхнюю границу нормы).
3. Перенесенный инфаркт миокарда или ОНМК менее чем за 6 месяцев до включения в исследование.
4. Злоупотребление алкоголем (в пересчете на чистый спирт – более 40 мл ежедневно).
5. Психические заболевания.
6. Онкологические заболевания.

Пациентам, давшим согласие на участие в исследовании, были объяснены его цели и задачи. До включения в исследование пациенты получили необходимые знания по диете, режиму питания и физических нагрузок, навыкам самоконтроля уровня глюкозы крови, сведения об острых и отдаленных осложнениях сахарного диабета.

Общая продолжительность исследования составила 3 месяца, в ходе которого осуществлялся подбор сахароснижающей терапии пациентам с впервые выявленным СД2. На скрининговом визите и через 3 месяца

проводили опрос, физикальный осмотр, определяли параметры углеводного, липидного обмена и окислительного стресса (рис. 9).

Исследования крови

3 месяца подбора

сахароснижающей терапии

(n=16)

Исследования крови



Рисунок 9 – Схема исследования

Таблица 4 – Алгоритм индивидуализированного выбора целей терапии по HbA_{1c}*

	Возраст		
	Молодой	Средний	Пожилой и/или ОПЖ < 5 лет
Нет тяжелых макрососудистых осложнений и/или риска тяжелой гипогликемии **	< 6,5%	< 7,0%	< 7,5%
Есть тяжелые макрососудистые осложнения и/или риск тяжелой гипогликемии	< 7,0%	< 7,5%	< 8,0%

Примечания: ОПЖ – ожидаемая продолжительность жизни

*- Данные целевые значения не относятся к детям, подросткам и беременным женщинам

**.- Основными критериями риска тяжелой гипогликемии являются: тяжелая гипогликемия в анамнезе, бессимптомная гипогликемия, большая продолжительность СД, ХБП С3 и выше, деменция

Терапевтические цели были определены в соответствии с Алгоритмами индивидуализированного выбора целей терапии по HbA_{1c} (табл. 4) [1].

В связи с декомпенсацией углеводного обмена на момент поступления в стационар (HbA_{1c} ≥ 10%) всем пациентам с впервые выявленным СД2 проводилась инсулинотерапия в интенсифицированном режиме. В последующем при снижении уровня гликемии пациенты были переведены на различные схемы сахароснижающей терапии. Четырем пациентам была назначена монотерапия метформином. Девяти пациентам был рекомендован прием комбинации препаратов СМ и метформина. У трех пациентов удалось достичь компенсации углеводного обмена за 3 месяца на комбинации инсулинотерапии в базис-болюсном режиме и метформина. Следует отметить, что всем пациентам был рекомендован прием препаратов из группы бигуанидов (Метформин 2000 мг/сутки) (рис. 10).

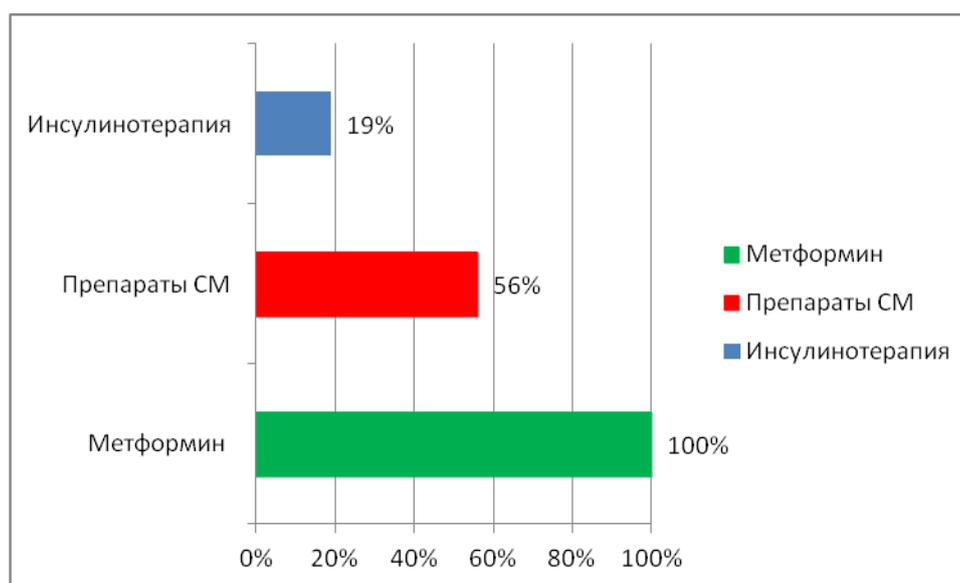


Рисунок 10 – Группы сахароснижающих препаратов, назначенные пациентам с впервые выявленным СД2 для достижения целевого HbA_{1c} за 3 месяца

2.2. Клинические и биохимические методы исследования

Всем пациентам, включенным в исследование, проводилась оценка общего состояния, измерение АД, ЧСС, роста и массы тела.

Индекс массы тела был вычислен по формуле:

ИМТ = масса тела (кг): рост² (м²).

Все пациенты сдали образцы крови из локтевой вены натощак (после предварительного голодания в течение не менее 8 часов и не более 14 часов) в период с 07:30 до 09:30. Для получения плазмы забор крови осуществляли в присутствии антикоагулянта ЭДТА (1 мг/мл), после чего кровь центрифугировали при +4 °С, со скоростью 1000 г не более 20 минут в рефрижераторной центрифуге 3-16 KL (Sigma, США). Все больные также сдали на анализ утреннюю порцию мочи.

Для определения активности антиоксидантных ферментов готовили лизаты крови (1:10) в изотоническом фосфатном буфере.

Для измерения **показателей липидного спектра** в плазме крови были использованы тест-наборы BioSystems (Испания); измерения проводили на химическом анализаторе Beckman Coulter AU 680 (США). В рамках обследования всем пациентам были определены: содержание общего холестерина, Хс ЛПОНП, Хс ЛНП, Хс ЛПВП, уровень триглицеридов.

Определение уровня **гликированного гемоглобина (HbA_{1c})** проводилось ex tempore методом капиллярного электрофореза на приборе Capillarys 2, произведенным фирмой Sebia (Франция).

В данной работе было проведено определение активности ключевых антиоксидантных ферментов.

Супероксиддисмутаза (СОД) – антиоксидантный фермент, который детоксицирует супероксидный анион-радикал (O₂^{•-}), таким образом предотвращая образование гидроксил-радикала (НО[•]), обладающего высокой токсичностью и способного повреждать молекулы белков, липидов, углеводов и нуклеиновых кислот.

Схема реакции, лежащей в основе антиоксидантного действия СОД:



Для измерения активности Cu-Zn-СОД проводили осаждение гемоглобина в лизате эритроцитов крови с помощью смеси этанол-хлороформ (3:5) [34].

После этого в прозрачной надосадочной части образца определяли активность СОД по ингибированию восстановления синего тетразолия супероксидным радикалом, который был сгенерирован в системе ксантиноксантиоксидаза, регистрируя кинетику образования формазана при 560 нм на спектрофотометре Hitachi-557 (Япония) [61]. За единицу активности СОД принимали количество антиоксидантного фермента, необходимого для 50% подавления восстановления синего нитротетразолия в данных условиях.

Селензависимая глутатионпероксидаза (ГП) – в основе определения липопероксидазной активности ГП проходят 2 реакции. ГП катализирует реакцию восстановления перекиси водорода и гидропероксидов полиненасыщенных жирных кислот (LOOH) глутатионом (GSH) с образованием окси-кислот (LOH).

На втором этапе глутатионредуктаза (ГР) катализирует реакцию восстановления окисленного глутатиона (GSSG), образовавшегося в предыдущей реакции.

Биохимические реакции, лежащие в основе метода определения липопероксидазной активности ГП:



Для определения активности ГП в нашем эксперименте использовали реакционную среду, содержащую избыток субстратов – восстановленный глутатион, NADPH, органический гидропероксид и глутатионредуктазу (полученную из дрожжей).

Активность ГП определяли по скорости окисления NADPH в сопряженной глутатион-редуктазной системе при 340 нм с гидропероксидом

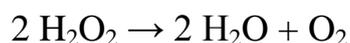
трет-бутила в качестве субстрата на химическом анализаторе FP-900 Labsystems Oy (Финляндия) [22,166].

Была введена поправка на неферментативное окисление глутатиона за время реакции при расчете начальной скорости.

За единицу активности ГП принимали количество фермента, которое необходимо для окисления 1 мкмоль глутатиона за 1 минуту в данных условиях.

Активность **каталазы** определяли на спектрофотометре Hitachi-557 (Япония) по изменению содержания пероксида водорода при добавлении лизата эритроцитов [47].

Каталаза катализирует следующую реакцию:



В инкубационную среду, содержащую 30 мМ пероксида водорода в 50 мМ фосфатном буфере (pH= 7,0), добавляли исследуемый образец лизата эритроцитов, после чего регистрировали изменение оптической плотности в течение 3-5 минут при длине волны поглощения 240 нм.

При расчете активности каталазы коэффициент молярной экстинкции пероксида водорода составлял $E=43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. За единицу активности фермента принимали количество каталазы, необходимое для утилизации 1 мкмоль пероксида водорода за 1 минуту.

Определение ТБК-реактивных продуктов (**МДА и других карбонильных соединений**) в плазме крови проводили по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой, анализируя количество образовавшегося триметинового комплекса при 532 нм на спектрофотометре Hitachi 220A (Япония) [21,23].

Для этого готовили раствор тиобарбитуровой кислоты. 150 мг тиобарбитуровой кислоты растворяли в 31 мл дистиллированной воды, предварительно нагретой до 60 С (в течение 10-15 минут).

В пробирку добавляли 3 мл 1,4% раствора ортофосфорной кислоты, 0,25 мл плазмы крови и 1 мл раствора тиобарбитуровой кислоты. В

контрольную пробу вместо 0,25 мл плазмы крови добавляли такое же количество дистиллированной воды.

Предварительно накрыв пробирки конденсирующими колпачками, их помещали в водяную баню на 45 минут при температуре +100 °С. После кипячения пробирки, охлаждали в течение 3-5 минут в воде и добавляли в них 3 мл n-бутанола.

Затем пробирки встряхивали до образования однородной белой суспензии с розовым оттенком. Следом за этим проводили центрифугирование образца при 1800 g в течение 10 минут.

Добавив 3 мл супернатанта в чистую пробирку, проводили измерение оптической плотности исследуемого образца против контрольного при 2-х длинах волн: 535 и 570 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Расчет содержания ТБК-реактивных продуктов производили по формуле:

$$C = D_{535} - D_{570} / 0,156 \times 16$$

Где: C- содержание ТБК- активных продуктов в опытной пробе (мкмоль/л);

D_{535} – оптическая плотность опытной пробы при 535 нм;

D_{570} - оптическая плотность опытной пробы при 570 нм;

0,156 – коэффициент молярной экстинкции комплекса малоновый диальдегид – ТБК;

16 – коэффициент разведения плазмы крови.

Уровень окислительно модифицированных липопротеидов низкой плотности (ок-ЛНП) в плазме крови определяли иммунохимическим методом при помощи тест-наборов Merckodia Oxidized LDL ELISA (Швеция) (содержащих моноклональные антитела к МДА-модифицированным ЛНП) на планшетном спектрофотометре BioTek EL808 (США) [55,76,139,177].

Об окислительной модификации белков плазмы крови судили по изменению **уровня восстановленных тиолов**, который определяли с помощью реактива Ellman на спектрофотометре Hitachi-557 (Япония) [118].

При реакции сульфгидрильных (тиоловых) групп с реактивом Элмана (раствор 5,5'-дителиобис-2-нитробензойной кислоты) происходит разрыв дисульфидной связи в реактиве и образование 2-нитро-5-тиобензойной кислоты, которая при щелочных рН в воде переходит в хиноидную форму и имеет ярко-жёлтую окраску.

Схема реакции:



Образующийся тионитрофильный анион может количественно определяться на спектрофотометре при 412 нм.

Для определения тиоловых групп в пробирку добавляли 2,5 мл 0,1 М натрий-натрий фосфатного буфера (рН=8,0), 1 мМ ЭДТА, 50 мкл раствора Элмана (с концентрацией 4 мг/мл) и 250 мкл исследуемого образца плазмы крови пациентов.

Затем все перемешивали, инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре и измеряли оптическую плотность исследуемого образца в 1 см кювете против образца сравнения, содержащего вместо плазмы крови такое же количество натрий-натрий фосфатного буфера при 412 нм.

Для расчета уровня восстановленных тиолов в плазме крови (в мкмоль/мл) коэффициент молярной экстинкции реактива Элмана принимали за $14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Длина теломерных повторов в хромосомах была определена модифицированным методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Для этого производили выделение ДНК из лейкоцитов крови с использованием «ДНК-Экстран 1» ЗАО «Синтол» (Россия).

Затем на анализаторе нуклеиновых кислот «АНК-32» (Россия) проводили амплификацию в реальном времени [74]. Все образцы были исследованы трехкратно.

Содержание 8-гидрокси-гуанина (8-охо-dG) в плазме крови и моче определяли иммунохимическим методом с помощью тест-наборов фирмы Trevigen (США) на планшетном спектрофотометре BioTek EL808 (США).

Тест-Набор Trevigen (США) основан на быстром и чувствительном конкурентном иммуноферментном методе и предназначен для количественного определения 8-гидрокси-2'-деоксигуанозина в образцах мочи, сыворотки и слюны.

2.3. Статистическая обработка результатов

При проведении статистической обработки результатов исследования использовали компьютерную программу SPSS 14 for Windows Version 7.0.

С помощью критерия Колмогорова-Смирнова проводили оценку нормальности распределения переменных.

Для оценки достоверности между группами использовали непарный непараметрический метод анализа по Манну-Уитни.

Достоверность измерения показателей на фоне проведения эффективной сахароснижающей терапии определяли с помощью парного непараметрического метода анализа по Вилкоксоу.

Результаты исследования представлены в виде средних значений параметров и ошибки среднего ($M \pm m$).

Для всех проведенных исследований различия считали достоверными при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Окислительный стресс и укорочение теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови у пациентов с впервые выявленным диабетом 2 типа

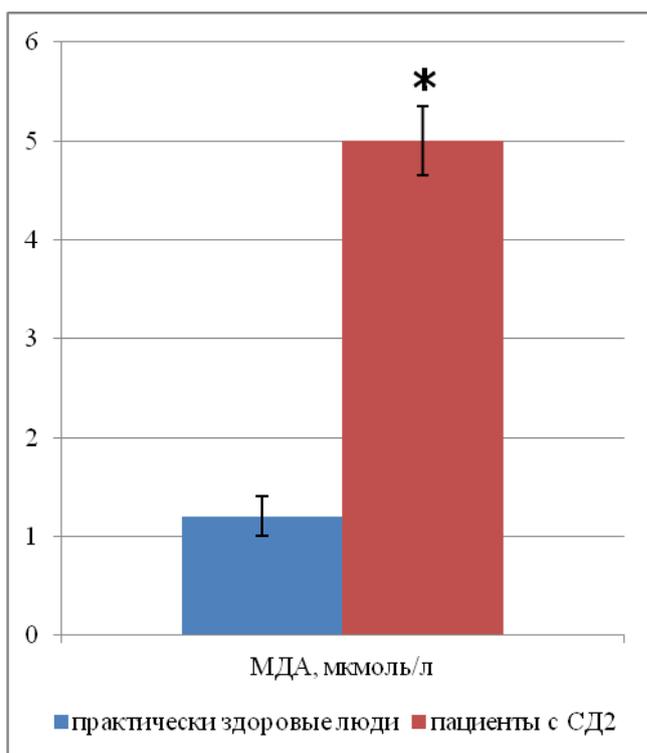
В первой части данной главы представлены результаты исследования параметров окислительного стресса у практически здоровых людей и пациентов с впервые выявленным СД2 с выраженными нарушениями углеводного обмена ($HbA_{1c} \geq 10\%$).

В исследование были включены 16 пациентов с впервые выявленным СД2 (9 мужчин/7 женщин; 55,4 лет \pm 1,4), не получавших ранее сахароснижающую терапию, с высоким уровнем гликированного гемоглобина ($HbA_{1c} = 10,7\% \pm 1,4$).

Группа контроля представлена 67 практически здоровыми людьми (30 мужчин/37 женщин; 53,8 лет \pm 3,7) без нарушений липидного и углеводного обмена ($HbA_{1c} = 5,5\% \pm 0,1$), а также каких-либо признаков наличия ИБС. Группы были сопоставимы по полу и возрасту.

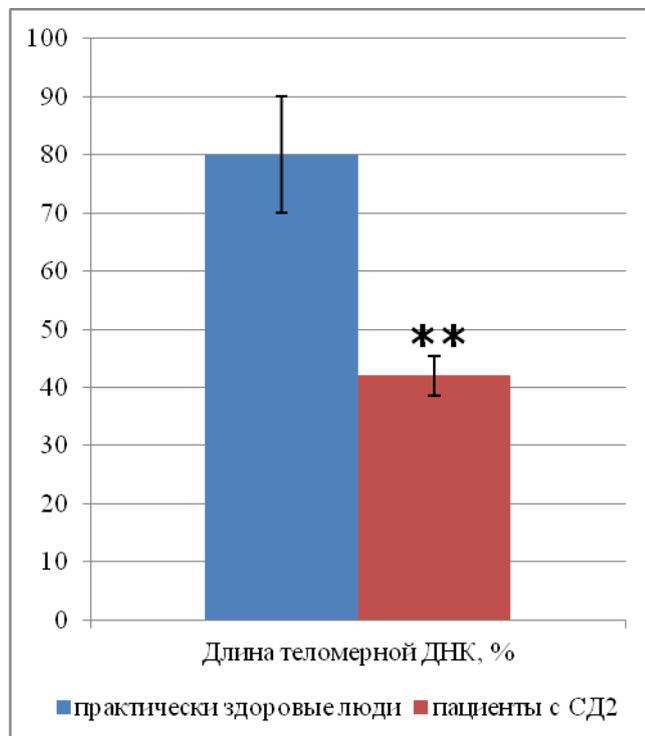
При обследовании пациентов были определены: уровень HbA_{1c} , содержание МДА в плазме крови, активность ключевых антиоксидантных ферментов в эритроцитах – СОД, ГП и каталазы. Также была измерена относительная длина теломеров в ДНК лейкоцитов крови.

У больных СД2 с выраженными нарушениями углеводного обмена ($HbA_{1c} = 10,7\% \pm 1,4$) обнаружено резкое увеличение (почти в 3 раза) содержания вторичного продукта свободнорадикального окисления – МДА в плазме крови по сравнению с группой практически здоровых, у которых уровень гликированного гемоглобина ($HbA_{1c} = 5,5\% \pm 0,1$) был в пределах нормы (рис. 11).



* - $p < 0,0001$

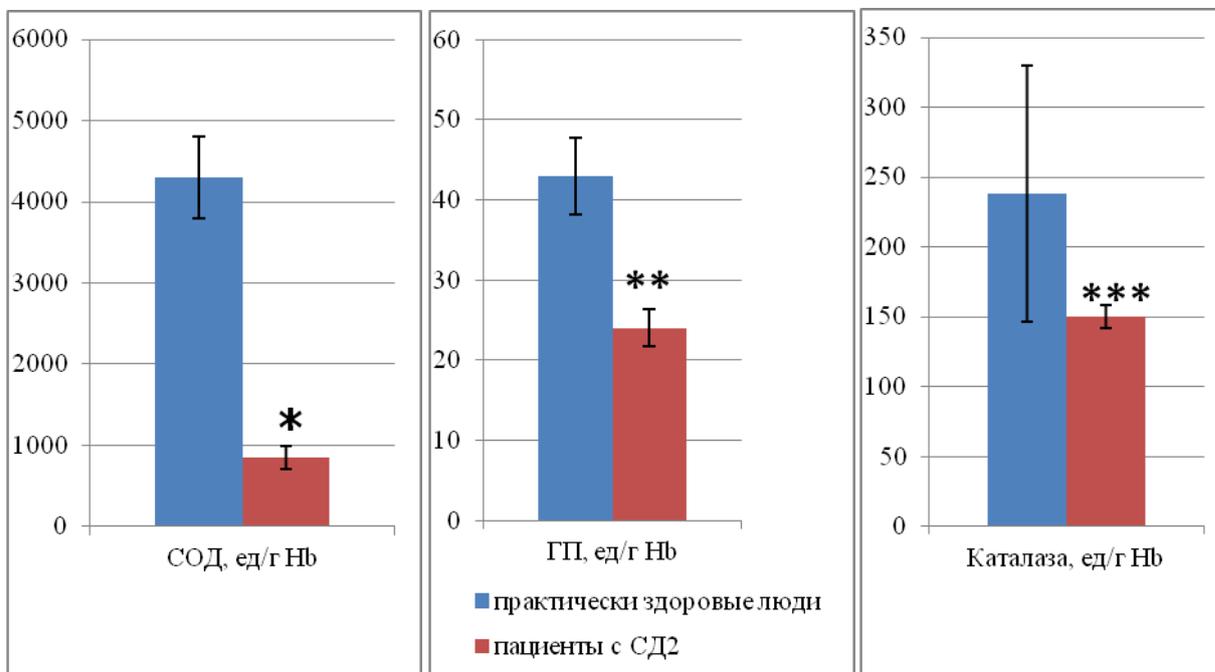
Рисунок 11 – Содержание МДА в плазме крови практически здоровых людей (1) и пациентов СД2 (2): $n_1=20$; $n_2=16$



** - $p < 0,001$

Рисунок 12 – Длина теломерной ДНК в крови практически здоровых людей (1) и пациентов СД2 (2): $n_1=67$; $n_2=16$

У больных СД2 наблюдали также проявление окислительной деструкции ДНК в лейкоцитах крови – уменьшение относительной длины теломеров (почти на 30%) по сравнению с группой практически здоровых пробандов (рис. 12) [52,56,144,200].



* - $p < 0,0001$; ** - $p < 0,001$; *** - н/д

Рисунок 13 – Активность ключевых антиоксидантных ферментов в эритроцитах практически здоровых людей (1) и пациентов с СД2 (2): $n_1=20$; $n_2=16$

Одновременно в эритроцитах больных СД2 в этой группе было выявлено снижение активности ключевых антиоксидантных ферментов: СОД (более чем в 4 раза) и ГП (почти в 2 раза) по сравнению с группой практически здоровых обследованных [49,50,176,205]. При этом, активность каталазы достоверно не изменялась, что может быть связано с резистентностью данного фермента к действию продуктов окисления (рис. 13) [203].

При исследовании коррелятивных связей между длиной теломеров в хромосомах форменных элементов крови и параметрами окислительного стресса было установлено лишь наличие слабой корреляции между длиной теломерных повторов и содержанием МДА в плазме крови ($r=0,426$; $p < 0,1$) и

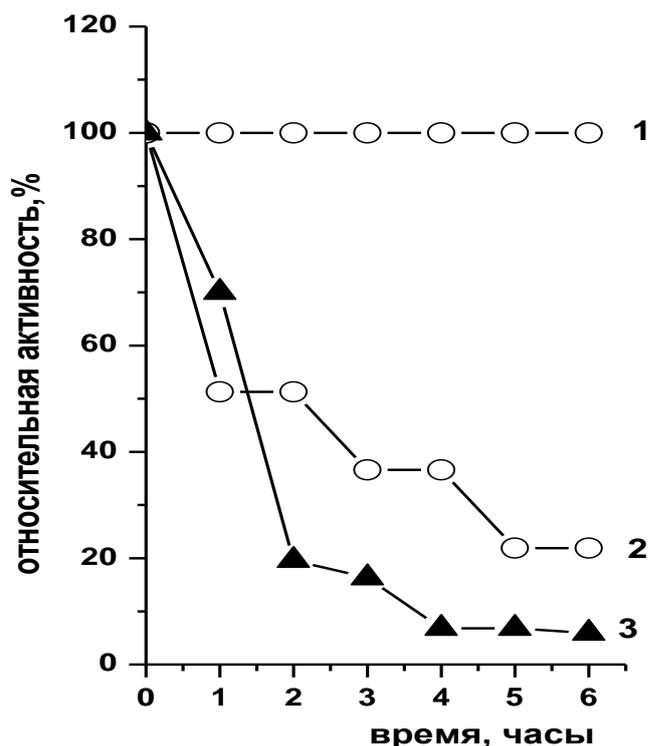
длиной теломеров и уровнем HbA_{1c} ($r=0,411$; $p<0,1$). Других достоверных коррелятивных связей между длиной теломерных повторов и показателями окислительного стресса выявлено не было (данные не приводятся).

Таким образом, у пациентов с СД2 с декомпенсацией углеводного обмена наряду с развитием окислительного стресса (о чем свидетельствует снижение активности ключевых антиоксидантных ферментов в эритроцитах крови – СОД и ГП и увеличение содержания вторичного продукта окисления в плазме крови – МДА) мы отметили укорочение длины теломерных повторов, которое может быть связано с окислительной деструкцией молекул ДНК.

Следовательно, мы выявили значительные нарушения регуляции свободнорадикальных процессов у пациентов СД2 с выраженными нарушениями углеводного обмена ($HbA_{1c} \geq 10\%$) по сравнению с практически здоровыми обследованными.

3.2. Влияние природных дикарбониллов на активность антиоксидантных ферментов *in vitro*

Причина столь резкого снижения активности ключевых антиоксидантных ферментов в эритроцитах больных СД2, полученного в исследовании, может быть объяснена ингибированием ферментативной активности вследствие модификации белков природными низкомолекулярными дикарбонилами, накапливающимися в плазме крови при диабете [137]. Действительно, в наших экспериментах *in vitro* при инкубации эритроцитов человека в присутствии глиоксаля и метилглиоксаля было обнаружено резкое подавление активности СОД в красных кровяных клетках (рис. 14).



Примечание: для получения эритроцитов использовали кровь практически здоровых доноров

Обозначения: 1. Активность нативной СОД в эритроцитах человека в процессе инкубации в течение 6 часов в изотоничном К,Na-фосфатном буфере pH 7,4; 2. Изменение активности СОД в эритроцитах человека в процессе инкубации в присутствии 10мМ метилглиоксаля в течение 6 часов в изотоничном К,Na-фосфатном буфере pH 7,4; 3. Изменение активности СОД в эритроцитах человека в процессе инкубации в присутствии 10мМ глиоксаля в течение 6 часов в изотоничном К,Na-фосфатном буфере pH 7,4

Рисунок 14 – Влияние природных низкомолекулярных дикарбониллов (глиоксаля и метилглиоксаля) на активность СОД в эритроцитах человека в условиях *in vitro*

В связи с тем, что для СОД не существует прямых методов определения активности, анализ параметров ферментативной кинетики невозможен, тем не менее, при исследовании влияния дикарбониллов на другой антиоксидантный фермент – ГП было установлено изменение K_m и V_{max} , свидетельствующее о химической модификации активного центра [125].

Кроме того, нами была выявлена сильная отрицательная корреляция ($r=0,65$; $p<0,0001$) между активностью СОД и уровнем гликированного

гемоглобина в эритроцитах больных СД2, что также может свидетельствовать о модификации молекул фермента, проходящей одновременно с модификацией молекул гемоглобина (рис. 15).

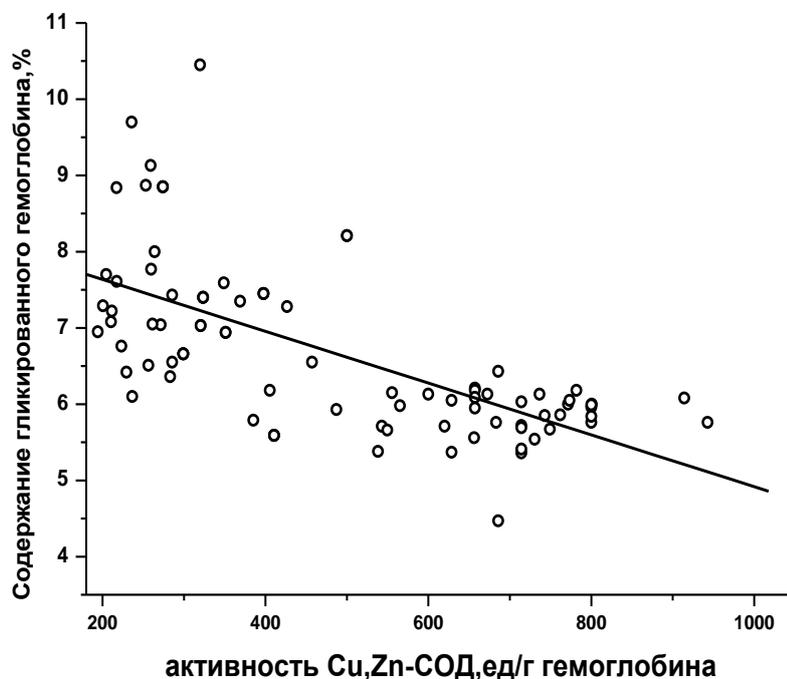


Рисунок 15 – Корреляционная зависимость между уровнем HbA_{1c} и активностью эритроцитарной СОД у пациентов с СД2 ($r = -0,652$; $p < 0,0001$; $n = 44$)

Следует отметить, что обнаруженный факт может служить основой для разработки дополнительного метода биохимической диагностики СД2 по падению активности СОД, который имеет преимущества по сравнению с определением HbA_{1c} вследствие простоты, возможности длительного хранения замороженных образцов до проведения анализа и отсутствия необходимости в специальной дорогостоящей аппаратуре.

3.3. Модификация белков и деструкция ДНК в результате процессов окислительного и карбонильного стресса при СД2

Во второй части настоящей главы мы расширили количество параметров окислительного и карбонильного стресса и проводили сравнение

группы пациентов с ИБС без нарушений углеводного обмена и группы больных СД2 с выраженными нарушениями углеводного обмена ($HbA_{1c} \geq 10\%$).

В исследование были включены 75 пациентов. Из них: группа пациентов СД2 ($n=50$; $61,2$ лет $\pm 1,85$; 26/24 муж/жен): 25 пациентам диагноз установлен впервые ($n=25$; $54,1$ лет $\pm 2,4$; 14/11 муж/жен) и 25 больных СД2 с анамнезом заболевания в среднем 10 лет (от 5 до 15 лет) – ($n=25$; $68,4$ лет $\pm 2,0$; 12/13 муж/жен).

Группу сравнения составили 25 пациентов с ИБС без признаков ишемии на момент включения в исследование и медикаментозно контролируемой артериальной гипертензией без нарушений углеводного обмена ($n=25$; $62,4$ лет $\pm 1,89$; 16/9 муж/жен). Все группы сопоставимы по полу и возрасту.

При обследовании мы определяли уровень окЛНП в плазме крови в качестве маркера выраженности окислительного стресса. По изменению длины теломеров в лейкоцитах крови и накоплению конечного продукта распада нуклеиновых кислот – 8-гидрокси-гуанина в плазме крови и в моче мы судили о происходящей окислительной деструкции молекул ДНК.

Об окислительной модификации белков свидетельствовало изменение активности ключевого фермента антиоксидантной системы – СОД, а также уровня восстановленных тиолов.

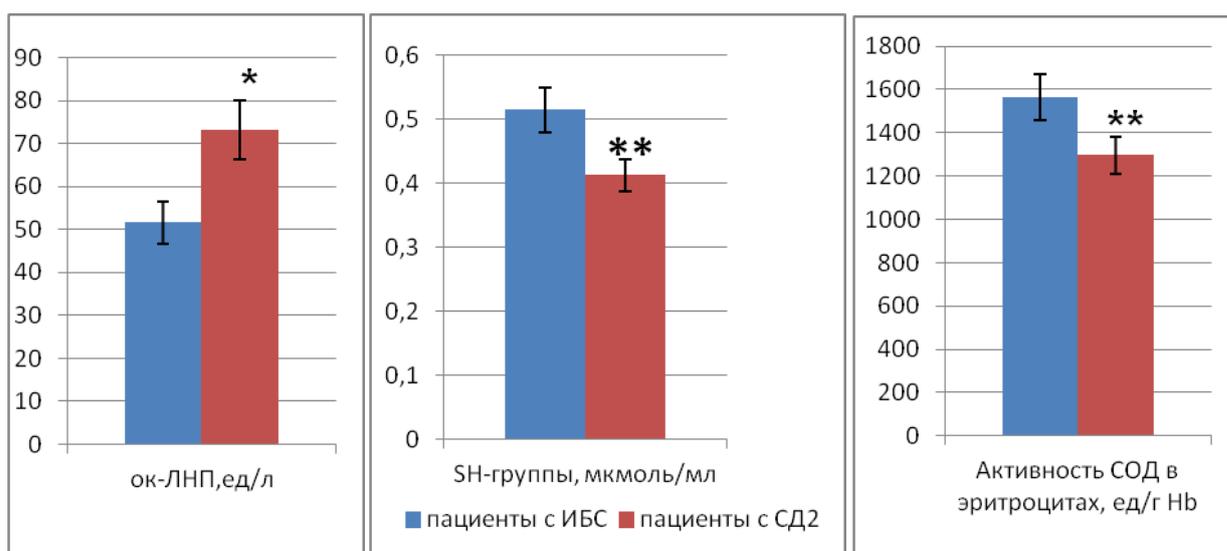
Основные результаты исследования представлены в таблице 5, из рассмотрения которой можно обратить внимание на серьезные нарушения углеводного обмена у пациентов СД2. У больных СД2 уровень HbA_{1c} был в 2,3 раза выше, чем у пациентов из группы сравнения.

Таблица 5 – Показатели окислительного и карбонильного стресса у пациентов СД2 с декомпенсацией углеводного обмена в сравнении с группой контроля

Параметр	Группы исследованных пациентов		
	Группа контроля (без нарушений углеводного обмена) (n=25)	Группа пациентов СД2 (n=50)	
Гликированный гемоглобин (HbA _{1c}), %	4,6±0,05	10,7±0,3	p<0,0001
Окисленные ЛНП (окЛНП), ед/л	51,6±3,68	73,2±3,42	p<0,0001
Содержание восстановленных тиолов, мкмоль/мл	0,515±0,015	0,413±0,002	p<0,0001
Активность СОД в эритроцитах, ед/г Нб	1564±25,8	1297±22,3	p<0,001
Относительная длина теломеров в моноцитах, %	110,4±1,33	75,9±1,29	p<0,0001
Содержание 8-оксигуанина в плазме крови, нмоль/л	24,9±0,26	27,2±0,23	p<0,001
Содержание 8-оксигуанина в моче, нмоль/л	60,4±1,50	65,1±0,15	p<0,001

Как и ожидалось, у пациентов СД2 отмечается повышение содержания окЛНП в плазме крови на 42% ($p < 0,0001$), что не только подтверждает наличие окислительного стресса у этих больных, но и свидетельствует о происходящей окислительной модификации апопротеина В-100 частиц ЛНП [50,146, 196]. О проявлениях окислительного стресса *in vivo* можно судить по окислению восстановленных тиолов. Соответственно у пациентов с СД2 мы выявили снижение уровня восстановленных тиолов на 20% ($p < 0,0001$). Также у пациентов с СД2 с декомпенсацией углеводного обмена было выявлено снижение активности одного из ключевых антиоксидантной системы – СОД на 17% ($p < 0,001$) [49].

Вышеуказанные изменения свидетельствуют о серьезных модификациях, происходящих в молекулах различных белков и пептидов (рис. 16).

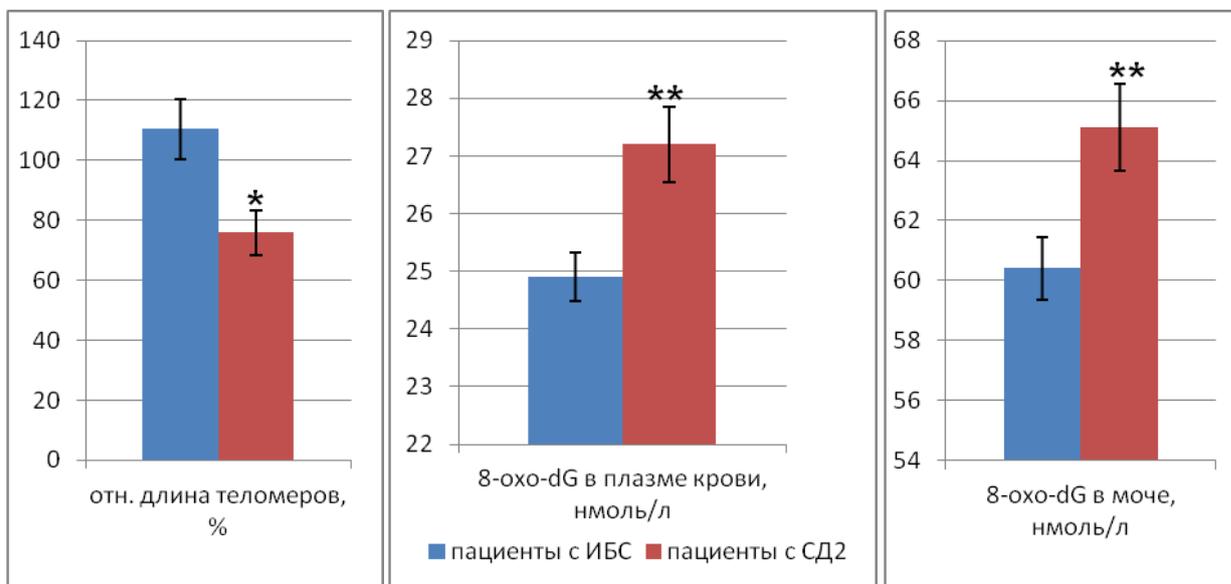


* - $p < 0,0001$; ** - $p < 0,001$

Рисунок 16 – Параметры окислительной модификации белков у пациентов с ИБС без нарушений углеводного обмена ($HbA_{1c} = 4,6\% \pm 0,05$) и пациентов СД2 в период декомпенсации углеводного обмена ($HbA_{1c} = 10,7\% \pm 0,3$)

Значительные нарушения были выявлены и в катаболизме молекул ДНК [105,124]: в частности, по сравнению с больными из группы сравнения без нарушений углеводного обмена у обследованных пациентов с СД2 резко

уменьшена длина теломерных повторов ДНК в хромосомах лейкоцитов на 31% ($p < 0,0001$), а также повышено содержание продукта катаболизма ДНК – 8-гидрокси-гуанина как в плазме крови (на 10%; $p < 0,001$), так и в моче (на 8%; $p < 0,001$) (рис. 17).



* - $p < 0,0001$; ** - $p < 0,001$

Рисунок 17 – Параметры окислительной деструкции ДНК у пациентов с ИБС без нарушений углеводного обмена ($HbA_{1c} = 4,6\% \pm 0,05$) и пациентов СД2 в период декомпенсации углеводного обмена ($HbA_{1c} = 10,7\% \pm 0,3$)

Также нам было интересно исследовать показатели углеводного и липидного обмена и параметры окислительного стресса у пациентов с впервые выявленным СД2 в сравнении с больными СД2 с анамнезом заболевания в среднем 10 лет (табл. 6).

У пациентов с впервые выявленным СД2 уровень HbA_{1c} превышал таковой в группе больных СД2 с анамнезом заболевания в среднем 10 лет более чем на 10% ($p = 0,025$).

Таблица 6 – Показатели углеводного и липидного обмена, а также параметры окислительного стресса у пациентов с впервые выявленным СД2 и СД2 с анамнезом заболевания в среднем 10 лет

Параметр	Впервые выявленный СД2 (n=25)	СД 2 с анамнезом заболевания в среднем 10 лет (n=25)	
Гликированный гемоглобин (HbA _{1c}), %	11,4±0,45	10,1±0,34	p=0,025
Триглицериды, ммоль/л	2,78±0,31	2,38±0,39	p=0,044
Хс-ЛПВП, ммоль/л	1,096±0,12	1,2±0,067	p=0,026
Активность СОД в эритроцитах, ед/г Нь	1078,85±63,54	846,46±47,85	p=0,005
Содержание 8-оксигуанина в плазме крови, нмоль/л	27,6±0,37	26,1±0,32	p=0,0055
Содержание 8-оксигуанина в моче, нмоль/л	65,7±0,08	64,5±0,23	p=0,0001

Маркером, свидетельствующим о деструкции молекул ДНК, является 8-гидроксигуанидин, содержание которого увеличено незначительно в группе пациентов с впервые выявленным СД2 по сравнению с больными

СД2 с анамнезом заболевания в среднем 10 лет как в крови (на 5,4%, $p=0,0055$), так и в моче (на 1,8%, $p=0,0001$).

При исследовании липидного обмена было выявлено достоверное повышение уровня триглицеридов на 14,4% ($p=0,044$) и снижение Хс-ЛПВП на 8,7% ($p=0,026$) у пациентов с впервые выявленным СД2.

В исследованной группе больных СД2 с длительным анамнезом заболевания мы наблюдали сильную положительную корреляцию между уровнем HbA_{1c} и длительностью анамнеза заболевания ($r=0,83$; $p<0,001$) (рис. 18).

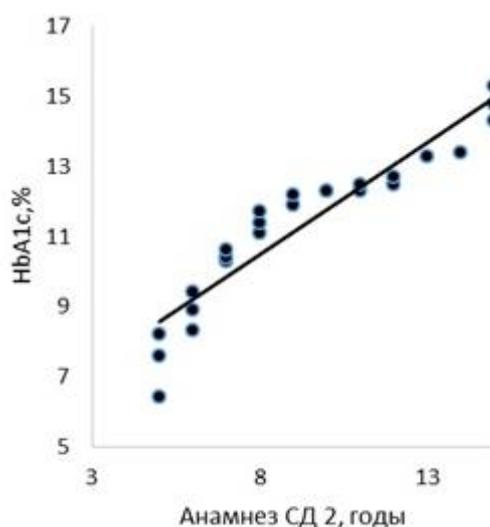


Рисунок 18 – Корреляционная зависимость между уровнем HbA_{1c} и продолжительностью заболевания СД2

Эти данные не являются неожиданными, однако показательно, что в этой группе больных СД2 нами была выявлена отрицательная корреляция ($r=0,48$; $p<0,02$) между активностью СОД в эритроцитах и продолжительностью заболевания (рис. 19).

Очевидно, что эти данные могут являться еще одним аргументом, свидетельствующим о наличии связи между окислительной модификацией СОД и степенью нарушений углеводного обмена при СД2 [49,50,205], причем эти данные подтверждают важность и информативность определения активности эритроцитарной СОД в качестве дополнительного

биохимического критерия выраженности декомпенсации углеводного обмена при СД2.

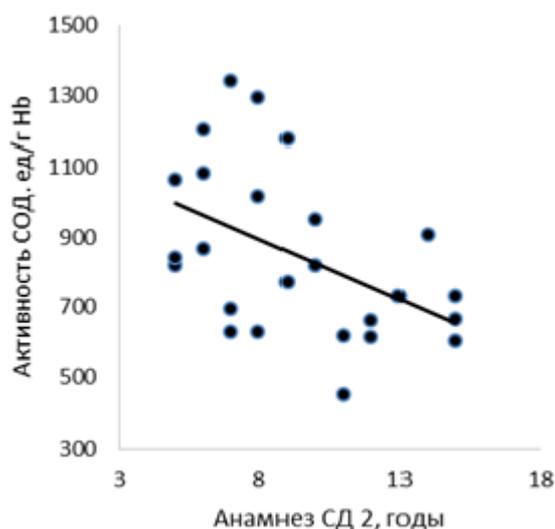


Рисунок 19 – Корреляционная зависимость между длительностью СД2 и активностью эритроцитарной СОД у пациентов СД2 ($r = -0,476$; $p = 0,016$; $n = 25$)

Других достоверных изменений показателей при сравнении этих двух групп получено не было (данные не приводятся).

Таким образом, данные проведенного исследования убедительно свидетельствуют о наличии проявлений окислительного стресса у больных СД2 с выраженными нарушениями углеводного обмена.

Отмеченное нами увеличение уровня МДА в плазме крови больных СД2 согласуется с ранее полученными данными других исследований, в которых увеличение содержания МДА было выявлено как в крови животных с экспериментальным диабетом, так и в плазме крови больных СД2 (рис. 11) [159,172].

Следует отметить, что наличие окислительного стресса при СД2, постулированное в этих работах, было основано на анализе исключительно косвенных показателей, главным образом, на основании регистрации повышенного уровня МДА в плазме крови больных.

Поскольку реакция с 2-ТБК использованная в этих работах для определения содержания МДА обладает низкой специфичностью, в этих работах мог определяться не только МДА, но и различные вещества плазмы крови, способные реагировать с 2-ТБК – TBARS [137].

Следовательно, увеличенный уровень TBARS не может рассматриваться в качестве абсолютно корректного критерия наличия окислительного/карбонильного стресса при СД2.

Исходя из вышеизложенного, нам представлялось важным в рамках комплексного исследования групп больных СД2 с нарушениями углеводного обмена и больных ИБС без нарушений углеводного обмена провести одновременное изучение параметров, определяющих выраженность окислительного/карбонильного стресса (в том числе, отличных от МДА), характеризующих влияние свободнорадикальных процессов на окислительную модификацию белков и окислительный катаболизм молекул ДНК.

В качестве показателей окислительной модификации белков исследовали уровень окислительной модификации апопротеина В-100 частиц ЛНП плазмы крови (ок-ЛНП), уровень восстановленных тиолов в пептидах и протеинах плазмы крови, а также активность СОД и ГП в эритроцитах, падение активности которых при СД2, в соответствии с нашими данными (рис. 14), может быть обусловлено модификацией этих ферментов накапливающимися при диабете низкомолекулярными дикарбонилами (рис. 11) [137].

Кроме того, исследовали показатели, свидетельствующие об окислительной деструкции молекул ДНК: относительную длину теломеров лейкоцитов крови, а также содержание конечного продукта окислительной деструкции ДНК – 8-охо-dG в плазме крови и моче больных СД2.

Полученные данные убедительно свидетельствуют об окислительной модификации белков при СД2 по сравнению с больными ИБС (у которых наблюдается выраженный окислительный стресс, [137], так как уровень

модифицированного апопротеина В-100 в частицах ЛНП был увеличен на 29,5%, содержание восстановленных тиолов снижено почти на 20% и активность СОД уменьшена более чем на 17% (рис. 16).

У больных СД2 по сравнению с больными ИБС также более активно протекает окислительный катаболизм молекул ДНК, о чем свидетельствует снижение относительной длины теломеров в лейкоцитах крови более чем на 30% и достоверное снижение содержания 8-охо-dG в плазме крови и, особенно, в моче обследованных пациентов (рис. 17).

3.4. Подавление процессов свободнорадикального окисления в результате проведения эффективной сахароснижающей терапии у пациентов СД2

В следующей части нашей работы мы исследовали наиболее информативные показатели окислительного/карбонильного стресса для оценки эффективности проводимой сахароснижающей терапии у пациентов СД2.

В исследование были включены 16 пациентов с впервые выявленным СД2, не получавшие ранее сахароснижающую терапию (9 мужчин/7 женщин; возраст 55,4 лет \pm 1,4; индекс массы тела 30,7 кг/м² \pm 1,2), с декомпенсацией углеводного обмена (HbA_{1c}=10,7% \pm 1,4).

Общая продолжительность исследования составила 3 месяца, в ходе которого осуществлялся подбор сахароснижающей терапии пациентам с впервые выявленным СД2.

На скрининговом визите и через 3 месяца проводили опрос, физикальный осмотр, определяли параметры углеводного, липидного обмена и окислительного стресса (рис. 9). Терапевтические цели были определены в соответствии с Алгоритмами индивидуализированного выбора целей терапии по HbA_{1c} (табл. 4).

В связи с декомпенсацией углеводного обмена на момент поступления в стационар ($HbA_{1c} \geq 10\%$) всем пациентам с впервые выявленным СД2 проводилась инсулинотерапия в интенсифицированном режиме.

В последующем при снижении уровня гликемии пациенты были переведены на различные схемы сахароснижающей терапии. 4 пациентам была назначена монотерапия метформином. Следует отметить, что всем пациентам был рекомендован прием препаратов из группы бигуанидов (Метформин 2000 мг/сутки) (рис. 10).

Таблица 7 – Показатели углеводного и липидного обмена у пациентов с впервые выявленным СД2 до лечения и на фоне проведения сахароснижающей терапии в течение 3-х месяцев

Показатель	До лечения (n=16)	Через 3 мес. после начала лечения (n=16)	P
HbA _{1c} , %	10,7(9,98-11,13)	7,06(6,72-7,77)	P<0,0001
Общий ХС, ммоль/л	5,81(4,78-6,86)	4,88(4,5-5,42)	P<0,03
ХС-ЛОНП, ммоль/л	1,17(0,81-1,75)	0,82(0,66-1,08)	P<0,03
ХС-ЛНП, ммоль/л	3,72(2,68-4,37)	2,97(2,60-3,48)	н/д
ХС-ЛВП, ммоль/л	1,00(0,85-1,12)	1,05(0,98-1,21)	н/д
ТГ, ммоль/л	2,56(1,77-3,82)	1,79(1,44-2,36)	P<0,03
Коэффициент атерогенности, %	4,78(4,19-5,44)	3,50(2,90-4,34)	P<0,001

Примечание: результаты представлены в виде медианы и 25% и 75% квартилей

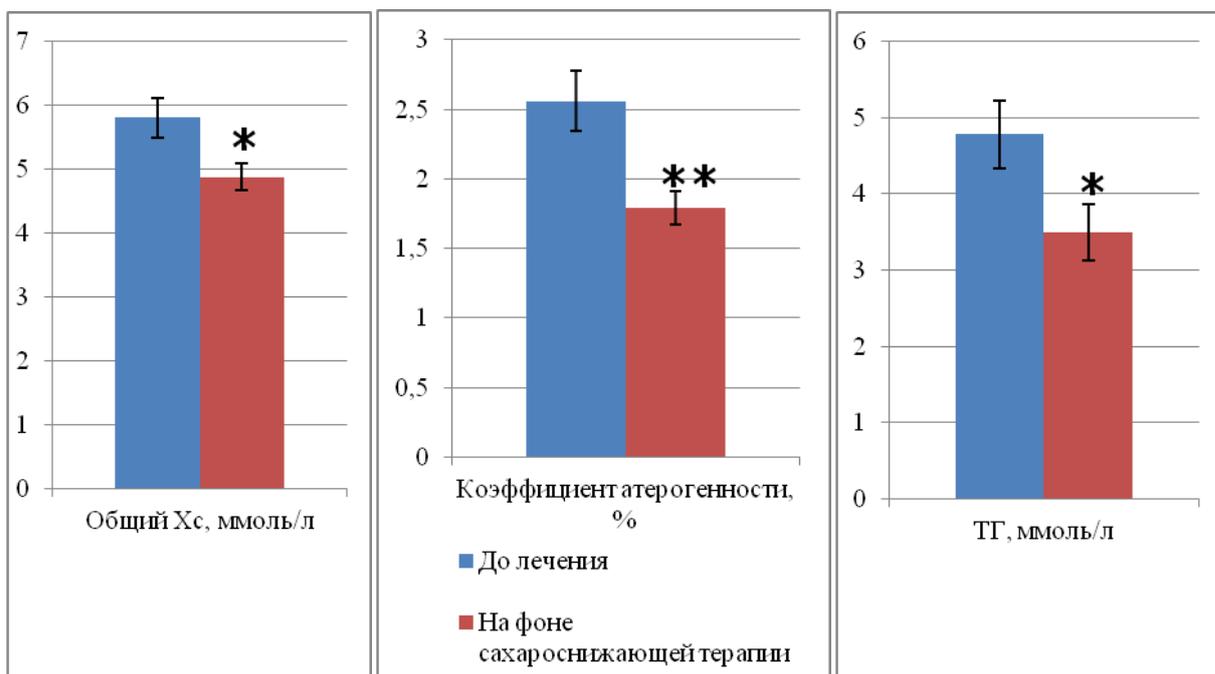
Всем пациентам были определены: уровень HbA_{1c}; показатели липидного спектра (содержание общего холестерина (Хс), Хс ЛНП, Хс ЛВП, Хс ЛПОНП, триглицеридов (ТГ)); содержание МДА и окЛНП в сыворотке крови; активность антиоксидантных ферментов (ГП и каталазы) в

эритроцитах. Показатели углеводного и липидного обмена до и на фоне проведения эффективной сахароснижающей терапии представлены в табл. 7.

Сразу обращает на себя внимание наличие выраженных нарушений углеводного обмена у пациентов с СД2 – уровень $HbA_{1c} \geq 10\%$.

Также эти пациенты имели определенные нарушения липидного обмена, в частности высокий уровень общего холестерина и коэффициента атерогенности.

Из рассмотрения таблицы мы видим, что на фоне проведения сахароснижающей терапии при достижении целевого уровня HbA_{1c} (снизился на 31%, $p < 0,0001$) было отмечено достоверное снижение уровня общего Хс на 13% ($p < 0,03$) и ТГ на 30% ($p < 0,03$). Уровни Хс ЛНП и Хс ЛВП достоверно не изменялись. И, соответственно, получено достоверное снижение коэффициента атерогенности на 26% ($p < 0,001$) (рис. 20).



* - $p < 0,03$; ** - $p < 0,001$

Рисунок 20 – Показатели липидного обмена у пациентов с впервые выявленным СД2 до лечения и на фоне проведения сахароснижающей терапии

Параллельно, на фоне проведения эффективной сахароснижающей терапии, сопровождающейся достоверным снижением HbA_{1c} , значительно изменились и показатели окислительного/карбонильного стресса (табл. 8).

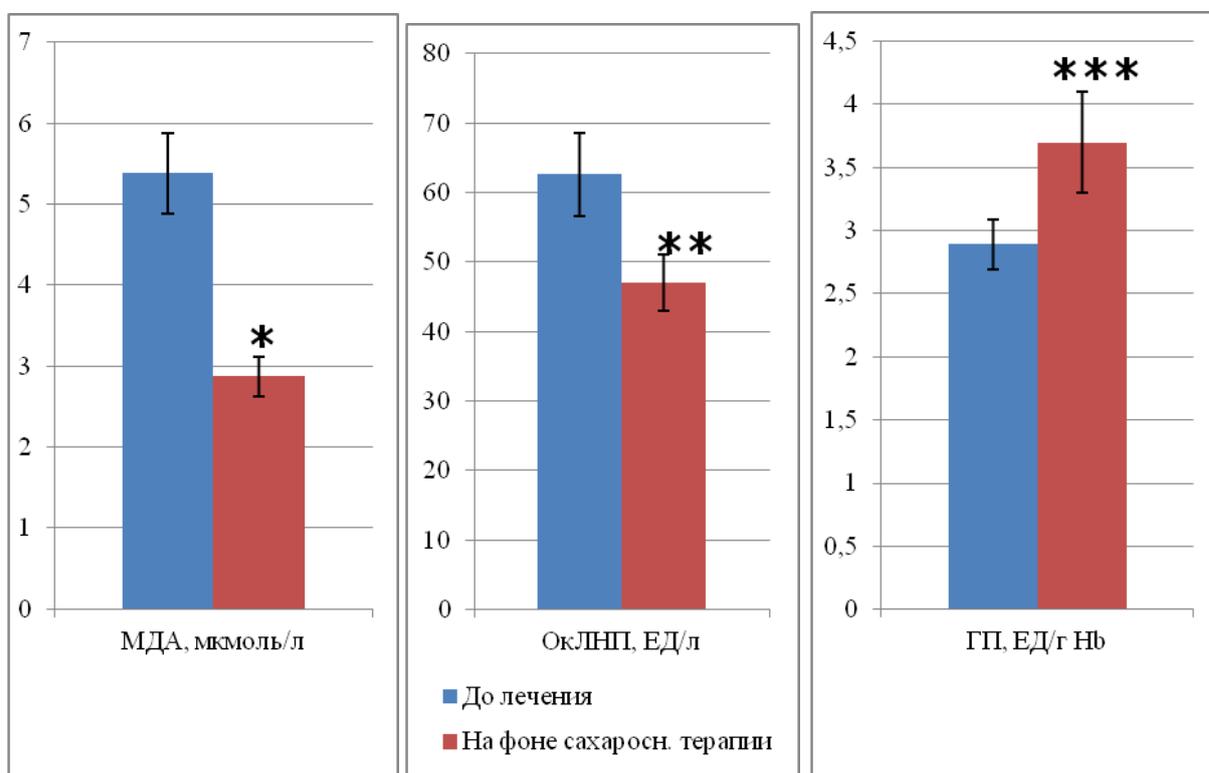
Таблица 8 – Показатели окислительного и карбонильного стресса у пациентов с впервые выявленным СД2 до лечения и на фоне проведения эффективной сахароснижающей терапии в течение 3-х месяцев

Показатель	До лечения (n=16)	Через 3 мес. после начала лечения (n=16)	P
МДА, мкмоль/л	5,38(3,59-6,51)	2,87(2,56-3,28)	P<0,0001
ОкЛНП, ЕД/л	62,66(51,79-69,64)	47,00(38,45-56,92)	P<0,001
Каталаза, ммоль/мин/мг Hb	177,39(152,65-187,04)	178,04(158,12-212,28)	н/д
ГП, ЕД/г Hb	2,89(2,60-3,68)	3,70(3,24-3,97)	P<0,03

Примечание: результаты представлены в виде медианы и 25% и 75% квартилей

Известно, что у пациентов с СД2 с декомпенсацией углеводного обмена повышено содержание таких параметров окислительного/карбонильного стресса, как МДА и окЛНП [36,53,196]. В исследовании было показано, что при достижении целевого HbA_{1c} в процессе проводимой терапии в течение 3-х месяцев содержание МДА достоверно снижалось на 38% ($p<0,0001$), а уровень окЛНП на 22% ($p<0,001$). Параллельно мы исследовали изменение активности антиоксидантных ферментов. Мы выявили достоверное повышение активности ГП на фоне проводимой сахароснижающей терапии на 23% ($p<0,03$) (рис. 21). При этом активность каталазы при нормализации показателей углеводного обмена достоверно не изменялась, что может быть

объяснено рефрактерностью данного фермента к действию АФК [203], а также сравнительно коротким периодом наблюдения этих пациентов (табл. 8).



* - $p < 0,0001$; ** - $p < 0,001$; *** - $p < 0,03$

Рисунок 21 – Изменения показателей окислительного стресса у пациентов с СД2 на фоне проведения эффективной сахароснижающей терапии в течение 3-х месяцев

В процессе проведения сахароснижающей терапии была выявлена положительная корреляция между уровнем HbA_{1c} и концентрацией МДА ($r=0,57$; $p < 0,0001$) (рис. 22), а также между уровнем HbA_{1c} и содержанием ок-ЛНП ($r=0,51$; $p < 0,003$) (рис. 23).

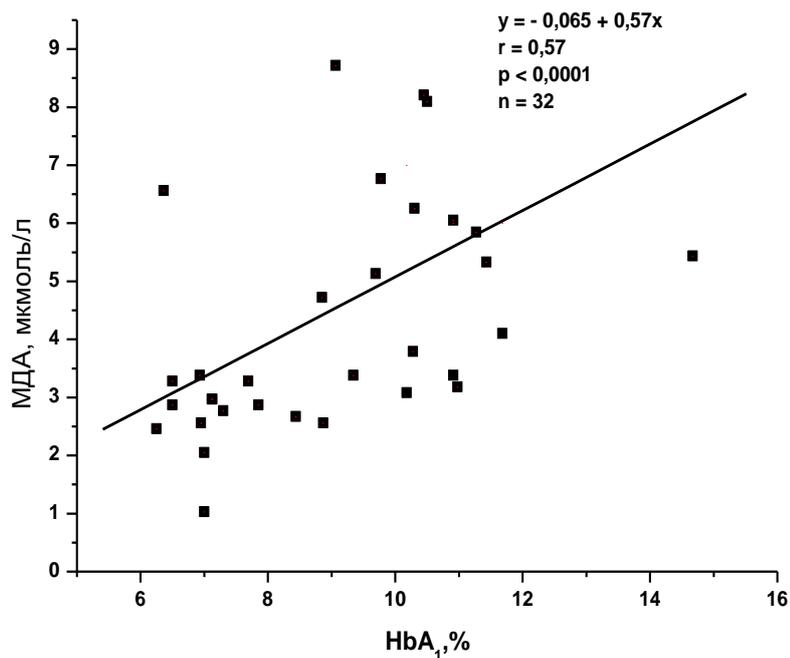


Рисунок 22 – Корреляция между уровнем HbA_{1c} и содержанием МДА в плазме крови больных СД2

Таким образом, в нашем исследовании показано, что терапевтические мероприятия, направленные на компенсацию углеводного обмена у пациентов с СД2 должны способствовать и подавлению проявлений окислительного стресса.

Следует отметить, что для достижения нормализации углеводного обмена у всех пациентов был использован метформин.

Известно, что метформин взаимодействует с метилглиоксалем, в ходе реакции происходит образование триазепинона, который можно определить в моче с помощью масс-спектрометрии [115,148].

Следовательно, можно предположить, что применение метформина способствует подавлению дальнейшего развития окислительного/карбонильного стресса [193].

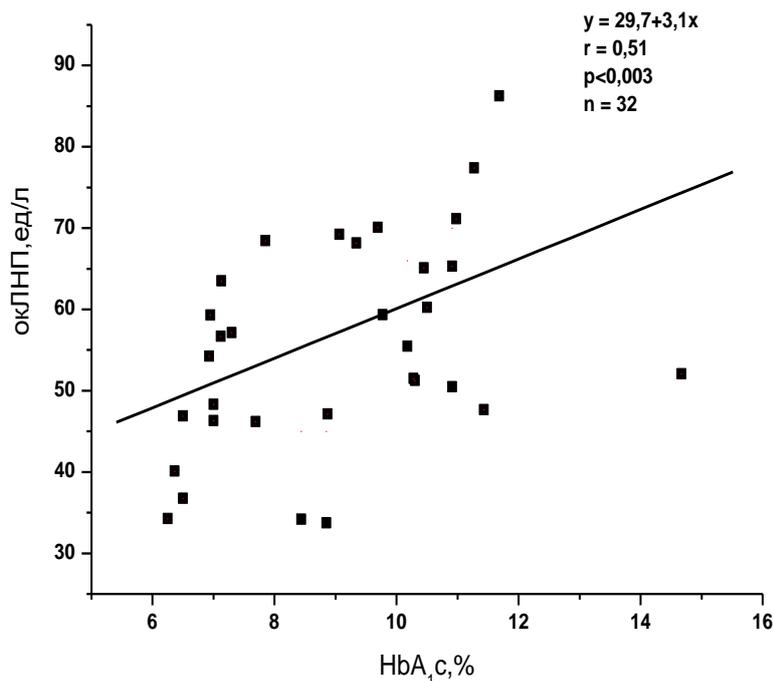


Рисунок 23 – Корреляция между уровнем HbA_{1c} и содержанием окЛНП в плазме крови больных СД2

Таким образом, успешная сахароснижающая терапия больных СД2 сопровождается достоверным снижением таких параметров окислительного/карбонильного стресса как содержание МДА и уровень окЛНП в плазме крови, что может быть критерием подавления окислительных повреждений белков и ДНК вследствие проведения лечебных мероприятий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты работы позволяют сделать ряд важных заключений:

1. В проведенном исследовании убедительно продемонстрировано, что у больных СД2 с выраженными нарушениями углеводного обмена выявлены существенные нарушения регуляции свободнорадикальных процессов по сравнению с практически здоровыми людьми (увеличение содержания МДА в плазме крови, снижение активности СОД и ГП в эритроцитах, снижение длины теломерных повторов в хромосомной ДНК лейкоцитов крови).
2. В экспериментах *in vitro* показано, что снижение активности антиоксидантных ферментов (прежде всего, СОД) в эритроцитах больных СД2 может быть обусловлено химической модификацией активного центра этих белков низкомолекулярными природными дикарбонилами (такими как глиоксаль и метилглиоксаль). В соответствии с этим выявлена сильная отрицательная корреляция между содержанием гликированного гемоглобина и активностью СОД в эритроцитах больных СД2, что может служить основой для разработки нового биохимического теста для диагностики и оценки эффективности терапии СД2. В соответствии с этим установлено, что снижение активности СОД в эритроцитах больных СД2 зависит от продолжительности заболевания.
3. Несмотря на то, что у больных ИБС проявление окислительного стресса резко возрастает (Lankin V., Tikhaze A., 2017), у больных СД2 с нарушениями углеводного обмена выявлены множественные изменения, свидетельствующие о том, что выраженность окислительного стресса у этих больных превышает таковую у больных ИБС. Более того, было установлено, что у больных СД2 наблюдаются характерные изменения, отражающие химическую модификацию биополимеров: окислительную модификацию белков (апопротеина В-100 частиц ЛНП и тиолсодержащих протеинов и пептидов плазмы крови, равно как молекул ключевых антиоксидантных ферментов эритроцитов - СОД и ГП), а также окислительные повреждения молекул ДНК (снижение длины теломерных повторов в лейкоцитах крови и

увеличение уровня конечного продукта окислительной деструкции ДНК - 8-гидрокси-гуанина в плазме крови и моче). Полученные результаты комплексного исследования на основании анализа объективных биохимических параметров впервые убедительно демонстрируют наличие окислительного стресса у больных СД2 с нарушениями углеводного обмена.

4. Впервые показано, что сахароснижающая терапия больных СД2 на фоне снижения уровня гликированного гемоглобина сопровождается достоверным уменьшением выраженности окислительного стресса: значительным снижением уровня ок-ЛНП и МДА в плазме крови. При этом в процессе сахароснижающей терапии больных СД2 отмечено наличие достоверной положительной корреляции ($r=0,51-0,57$) между уровнем гликированного гемоглобина и содержанием ок-ЛНП и МДА в плазме крови, что может быть использовано в качестве дополнительного биохимического теста для контроля эффективности лечения.

ВЫВОДЫ

1. В комплексном биохимическом исследовании показано достоверное увеличение содержания МДА в плазме крови (почти в 3 раза, $p < 0,0001$), снижение активности СОД (более чем в 4 раза, $p < 0,0001$) и ГП (почти в 2 раза, $p < 0,001$), а также уменьшение длины теломерных повторов в ДНК лейкоцитов крови (почти на 30%, $p < 0,001$) у больных впервые выявленным СД2 ($HbA_{1c} = 10,7\% \pm 1,4$) по сравнению с практически здоровыми людьми без нарушений липидного и углеводного обмена.
2. У больных СД2 ($HbA_{1c} = 10,7\% \pm 0,3$) по сравнению с группой больных с ИБС было установлено достоверное увеличение уровня ок-ЛНП (почти в 1,5 раза, $p < 0,0001$) и содержания 8-гидрокси-гуанина в плазме крови и моче (почти на 10% и 8% соответственно, $p < 0,001$), а также снижение уровня восстановленных тиолов в плазме крови (на 20%, $p < 0,0001$), активности СОД в эритроцитах (на 17%, $p < 0,001$) и длины теломерных повторов в лейкоцитах крови (на 31%, $p < 0,0001$).
3. Показано, что природные дикарбонилы, образующиеся при окислительных превращениях глюкозы – глиоксаль и метилглиоксаль, ингибируют активность СОД в эритроцитах человека в процессе инкубации с этими дикарбонилами.
4. У больных СД2 с выраженными нарушениями углеводного обмена ($HbA_{1c} = 10,7\% \pm 1,4$) выявлена положительная корреляция между уровнем HbA_{1c} и содержанием МДА в плазме крови ($r = 0,57$; $p < 0,0001$; $n = 32$) и содержанием ок-ЛНП ($r = 0,51$; $p < 0,003$; $n = 32$), а также отрицательная корреляция между уровнем HbA_{1c} и активностью эритроцитарной СОД ($r = -0,652$; $p < 0,0001$; $n = 44$).

Кроме того, установлено, что снижение активности СОД в эритроцитах больных СД2 зависит от продолжительности заболевания.

5. Показано, что сахароснижающая терапия больных СД2 с использованием бигуанидов, препаратов сульфонилмочевины и

инсулинотерапии, приводит к значительному уменьшению уровня МДА (на 38%, $p < 0,0001$) и ок-ЛНП (на 22%, $p < 0,001$) в плазме крови.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. На основании полученных результатов можно рекомендовать определение уровня окислительно-модифицированных ЛНП, в качестве дополнительного биохимического теста для оценки эффективности проводимой сахароснижающей терапии у больных СД2.
2. На основании выявленной корреляции между уровнем HbA_{1c} и активностью СОД в эритроцитах может быть предложен дополнительный биохимический тест определения активности СОД для выявления выраженности и длительности нарушений углеводного обмена у больных СД2.

Тест может быть более удобен, чем определение HbA_{1c}, вследствие возможности использования замороженных и длительное время хранящихся образцов крови, а также вследствие более простой и дешевой аппаратуры для этих анализов, чем для определения HbA_{1c}, однако в связи с тем, что активность СОД может изменяться при различных патологиях, характеризующихся развитием окислительного стресса, этот тест не может использоваться для диагностики СД2.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 2-ТБК - 2-тиобарбитуровая кислота
АГ - артериальная гипертония
АД - артериальное давление
АпоВ-100 - аполипопротеин В-100
АФК - активные формы кислорода
ГИП - глюкозозависимый инсулиотропный полипептид
ГП - глутатионпероксидаза
ГПП-1 - глюкагоноподобный пептид-1
ГР – глутатионредуктаза
ДАГ - диацилглицерол
ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
ИБС - ишемическая болезнь сердца
ИМТ - индекс массы тела
КПНГ - конечные продукты неферментного гликирования
ЛНП - липопротеиды низкой плотности
ЛПВП - липопротеиды высокой плотности
ЛПОНП - липопротеиды очень низкой плотности
МДА - малоновый диальдегид
НГЛТ-2 - натрий-глюкозный-котранспортер 2 типа
ок-ЛНП - окислительно модифицированные ЛНП
ПКС – протеинкиназа С
ПНЖК - полиненасыщенные жирные кислоты
ПОЛ - перекисное окисление липидов
СД2 - сахарный диабет 2 типа
СОД - супероксиддисмутаза
ТГ - триглицериды
Хс - холестерин
8-охо-dG - 8-гидрокси-гуанин
GSN - глутатион восстановленный

GSSG - глутатион окисленный

HbA_{1c} - гликированный гемоглобин

IDF - Международная Федерация Диабета

NAD⁺ - никотинамидадениндинуклеотид

NADH - никотинамидадениндинуклеотид восстановленный

NADP⁺ - никотинамидадениндинуклеотидфосфат

NADPH - никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный

NO - оксид азота

PARP - поли(АДФ-рибоза)-полимераза

TBARS - вещества, реагирующие с 2-тиобарбитуровой кислотой

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом [Текст] / И.И. Дедов [и др.]. – 8-й выпуск. – М., 2017.
2. Аметов, А.С. Инсулиносекреция и инсулинорезистентность: две стороны одной медали [Текст] / А.С. Аметов // Пробл. эндокринологии. – 2002. – Т.48, №3. – С.31-37.
3. Аметов, А.С. Патолофизиологический подход как основа выбора стратегии успешного лечения сахарного диабета 2 типа [Текст] / А.С. Аметов // Фарматека. – 2017. – №5(338). – С. 28-35.
4. Аметов, А.С. Сахарный диабет - независимый фактор риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [Текст] / А.С. Аметов, Н.К. Кулиджанян // Терапевт. арх. – 2012. – Т.84, №8. – С. 91-94.
5. Ахмед, Н. (Ahmed, N.). Роль конечных продуктов гликирования в патогенезе осложнений сахарного диабета [Текст] / N. Ahmed, P. J. Thornalley // Рус. мед. журн. – 2009. – Т.17, №9. – С.642-650.
6. Балаболкин, М.И. Роль дисфункции эндотелия и окислительного стресса в механизмах развития ангиопатий при сахарном диабете 2 типа [Текст] / М.И. Балаболкин, В.М. Креминская, Е.М. Клебанова // Кардиология. – 2009. – Т. 44, № 7. – С. 90 – 97.
7. Балаболкин, М.И. Роль инсулинорезистентности в патогенезе сахарного диабета типа 2 [Текст] / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова // Терапевт. арх. – 2003. – Т.75, №1. – С.72-77.
8. Балаболкин, М.И. Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений диабета (лекция) [Текст] / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова // Пробл. эндокринологии. – 2000. – Т.46, № 6. – С.29-34.
9. Бирюкова, Е.В. Современная модель прогнозирования риска развития сердечно-сосудистых заболеваний у больных сахарным диабетом [Текст] / Е.В. Бирюкова // Терапевт. арх. – 2012. – Т.84, №10. – С. 98-102.

10. Бондаренко, В.М. Кишечная микрофлора, ожирение и диабет 2 типа [Текст] / В.М. Бондаренко, В.В. Малеев, В.Г. Лиходед // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2014. – №3. – С. 42-49.
11. Владимиров, Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах [Текст] / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
12. Влияние окислительного стресса на длину теломерных повторов в хромосомах лейкоцитов крови лиц с различным риском сердечно-сосудистой смерти и больных ИБС [Текст] / Н.А. Дорошук [и др.] // Кардиологический вестник. – 2017. – Т.12, №1. – С. 32-37.
13. Горшунская, М.Ю. Функция бета-клеток и чувствительность к инсулину у больных сахарным диабетом типа 2 [Текст] / М. Ю. Горшунская, О. М. Белецкая // Пробл. эндокринологии. – 2003. – Т.49, №3. – С.6-9.
14. Гузенко, В.Е. Окислительный стресс при сахарном диабете и его фармакологическая коррекция [Текст] / В.Е. Гузенко, Л.М. Макарова, В.Е. Погорелый // Рос. педиатр. журн. – 2010. – №5. – С.42-50.
15. Дедов, И.И. Феномен "метаболической памяти" в прогнозировании риска развития сосудистых осложнений при сахарном диабете [Текст] / И.И. Дедов, М.В. Шестакова // Терапевт. арх. – 2015. – Т.87, №10. – С. 4-10.
16. Дихт, Н.И. Состояние системы гемостаза и антитромбоцитарной активности сосудистой стенки при декомпенсации сахарного диабета [Текст] / Н.И. Дихт, В.Ф. Киричук, М.Н. Солун // Успехи современного естествознания. – 2008. – № 5. – С. 95-96.
17. Занозина, О.В. Окислительная модификация белков в плазме крови больных сахарным диабетом типа 2 в зависимости от степени компенсации углеводного обмена и длительности заболевания [Текст] / О.В. Занозина, Т.Г. Щербатюк, Н.Н. Боровков // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2010. – №1. – С.113-118.

18. Зенков, Н.К. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты [Текст] / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньшикова. – М.: Наука/Интерпериодика, 2001. – 343 с.
19. Климов, А.Н. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения [Текст] / А.Н. Климов, Н.Г. Никульчева. – СПб.: Питер, 1999. – С. 291-360.
20. Кондратьева, Е.И. Гены синтаз оксида азота (NOS) в патогенезе сахарного диабета и его осложнений [Текст] / Е.И. Кондратьева, Т.В. Косянкова // Пробл. эндокринологии. – 2002. – Т.48, №2. – С.33-38.
21. Ланкин, В.З. Изучение аскорбат-зависимого перекисления липидов тканей при помощи теста с 2-тиобарбитуровой кислотой [Текст] / В.З. Ланкин, С.М. Гуревич, Е.Б. Бурлакова // Биоантиокислители / под ред. И.И. Иванова. – М.: Наука, 1975. – С.73-78.
22. Ланкин, В.З. Ингибирование перекисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментными системами (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза и глутатионредуктаза) при экспериментальном злокачественном росте [Текст] / В.З. Ланкин, С.М. Гуревич // Докл. АН СССР. – 1976. – Т.226, № 3. – С. 705-708.
23. Ланкин, В.З. Окисление эндогенных липидов в гомогенатах тканей животных-опухоленосителей [Текст] / В.З. Ланкин, Л.П. Михеева // Биоантиокислители. – М.: Наука, 1975. – С. 151-156.
24. Ланкин, В.З. Особенности модификации липопротеинов низкой плотности в развитии атеросклероза и сахарного диабета типа 2 [Текст] / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Е.М. Кумскова // Кардиологический вестник. – 2008. – Т. 111(XV), №1. – С. 60-67.
25. Ланкин, В.З. Свободнорадикальные процессы в норме и при заболеваниях сердечно-сосудистой системы [Текст] / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе. – М., 2000. – 60 с.
26. Ланкин, В.З. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях [Текст]: пособие для врачей / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Ю.Н. Беленков. – 2-е изд. – М.: РКНПК МЗРФ, 2001.

27. Ланкин, В.З. Свободно-радикальные процессы играют важную роль в этиологии и патогенезе атеросклероза и сахарного диабета [Текст] / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе // Кардиология. – 2016. – Т.56, № 12. – С. 97-105.
28. Ланкин, В.З. Свободнорадикальные процессы при патологии сердечно-сосудистой системы [Текст] / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Ю.Н. Беленков // Кардиология. – 2000. – Т. 40, № 7. – С. 48-61.
29. Липопротеины сыворотки крови при сахарном диабете типа 2 [Текст] / О.Н. Потеряева [и др.] // Пробл. эндокринологии. – 2003. – Т.49, №4. – С.4-8.
30. Матвеева, С.А. Особенности биотрансформации липидов у больных ишемической болезнью сердца, артериальной гипертензией, сахарным диабетом 2 типа [Текст] / С.А. Матвеева // Материалы науч. конф., посвящ. 60-летию основания Рязан. гос. мед. ун-та / под общ. ред. В.Г. Макаровой; РязГМУ. – Рязань, 2004. – Ч.1. – С.186-188.
31. Меньщикова, Е.Б. Биохимия окислительного стресса. Оксиданты и антиоксиданты [Текст] / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, С.М. Шергин. – Новосибирск, 1994. – 203 с.
32. Механизмы окислительной модификации липопротеидов низкой плотности при окислительном и карбонильном стрессе [Текст] / В.З. Ланкин [и др.] // Биохимия. – 2007. – Т. 72, № 10. – С. 1330-1341.
33. Недосугова, Л.В. Окислительный стресс при сахарном диабете типа 2 и возможности его медикаментозной коррекции [Текст]: дис. д-ра мед. наук / Л.В. Недосугова. – М., 2006.
34. О возможности исследования процессов липопероксидации в переживающих тканях [Текст] / В.З. Ланкин [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. –1981. – Т.91, № 3. – С. 327-328.
35. Окислительный стресс при атеросклерозе и диабете [Текст] / В.З. Ланкин [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2005. – Т. 140, № 7. – С. 48-51.
36. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты [Текст] / Е.Б. Меньщикова [и др.]. – М.: Слово, 2006.

37. Протасов, К.В. Атерогенная дислипидемия при сахарном диабете: патогенез, клиническая и прогностическая значимость, показатели контроля липидного обмена [Текст] / К.В. Протасов // Сибирский медицинский журнал (Иркутск) . – 2012. – №5. – С. 5-6.
38. Резцова, В.В. Метилглиоксаль и глиоксалаза при опухолевом росте и диабете [Текст] / В.В. Резцова, И.Г. Коваленко, Л.М. Берштейн // Вопр. онкологии. – 2008. – Т.54, №2. – С.142-147.
39. Роль окислительного стресса в прогрессировании атеросклероза у больных ишемической болезнью сердца в сочетании с хронической обструктивной болезнью легких [Текст] / Н.Ю. Григорьева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – № 7. –С.48-51.
40. Сахарный диабет: ангиопатии и окислительный стресс: пособие для врачей [Текст] / И.И. Дедов [и др.]. – М., 2003. – 85 с.
41. Суркова, Е.В. Сахарный диабет и центральная нервная система [Текст] / Е.В. Суркова // Терапевт. арх. – 2016. – Т.88, №10. – С. 82-86.
42. Тканевая инсулинорезистентность: степень выражения и взаимосвязь с факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний [Текст] / М.Н. Мамедов [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2000. – № 1. – С.24 -28.
43. Факторы роста и конечные продукты гликирования у больных с различными формами ишемической болезни сердца и сахарным диабетом 2-го типа [Текст] / Е. В. Иванникова [и др.] // Терапевт. арх. – 2015. – Т.87, №10. – С. 19-25.
44. Хемилюминесценция липопротеидов разных классов сыворотки крови человека [Текст] / Ю.Г. Осис [и др.] // Вопр. мед. химии. – 1982. – Т. 28, № 1. – С.122-126.
45. Яфасов, К.М. Дислипидемия при сахарном диабете 2 типа: патогенез и лечение [Текст] / К.М. Яфасов, Н.В. Дубянская // Кардиология. – 2001. – №9. – С.74-77.
46. Abdul-Ghani, Muhammad A. Pathogenesis of Insulin Resistance in Skeletal Muscle [Text] / Muhammad A. Abdul-Ghani, Ralph A. DeFronzo. // Journal of

- Biomedicine and Biotechnology. – 2010; 2010. – Article ID 476279. 19 pages.
- DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus // *Med Clin North Am.* – 2004.
47. Aebi, H. Catalase in vitro [Text] / H. Aebi // *Methods Enzymol.* – 1984. – Vol. 105. – P. 121-126.
48. Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions [Text] / K. Oörni [et al.] // *J Lipid Res.* – 2000. – Vol. 41, № 11. – P. 1703-14.
49. Aldehyde inhibition of antioxidant enzymes in the blood of diabetic patients [Text] / V.Z. Lankin [et al.] // *J. Diabetes.* – 2016. – Vol. 8, № 3. – P. 398-404. 131
50. Aldehyde-dependent modification of low density lipoproteins [Text] / V.Z. Lankin [et al.] // *Handbook of Lipoprotein Research.* – N.Y.: NOVA Sci.Publish., 2010. – P. 85-107.
51. Allin, K.H. Mechanisms in endocrinology: gut microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus [Text] / K.H. Allin, T. Nielsen, O. Pedersen // *Eur. J. Endocrinol.* – 2015. – Vol. 172. – P. 167–77.
52. Analysis of association among clinical features and shorter leukocyte telomere length in mitochondrial diabetes with m.3243A>G mitochondrial DNA mutation [Text] / M.C. Zhou [et al.] // *BMC Med. Genet.* – 2015. – Vol. 16, № 1. – P. 92. doi: 10.1186/s12881-015-0238-2.
53. Antioxidant and regulatory role of mitochondrial uncoupling protein UCP2 in pancreatic beta-cells [Text] / P. Ježek [et al.] // *Physiol Res.* – 2014. – Vol. 63 (Suppl 1). – P. S73-91.
54. Antioxidants and diabetes mellitus: review of the evidence [Text] / C. Cuerda [et al.] // *Nutr Hosp.* – 2011. – Vol. 26, № 1. – P. 68-78.
55. Apolipoprotein B-bound lipids as a marker for evaluation of low density lipoprotein oxidation in vivo [Text] / V.V. Tertov [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1995. – Vol. 214, № 2. – P. 608-613.

56. Association of telomere length with type 2 diabetes, oxidative stress and UCP2 gene variation [Text] / K.D. Salpea [et al.] // *Atherosclerosis*. – 2010. – Vol. 209, № 1. – P. 42-50.
57. Aubert, G. Telomere length measurement – Caveats and a critical assessment of the available technologies and tools [Text] / G. Aubert, M. Hills, P.M. Lansdorp // *Mutation Research*. – 2012. – Vol. 730. – P. 59–67.
58. Aviv, A. Telomeres and human aging: facts and fibs [Text] / A. Aviv // *Sci Aging Knowledge Environ*. – 2004. – Vol. 51. – P. 43.
59. Ayala, A. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal [Text] / A. Ayala, M.F. Muñoz, S. Argüelles // *Oxid Med Cell Longev*. – 2014; 2014. – P. 360438.
60. Bays, H. Role of the adipocytes, FFA, and ectopic fat in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: PPAR agonists provide a rational therapeutic approach [Text] / H. Bays, L. Mandarino, R.A. DeFronzo // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2004. – Vol. 89. – P. 463–478.
61. Beauchamp, C. Superoxide dismutase improved assays and assay applicable to acrylamide gels [Text] / C. Beauchamp, J. Fridovich // *Analyt. Biochem*. – 1971. – Vol. 44. – P. 276-287.
62. Beisswenger, P. Metformin inhibition of glycation processes [Text] / P. Beisswenger, D. Ruggiero-Lopez // *Diabetes Metab*. – 2003. – Vol. 29, № 4 (Pt 2). – P. 6S95-103.
63. Biophysical and biochemical studies on glycoxidatively modified human low density lipoprotein [Text] / M. Abidi [et al.] // *Arch Biochem Biophys*. – 2018. – Vol. 645. – P. 87-99. [https://doi: 10.1016/j.abb.2018.02.019](https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.02.019). Epub 2018 Mar 8.
64. Blackard, W.G. Down regulation of insulin receptors [Text] / W.G. Blackard, P. S. Guzelian, E. E. Small // *Trans Am Clin Climatol Assoc*. – 1979. – Vol. 90. – P. 94–101.
65. Brown, Audrey E. Genetics of Insulin Resistance and the Metabolic Syndrome [Text] / Audrey E. Brown, Mark Walker // *Curr Cardiol Rep*. – 2016. – Vol. 18. – P. 75.

66. Brownlee, M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging [Text] / M. Brownlee // *Ann. Rev. Med.* – 1996. – Vol. 46. – P. 223-234.
67. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications [Text] / M. Brownlee // *Nature*. – 2001. – Vol. 414. – P. 813-820.
68. Buchanan, T.A. Pancreatic beta-cell loss and preservation in type 2 diabetes [Text] / T.A. Buchanan // *Clin Ther.* – 2003. – Vol. 25 (Suppl B). – P. B32-B46.
69. Burcelin, R. Γ III-1-Based Strategies: A Physiological Analysis of Differential Mode of Action [Text] / R. Burcelin, P. Gourdy, S. Dalle // *Physiology*. – 2014. – Vol. 29. – P. 108–21.
70. Cakatay, U. Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control [Text] / U. Cakatay // *Diabetes Metab.* – 2005. – Vol. 31, № 6. – P. 551-557.
71. Carbonyl stress and schizophrenia [Text] / M. Arai [et al.] // *Psychiatry Clin Neurosci.* – 2014. – Vol. 68, № 9. – P. 655-65.
72. Cardiac disease in diabetic end-stage renal disease [Text] / R.N. Foley [et al.] // *Diabetologia*. – 1997. – Vol. 40. – P. 1307-1312.
73. Carvalho, B.M. Influence of gut microbiota on subclinical inflammation and insulin resistance [Text] / B.M. Carvalho, M.J. Saad // *Mediators Inflamm.* – 2013;2013. – P. 986734.
74. Cawthon, R.M. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method [Text] / R.M. Cawthon // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – Vol.37, №3. – P. e21.
75. Cheng, T.O. Rising incidence of coronary artery disease in China in parallel with rising 'normal' plasma cholesterol levels [Text] / T.O. Cheng // *Atherosclerosis*. – 2004. – Vol. 173, № 2. – P. 371.
76. Cholesterol-rich low density lipoproteins are also more oxidized [Text] / V. Lankin [et al.] // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 2011. – Vol. 355, № 1-2. – P. 187-191.

77. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells [Text] / D.J. Kurz [et al.] // *J. Cell. Sci.* – 2004. – Vol. 117 (Pt 11). – P. 2417-2426.
78. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress [Text] / J. Frijhoff [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* – 2015. – Vol. 23, № 14. – P. 1144-70.
79. Codrenu, S.G. Analysis of protein damage by the lipidelectrophyle 4-hydroxy-2-nonenal [Text] / S.G. Codrenu // *Mol. Cell. Proteomics.* – 2009. – Vol. 8. – P. 670-680.
80. Csányi, Gábor, Jr. Oxidative Stress in Cardiovascular Disease [Text] / Gábor Csányi, Jr., J.M. Francis // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2014. – Vol. 15, № 4. – P. 6002-6008.
81. Cytoprotective Effects of Pumpkin (*Cucurbita Moschata*) Fruit Extract against Oxidative Stress and Carbonyl Stress [Text] / R. Shayesteh [et al.] // *Drug Res (Stuttg)* . – 2017. – Vol. 67, № 10. – P. 576-582. <https://doi: 10.1055/s-0043-110484>. Epub 2017 Jun 6.
82. Davydov, V. V. Possible role of aldehydes scavenger enzymes during aging [Text] / V. V. Davydov, N. M. Dobaeva, A. I. Bozhkov // *Exp. Gerontol.* – 2004. – Vol. 39. – P. 11-16.
83. DeFronzo, R.A. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus [Text] / R.A. DeFronzo // *Diabetes.* – 2009. – Vol. 58. – P. 773–95.
84. DeFronzo, R.A. Dysfunctional fat cells, lipotoxicity, and type 2 diabetes [Text] / R.A. DeFronzo // *Int J Clin Pract Suppl.* – 2004. – Vol.143. – P. 9– 21.
85. DeFronzo, R.A. From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus [Text] / Ralph A. DeFronzo // *Diabetes.* – 2009. – Vol. 58, № 4. – P. 773–795.
86. De Fronzo, R.A. Pathophysiologic Approach to Therapy in Patients With Newly Diagnosed Type 2 Diabetes [Text] / R.A. DeFronzo, R. Eldor, M. Abdul-Ghani // *Diabetes care.* – 2013. – Vol. 36 (Suppl. 2). – P. S127–S138.

87. DeFronzo, R.A. The role of the kidneys in glucose homeostasis: a new path towards normalizing glycaemia [Text] / R.A. DeFronzo, J.A. Davidson, S. Del Prato // *Diabetes Obes. Metab.* – 2012. – Vol. 14. – P. 5–14.
88. Dhule, Sunita. Platelet aggregation and clotting time in type 2 diabetic males [Text] / Sunita Dhule, Swati Gawali // *Natl J Physiol Pharm Pharmacol.* – 2014. – Vol. 4, № 2. – P. 121-123.
89. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part 1 [Text] / F. Paneni [et al.] // *Eur Heart J.* – 2013. – Vol. 34. – P. 2436–2443.
90. Diabetes and the brain: oxidative stress, inflammation, and autophagy [Text] / M. Muriach [et al.] // *Oxid Med Cell Longev.* – 2014; 2014. – P. 102158.
91. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial [Text] / J. Stamler [et al.] // *Diabetes care.* – 1993. – Vol. 16, № 2. – P. 434-444.
92. Diabetes, prediabetes and cardiovascular risk [Text] / L.G. Mellbin [et al.] // *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* – 2010. – Vol. 17. – P. S9–S14.
93. Diabetic Cardiovascular Disease Induced by Oxidative Stress [Text] / Y. Kayama [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2015. – Vol. 16, № 10. – P. 25234-63.
94. Dicarbonyl stress and glyoxalase enzyme system regulation in human skeletal muscle [Text] / J.T. Mey [et al.] // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2018. – Vol. 314, № 2. – P. R181-R190. [https://doi: 10.1152/ajpregu.00159.2017](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00159.2017). Epub 2017 Oct 18.
95. Distribution and correlates of lipoproteins and their subclasses in black and white young adults. The Bogalusa Heart Study [Text] / S.R. Srinivasan [et al.] // *Atherosclerosis.* – 2001. – Vol. 59, № 2. – P. 391-7.
96. Donato, H. Lipid peroxidation, cross-linking reactions, and aging [Text] / H. Donato // *Age pigments* / ed.: R.S. Sohal. – Amsterdam etc.: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981. – P. 63-81.

97. Drucker, D.J. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes [Text] / D.J. Drucker, M.A. Nauck // *Lancet*. – 2006. – Vol. 368. – P. 1696–1705.
98. Dunning, B. Alpha cell function in health and disease: influence of glucagon-like peptide-1 [Text] / B. Dunning, J.E. Foley, B. Ahrén // *Diabetologia*. – 2005. – Vol. 48, № 9. – P. 1700-1713.
99. Effects of the Reactive Metabolite Methylglyoxal on Cellular Signalling, Insulin Action and Metabolism - What We Know in Mammals and What We Can Learn From Yeast [Text] / J. Zemva [et al.] // *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. – 2018. – Feb 8. [https://doi: 10.1055/s-0043-122382](https://doi:10.1055/s-0043-122382).
100. Effects of vitamin E and glutathione on glucose metabolism: role of magnesium [Text] / M. Barbagallo [et al.] // *Hypertension*. – 1999. – Vol. 34, № 4 (Pt 2). – P. 1002-6.
101. Effects of vitamin E on cardiovascular outcomes in people with mild-to-moderate renal insufficiency: results of the HOPE study [Text] / J.F. Mann [et al.]; HOPE Investigators // *Kidney Int*. – 2004. – Vol. 65, № 4. – P. 1375-80.
102. Elliott, T.G. Relationship between insulin resistance and coronary heart disease in diabetes mellitus and the general population: a critical appraisal [Text] / T.G. Elliott, G. Viberti // *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab*. – 1993. – Vol. 7. – P. 1079-1103.
103. Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity [Text] / Wineke Bakker [et al.] // *Cell and Tissue Research*. – 2009. – Vol. 165. DOI: 10.1007/s00441-008-0685-6.
104. Evaluation of urinary 8-hydroxydeoxy-guanosine as a novel biomarker of macrovascular complications in type 2 diabetes [Text] / T. Nishikawa [et al.] // *Diabetes Care*. – 2003. – Vol. 26, № 5. – P. 1507-12.
105. Evans, M.D. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids [Text] / M.D. Evans, M.S. Cooke // *Bioessays*. – 2004. – Vol. 26, № 5. – P. 533-542. doi: 10.1002/bies.20027.

106. Free Radicals in Biology and Medicine [Text] / eds.: B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. – 5th edition. – Oxford University Press, 2015.
107. Freeman, J.S. The pathophysiologic role of incretins [Text] / J.S. Freeman // J Am Osteopath Assoc. – 2007. – Vol. 107 (Suppl). – P. S6-S9.
108. Fyhrquist, F. The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease [Text] / F. Fyhrquist, O. Saijonmaa, T. Strandberg // Nat. Rev. Cardiol. – 2013. – Vol.10. – P. 274–83.
109. Genetic syndromes of severe insulin resistance [Text] / R.K. Semple [et al.] // Endocr Rev. – 2011. – Vol. 32, № 4. – P. 498-514.
110. Glucagon dose response curve for hepatic glucose production and glucose disposal in type 2 diabetic patients and normal individuals [Text] / M. Matsuda [et al.] // Metabolism. – 2002. – Vol. 51. – P. 1111– 1119.
111. Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non–insulin-dependent diabetes [Text] / H. Rahmoune [et al.] // Diabetes. – 2005. – Vol. 54. – P. 3427– 3434.
112. Glucose-dependent insulintropic polypeptide: a bifunctional glucose-dependent regulator of glucagon and insulin secretion in humans [Text] / M. Christensen [et al.] // Diabetes. – 2011. – Vol. 60. – P. 3103–109.
113. Greider, C.W. Regulating telomere length from the inside out: the replication fork model [Text] / C.W. Greider // Genes Dev. – 2016. – Vol. 30, № 13. – P. 1483-91.
114. Hadi, A.R. Hadi. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus [Text] / Hadi A.R. Hadi, Jassim A.L. Suwaidi // Vascular Health and Risk Management. – 2007. – Vol. 3, № 6. – P. 853–876.
115. Halliwell, B. Free radicals, oxygen toxicity and aging [Text] / B. Halliwell // Age pigments / ed.: R.S. Sohal. – Amsterdam etc.: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981. – P. 2-62.
116. Halliwell, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease [Text] / B. Halliwell // Am. J. Medicine. – 1991. – Vol. 91(Suppl.3C). – P. 14S-22S.

117. High-density lipoprotein impedes glycation of low-density lipoprotein [Text] / Nahla N. Younis [et al.] // *Diabetes and Vascular Disease Research*. – 2013. – Vol. 10. – P. 152.
118. Hu, M.L. Measurements of protein thiol groups and glutathione in plasma [Text] / M.L. Hu // *Methods Enzymology*. – 1994. – Vol. 233. – P.381-385.
119. Hyperglycemia impairs proteasome function by methylglyoxal [Text] / M.A. Queisser [et al.] // *Diabetes*. – 2010. – Vol. 59, № 3. – P. 670-8. doi: 10.2337/db08-1565. Epub 2009 Dec 15.
120. Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases [Text] / T.V. Fiorentino [et al.] // *Curr Pharm Des*. – 2013. – Vol. 19, № 32. – P. 5695-703.
121. IDF diabetes atlas [Text] – 7th edition. – 2015. – URL: diabetesatlas.org
122. IDF diabetes atlas [Text]. – 8th edition. – 2017. – URL: diabetesatlas.org
123. Impact of carbonylation on glutathione peroxidase-1 activity in human hyperglycemic endothelial cells [Text] / C.S. Sultan [et al.] // *Redox Biol*. – 2018. – Vol. 16. – P. 113-122. [https://doi: 10.1016/j.redox.2018.02.018](https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.02.018). Epub 2018 Mar 1.
124. Increased DNA dicarbonyl glycation and oxidation markers in patients with type 2 diabetes and link to diabetic nephropathy [Text] / S. Waris [et al.] // *J Diabetes Res*. – 2015;2015. – Article ID 915486. 10 pages. <https://doi.org/10.1155/2015/915486>
125. Influence of dicarbonyls on kinetic characteristics of glutathione peroxidase [Text] / V.Z. Lankin [et al.] // *Dokl Biochem Biophys*. – 2017. – Vol. 475, № 1. – P. 287-290. doi: 10.1134/S1607672917040123. Epub 2017 Sep 2.
126. Influence of duration of diabetes, glycemic control, and traditional cardiovascular risk factors on early atherosclerotic vascular changes in adolescents and young adults with type 2 diabetes mellitus [Text] / A.S. Shah [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2009. – Vol. 94, № 10. – P. 3740-3745.
127. Inouye, M. Dicarboxylic acids as markers of fatty acid peroxidation in diabetes [Text] / M. Inouye, T. Mio, K. Sumino // *Atherosclerosis*. – 2000. – Vol. 148. – P. 197-202.

128. Insulin-mediated suppression of lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle of obese type 2 diabetic men and men with normal glucose tolerance [Text] / J.W. Jocken [et al.] // *Diabetologia*. – 2013. – Vol. 56, № 10. – P. 2255-65.
129. Interplay of oxidative, nitrosative/nitrative stress, inflammation, cell death and autophagy in diabetic cardiomyopathy [Text] / Z.V. Varga [et al.] // *Biochim Biophys Acta*. – 2015. – Vol. 1852, № 2. – P. 232-42.
130. Ishii, H. Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus [Text] / H. Ishii, K. Daisuke, G.L. King // *J. Mol. Med.* – 1998. – Vol. 76. – P. 21-31.
131. Kelley, D. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination [Text] / D. Kelley, L.J. Mandarino // *Diabetes*. – 2000. – Vol. 49. – P. 677– 683.
132. Kennedy, A. Glication, oxidation, and lipoxidation in the development of diabetic complications [Text] A. / Kennedy, T. Lions // *Metabolism*. – 1997. – Vol. 46, № 12 (Suppl. 1).
133. Krssak, Martin. Alterations in Postprandial Hepatic Glycogen Metabolism in Type 2 Diabetes [Text] / Martin Krssak // *Diabetes*. – 2004. – Vol. 53, № 12. – P. 3048-3056.
134. Lankin, V. The enzymatic systems in the regulation of free radical lipid peroxidation [Text] / V. Lankin // *Free Radicals, Nitric Oxide, and Inflammation: Molecular, Biochemical, and Clinical Aspects*. – Amsterdam etc.: IOS Press, 2003. – Vol. 344. – P. 8-23. – (NATO Science Series).
135. Lankin, V.Z. Free radical lipoperoxidation during atherosclerosis and antioxidative therapy of this disease [Text] / V.Z. Lankin, A.K. Tikhaze // *Free Radicals, Nitric Oxide, and Inflammation: Molecular, Biochemical, and Clinical Aspects* / eds.: A. Tomasi [et al.]. – Amsterdam etc.: IOS Press, 2003. – Vol.344. – P. 218-231. – (NATO Science Series).
136. Lankin, V.Z. Free Radical Processes Play an Important Role in the Etiology and Pathogenesis of Atherosclerosis and Diabetes [Text] / V.Z. Lankin, A.K. Tikhaze // *Kardiologija*. – 2016. – Vol. 56, № 12. – P. 97-105.

137. Lankin, V.Z. Role of Oxidative Stress in the Genesis of Atherosclerosis and Diabetes Mellitus: A Personal Look Back on 50 Years of Research [Text] / V.Z. Lankin, A.K. Tikhaze // *Curr Aging Sci.* – 2017. – Vol. 10, № 1. – P. 18-25. doi: 10.2174/1874609809666160926142640
138. Leukocyte telomere length in the Finnish Diabetes Prevention Study [Text] / I. Hovatta [et al.] // *PLoS ONE.* – 2012. – Vol. 7, № 4. – P. e34948.
139. Lindgren, F.T. Preparative ultracentrifugal laboratory procedure suggestions for lipoprotein analysis [Text] / F.T. Lindgren // *Analysis of Lipids and Lipoproteins.* – NY: Champaign, 1975. – P. 204-224.
140. Luther, J.M. Effects of aldosterone on insulin sensitivity and secretion [Text] / J.M. Luther // *Steroids.* – 2014. – Vol. 91. – P. 54-60.
141. Maiese, K. New Insights for Oxidative Stress and Diabetes Mellitus [Text] / K. Maiese // *Oxid Med Cell Longev.* – 2015; 2015. – P. 875961.
142. Maiese, K. Programming apoptosis and autophagy with novel approaches for diabetes mellitus [Text] / K. Maiese // *Curr Neurovasc Res.* – 2015. – Vol. 12, № 2. – P. 173-88.
143. Malonyldialdehyde and glyoxal act differently on low-density lipoproteins and endotheliocytes [Text] / Elena M. Kumskova [et al.] // *Molecular and Cellular Biochemistry.* – 2014. – Vol. 396, Issue 1–2. – P. 79–85.
144. Mean leukocyte telomere length shortening and type 2 diabetes mellitus: a case-control study [Text] / R.Y. Zee [et al.] // *Transl. Res.* – 2010. – Vol. 155, № 4. – P. 166-169.
145. Mechanisms and pharmacology of diabetic neuropathy – experimental and clinical studies [Text] / M.Zychowska [et al.] // *Pharmacological Reports.* – 2013. – Vol. 65. – P. 1601-1610.
146. Mechanisms of Oxidative Modification of Low Density Lipoproteins under Conditions of Oxidative and Carbonyl Stress [Text] / V.Z. Lankin [et al.] // *Biohimiya = Biochemistry (Mosc).* – 2007. – Vol. 72, № 10. – P. 1081-1090. (In Russ.)

147. Mertens, A. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis [Text] / A. Mertens, P. Holvoet // *FASEB J.* – 2001. – Vol. 15, № 12. – P. 2073-84.
148. Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes [Text] / P.J. Beisswenger [et al.] // *Diabetes.* – 1999. – Vol. 48. – P. 198-202.
149. Mihoub, M. Protein Repair from Glycation by Glyoxals by the DJ-1 Family Maillard Deglycases [Text] / M. Mihoub, J. Abdallah, G. Richarme // *Adv Exp Med Biol.* – 2017. – Vol. 1037. – P. 133-147. [https://doi: 10.1007/978-981-10-6583-5_9](https://doi.org/10.1007/978-981-10-6583-5_9).
150. Monocyte telomere shortening and oxidative DNA damage in type 2 diabetes [Text] / M.J. Sampson [et al.] // *Diabetes Care.* – 2006. – Vol. 29, № 2. – P. 283-289.
151. Montane, J. Stress and the inflammatory process: a major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes [Text] / J. Montane, L. Cadavez, A. Novials // *Diabetes Metab Syndr Obes.* – 2014. – Vol. 7. – P. 25-34.
152. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction [Text] / S.M. Haffner [et al.] // *N Engl J Med.* – 1998. – Vol. 339. – P. 229–234.
153. Mulder, H. Is shortening of telomeres the missing link between aging and the Type 2 Diabetes epidemic? [Text] / H. Mulder // *Aging (Albany NY).* – 2010. – Vol. 2, № 10. – P. 634-636.
154. Multimarker screening of oxidative stress in aging [Text] / K. Syslová [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2014. – ID562860.
155. Muoio, D.M. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes [Text] / D.M. Muoio, C.B. Newgard // *Nature reviews molecular cell biology.* – 2008. – Vol. 9. – P. 193–205.
156. N-(3-methylpyridinium) lysine, a mayor product generated in acrolein – modified protein [Text] / A. Furuhashi [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 49. – P. 48658-48665.
157. Nonenzymatic glycation impairs the antiinflammatory properties of apolipoprotein A-I [Text] / E. Nobecourt [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* –

2010. – Vol. 30, № 4. – P. 766-72. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.201715. Epub 2010 Jan 28.

158. O'Brein, P.J. Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health [Text] / P.J. O'Brein, A.G. Siraki, N. Shangari // Clin. Rev. Toxicol. – 2005. – Vol. 5. – P. 669-662.

159. Oberley, L.W. Free radicals and diabetes [Text] / L.W. Oberley // Free Radic Biol Med. – 1988. – Vol. 5, № 2. – P. 113-124.

160. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control [Text] / A. Aydin [et al.] // Clin Biochem. – 2001. – Vol. 34, № 1. – P. 65-70.

161. Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications [Text] / D. Pitocco [et al.] // Int J Mol Sci. – 2013. – Vol. 14, № 11. – P. 21525-50.

162. Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies [Text] / A.C. Montezano [et al.] // Can J Cardiol. – 2015. – Vol. 31, № 5. – P. 631-41.

163. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes [Text] / D. Pitocco [et al.] // Rev Diabet Stud. – 2010. – Vol. 7, № 1. – P. 15-25.

164. Oxidative stress-related biomarkers in essential hypertension and ischemia-reperfusion myocardial damage [Text] / R. Rodrigo [et al.] // Disease Markers. – 2013. – Vol. 35, № 6. – P. 773-90.

165. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies [Text] / V. Rani [et al.] // Life Sci. – 2016. – Vol. 148. – P. 183-93.

166. Paglia, D.E. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase [Text] / D.E. Paglia, W.N. Valentine // J. Lab. Clin. Med. – 1967. – Vol. 70, № 1. – P.158-167.

167. Pasaoglu, H. Lipid peroxidation and resistance to oxidation in patients with type 2 diabetes mellitus [Text] / H. Pasaoglu, B. Sancak, N. Bukan // Tohoku J Exp Med. – 2004. – Vol. 203, № 3. – P. 211-8.

168. Pathogenesis of prediabetes: role of the liver in isolated fasting hyperglycemia and combined fasting and postprandial hyperglycemia [Text] / R. Basu [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2013. – Vol. 98, № 3. – P. 2012-3056.
169. Physiological and pharmacological mechanisms through which the DPP-4 inhibitor sitagliptin regulates glycemia in mice [Text] / A. Waget [et al.] // *Endocrinology.* – 2011. – Vol.152, № 8. – P. 3018–29.
170. Piarulli, F. Glyco-oxidation and cardiovascular complications in type 2 diabetes: a clinical update [Text] / F. Piarulli, G. Sartore, A. Lapolla // *Acta Diabetol.* – 2013. – Vol. 50, № 2. – P. 101-10.
171. Piarulli, Francesco. Glyco-oxidation and cardiovascular complications in type 2 diabetes: a clinical update [Text] / Francesco Piarulli, Giovanni Sartore, Annunziata Lapolla // *Acta Diabetol.* – 2013. – Vol. 50, № 2. – P. 101–110.
172. Piconi, L. Oxidative stress in diabetes [Text] / L. Piconi, L. Quagliaro, A. Ceriello // *Clin Chem Lab Med.* – 2003. – Vol. 41, № 9. – P. 1144-1149.
173. Pinzón, H.S. A systematic review of observational studies on oxidative/nitrosative stress involvement in dengue pathogenesis [Text] / H.S. Pinzón, N. Alvis-Guzman // *Colomb Med (Cali).* – 2015. – Vol. 46, № 3. – P. 135-43.
174. Pisoschi, A.M. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review [Text] / A.M. Pisoschi, A. Pop // *Eur J Med Chem.* – 2015. – Vol. 97. – P. 55-74.
175. Podrez, E.A. Anti-oxidant properties of high-density lipoprotein and atherosclerosis [Text] / E.A. Podrez // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* – 2010. – Vol. 37, № 7. – P. 719-25. doi: 10.1111/j.1440-1681.2010.05380.x.
176. Protective effect of thymoquinone on glucose or methylglyoxal-induced glycation of superoxide dismutase [Text] / M.A. Khan [et al.] // *Int J biol macromol.* – 2014. – Vol. 65. – P. 16-20. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.01.001>
177. Protein measurement with the Folin phenol reagent [Text] / O.H. Lowry [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265-275.

178. Purified anthocyanin supplementation reduces dyslipidemia, enhances antioxidant capacity, and prevents insulin resistance in diabetic patients [Text] / D. Li [et al.] // *J Nutr.* – 2015. – Vol. 145, № 4. – P. 742-8. doi: 10.3945/jn.114.205674
179. Reactive oxygen species: from health to disease [Text] / K. Brieger [et al.] // *Swiss Med Wkly.* – 2012. – Vol. 142. – P. w13659.
180. Relationship between plasma glycation with membrane modification, oxidative stress and expression of glucose transporter-1 in type 2 diabetes patients with vascular complications [Text] / K.A. Adeshara [et al.] // *J Diabetes Complications.* – 2017. – Vol. 31, № 2. – P. 439-448. [https://doi: 10.1016/j.jdiacomp.2016.10.012](https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2016.10.012). Epub 2016 Oct 17.
181. Renal Effects of SGLT-2 Inhibitors and Other Anti-diabetic Drugs: Clinical Relevance and Potential Risks [Text] / E. Lioudaki [et al.] // *Clin Pharmacol Ther.* – 2017. – Vol. 102, № 3. – P. 470-480.
182. Robson, R. Oxidative stress biomarkers in type 2 diabetes mellitus for assessment of cardiovascular disease risk [Text] / R. Robson, A.R. Kundur, I. Singh // *Diabetes Metab Syndr.* – 2017. – Dec 30. pii: S1871-4021(17)30465-4.
183. Role of advanced glycation products in cellular signaling [Text] / C. Ott [et al.] // *Redox Biol.* – 2014. – Vol. 2. – P. 411-29.
184. Role of small dense low-density lipoprotein in coronary artery disease patients with normal plasma cholesterol levels [Text] / S. Koba [et al.] // *J Cardiol.* – 2000. – Vol. 36, № 6. – P. 371-8.
185. Ruskovska, T. Oxidative stress and protein carbonylation in adipose tissue - implications for insulin resistance and diabetes mellitus [Text] / T. Ruskovska, D.A. Bernlohr // *J Proteomics.* – 2013. – Vol. 92. – P. 323-34.
186. Sarkar, P. Comparative analysis of different dietary antioxidants on oxidative stress pathway genes in L6 myotubes under oxidative stress [Text] / P. Sarkar, A. Bhowmick, S. Banu // *Cytotechnology.* – 2018. – Mar 14. [https://doi: 10.1007/s10616-018-0209-5](https://doi.org/10.1007/s10616-018-0209-5).

187. Serum lipoproteins, lipid peroxides and prostacycline biosynthesis in patients with coronary heart disease [Text] / A. Szczeklik [et al.] // *Prostaglandins*. – 1981. – Vol. 22. – P. 795-807.
188. Short telomeres are associated with increased carotid atherosclerosis in hypertensive subjects [Text] / A. Benetos [et al.] // *Hypertension*. – 2004. – Vol. 43, № 2. – P. 182-185.
189. Slatter, D.A. Bailey Identification of a new cross-link and unique histidine adduct from bovine serum albumin incubated with malondialdehyde [Text] / D.A. Slatter, N.C. Avery // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 1. – P. 61-69.
190. Stocker, R. Role of oxidative modifications in atherosclerosis [Text] / R. Stocker, J.F. Keaney Jr. // *Physiol Rev.* – 2004. – Vol. 84, № 4. – P. 1381-478.
191. Structural basis for the recognition of oxidized phospholipids in oxidized low density lipoproteins by class B scavenger receptors CD36 and SR-BI [Text] / D. Gao [et al.] // *J Biol Chem.* – 2010. – Vol. 285, № 7. – P. 4447-54. doi: 10.1074/jbc.M109.082800. Epub 2009 Dec 8.
192. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins [Text] / J.P. Segrest [et al.] // *J Lipid Res.* – 2001. – Vol. 42, № 9. – P. 1346-67.
193. Superoxide formation as a result of interaction of L-lysine with dicarbonyl compounds and its possible mechanism [Text] / K.B. Shumaev [et al.] // *Biochemistry (Moscow)*. – 2009. – Vol. 74, № 4. – P. 461–466.
194. Suzuki, D. Carbonyl stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy [Text] / D. Suzuki, T. Miyata // *Intern Med.* – 1999. – Vol. 38, № 4. – P. 309-14.
195. Tai, N. The role of gut microbiota in the development of type 1, type 2 diabetes mellitus and obesity [Text] / N. Tai, F.S. Wong, L. Wen // *Rev. Endocr. Metab. Disord.* – 2015. – Vol. 16. – P. 55–65.
196. Tangvarasittichai, S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus [Text] / S. Tangvarasittichai // *World J Diabetes.* – 2015. – Vol. 6, № 3. – P. 456-80.
197. Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities [Text] / C.H. Chen [et al.] // *Physiol Rev.* – 2014. – Vol. 94, № 1. – P. 1-34.

198. Telomere length and type 2 diabetes in males: a premature aging syndrome [Text] / B. Murillo-Ortiz [et al.] // *Aging Male*. – 2012. – Vol. 15, № 1. – P. 54-58.
199. Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? [Text] / J.M. Houben [et al.] // *Free Radic Biol Med*. – 2008. – Vol. 44, № 3. – P. 235-246.
200. Telomere length attrition, a marker of biological senescence, is inversely correlated with triglycerides and cholesterol in South Asian males with type 2 diabetes mellitus [Text] / A.L. Harte [et al.] // *Exp. Diabetes Res*. – 2012; 2012. – P. 895185.
201. Telomere shortening in atherosclerosis [Text] / N.J. Samani [et al.] // *The Lancet*. – 2001. – Vol. 358 (9280). – P. 472-473.
202. The contributions of fasting and postprandial blood glucose increments to oxidative stress and inflammation in dyslipidemic type 2 diabetic patients with stable ischemic heart disease [Text] / B. Djindjic [et al.] // *Int J Cardiol*. – 2017. – Vol. 227. – P. 611-616. <https://doi:10.1016/j.ijcard.2016.10.089>. Epub 2016 Oct 31.
203. The Effect of Natural Dicarboxyls on Activity of Antioxidant Enzymes in Vitro and in Vivo [Text] / V.Z. Lankin [et al.] // *Biomedical Chemistry*. – 2012. – Vol. 6, № 1. – P. 81-86.
204. The Influence of Glucose on the Free Radical Peroxidation of Low Density Lipoproteins in Vitro and in Vivo [Text] / V.Z. Lankin [et al.] // *Biomedical Chemistry*. – 2011. – Vol. 5, № 3. – P. 284-292.
205. The initiation of free radical peroxidation of low-density lipoproteins by glucose and its metabolite methylglyoxal: a common molecular mechanism of vascular wall injury in atherosclerosis and diabetes [Text] / V. Lankin [et al.] // *Mol. Cell.Biochem*. – 2014. – Vol. 395, № 1-2. – P. 241-252.
206. The relationship between diet quality and insulin resistance in obese children: adaptation of the Healthy Lifestyle-Diet Index in Turkey [Text] / Y. Ertaş Öztürk [et al.] // *J Pediatr Endocrinol Metab*. – 2018. – Mar 1.
207. The short-term effects of soybean intake on oxidative and carbonyl stress in men and women [Text] / P. Celec [et al.] // *Molecules*. – 2013. – Vol. 18, № 5. – P. 5190-5200.

208. The Time Is Right for a New Classification System for Diabetes: Rationale and Implications of the β -Cell-Centric Classification Schema [Text] / S.S. Schwartz [et al.] // *Diabetes Care*. – 2016. – Vol. 39. – P. 179–186.
209. Thioredoxin-interacting protein mediates ER stress-induced β cell death through initiation of the inflammasome [Text] / C.M. Osowski [et al.] // *Cell. Metab.* – 2012. – Vol. 16. – P. 265–73.
210. Turk, Z. Glycotoxines, carbonyl stress and relevance to diabetes and its complications [Text] / Z. Turk // *Physiol Res*. – 2010. – Vol. 59, № 2. – P. 147-56.
211. Understanding the role of gut microbiome in metabolic disease risk [Text] / Y. Sanz [et al.] // *Pediatric. Res*. – 2015. – Vol. 77. – P. 236–44.
212. von Zglinicki, T. Oxidative stress shortens telomeres [Text] / T. von Zglinicki // *Trends Biochem. Sci.* – 2002. – Vol. 27, № 7. – P. 339-344.
213. Wang, J.C. Aging and Atherosclerosis: Mechanisms, Functional Consequences, and Potential Therapeutics for Cellular Senescence [Text] / J.C. Wang, M. Bennett // *Circ Res*. – 2012. – Vol. 111. – P. 245-259.
214. Williams, K.J. Lipoprotein retention--and clues for atheroma regression [Text] / K.J. Williams, Tabas I. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2005. – Vol. 25, № 8. – P. 1536-40.
215. Witz, G. Biological interactions of α,β -unsaturated aldehydes [Text] / G. Witz // *Free Radic. Biol. & Med.* – 1989. – Vol. 7. – P. 333-349.
216. β -Cell Failure in Type 2 Diabetes: Postulated Mechanisms and Prospects for Prevention and Treatment [Text] / Philippe A. Halban [et al.] // *Diabetes Care*. – 2014. – Vol. 37, № 6. – P. 1751-1758.