

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБЩЕОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
ЧИТИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРОБЛЕМ ЗДОРОВЬЯ СЕМЬИ И
РЕПРОДУКЦИИ ЧЕЛОВЕКА»

На правах рукописи

ШЕМЯКИНА НАДЕЖДА АНАТОЛЬЕВНА

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАРБОНИЛЬНОГО
СТРЕССА И СОСТОЯНИЯ ТИОЛ-ДИСУЛЬФИДНОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ
САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА С МАКРОАНГИОПАТИЕЙ НИЖНИХ
КОНЕЧНОСТЕЙ И СПОСОБЫ ИХ КОРРЕКЦИИ

14.03.03 - Патологическая физиология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Намоконов Е.В.

Научный консультант:

доктор биологических наук

Даренская М.А.

ЧИТА – 2017 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. Современные представления о молекулярных механизмах развития макроангиопатий при сахарном диабете 2 типа и способах их коррекции. Обзор литературы	15
1.1 Некоторые аспекты патогенеза сосудистых осложнений сахарного диабета 2 типа	15
1.2 Механизмы развития окислительного и карбонильного стрессов при сахарном диабете 2 типа, осложненном макроангиопатиями	21
1.3 Маркеры карбонильного стресса при сахарном диабете 2 типа	27
1.4 Компоненты тиол-дисульфидной системы в норме и при развитии патологических состояний	30
1.5 Использование препаратов липоевой кислоты в терапии сосудистых осложнений сахарного диабета 2 типа, как регуляторов метаболических процессов	36
1.6 Некоторые плеiotропные эффекты N-ацетилцистеина	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1. Клиническая характеристика обследованных лиц и проводимой фармакотерапии	43
2.2. Методы исследования	48
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	54
3.1. Закономерности изменений показателей карбонильного стресса и состояния тиол-дисульфидной системы у мужчин с СД 2 типа и макроангиопатией нижних	

конечностей	54
3.2. Динамика изменения показателей карбонильного стресса и концентрации аминотиолов у мужчин с макроангиопатией нижних конечностей на фоне лечения α - липоевой кислотой	62
3.3. Особенности состояния тиол-дисульфидной системы и изменения концентрации уровня конечных продуктов гликирования на фоне проведения консервативной терапии с включением НАС	67
3.4 Сравнительный анализ изменения функциональных связей показателей карбонильного стресса и тиол-дисульфидной системы у мужчин контрольной группы и пациентов с СД 2 типа, осложненным и неосложненным макроангиопатией нижних конечностей	77
3.5. Наиболее информативные показатели метаболических изменений у больных СД 2 типа с макроангиопатией нижних конечностей	81
3.6. Сравнительная характеристика изменений клинических проявлений макроангиопатии нижних конечностей у больных СД 2 типа под влиянием различных методов терапии	84
ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	88
ВЫВОДЫ	101
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	103
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	106

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Сахарный диабет (СД) остается одной из наиболее актуальных медико-социальных проблем. Это обусловлено его широким распространением, тенденцией к увеличению частоты, тяжестью многочисленных осложнений, трудно поддающихся лечению (Балоболкин М.И., 2005). Заболеваемость СД приобрела черты нарастающей пандемии. По последним данным, численность больных СД в мире за последние 10 лет увеличилась более чем в 2 раза, и к концу 2015 года достигла 415 млн. человек (Дедов И.И., Шестакова М.В., 2017; Аметов А.С., 2013). Согласно прогнозам Международной диабетической федерации к 2040 году СД будет страдать 642 млн. человек. Столь стремительный рост заболеваемости СД послужил причиной принятия Резолюции ООН 61/225 от 20.12.2006 о сахарном диабете, а в 2011 году - Политической декларации ООН, обращенной к национальным системам здравоохранения, с призывом создавать многопрофильные стратегии в области профилактики неинфекционных заболеваний и борьбы с ними, где особое внимание привлечено к проблеме СД, как одной из ведущих причин инвалидизации и смертности населения (Diabetes Atlas IDF, 2006). В Российской Федерации по данным федерального регистра на окончание 2016г. на диспансерном учете состояло 4,35млн. человек (3% населения), из них 92% (4млн) приходится на долю СД 2 типа. Однако реальная численность пациентов в РФ не менее 8-9млн, что подтверждено масштабными эпидемиологическими исследованиями (NATION) (Дедов И.И., Шестакова М.В., 2017). Заболеваемость сахарным диабетом в Забайкальском крае за 2015 год составила 2397,2, заболеваемость в Российской федерации составляет 2896,7. Общая численность больных сахарным диабетом в Забайкальском крае составляет 22778 человек, из них на долю больных сахарным диабетом 2 типа приходится 20599 человек, тогда как за 2016год количество больных СД 2 типа увеличилось до 22428 человек (Серебрякова О.В., Отчет главного внештатного эндокринолога по

Забайкальскому краю, 2016). По распоряжению Правительства Забайкальского края от 10 августа 2012 года N 401-р, разработана долгосрочная целевая программа "Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями, формирование здорового образа жизни в Забайкальском крае (2013-2017 годы)", в которую включена подпрограмма «Сахарный диабет». Ее целью являются снижение уровня заболеваемости сахарным диабетом, совершенствование мер профилактики его осложнений, выявление больных сахарным диабетом на ранних стадиях, увеличение средней продолжительности жизни больных сахарным диабетом.

Одним из главных осложнений диабета, наиболее часто приводящему к инвалидизации и снижению качества жизни пациентов, является диабетическая макроангиопатия нижних конечностей, которая в конечном итоге приводит к развитию синдрома диабетической стопы (СДС) (Дедов И.И., 2005). Поражения артерий при СД характеризуется преимущественно дистальной локализацией в сочетании с макроангиопатией нижних конечностей и диабетической полинейропатией. При данном течении заболевания болевой синдром или перемежающаяся хромота могут отсутствовать, тогда как трофические нарушения и некрозы мягких тканей могут возникать на любой стадии диабетической макроангиопатии.

Из многообразных метаболических факторов, определяющих течение обменных процессов и факторов, влияющих на развитие макроангиопатии нижних конечностей у пациентов с СД 2 типа, значимый интерес представляет система «перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита» (ПОЛ-АОЗ), нарушения которой сопутствуют или являются причиной многих заболеваний (Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б., 2001; Лю Б.Н., 2002; Колесникова Л.И. и соавт., 2002, 2009; Марков Х.М., 2005; Луцкий М.А., Есауленко И.Э., 2006). В этом вопросе важная роль представляется и конечным продуктам гликирования (глиоксаль, метилглиоксаль), которые, в свою очередь, могут быть самостоятельными источниками АФК и являются показателями карбонильного

стресса. Липидная пероксидация и неферментативное гликозилирование включают аналогичные реакции и промежуточные продукты и, вероятно, могут усиливать друг друга (Занозина О.В., Боровков Н.Н., Щербатюк Т.Г., 2009).

Степень разработанности темы

Согласно данным многочисленных исследований, основными принципами лечения диабетической макроангиопатии нижних конечностей на современном этапе являются: стабильная компенсация сахарного диабета, нормализация артериального давления, баллонная ангиопластика, сочетание открытых и эндоваскулярных методов реваскуляризации, дистальное шунтирование, эндартерэктомия (Дедов И.И., Шестакова М.В., 2017). Реконструктивные операции, бесспорно, направлены на восстановление кровотока. Но способствует ли это улучшению обменных процессов на уровне клетки в полной мере - этот вопрос остается открытым, так как отдаленные результаты неутешительны. Возможны тромбозы шунтов после реконструктивных операций, причем как в раннем, так и позднем послеоперационном периоде (Дибиров М.Д. и соавт., 2009), раневые осложнения (Дуданов И.П. и соавт., 2008).

Основные диагностические мероприятия касаются выполнения пальпации, аускультации периферических артерий, ультразвуковой доплерографии и доплерометрии с подсчетом лодыжечно-плечевого индекса ЛПИ (соотношение систолического АД в артерии стопы и систолического АД в плечевой артерии). Основными мерами профилактики данного осложнения являются: отказ от курения, достижение и поддержание индивидуальных целевых показателей углеводного обмена, коррекция АД.

Ишемия и гипоксия тканей при сахарном диабете являются основными факторами, способствующими повышенному образованию реактивных оксидантов в различных органах и тканях и участвующими в развитии патологически измененных структур тканей и органов. Это приводит к нарушению их функции. Заболевание характеризуется синдромом хронической гипергликемии, которая приводит к нарушению всех видов обмена веществ,

влияя непосредственно на развитие сосудистых осложнений диабета (Черданцев Д.В., Николаева Л.П., 2010). Гипергликемия натощак и в постпрандиальном периоде, а также острые колебания содержания глюкозы приводят к избыточному гликозилированию и активации окислительного стресса, что способствует развитию и прогрессированию осложнений СД (Занозина О.В., 2010). Степень развития эндотоксикоза при СД в первую очередь определяется факторами местного иммунитета и состоянием свободнорадикального окисления.

Известно, что в образовании источников свободных радикалов при СД также участвуют шесть путей метаболизма глюкозы. В результате окисления глюкозы по полиольному пути образуются реактивные дикарбонильные сахара, которые запускают процесс неферментативного, или аутоокислительного, гликозилирования белков с образованием активных форм кислорода (Phillips S., 1993). Этот процесс ведет к апоптозу клетки, что подтверждает причинно-следственную связь окислительного и карбонильного стрессов (Недосугова Л.В., 2006). «Одной из основных, если не главных, задач лечения СД является борьба с окислительным стрессом и его производным — карбонильным стрессом», — так определил основное направление свободно-радикальной медицины в диабетологии профессор М.И. Балаболкин (Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., 2005).

Ликвидацию последствий окислительного стресса осуществляет система антиоксидантной защиты. Нарушение функционирования антиоксидантной системы играет важную роль в развитии сосудистых осложнений при СД.

Глутатион (GSH) является регулятором многих клеточных процессов, таких как: экспрессия генов, синтез ДНК и белков, протеолиз, клеточная пролиферация и апоптоз, продукция цитокинов и иммунная защита, регуляция функции митохондрий, клеточный, оксидативный статус и др. Антиоксидантная активность GSH проявляется главным образом за счет наличия в его молекуле тиоловой группы. Он играет решающую роль в нейтрализации свободных

радикалов внутри клетки. При остром окислительном стрессе концентрация GSH снижается, окисленный глутатион (GSSG) возрастает, в результате ускоряется turnover GSH/GSSG цикла (Jones D.P., 2002). Другие ферменты – GSSG редуктаза и NADPH – при нормальных условиях поддерживают соотношение [GSH/GSSG] 100 или более (Pastore A. et al., 2003).

Опубликован ряд работ о возможностях фармакологической коррекции уровня глутатиона при ряде заболеваний. Среди них наиболее перспективными, на наш взгляд, являются исследования о применении экзогенного GSH и его предшественников (N-ацетилцистеин и его этиловый эфир, S-нитрозоглутатион, S-аллилцистеин и т.д.), поскольку они непосредственно участвуют в синтезе нативного GSH. Однако влияние указанных веществ изучено пока лишь в экспериментах с лабораторными животными. Существует медицинский препарат N-ацетилцистеин (NAC), сфера применения которого связана в основном с бронхо-легочной патологией. Молекула NAC внутриклеточно трансформируется в цистеин, который является донатором SH-групп для синтеза глутатиона.

Некоторые звенья патогенеза диабетической макроангиопатии нижних конечностей до настоящего времени не известны. Очевидно, что решение этих вопросов позволит расширить наши взгляды на механизм формирования макроангиопатии нижних конечностей, а, следовательно, наметит пути более эффективной патогенетической терапии.

Цель работы - установить закономерности изменений показателей карбонильного стресса и состояния тиол-дисульфидной системы у больных СД 2 типа с макроангиопатией нижних конечностей для патогенетического обоснования принципов профилактики и коррекции.

Для реализации поставленной цели последовательно решались следующие **задачи:**

1. Оценить интенсивность карбонильного стресса у пациентов с СД 2 типа с макроангиопатией нижних конечностей.

2. Выявить изменения в содержании компонентов тиол-дисульфидной системы у пациентов с СД 2 типа, осложненным макроангиопатией нижних конечностей.
3. Определить характер взаимоотношений показателей карбонильного стресса и тиол-дисульфидной системы у пациентов с СД 2 типа, осложненным и неосложненным макроангиопатией нижних конечностей.
4. Установить наиболее информативные показатели карбонильного стресса и тиол-дисульфидной системы у мужчин с СД 2 типа с целью прогнозирования макроангиопатии нижних конечностей.
5. Оценить и сравнить клиническую эффективность проведения базисной терапии различными препаратами с антиоксидантными свойствами и предложить оптимальный вариант для профилактики и лечения диабетической макроангиопатии нижних конечностей.

Научная новизна

Впервые установлены особенности проявления карбонильного стресса у мужчин с СД 2 типа, осложненным макроангиопатией нижних конечностей, заключающиеся в повышении концентрации конечных продуктов гликирования.

Доказано, что у мужчин с СД 2 типа, осложненным макроангиопатией нижних конечностей, отмечается снижение содержания восстановленной фракции цистеина в плазме крови, уменьшения концентрации общего и свободного глутатиона в эритроцитах, а также увеличения уровней окисленного глутатиона и цистеина.

Получены новые данные о окислительно-восстановительном потенциале клетки, который претерпевает выраженные изменения в виде уменьшения соотношений GSH/GSSG, CysSH/CysSSCys в сравнении с пациентами, не имеющими сосудистых осложнений. Данный коэффициент может характеризовать антиоксидантные свойства клетки.

Впервые установлены наиболее значимые показатели карбонильного стресса и тиол-дисульфидной системы у пациентов с сахарным диабетом 2 типа и в сочетании с макроангиопатией нижних конечностей, что позволило рассчитать коэффициент прогноза риска развития сосудистых осложнений.

Выявленные закономерности позволили разработать концептуальную схему включения патогенетических механизмов в формирование макроангиопатии у больных сахарным диабетом 2 типа и обосновать необходимость лечебных мероприятий, направленных не только на эффективную коррекцию метаболических нарушений, но и на активизацию репаративных процессов.

Приоритетным и патогенетически обоснованным является использование N-ацетилцистеина у больных с СД 2-го типа, осложненного макроангиопатией нижних конечностей, приводящим к невилированию проявлений карбонильного стресса, за счет уменьшения количеств глиоксаля и метилглиоксаля и стабилизации окислительно-восстановительного потенциала клетки, благодаря увеличению содержания восстановленных фракций цистеина и глутатиона и уменьшению их окисленных фракций.

Проведенный расчет интегральных показателей метилглиоксаля и свободного глутатиона по отношению их содержания у больного к среднему значению у здоровых лиц объективно отражает степень ишемии тканей конечности, что повышает точность прогноза риска развития сосудистых осложнений (заявка на изобретение № 2017118835).

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные свидетельствуют о закономерностях изменений и взаимодействия некоторых показателей карбонильного и окислительного стрессов, аминотиолов, системы глутатиона у больных сахарным диабетом 2 типа, осложненным макроангиопатией нижних конечностей. Результаты исследований могут быть полезными для расширения сведений о патогенезе сосудистых осложнений у больных сахарным диабетом 2 типа.

Обнаруженные изменения концентрации конечных продуктов гликирования и уменьшение содержания показателей системы аминокислот могут служить прогностическими критериями развития сосудистых осложнений у данной категории пациентов.

Применение N-ацетилцистеина в комплексной терапии позволит улучшить качество лечения пациентов с СД 2 типа с макроангиопатией нижних конечностей за счет стимулирования антиоксидантной системы. А это позволит предотвратить развитие более тяжелых осложнений и улучшить качество жизни пациентов.

Методология и методы исследования

Исследование проводилось в 2012-2016 гг. Основными объектами исследования являлись некоторые показатели карбонильного стресса и тиол-дисульфидной системы у лиц без нарушения углеводного обмена, а также у пациентов с сахарным диабетом 2 типа, имеющих нарушения сосудистого компонента при применении различных видов консервативной терапии. Дизайн исследования согласуется с принципами надлежащей клинической (ГОСТР 52379-2005) и лабораторной (ГОСТ Р-53434-2009) практики. Работа проводилась с соблюдением правил научных исследований и была одобрена Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО ЧГМА. Теоретической и методологической основой исследования послужили фундаментальные и прикладные исследования отечественных и зарубежных ученых по данной проблеме, публикации в периодических изданиях, методические рекомендации.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Развитие макроангиопатии нижних конечностей у пациентов с сахарным диабетом 2 типа сопровождается интенсификацией карбонильного стресса (увеличение уровней глиоксаля и метилглиоксаля) на фоне снижения активности тиол-дисульфидной системы (низкие значения восстановленных форм цистеина и глутатиона, с избыточным количеством окисленных фракций).

2. Наиболее информативными показателями при прогнозировании развития макроангиопатии нижних конечностей при СД 2 типа являются метилглиоксаль, восстановленная и окисленная фракция глутатиона и их соотношение GSH/GSSG.

3. Патогенетически обоснованным в комплексном лечении пациентов с диабетической макроангиопатией нижних конечностей является включение в базисную терапию препаратов N-ацетилцистеина, что способствует эффективному обезвреживанию конечных продуктов гликирования, а также нивелированию клинических проявлений макроангиопатии (улучшение репаративных процессов в ране, значительное снижение болевого синдрома).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена достаточным объемом клинического материала, однородностью выборки субъектов, применением современных методов исследования и адекватных методов биомедицинской статистики, теоретическим обоснованием полученных данных. Материалы и основные положения диссертации доложены на III Съезде хирургов Забайкальского края. 2016г, V международной научно-практической конференции «Здоровье для всех» г. Пинск, Белоруссия, 2012г, межрегиональной научно-практической конференции «Реабилитация хирургических больных в условиях модернизации отечественного и регионального здравоохранения» - г. Чита, 2013г., 5 съезде хирургов Сибири и Дальнего Востока г. Новосибирск 2014 г., IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 75-летию Городской клинической больницы № 5 г. Казани 2014г, XIV научно-практической конференции студентов и молодых ученых. «Медицина завтрашнего дня» г. Чита 2015г, VIII Международной научно-практической интернет – конференции «Состояние здоровья: медицинские, социальные и психолого-педагогические аспекты» Монголия 2017 г., XVIII-ой Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежь и медицинская наука в XXI веке» г. Киров 2017г., VI съезде

хирургов Сибири и Дальнего Востока «Актуальные проблемы хирургии» г. Иркутск 2017г.

Личное участие автора

Исследователем проведена самостоятельная работа с источниками отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации, обобщение данных, оформление в виде обзора литературы, освоение методик и участие в выполнении лабораторных анализов в соответствии с дизайном исследований; формирование базы данных, статистическая обработка полученного материала; написание и публикация статей, участие в научно-практических конференциях, конгрессах регионального уровня. Кроме того, исследователем лично проводился контроль над соблюдением дизайна исследования, лечение пациентов, организация забора, подготовка к транспортировке и доставка образцов крови в лаборатории, осуществлялся постоянный контакт с эндокринологами.

Внедрение результатов исследования в практику

Основные положения работы внедрены в учебный процесс кафедр патологической физиологии, общей хирургии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России. Результаты настоящих исследований внедрены в работу отделения общей хирургии НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Чита 2» ОАО РЖД.

Публикации

По результатам диссертационного исследования опубликовано 15 печатных работ, 6 из которых в журналах, включенных ВАК Минобрнауки России в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата медицинских наук».

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 132 страницах машинописного текста. Она состоит из введения, обзора литературы, материала и методов исследования, главы о результатах исследования и их обсуждения, общего заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 224 источник, из них – 58 отечественных и 166 - иностранных авторов. Работа иллюстрирована 16 таблицами, 10 рисунками.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМАХ РАЗВИТИЯ МАКРОАНГИОПАТИЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ ПРИ СД 2 ТИПА И СПОСОБАХ ИХ КОРРЕКЦИИ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Некоторые аспекты патогенеза сосудистых осложнений при сахарном диабете 2 типа

СД относится к системным гетерогенным заболеваниям, обусловленным абсолютным (СД 1 типа) или относительным (СД 2 типа) дефицитом инсулина, следствием чего является нарушение углеводного обмена, что в конечном итоге приводит к поражению многих функциональных систем организма (Дедов И.И., 2017). Заболеваемость СД только увеличивается, ежегодный прирост составляет около 5-7%. Согласно прогнозам экспертов, к 2025г. число больных СД может составить 250млн. человек (Дедов И.И., 2017). По данным федерального регистра в Российской Федерации в 2016г. на диспансерном учете состояло 4,35 млн. человек (3% населения), из них 92% (4млн) приходилось на долю СД 2 типа. Между тем результаты контрольно-эпидемиологических исследований, проведенных ФГБУ Эндокринологический научный центр (ЭНЦ) МЗ РФ в период с 2002 по 2010 г., показали, что истинная численность больных СД в России приблизительно в 3-4 раза больше официально зарегистрированной и достигает 9 – 10 млн. человек, что составляет около 7 % населения (Дедов И.И., 2015). Невозможность утилизации глюкозы и ее высокий уровень в крови и моче в конечном итоге ведет к тканевому энергодефициту, поражению микрокапиллярного сосудистого русла, прогрессирующему эндотоксикозу, кетоацидозу, т.е. к нарушению всех видов тканевого обмена. Метаболические нарушения, характерные для СД, приводят к прогрессированию его многочисленных осложнений, в основе которых, прежде всего, лежат диабетические ангиопатии с поражением макро и микроциркуляторного звена сосудистого русла.

Исходя из клинических рекомендаций, выделяют 3 степени тяжести развития диабетической макроангиопатии нижних конечностей, которая основана на характеристике состояния кровотока в артериях нижних конечностей (согласно Международному консенсусу по диабетической стопе, 2011 г.) (таблица 1).

Таблица 1

Состояние кровотока в артериях нижних конечностей

Степень	Симптомы и признаки
1-я степень	Симптомов нет, пальпаторно пульсация сохранена: ЛПИ* 0,9-1,0, или Пальце-плечевой индекс > 0,6, или ТсрО ₂ > 60 мм рт. ст.
2-я степень	Есть симптомы, перемежающаяся хромота: ЛПИ < 0.6, или Систолическое давление в пальцевой артерии > 30 мм рт. ст., или ТсрО ₂ > 30 мм рт. ст.
3-я степень	Вне зависимости от клинических проявлений: систолическое давление в артериях голени < 50 мм рт. ст., или в пальцевой артерии < 30 мм рт. ст., или ТсрО ₂ < 30 мм рт. ст.

* Лодыжечно-плечевой индекс.

Можно считать, что для развития сосудистых осложнений диабета необходимо наличие как внешних (хроническая гликемия), так и внутренних (генетических) факторов. В.В Петровым проведены изучения частотного распределения аллелей генетических вариантов (мутаций, полиморфизмов) «кандидатных» генов, ассоциированных с развитием сердечнососудистой патологии: С677Т гена МТНFR, E2|E3|E4 гена ApoE, I|D гена ACE. Изученные

маркеры могут быть связаны с факторами риска развития сердечно-сосудистой патологии и принимать участие в формировании ангиопатии нижних конечностей. Мутация С677Т гена МТНFR связана с гипергомоцистеинемией, которая играет значительную роль в повреждении эндотелия сосудов и провоцирует склонность к тромбозам. Кроме того, имеется связь диабета с склонностью к тромбозам, возрастающей на местах атероматозных поражений. При диабете возрастают адгезивность и агрегация тромбоцитов, а также уровни различных факторов коагуляции и ингибиторов антикоагулянтного тканевого плазминогена, что способствует потенциально прокоагулянтному состоянию.

Вопрос о первичности и вторичности патогенеза ангиопатий по отношению к сахарному диабету, т.е. являются ли ангиопатии поздними осложнениями сахарного диабета или же проявлениями заболевания, остается открытым. Многочисленными электронно-микроскопическими исследованиями биоптатов икроножных мышц, проведенными в 60-80-е годы, было показано, что четко выявляется утолщение базальной мембраны у лиц с предиабетом. т.е. за несколько лет до манифестации нарушений углеводного обмена. По мнению автора, патогенез ангиопатий многофакторный. Наследование ангиопатий можно расценивать как генетическую предрасположенность, которая имеет полигенный тип передачи. Для реализации генетической предрасположенности к развитию ангиопатий необходимо участие внешних факторов, в роли которых выступают в первую очередь гипергликемия и связанный с ней каскад метаболических, гормональных, реологических и других нарушений. Без участия последних факторов невозможна реализация генетической предрасположенности к ангиопатии (Балоболкин М.И., 1999). Характеристика поражения сосудов крупного и среднего калибра при сахарном диабете (макроангиопатия) практически не отличается от атеросклеротического, которое имеет место и у больных без диабета, за исключением того, что указанное поражение сосудов у больных диабетом встречается на 8-10 лет раньше, чем у их сверстников, не

страдающих диабетом. При сахарном диабете имеется достаточное количество дополнительных факторов, участвующих в развитии атеросклероза. Одним из таких факторов является (наряду с углеводным) нарушение обмена липидов, которое в большей степени имеет место при СД 2 типа. Декомпенсация сахарного диабета сопровождается нарушениями и жирового обмена, т.к. эти два вида обмена веществ настолько взаимосвязаны, что даже при кратковременных изменениях углеводного обмена выявляются нарушения различной степени выраженности и в обмене липидов. Однако эти изменения, как правило, не сопровождаются достоверными отклонениями концентрации холестерина липопротеидов низкой плотности (ЛНП) в плазме крови (Savanne M., 1997).

Для СД 2 типа характерна постпрандиальная гиперлипидемия. Как показали исследования Н. Ginberg, у больных сахарным диабетом снижен постпрандиальный уровень липопротеиновой липазы и имеет место снижение ее стимуляции инсулином в жировой ткани (Ginberg H., 1991). Показано, что при сахарном диабете происходит комплексообразование липопротеиновой липазы с остаточными частицами липопротеинов, содержащих большое количество триглицеридов и перенос этих поверхностных компонентов липопротеинов к ЛВП. Это также приводит к снижению активности липопротеиновой липазы и в конечном итоге к уменьшению рецептор опосредованного клиренса остаточных частиц различных липидов (Corpack S., 1996).

Давно известно, что сахарный диабет является фактором риска возникновения и развития атеросклероза, причем наличие сопутствующего диабета значительно ускоряет прогрессирование атеросклероза (Laakso M., 2008). Установлено, что наиболее ранними событиями, происходящими на сосудистой стенке, являются взаимодействие полиморфно-ядерных лейкоцитов с эндотелиальными клетками и их активация. Показано (Prescott S., 1997), что различные медиаторы, такие, как тромбин, пептидолейкотриены, гистамин, брадикинин, могут активировать (стимулировать) эндотелиальные клетки к

экспрессии на их поверхности белков Р-селектинов, которые в неактивированном состоянии находятся в специализированных секреторных гранулах внутри клеток. При этом Р-селектины, обладающие адгезивными свойствами, быстро транслоцируются на поверхность клеток и способствуют адгезии (связыванию или прилипанию) эндотелиальных клеток с лейкоцитами. Такая фаза активирования сопровождается значительным увеличением синтеза эндотелиальными клетками фактора, активирующего тромбоциты (platelet-activating factor или PAF) (Балоболкин М.И., 1999). Этот фосфолипидный медиатор, экспрессирующийся на поверхности клетки, связывает лейкоцитарный рецептор PAF. Комплексообразование PAF с соответствующим рецептором лейкоцита инициирует образование собственных адгезивных белков, таких, как P2-интегрины. Одновременно происходят морфологические изменения, хемотаксис, перемещение гладкомышечных клеток и образование гранул, содержащих протеолитические ферменты и свободные радикалы, которые оказывают повреждающее действие на сосудистую стенку. В условиях окислительного стресса и повышенного уровня свободных радикалов полиморфно-ядерные лейкоциты посредством PAF, а возможно и других белков, обладающих идентичными свойствами, накапливают окисленные фосфолипиды, являющиеся производными свободно-радикального повреждения мембранных фосфолипидов. Этот многоступенчатый процесс четко контролируется и в случае неадекватной адгезии соответствующей активации клеток не наступает, и клетки-участники высвобождаются из такого комплексообразования обратно в кровяное русло. Вовлечение моноцитов и макрофагов в этот процесс происходит аналогичным образом. В процессах адгезии моноцитов к эндотелию сосудистой стенки также участвуют Р-селектины. Миграция моноцитов в интиму сосуда, которая наблюдается уже через несколько недель от начала гиперлипидемии, может осуществляться без нарушения целостности эндотелиальной стенки. В интиме моноциты сравнительно быстро трансформируются в липидсодержащие макрофагальные или пенистые клетки путем нерегулируемого поглощения

модифицированных липопропротеидов через окисленные рецепторы липопропротеидов низкой плотности. Скорость миграции моноцитов обратно пропорциональна количеству липопропротеидов низкой плотности, аккумулированных в интиме сосудистой стенки. Моноциты и макрофаги, которые участвуют в процессах адгезии с Р-селектинами, но не с другими адгезивными молекулами, в последующем способны синтезировать и секретировать цитокины и хемокины, необходимые для активизации и поддержания ранней фазы хронического воспаления мышечной стенки сосуда, что постоянно наблюдается в местах, пораженных атеросклеротическим процессом (Prescott S., 1997). Дисфункция эндотелия зависит и от изменения скорости кровотока, тонуса сосудистой стенки и от функции самого эндотелия, который можно рассматривать как эндокриноподобную ткань в нашем организме, продуцирующая большое количество веществ. Показано, что при манифестации СД 1 типа выявляемое ускорение кровотока связано с повышением высвобождения оксида азота в ответ на гипергликемию (Posfou L., 1997). Однако длительная гипергликемия, стимулируя полиоловый путь обмена глюкозы, приводит к истощению содержания в эндотелиальных клетках глутатиона и NADPH. Гипергликемия способствует увеличению активности диацилглицерина и протеинкиназы С, которые, ингибируя эндотелиальную NO-синтазу также снижают образование оксида азота. Хроническая гипергликемия увеличивает количество гликогемоглобина и других продуктов конечного гликозилирования (Klein R., 1996) которая, как известно, является одним из самых важных факторов в патогенезе сосудистых осложнений диабета. Конечные продукты гликозилирования снижают доступность или "гасят" активность оксида азота, являются еще одним дополнительным фактором нарушения функции эндотелия. Результаты последних исследований свидетельствуют о том, что окислительно модифицированные ЛНП участвуют не только в первичном повреждении сосудистой стенки, но также провоцируют развитие дисфункции эндотелия (Апостов Е.О., 2007), вследствие чего вновь поднимается вопрос о необходимости использования антиоксидантов

для предотвращения повреждений стенки сосудов (Lapolla A., 2003; Shen X.C., 2012).

1.2. Механизмы развития окислительного и карбонильного стрессов при СД 2 типа

Процессы свободнорадикального окисления во многом определяют стабильность гомеостаза живого организма. В результате нарушения активности этой системы накапливаются токсичные продукты, что является одной из причин разбалансировки регуляции гомеостаза, приводящей к серьезным метаболическим нарушениям, изменениям иммунного статуса, гормональным сдвигам, глубоким нарушениям в системе детоксикации. В оценке функциональных расстройств различных систем организма важная роль принадлежит фундаментальным исследованиям регуляторных механизмов, непосредственно связанных с метаболическими процессами, обеспечивающими обновление и стабильность клеточных мембран. Молекулярный кислород (O_2) необходимый элемент для выживания человеческого вида и всех аэробных организмов. Прежде всего, аэробный метаболизм необходим для окислительного фосфорилирования как основного поставщика энергии. С самого начала изучения проблемы, возникло понятие "кислородного парадокса" – кислород необходим для жизни, но при определенных условиях он становится опасным и угрожает ее существованию. Согласно современным представлениям, основным патогенетическим фактором многих заболеваний и патологических состояний, сопровождающихся нарушением биологических барьеров клеточных мембран, является активация свободнорадикальных окислительных реакций. Изменение активности этого процесса приводит к нарушению функции клетки и, как следствие, к развитию патологии (Горожанская Э.Г., 2010) Пусковым моментом, способствующим развитию процесса свободнорадикального окисления, является образование супер-анион-радикала, который атакует липидную основу клеточной мембраны, образуя при этом перекисные соединения. Свободнорадикальные реакции ПОЛ

протекают во всех клетках и тканях живых организмов, в основном в биомембранах, и представляют собой каскад окислительных реакций деградации ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов. В клетках здорового организма стационарный уровень ПОЛ является жизненно важным звеном в регуляции проницаемости и транспорта веществ через мембраны, в транспорте электронов в цепи дыхательных ферментов и других клеточных механизмах, в синтезе простагландинов и лейкотриенов, метаболизме катехоламинов и стероидных гормонов, в дифференцировке и делении клеток. Окислительные реакции с участием свободных радикалов рассматриваются в настоящее время как необходимый процесс в регуляции клеточного метаболизма. В процессах жизнедеятельности клетки способность свободных радикалов инициировать реакции ПОЛ играет существенную роль. Особо важное значение ПОЛ для организма заключается в обновлении мембран клеток и поддержании посредством этого структурного гомеостаза. Активация ПОЛ, приводящая к значительным расстройствам гомеостаза, может оказаться одной из основных причин неблагоприятного течения ряда тяжелых заболеваний. При неблагоприятных условиях формируются молекулы, содержащие активные формы кислорода (reactive oxygen species или ROS), которые повреждают липидный слой мембран клеток (lipid peroxidation или LPO). Аналогичным свойством обладают активные азотсодержащие молекулы (reactive nitrogen species, RNS). Чтобы начался процесс LPO, молекула липида должна быть активирована инициатором. В качестве таких инициаторов и выступают ROS. ROS – принятое международное сокращение химически активных молекул, содержащих кислород. Примеры пероксидов: $[O - O]^{2-}$ - пероксид ион, $R_1 - O - O - R_2$ – органический пероксид, $R - O - O - H$ – гидропероксид, $R - CO - O - O - H$ – перкислота. Другие ROS, например, H_2O_2 , O_2^{*-} и $*OH^1$ – наиболее распространенные прооксиданты, присутствующие, как при физиологических, так

¹*OH, т.е. гидроксильный радикал имеет очень короткий период полужизни (10^{-9} s) и его реакция с субстратами происходит мгновенно

и патологических состояниях (Novo E., Parola M., 2008). Из известных и хорошо изученных механизмов, является аутооксидация ненасыщенных жирных кислот, таких как линолевая, линоленовая, арахидоновая и ω -3 (Shibamoto T., 2006). В общем виде механизмы формирования продуктов LPO, представлены на рис. 1.

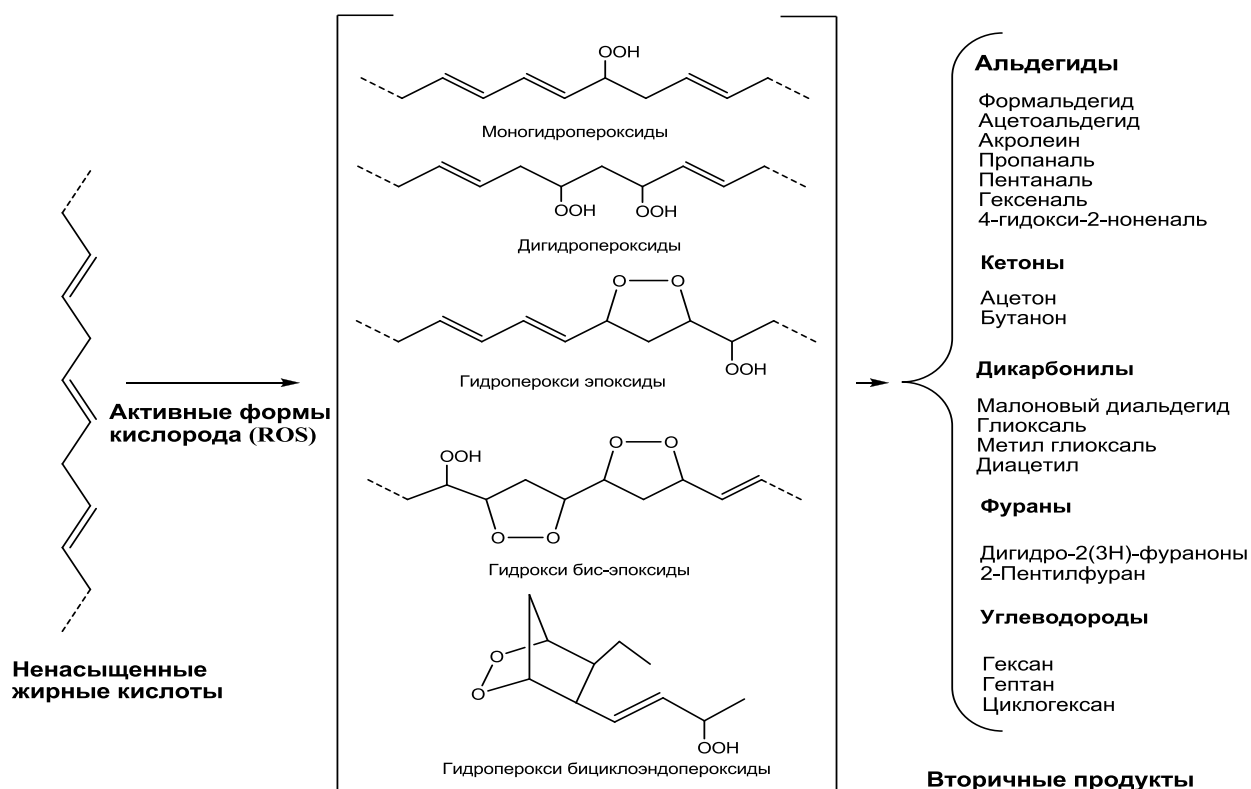


Рис. 1. Предполагаемые механизмы формирования промежуточных и вторичных (конечных) продуктов LPO (Shibamoto T., 2006).

В физиологических условиях образования ROS в клетках сдерживается системой ферментативных и неферментативных антиоксидантов на низком уровне. Окислительный стресс можно рассматривать как нарушение баланса в системе образования свободных радикалов и механизмах антиоксидантной защиты, основу которого составляют свободнорадикальные реакции. ПОЛ - важный патогенетический фактор многих заболеваний, связанных с функциональным нарушением биологических мембран, вызывающий серьезные,

подчас необратимые изменения, в метаболических внутриклеточных процессах, приводящих к гибели клетки и в дальнейшем всего организма.

Известно, что *in vitro* присутствие глюкозы усиливает свободнорадикальное окисление липопротеидов низкой плотности (ЛПНП). Стойкая гипергликемия, вызывающая окислительный стресс за счет образующихся при автоокислении глюкозы свободных радикалов, приводит к истощению антиоксидантной системы организма и утяжелению патологического процесса. У больных СД 2 типа даже при небольшой длительности заболевания присутствует активация окислительного стресса, которая проявляется окислительной модификацией белков и ростом ПОЛ (Намоконов Е.В., 2010; Газин И.К., 2008). Степень активации этих реакций тесно связана с ослаблением ферментативной антиоксидантной защиты, длительностью заболевания, степенью декомпенсации углеводного обмена, наличием поздних осложнений. Также происходит гликация белков. Гликация коллагена может провоцировать атерогенез поступления липопротеидов во внеклеточный матрикс, делая его более подверженным к окислительной модификации, что представляется фактором, предрасполагающим к развитию поражений сосудов (American Diabetes Assosiation, 2008; Orchard T.J., 1998). Усиление активности ПОЛ играет существенную роль в повреждении эритроцитов и эндотелия сосудов и в формировании диабетических ангиопатий (Черданцев Д.В., 2010).

Согласно современным представлениям под ROS подразумевают широкий класс высокореакционных кислородных соединений радикальной и нерадикальной природы, образующихся в клетках в результате неполного восстановления молекулярного кислорода или изменения спина одного из его электронов, находящихся на внешних орбиталях. Следует отметить, что ROS в низких и средних концентрациях выполняют физиологические функции, играя важную роль в поддержании гомеостаза. В то же время высокие концентрации ROS вызывают в клетках биохимические и структурные нарушения, которые

способствуют развитию функциональной несостоятельности различных органов и систем организма. Активация эндогенных механизмов генерации ROS приводит к напряжению механизмов антиоксидантной защиты и развитию окислительного стресса. В клетках ROS вызывают различные повреждения белковых молекул, такие как: окисление аминокислотных остатков, образование белок-белковых сшивок, фрагментация молекул. Окислению ROS в первую очередь подвергаются серосодержащие белки; в результате снижается содержание восстановленных и повышается уровень окисленных SH – групп, поэтому соотношение окисленных и восстановленных SH – групп белковых молекул может быть использовано в качестве показателя развития окислительного стресса (Горожанская Э.Г., 2010). Взаимодействие белков с радикалами и активными формами кислорода приводит к образованию гидроперекисей, альдегидов и других реакционных соединений. В последние годы особое внимание уделяется роли ROS в развитии апоптоза. По-видимому, клетки, имеющие дефекты антиоксидантной защиты, наиболее чувствительны к воздействиям, вызывающим их запрограммированную гибель. Усиление генерации ROS и развитие в клетках окислительного стресса способствуют радикальному разрушению мембран и ДНК, что заканчивается их гибелью.

Тесно сопряжен с окислительным так называемый нитрозативный стресс (Halliwell B., Chirico S., 1993; Novo E., Parola M., 2008). RNS (Reactive Nitrogen Species) – семейство молекул, получающихся при взаимодействии оксида азота (NO) и супероксида (O_2^-). В норме NO – малая гидрофобная молекула – легко проникает через мембраны клеток без участия каналов или рецепторов (Pacher P. et al., 2007). NO является ключевым медиатором в регуляции функции сосудистой стенки, расслабляет гладкие мышцы и тем самым расширяет сосуды и снижает артериальное давление. NO образуется в процессе превращения аргинина в цитруллин при участии NO-синтетазы.

Однако возможно побочное повреждающее действие NO и RNS: в присутствии больших количеств ROS, супероксида или молекулярного кислорода, NO генерирует высокоактивные RNS, такие как: N_2O_3 или $ONOO^-$ (пероксинитрил). Пероксинитрил - соединение с высокой реакционной способностью - прямо взаимодействует с компонентами клеток, включая липиды, тиолы, остатки аминокислот, ДНК-основания и низкомолекулярные антиоксиданты. Самой часто встречающейся реакцией пероксинитрила с аминокислотами – окисление цистеина. Таким образом, NO может оказывать повреждающий эффект, причем, сценарий некроза клетки более вероятен, чем апоптоз. При этом антиоксидантный потенциал клетки значительно ослабляется, результатом чего является истощение запасов GSH или значительное уменьшение соотношения GSH/GSSG (Novo E., Parola M., 2008). Окислительный стресс и его медиаторы вовлекаются в патогенез многих заболеваний, таких как: атеросклероз, сахарный диабет, сердечно-сосудистые расстройства, рак, нейродегенеративные заболевания, хронические болезни печени и легких, возрастная патология, артриты и другие воспалительные процессы (Shibamoto T., 2006; Novo E., Parola M., 2008).

Окислительный стресс при сахарном диабете может быть следствием различных механизмов:

повышенного образования реактивных оксидантов, образующихся при окислении, как самих углеводов, так и углеводов, образующих комплексы с различными белками, а также в результате аутоокисления жирных кислот в триглицеридах, фосфолипидах и эфирах холестерина;

снижения активности антиоксидантной системы в организме, которая представлена глутатионом, глутатионпероксидазой, каталазой, супероксиддисмутазой, витаминами К, Е, С, α -липоевой кислотой и другими антиоксидантами (таурин, каротин, мочевая кислота и коэнзим Q10);

нарушения ферментов полиолового обмена глюкозы, митохондриального окисления, обмена простагландинов и лейкотриенов и снижения активности глиоксалазы;

нарушения концентрации или обмена глутатиона и ионов некоторых металлов (Балаболкин М.И., 2005).

Гликирование (иногда называют неферментативное гликозилирование) обычно является результатом ковалентного связывания белка или молекулы липида с молекулой сахара, таких как фруктоза или глюкоза без участия ферментов. Гликирование может происходить в организме (эндогенное), либо вне его (экзогенное). В результате образуются *Advances Glycation End-products* – это конечные продукты гликирования (или гликозилирования); принятые сокращения – AGE and AGEs (Turk Z., 2010)

При СД 2 типа происходит аутоокисление глюкозы и ее, метаболических интермедиатов, которые способствует образованию реакционноспособных дикарбонильных сахаров - метилглиоксаля и 3-дезоксиглюкозона. В результате запускается процесс неферментативного гликирования белков с образованием ROS. Избыток ROS инициирует апоптоз клетки, что подтверждает взаимосвязь окислительного и карбонильного стресса. Активация полиольного пути метаболизма глюкозы приводит не только к генерации свободных радикалов (СР), но и к снижению активности восстановленного глутатиона – основного антиоксиданта клетки (Балаболкин М.И., 2002)

Исходя из вышеизложенного, можно считать, что раннее выявление нарушений в системе «ПОЛ-АОЗ» (непосредственная оценка показателей карбонильного стресса и тиол-дисульфидной системы), и как, следствие, - стимуляция антиоксидантной системы являются одними из основных звеньев в профилактике сосудистых осложнений у пациентов с СД 2 типа.

1.3. Маркеры карбонильного стресса при сахарном диабете 2 типа

Первичные продукты LPO – это нестабильные гидроперекиси, в дальнейшем превращающиеся в различные вторичные продукты, в частности,

нестабильные (конечные) альдегиды – малоновый диальдегид (MDA) и 4-гидрокси-2,3-алкенали (HAKs) с различной длиной алифатической цепи.

Эти альдегиды обладают высокой реакционной способностью, образуя перекрестные химические связи с белками (Esterbauer H. and Cheeseman K.H., 1990; Esterbauer H. et al., 1991) и ДНК (Marnett L.J., 1999; Nair U., et al., 2007). Основной мишенью для химической атаки альдегидов являются первичные аминогруппы (NH₂) аминокислот, пептидов, белков, ДНК и пр². Результатом является их доказанная токсичность и мутагенность. Предполагается, что 4-гидрокси-2,3-ноненаль, открытый более четверти века назад, является наиболее биологически активным из всех перечисленных альдегидов (Novo E., Parola M., 2008).

Следующая группа маркеров низкомолекулярные α-кетоальдегиды – глиоксаль(Go) и метилглиоксаль(MGo) как показатели карбонильного стресса. Они имеют в основном эндогенное происхождение и образуются при метаболических превращениях глюкозы и окислительной деградации липидов (Shangari N. and O'Brien P.J., 2004; Thornalley P.J., 2007) (рис.2)(рис.3).

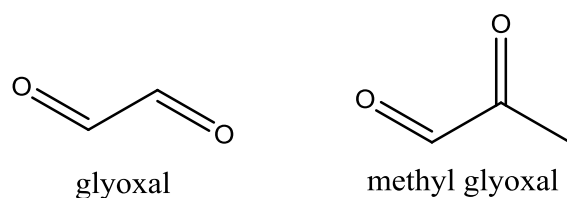


Рис. 1. Химическая структура кетоальдегидов.

² Самой распространенной реакцией для анализа аминокислот, является химическая дериватизация первичных аминогрупп ортофталевым альдегидом в присутствии меркаптанов (SH). Реакция происходит в считанные секунды при комнатной температуре и слабощелочной среде.

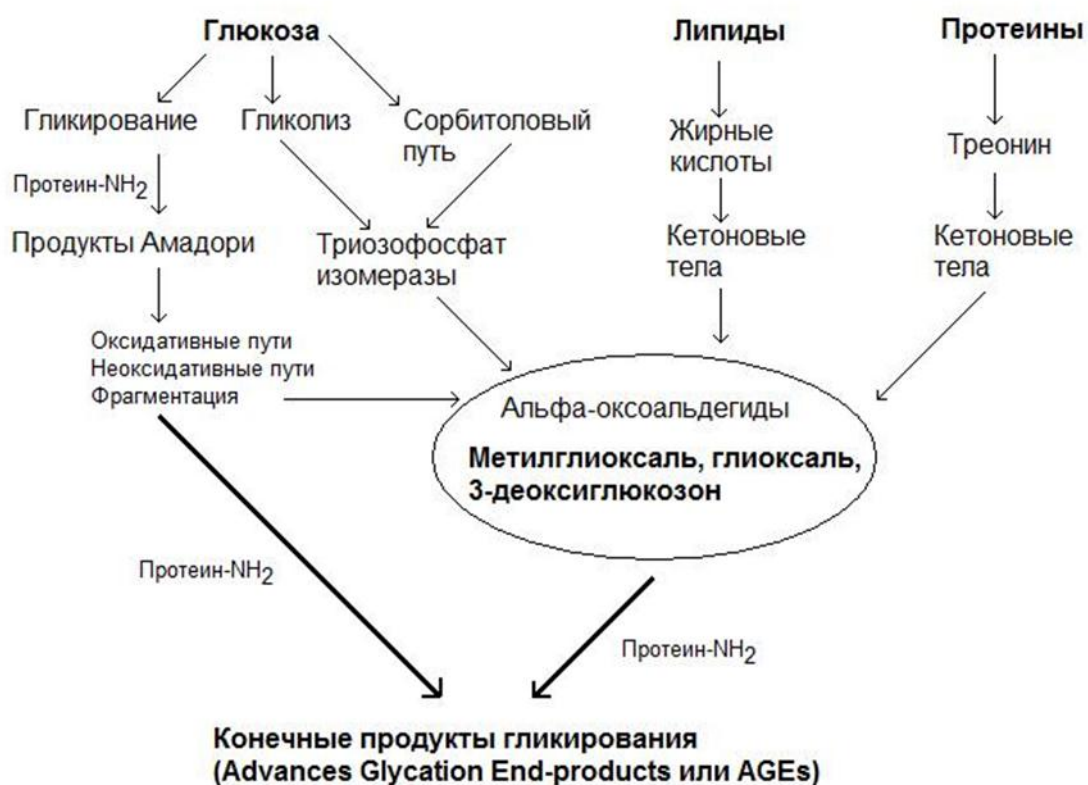


Рис. 3. Схема биогенеза активных карбонильных веществ (Turk Z., 2010).

Внутри клетки метилглиоксаль (MGo) и глиоксаль (Go) образуют перекрестные связи с биомолекулами и тем самым инактивируют антиоксидантную систему (Rabbani N. and Thornalley P.J., 2011). При физиологических условиях обе молекулы эффективно "подчищаются" ферментативными системами, например, глиоксилазами при активном участии глутатиона. В экспериментах на изолированных гепатоцитах крыс показано, что в концентрации 5 mM, глиоксаль истощает запасы глутатиона, тем самым способствует атаке молекул пероксидов (ROS) и вызывает коллапс мембранного потенциала митохондрий (Shangari N. and O'Brien P.J., 2004). Снижение внутриклеточного уровня глутатиона при окислительном стрессе приводит к повышению уровней Go, MGo и AGE (Abordo E.A. et al., 1999). В этих условиях внутриклеточные протеины вступают в реакцию с Go и MGo, формируя, таким образом, AGEs (Abordo E.A. et al., 1999; Ahmed M.U. et al., 1997; Matkovics B. et al., 1997). Химическая модификация белков Go и MGo инактивирует важные для

клетки белки и приводит к задержке роста клетки вплоть до ее апоптоза и некроза (Abordo E.A. et al., 1999; Choudhary D. et al., 1997; Thornalley P.J. et al., 1999; Shamsi F.A. et al., 2000). Формирование AGEs in vivo может быть связано с развитием осложнений сахарного диабета, таких как: ангиопатия, ретинопатия, нейропатия и нефропатия (Shamsi F.A. et al., 2000). С практической точки зрения важным является мониторинг уровней Go и MGo у пациентов с СД, что позволит прогнозировать прогрессирование диабетических осложнений (Turk Z., 2010; Nakayama K. et al., 2008; Distler M.G. et al., 2013; Beisswenger P.G. et al., 2005).

Анализируя итоги исследований по механизмам свободнорадикальных процессов при атеросклерозе и СД можно надеяться, что в ближайшие годы будут созданы подходы, для разработки принципиально новых препаратов для комплексной терапии этих заболеваний, способных утилизировать не только активные формы кислорода и органические свободные радикалы, но и активные формы карбониллов, которые, как становится ясно, играют важную роль в развитии предатерогенных повреждений (Ланкин В.З., 2016).

1.4. Компоненты тиол-дисульфидной системы в норме и при развитии патологических состояний

На сегодняшний день тиол-дисульфидная система (SH/SS) во многих случаях выбирается в качестве маркера для мониторинга лекарственных воздействий, поскольку данная биохимическая система характеризует состояние антиоксидантной защиты и окислительно-восстановительных процессов организма. К основным функциям данной системы относится регуляция ферментативной и антиоксидантной активности, фагоцитоза и иммунных реакций, разных рецепторов, клеточного деления и роста, проницаемости биологических мембран, свертывания крови, мышечного сокращения (Соколовский В.В., 1996). Для клинической практики важным является определение антиоксидантной способности плазмы/сыворотки. Показателем служит соотношение тиолы/дисульфиды или SH/SS (Jones D.P., 2002): чем оно

больше, тем выше антиоксидантная способность крови. В плазме низкомолекулярные аминотиолы (SH) находятся в равновесии с окисленными формами (SS). Окисление SH-групп приводит к формированию соответствующих дисульфидов: цистина (CysSSCys), гомоцистина (HcySSHcy), дисульфида глутатиона (GSSG) и/или смешанных дисульфидов, и/или смешанных с протеинами дисульфидов (Giustarini D. et al., 2005). В плазме/сыворотке доминирующим аминотиолом является цистеин – концентрация цистеина, глутатиона и гомоцистеина составляет 200-300, 1-5 и 5-15 μ , соответственно (Isokawa M. et al., 2014). В последнее время появилось большое количество публикаций, показывающих также важную роль окисления белков в регуляции окислительно-восстановительного потенциала клеток (Ghezzi P. et al., 2005).

Важную роль в антиоксидантной защите организма играют легкоокисляющиеся пептиды, в состав которых входят SH – содержащие аминокислоты: цистеин, цистин и метионин. Особое место среди этих соединений занимает глутатион – тиолсодержащий трипептид, образованный аминокислотами цистеином, глутаминовой кислотой и глицином. Глутатион (эндогенный трипептид, L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine) является преобладающим низкомолекулярным аминотиолом клеток позвоночных и играет важную роль в защите их от свободных радикалов и химически активных молекул пероксидов (Fahey R.S. and Sundquist A.R., 1991; Meister A., 1994; Townsend D.M. et al., 2003; Wu G. et al., 2004; Cacciatore I. et al., 2010) (рис. 4).

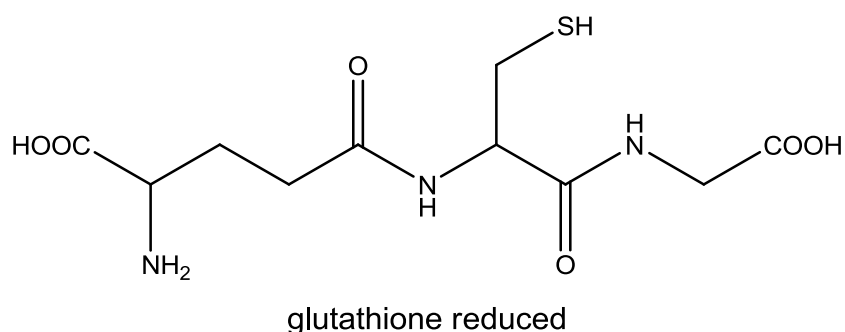


Рис. 4. Структура глутатиона.

В клетке глутатион существует в двух формах: окисленной (GSSG) и восстановленной (GSH) (рис. 5).

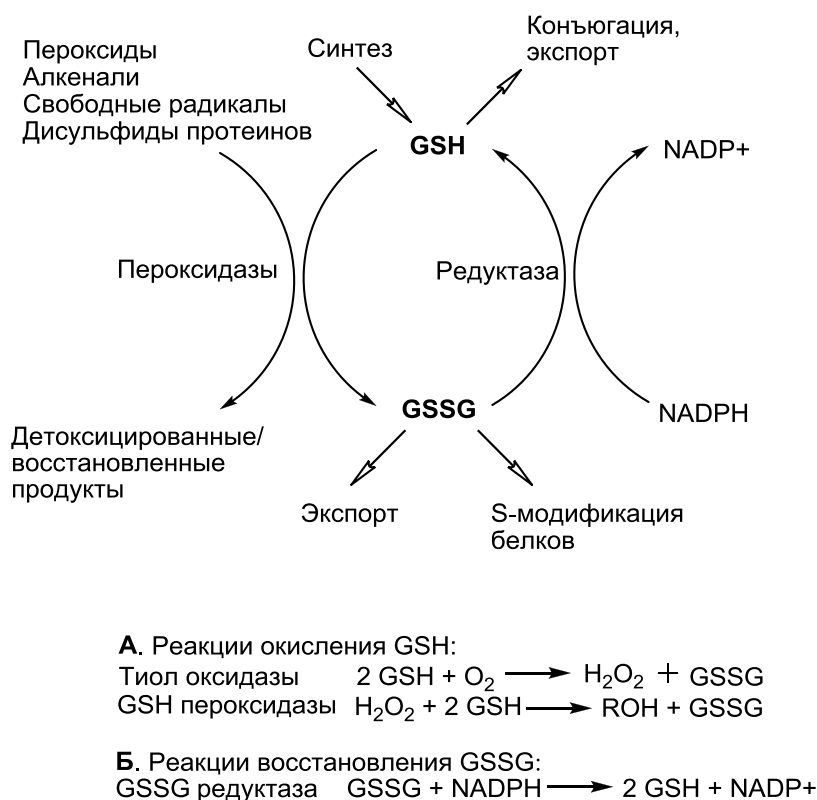


Рис. 5. Метаболизм глутатиона (Jones D.P., 2002).

Глутатион синтезируется из соответствующих аминокислот, поступающих в клетку при участии двух ферментов: γ -глутамилцистеинсинтетазы (γ -GCS) – конъюгирует глутамат с цистеином – и глутатионсинтетазы, которая конъюгирует образовавшийся дипептид с глицином (Fahey R.S. and Sundquist A.R., 1991; Griffith O.W., 1999; Townsend D.M. et al., 2003). Глутатион является регулятором многих клеточных процессов, таких как: экспрессия генов, синтез ДНК и белков, протеолиз, клеточная пролиферация и апоптоз, продукция цитокинов и иммунная защита, регуляция функции митохондрий, клеточный оксидативный статус и др. Основная масса глутатиона находится внутри клеток, а внеклеточная

концентрация его в плазме низкая и составляет 2-20 мкм/л или в среднем 6 мкм/л, что соответствует примерно 1.8 нг/мл. В эритроцитах его концентрация на несколько порядков выше. В биологической среде, включая эритроциты, глутатион содержится в двух формах: окисленной в виде дисульфидов (GSSG) и восстановленной, или свободной, в виде сульфгидрильных групп (GSHfree). Именно восстановленный глутатион обеспечивает антиоксидантную защиту клеток.

Внутриклеточный баланс GSH и GSSG является динамическим индикатором окислительного стресса. Хотя GSH синтезируется непрерывно и определяет судьбу многих клеток, скорость синтеза относительно низкая. Активность GSSG редуктазы зависит от GSSG концентрации. При остром окислительном стрессе концентрация GSH снижается, GSSG возрастает, в результате ускоряется turnover GSH/GSSG цикла (Jones D.P., 2002). GSH пероксидаза восстанавливает H_2O_2 , органические пероксиды и формирует GSSG. Тем самым фермент защищает мембрану клетки и внутриклеточные белки от оксидативного повреждения. Помимо роли одного из важнейших антиоксидантов, GSH выполняет много других полезных функций, которые кратко перечислены ниже (Wu G. et al., 2004; Townsend D.M. et al., 2003; Cacciatore I. et al., 2010):

- 1) GSH реагирует с физиологическими метаболитами (эстрогены, меланины, простагландины и лейкотриены) и ксенобиотиками (бромбензол, ацетаминофен), формируя меркаптопураты (Fanget Y.Z. al., 2002). Эти реакции инициируются глутатион-S-трансферазой, относящейся к семейству детоксицирующих ферментов.
- 2) GSH реагирует с NO с образованием гидросиламина и GSSG. внутриклеточная концентрация GSH является важным фактором, определяющим чувствительность клеток к NO и его производным (Cacciatore I. et al., 2010).

- 3) GSH является субстратом фермента формальдегид легидрогеназы, которая превращает формальдегид и GSH в S-формил-GSH (Townsend D.M. et al., 2003), нейтрализуя таким образом канцероген, т.е. формальдегид.
- 4) GSH вовлекается в систему глиоксилазных ферментов, которые превращают метилглиоксаль в D-лактат (Wu G. et al., 2004).
- 5) GSH вместе с цистеином, сульфгидрильные группы которых обладают высоким аффинитетом к металлам, реагируют с ними, образуя термодинамически стабильные комплексы, которые затем выводятся из организма (Cacciatore I. et al., 2010).

Синтез GSH зависит от трех основных факторов: (1) уровня γ -глутамилцистеинсинтетазы (γ -GCS) в клетке, (2) доступностью субстратов, в особенности L-цистеина и (3) ингибирующим влиянием GSH на γ -GCS по принципу отрицательной обратной связи (Griffith O.W., 1999). Внутриклеточный уровень аминокислот зависит от видовой принадлежности, типа ткани и состояния питания, но уровень L-цистеина стабильно и существенно ниже, чем уровни L-глутамата и глицина. Установлено, что концентрация L-глутамата, L-цистеина и глицина в печени составила 1.8, 0.15 и 2.2 мМ соответственно. Делают заключение об ограниченной роли L-цистеина в синтезе GSH. Недавние исследования представили убедительные доказательства этой ограниченной роли L-цистеина в синтезе GSH у различных видов животных и человека (Wu G. et al., 2004).

Уровень GSH зависит от цистеина, поскольку он содержит сульфгидрильную группу (SH), без которой GSH не будет выполнять присущие ему функции.

Цистеин (Cys) легко окисляется во внеклеточной жидкости в цистин (CysSSCys). Так, концентрация цистеина в плазме ниже, чем цистина – 10-25 $\mu\text{M/L}$ (1.2 – 3.0 мкг/мл) и 50-150 $\mu\text{M/L}$ (6.0 – 18.1 мкг/мл) соответственно (Wu G. et al., 2004). Цистеин и цистин легко проникают в клетку с помощью высокоэффективных транспортеров (Lu S.C., 2000). Этот процесс можно сделать

еще более эффективным, например, с помощью инсулина и фактора роста, которые усиливают захват цистеина и цистина клетками и тем самым увеличивают концентрацию внутриклеточного GSH (Lu SC., 2000).

Глутатион, как и другие SH – содержащие белки, являются ингибитором ROS и стабилизатором мембран. SH – содержащим соединениям принадлежит ведущая роль в защите клеток от OH – радикала. Антиоксидантная система глутатиона защищает организм от воздействия токсических продуктов, которые накапливаются в результате активации ПОЛ и только при ее недостаточности или истощении возникают серьезные нарушения клеточного метаболизма. Механизмы и их нейтрализация до сих пор окончательно не выявлены (Горожанская Э.Г., 2010). Нарушение функционирования антиоксидантной системы играет важную роль в развитии СД и его осложнений. Глутатион относится к основным звеньям антиоксидантной защиты, участвует в детоксикации ксенобиотиков и продуктов метаболизма, оказывает влияние на активность ферментов, регулирует обмен эйкозаноидов и простагландинов, влияет на биосинтез нуклеиновых кислот (Kulinsky V.I., Kolesnichenko L.S., 2009; Ballatori N., Krance S.M., Notenboom S., 2009). На сегодняшний день, состояние антиоксидантной системы больных СД 2 типа оценивают по уровню ферментов глутатионтрансферазы (ГТ) (Habig N.H., 1974), глутатионпероксидазы (ГПО) (метод Flohe L., 1989), глутатиоредуктазы (ГР) (по методу Mannervik B., 1989), супероксиддисмутазы (СОД) (Поберезкина Н.Б., Осинская Л.Ф., 1989.) и каталазы (Королюк М.А., и соавт. 1988), чаще всего, концентрацию восстановленного глутатиона определяют в плазме и эритроцитах по методу Anderson M.E. (1989). Выраженность окислительного стресса оценивают по уровню малонового диальдегида — MDA (метод С.Г Конюховой и соавт.). Доказано, что у больных СД состояние системы глутатиона имеет зависимость от типа сахарного диабета. СД 1 типа характеризуется снижением концентрации глутатиона и активности ГПО в плазме и эритроцитах на фоне активации ГР в эритроцитах. Для СД 2 типа характерно снижение содержания

глутатиона в эритроцитах, активация ГР в эритроцитах и ГПО в плазме на фоне снижения активности ГТ в плазме. Также, при СД 2 типа содержание глутатиона и активность ферментов его метаболизма зависят от сроков заболевания. Для мужчин с СД 2 типа характерна выраженная активация метаболизма глутатиона: снижение содержания глутатиона, повышение активности ГР в эритроцитах на фоне разнонаправленных сдвигов активности ГТ в плазме и эритроцитах (Сергеева Е.С., 2009).

1.5. Использование препаратов липоевой кислоты в терапии осложнений сахарного диабета 2 типа, как регуляторов метаболических процессов

Структура. Механизм действия.

Альфа-липоевая кислота является природной простетической группой в альфа-кетокислотных (пируватном, α -кетоглутаратном и α -кетокислот с разветвлённой боковой цепью) дегидрогеназных комплексах митохондрий и играет одну из ключевых ролей в метаболизме. Существуют данные, о том, что альфа-липоевая кислота влияет на клеточные метаболические процессы *in vitro*, обладая важным терапевтическим потенциалом в состояниях, сопровождающихся оксидативным стрессом, а также участвует в регуляции липидного и углеводного обменов (Балаболкин М.И., 1998г, Бустаманте Дж., 2001г).

Альфа-липоевая кислота была открыта в 1948 году О`Кейном и Гунсалусом. Альфа-липоевую кислоту из-за её сходства с жирной кислотой часто называют тиоктовой кислотой. В соответствии с современным уровнем знаний, α -липоевую классифицируют как витаминоподобное соединение (Kagan V.E., 1992г.; Thomas J.P., 1994).

Альфа-липоевая кислота является дисульфидным производным октановой кислоты и в течение десятилетий считается основной простетической группой ряда клеточных ферментативных комплексов. α -липоевая кислота является эффективным средством терапии или профилактики различных заболеваний, при

которых отмечается дисбаланс окислительно-восстановительного клеточного статуса. Это отмечается при сахарном диабете, нейродегенерации, ишемии - реперфузии, полинейропатии, ВИЧ и нарушениях функции печени. Различные исследования по радиоактивному распределению dl-[14 C]- или [35 S] – липоевой кислоты в тканях крыс после интраперитонеального или перорального назначения показали, что α -липоевая кислота быстро всасывается в желудке, проникает в различные ткани, где частично метаболизируется с последующей экскрецией. После назначения α -липоевой кислоты в течение 5 недель свободная α -липоевая кислота была обнаружена в различных тканях с наибольшей концентрации в сердце. При непосредственном поступлении в клетки *in vitro* α -липоевая кислота быстро захватывалась клетками и восстанавливалась до дигидролипоевой кислоты, которая высвобождалась клетками (Саклаков А.В., 2004).

Физико-химические свойства α -липоевой кислоты делают её сильной и реактивной биологической молекулой для ряда биохимических реакций, необходимых для окислительного метаболизма и модуляции функций клеток.

α -липоевая кислота и дигидролипоевая кислоты обладают высокой гидрофобностью. Это позволяет им с высокой скоростью проникать через биологические мембраны. α -липоевая кислота является кофактором дегидрогеназ α -кетокислот и системы расщепления глицина. Эти ферментативные комплексы участвуют в метаболических реакциях окисления пирувата, цикле лимонной кислоты, деградации аминокислот и их биосинтезе. Комплексы дегидрогеназ с α -кетокислотами, в частности, пируват-дегидрогеназный комплекс, α -кетоглутарат - дегидрогеназный комплекс и дегидрогеназный комплекс α -кетокислоты с разветвлённой боковой цепью составляют практически универсальное объединение ферментов. Они располагаются в митохондриальном матриксе, связаны с внутренней мембраной и катализируют окислительное декарбоксилирование различных α -кетокислотных субстратов (пирувата, α -кетоглутарата и укороченных α -кетокислот, образующихся при

трансаминировании лейцина, изолейцина и валина) в соответствующие формы ацил-Коа, сукцинил-Коа и изовалерил-Коа, соответственно, с образованием НАДН (Бустаманте Дж., 2001г).

Альфа-липоевая кислота играет важную роль в утилизации углеводов и нормализации энергетического обмена (ингибирует глюконеогенез и кетогенез, нормализует распад высокомолекулярных спиртов, улучшает аксональный транспорт) и обладает выраженным антиоксидантным действием. Одним из патогенетических звеньев в генезе развития диабетической макроангиопатии нижних конечностей является оксидативный стресс. С одной стороны, усиливается перекисное окисление с образованием свободных радикалов, а с другой – снижается эффективность работы антиоксидантной защиты. Регулирование такого дисбаланса α -липоевой кислотой осуществляется двумя путями: непосредственно инактивацией радикалов и восстановлением эндогенных антиоксидантных систем (Cohen M.P., 2003; Mc.Carty M.F., 1999).

В ряде работ показана способность α -липоевого / дигидролипоевого комплекса быть донором водорода в реакции, катализируемой селенопероксидазой. Глутатион-редуктаза также использует α -липоевую кислоту в качестве субстрата, что приводит к НАДФ-Н-зависимому образованию дигидролипоевой кислоты (Trujillo M., 2002; Бустаманте Дж., 2001г).

Наличие тиолового компонента делает это вещество высоко активным против ряда реактивных свободных радикалов и способствует регенерации окисленных антиоксидантов. В работах Rosenberg и Culic (1991) было отмечено, что назначение α -липоевой кислоты предотвращало развитие симптоматики недостаточности витаминов С и Е у морских свинок и витамина Е у крыс. Альфа-липоевая кислота и дигидроксилипоевая кислота способствуют очищению от перекиси водорода и HOCl .

Дигидролипоевая кислота имеет очень слабую взаимосвязь с радикалами токоферола. Поэтому большая часть рецикла витамина Е осуществляется посредством дигидролипоевой кислоты через промежуточный рецикл других

антиоксидантов, а при снижении уровня окисления глутатиона впоследствии восстанавливает радикалы витамина Е. В настоящее время, есть данные о том, что назначение липоата увеличивает уровень тканевого убихинола, который также может осуществлять рецикл витамина Е. Альфа-липоевую кислоту и её восстановленную форму называют «универсальным антиоксидантом», который функционирует как на мембране, так и в водных средах.

Таким образом, проведение лечения больных в ситуациях, сопровождающихся окислительным стрессом, к которым относится СД, препаратами α -липоевой кислоты позволяет благотворно воздействовать на систему «ПОЛ - антиоксиданты» и липидный спектр.

1.6. Некоторые плейотропные эффекты N-ацетилцистеина

В клинической практике N-ацетилцистеин (НАС) традиционно применяют в качестве отхаркивающего и противовоспалительного препарата. В последние годы выявлены новые механизмы антиоксидантного, глутатион-заместительного, детоксицирующего действия НАС (Nolin T.D., 2015). Это позволило использовать его для лечения интоксикаций (ацетаминофеном, свинцом и т. д.), профилактики и терапии артериальной гипертензии, атеросклероза, токсических реакций на введение рентгеноконтрастных веществ и химиотерапию. В созданном ВОЗ реестре клинических испытаний эффективность НАС изучают преимущественно при контраст-индуцированной нефропатии, кардиохирургических вмешательствах, лечении хронической обструктивной болезни легких, интоксикаций, онкологических заболеваний, СД.

N-ацетилцистеин – производное незаменимой серосодержащей аминокислоты метионина, входящей в состав ряда пищевых продуктов.

N-ацетилцистеин (НАС) используют в клинической практике уже несколько десятков лет, причем в последние годы спектр показаний к его применению расширяется и помимо традиционных – в качестве отхаркивающего и противовоспалительного препарата – включает новые направления, связанные с антиоксидантным и детоксицирующим действиями. N-ацетилцистеин является не

только пролекарством, но и прекурсором GSH и сначала деацетируется в цистеин, который в дальнейшем используется для синтеза GSH. Кроме того, он может выполнять самостоятельную роль по нейтрализации свободных радикалов и химически активных молекул пероксидов, превращаясь в итоге в дисульфид N-ацетилцистеина (Holdiness M.R., 1991). Оказывает антиоксидантное действие, обусловленное наличием SH-группы, способной вступить во взаимодействие и нейтрализовать электрофильные окислительные токсины. N-ацетилцистеин способствует повышению синтеза глутатиона, который является важным антиоксидантным фактором внутриклеточной защиты и обеспечивает поддержание функциональной активности и морфологической целостности клетки. Подавляет активность ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6. Посредством регуляции окислительно-восстановительных процессов способен влиять на ряд сигнальных путей, регулирующих апоптоз, ангиогенез и продукцию цитокинов.

Основная функция глутатиона – инактивировать АФК в реакции восстановления, а при ее нарушении развивается повреждающий клетку окислительный стресс. Процессы восстановления/окисления глутатиона являются ферментативными, причем на них оказывают влияние АФК, многие токсические вещества, дефицит селена (необходимого для функционирования фермента глутатионпероксидазы). NAC также содержит SH-группу и способен инактивировать АФК, поэтому его применение обеспечивает, помимо восполнения дефицита глутатиона, непосредственное антиоксидантное действие.

Биодоступность N-ацетилцистеина низкая и составляет при пероральном приеме 400 мг 4% для свободного и 9% для общего АЦЦ (Holdiness M.R., 1991). Низкая биодоступность АЦЦ обусловлена пресистемным метаболизмом (first-passeffect) (Olsson B. et al., 1988). Данные относительно другого важного фармакокинетического параметра – период полуэлиминации ($t_{1/2}$) неоднозначны и составляют 1.95 часа (Olsson B. et al., 1988), 2.27 часа (Borgstrom L. et al., 1986),

2.7 ± 0.3 часа (Jones A.L. et al., 1997), 3.7 ± 0.8 часа (Nolin T.D. et al., 2010), 3.68 ± 1.84 часа (Hong S-Y. et al., 2005).

Главная функция метионина в организме – служить основным источником сульфгидрильных групп, входящих в состав цистеина. Эти группы разрушают активные формы кислорода (АФК), вызывающие большое количество повреждений. Цистеин поступает в клетки с помощью нескольких высокоактивных АТФ-зависимых переносчиков; особенно много их в клетках печени, кишечника, канальцев почек (поэтому при снижении содержания цистеина эти органы страдают в первую очередь). В цитоплазме клеток из цистеина, глутамата и глицина синтезируется трипептидглутатион, причем скорость этого процесса зависит именно от поступления цистеина. Содержание глутатиона в клетке в сотни раз выше, чем цистеина; наиболее высоко оно в клетках печени и кишечника. Глутатион синтезируется в цитоплазме, и для его переноса в органеллы с наиболее активным уровнем окислительных процессов (а значит, и образования АФК) – митохондрии – также требуется переносчик и расходуется АТФ. N-ацетилцистеин проникает в митохондрии легче, поэтому его преимущества наиболее ярко проявляются в клетках, где транспортные системы работают с высокой нагрузкой и в первую очередь страдают при патологических процессах, например при СД 2-го типа (Деньгин В.В., 2008). Нарушение инактивации АФК приводит к разнообразным последствиям. В частности, оно вызывает перекисное окисление липидов мембран, в результате чего эти мембраны разрушаются (при этом образуется малоновый диальдегид, содержание которого можно определить в плазме и моче), и клетки погибают. В то же время показано, что введение N-ацетилцистеин снижает образование малонового диальдегида и клетки живут дольше.

Заключение

Анализ литературы со всей очевидностью показывает, что роль карбонильного стрессов, а так же нарушений антиоксидантной защиты клетки в

патогенезе развития сосудистых осложнений при СД 2 типа является важнейшей проблемой.

Доказательная медицина, которая направлена на раннюю, полную, качественную диагностику, и, как следствие, отражающая объективный прогноз течения заболевания, позволяет внести своевременную коррекцию в план лечения. В результате лечения сосудистых осложнений, значительно улучшается качество жизни пациента, уменьшается количество койко-дней в стационаре, снижается стоимость лечения, уменьшается риск возникновения гнойно-некротических процессов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Клиническая характеристика обследованных лиц и проводимой фармакотерапии

В работе с обследуемыми лицами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, в редакции, Бразилия, октябрь 2013) и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. №266. Проведение данного исследования было одобрено Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО ЧГМА (№10 от 29.11.2012). Все участники исследования подписывали информированные согласия.

Исследования проводились на базе ФГБОУ ВО Читинской Государственной медицинской академии (ректор – профессор, д.м.н., заслуженный врач РФ А.В. Говорин) в биохимической лаборатории НИИ Медицинской экологии Читинской Государственной медицинской академии (зав.лабораторией – к.м.н. Терешков П.П) с использованием клинической базы НУЗ «Дорожная клиническая больница» на ст. Чита 2 (директор – к.м.н. Громов П.В.) в период с 2013 по 2016 гг. Назначение препарата, наблюдение за пациентами в процессе терапии проводились непосредственно автором в отделении общей хирургии НУЗ «Дорожная клиническая больница» и эндокринологами.

Для решения поставленных задач нами были обследованы 60 мужчин в возрасте от 55 до 70 лет (средний возраст 63 ± 4). Всего в исследовании принимало участие 80 человек.

Контрольную группу (группа №1) составили 20 мужчин в возрасте от 55 до 65 лет, без сахарного диабета 2 типа, находившихся на плановом оперативном лечении в отделении хирургии.

В качестве критериев формирования групп служили изучаемые средства, которые использовались в комплексной терапии сосудистых осложнений. С учетом этого фактора были сформированы следующие группы:

Группа сравнения (группа №2) составила 20 мужчин с сахарным диабетом 2 типа, без сосудистых осложнений нижних конечностей.

Основная группа (группа №3) была представлена 40 мужчинами, страдающими сахарным диабетом 2 типа с макроангиопатией нижних конечностей (таблица 2)

Таблица 2

Характеристика групп объектов исследования, (Me [25p;75p])

Показатели	Группы обследованных		
	Группа(контроля) (n=20)	Группа 2 (сравнения) (n=20)	Группа 3(основная) (n=40)
Возраст, лет	64,23[62,40;70,20]	66,31 [61,50;72,50]	64,00 [59,00;70,00]
Мужчины	20	20	40

По характеру и степени поражения больные распределялись следующим образом; 30 пациентов с макроангиопатией нижних конечностей 1 степени (компенсация), характеризующейся наличием перемежающейся хромоты через 1000м и более, пальпаторно пульсация сохранена, ЛПИ - 0,9-1,0 и 10 пациентов со 2 степенью недостаточности кровообращения ПА (субкомпенсация), характеризующейся перемежающейся хромотой через 200-1000м, ЛПИ \leq 0,6. Трофические нарушения подразделяли по классификации раневых дефектов (по Вагнеру); из них 20 пациентов (50%) - раневой дефект отсутствовал, но наблюдались явления сухости кожи, клювовидная деформация пальцев,

выступление головок метатарзальных костей, другие костные и суставные аномалии, 10 пациентов (25%) - поверхностный язвенный дефект без признаков инфицирования на пальцах стоп, 7 пациентов (17%) – поверхностный язвенный дефект без признаков инфицирования на стопе, с преимущественной локализацией на пяточной области и 3 пациентов (8%) - поверхностный язвенный дефект голеней.

В зависимости от выбранного лечебного средства и проводимой терапии, которая включала в себя достижение и поддержание индивидуальных целевых показателей углеводного обмена (прием таблетированных, сахароснижающих препаратов из группы сульфонилмочевины и бигуанидов), антимикробные средства (антибиотики широкого спектра действия в достаточной дозировке, метронидазол), гиполипидемическая терапия (статины) разгрузку пораженной конечности (лечебно-разгрузочная обувь, индивидуальная разгрузочная повязка, кресло-каталка), первичную обработку раневого дефекта с полным удалением нежизнеспособных тканей хирургическим, ферментным или механическим путем, использование современных атравматичных перевязочных средств, соответствующих стадии раневого процесса, пациенты первой группы были подразделены на подгруппы по 20 человек. В 1-ой подгруппе (20 больных) в комплексной терапии назначался Sol.Octolipeni 600mg *1раз в/в в течение 7 дней, во 2-ой подгруппе(20 больных) дополнительно применяли введение Sol. N-acetylcysteine в суточной дозе 600mg однократно, внутривенно, в течение 7 дней.

Характеристика групп объектов исследования

В исследовании участвовали только лица, отвечающие критериям включения:

1. Верифицированный диагноз сахарного диабет 2 типа.
2. Уровень гликированного гемоглобина HbA1c от 6,5 до 8%
3. Пациенты мужского пола.
4. Возраст от 50 до 70 лет.

5. Подписанное добровольное информированное согласие пациента на участие в исследовании.

Критерии исключения:

1. Сахарный диабет 1 типа.
2. Наличие острых тяжелых осложнений СД 2 типа (диабетический кетоацидоз, гиперосмолярное, гипергликемическое состояние, молочнокислый ацидоз, гипогликемия и гипогликемическая кома).
3. Острые и хронические заболевания в стадии обострения.
4. Несоответствие критериям включения.
5. Критерии досрочного прекращения участия в исследовании:
6. Отсутствие приверженности к терапии.
7. Проявление побочных эффектов N-acetylcysteini.
8. Отзыв информированного согласия.

Характеристика проводимой фармакотерапии

Препарат α -липоевой кислоты. Препаратом α -липоевой кислоты, используемого в исследовании, был выбран Октолипен[®] (владелец регистрационного номера Фармстандарт Уфа ВИТА, Россия). Фармакологическое действие - препарат с антиоксидантным действием, регулирующий углеводный и липидный обмен. Основным показанием для назначения препарата является диабетическая полинейропатия.

Фармакокинетика. Уровень альфа-липоевой в сыворотке здоровых людей в среднем составляет примерно 10-15 $\mu\text{г}/\text{мл}$. Выведение альфа-липоевой кислоты из плазмы происходит очень быстро, конечный период полураспада составляет около 30 минут. Выведение α -липоевой кислоты осуществляется почками в виде

окисленных или конъюгированных метаболитов. Токсичность препарата очень низкая, тератогенное или канцерогенное действие α -липоевой кислоты не обнаружено.

Противопоказания к применению препарата: известная чувствительность к α -липоевой кислоте, беременность, лактация.

Препараты α -липоевой кислоты, способ лечения. На сегодняшний день Октолепен выпускается в растворе (1 ампула с 20 мл раствора, содержащего 600 мг α -липоевой кислоты) и в таблетках (в таблетке, покрытой оболочкой, содержится 300 мг α - липоевой кислоты). При проведении настоящего исследования Октолепен назначали по 600 мг 1 раз в сутки внутривенно, в течение 7 дней (Машковский М.Д., 2005).

Препарат N-ацетилцистеина

Препаратом N-ацетилцистеина, используемого в исследовании, был выбран Флуимуцил[®] (владелец регистрационного удостоверения: ZAMBON, S.p.A. Италия). Разрешен Фармакологическим комитетом России для клинического использования в качестве муколитического препарата с антиоксидантным действием. Форма выпуска - раствор для инъекций и ингаляций прозрачный, бесцветный, со слабым серным запахом; каждая ампула содержит 3мл – 300мг ацетилцистеина, вспомогательные вещества: динатрия эдетат, натрия гидроксид, вода д/и.

Оказывает антиоксидантное действие, обусловленное наличием SH-группы, способной вступать во взаимодействие и нейтрализовать электрофильные окислительные токсины. N-ацетилцистеин способствует повышению синтеза глутатиона, который является важным антиоксидантным фактором внутриклеточной защиты и обеспечивает поддержание функциональной активности и морфологической целостности клетки. Сульфгидрильная группа (SH) N-ацетилцистеина ответственна за его метаболическую активность, ацетильная группа делает молекулу более устойчивой к окислению и деструкции

пищеварительными ферментами. N-ацетилцистеин чаще рассматривают как пролекарство глутатиона, который в клетках и/или в плазме деацетилируется, превращаясь в L-цистеин, который в свою очередь идёт на построение глутатиона.

Кроме того, его используют при интоксикации ацетаминофеном, он оказывает цитопротекторное действие при химиотерапии онкологических заболеваний и предупреждает развитие нефропатии в результате использования рентгеноконтрастных средств.

Основные показания для применения препарата связаны с заболеваниями органов дыхания, сопровождающиеся нарушением отхождения мокроты (Машковский М.Д., 2005).

2.2. Методы исследования. Высокоэффективная жидкостная хроматография.

Аппаратура и оборудование.

В работе использовались - флуориметрический детектор RF-10AXL (Shimadzu, Япония), спектрофотометрический детектор Shimadzu SPD-M20, насос высокого давления LC-20AT Prominence (Shimadzu, Japan), ручной инжектор 7725i Rheodyne (USA) с петлей на 100 мкл, компьютерная хроматографическая программа "Мультихром" версия 3.0 (Амперсанд, Россия).

Биологический материал. Кровь забирали в "чистые" (сыворотка) или гепаринизированные (плазма) контейнеры (Vacutainer) и центрифугировали 10 мин.

Определение цистеина сыворотке крови (Дутов А.А., 2016)

Стандарты. Стандарты D,L-гомоцистеина (Fluka), L-цистеина (Aldrich) и L-глутатиона SH (Sigma-Aldrich), растворяли в 0.01 М HCl (100 нг/мкл) и хранили в холодильнике при +4⁰С (сохраняются до 3 месяцев). L-пеницилламин (Aldrich) использовали в качестве внутреннего стандарта (IS) для оценки потерь при

экстракции и дериватизации. Поскольку L-пеницилламин в водных растворах нестойк, после приготовления его помещали по 100 мкл. в РР-микропробирки и замораживали. В таком виде он сохраняется до 1 месяца.

Реактивы. Дериватизационный реагент готовили растворением 5,5'-дителиобис-(2-нитробензойной кислоты) или DTNB, > 97,5% (Fluka) в 0,25 М фосфатном буфере с рН 8.0 (40 мг/мл). Хранили в затемнённом месте при комнатной температуре. Сохраняется до 2 месяцев. В качестве восстанавливающего реагента использовали 1,4-дителиоэритритол, >99% ("Fluka") его растворяли в том же 0,25 М фосфатном буфере с рН 8,0 (2 мг/мл) и добавляли 0.3 мг/мл ЭДТА ("ХЧ", "Синтакон", Санкт-Петербург). Ацетонитрил ("Криохром", Санкт-Петербург) и изопропанол ("Лекбиофарм", Москва) квалификации "для ВЭЖХ", метанол LiChrosolv for liquid chromatography ("Merck", Германия), H_3PO_4 (puriss), лимонная кислота (puriss) и трифторуксусная кислота (TFA) >99,5% ("Fluka").

Определение общего (total) и свободного (free) цистеина (Cys) в плазме

Стандарты. По 20 мкл. Cys, IS (пеницилламин), GSH и Hcy + 80 мкл воды + 40 мкл реагента Элмана (40 мг/мл) → stand 10 мин., 5 мкл в петлю (=50 нг каждого). Биопробы; Cysfree: 200 мкл плазмы+ 100 мкл 0.25 М фосфатного буфера с рН 8.0 Cystotal: 200 мкл плазмы+ 50 мкл DTT (4 мг/мл) + 50 мкл 0.25 М фосфатного буфера с рН 8.0. Примечание: обе биопробы обрабатываются одновременно 10 мин при 50⁰С + 20 мкл IS (пеницилламин, 100 нг/мкл) + 40 мкл реагента Элмана (40 мг/мл) → mix, stand min 10 мин + 20 мкл HClO₄, mix, центрифугировать 2 мин при 10.000 rpm, 10 мкл в петлю (=0.005 мл плазмы и содержит 50 нг IS).

Колонка Luna (Phenomenex) 150 × 4.6 мм, C18(2), 5 мкм, с предколонкой, УФ 330 нм, ацетонитрил – 0.05 М лимонная кислота – изопропанол (20:80:1, v/v/v), 1000/мин, 78 бар.

Определение глутатиона (Дутов А.А., 2015)

Стандарты. Стандарты D,L-гомоцистеина (Fluka), L-цистеина (Aldrich) и L-глутатионаSH (Sigma-Aldrich), растворяли в 0.01 М HCl (100 нг/мкл) и хранили в холодильнике при +4⁰C (сохраняются до 3 месяцев). L-пеницилламин (Aldrich) использовали в качестве внутреннего стандарта (IS) для оценки потерь при экстракции и дериватизации. Поскольку L-пеницилламин в водных растворах нестойк после приготовления его помещали по 100 мкл в PP-микропробирки и замораживали. В таком виде он сохраняется до 1 месяца.

Реагенты. Аналогичны таковым как при анализе цистеина. Стандарты смешивали по 10 мкл смеси четырех стандартов (все в концентрации 100 нг/мкл), добавляли 40 мкл воды и 20 мкл реагента Элмана (20 мг/мл). Выдерживали 10 мин и 10 мкл вводили в петлю инжектора.

Обработка биологического материала. Кровь отбирали в вакутайнеры с ЭДТА, центрифугировали и плазму выбрасывали. Эритроциты отмывали 3-4 объемами физиологического раствора путем переворачивания пробирки и центрифугировали 2 мин при 3000 rpm (СМ-6М, Elmi, Латвия). Верхний слой физиологического раствора отбрасывали. Процедуру повторяли до тех пор, пока надосадочный раствор не станет прозрачным. Отбирали 40 мкл эритроцитарной массы в 2-мл полипропиленовую пробирку с овальным дном, добавляли 360 мкл воды, перемешивали, и, таким образом, получался гемолизат. По 200 мкл этого гемолизата использовали для анализа общего и свободного глутатиона.

Дериватизация. К 200 мкл гемолизата добавляли 100 мкл 1,4-дитиоэритритола + 40 мкл 0.25 М фосфатного буфера с pH 8.0 для анализа общего GSH или только 140 мкл того же буфера для анализа свободного GSH и помещали в термостат на 15 мин при 50⁰C. Затем добавляли 40 мкл внутреннего стандарта (L-пеницилламин, 100 нг/мкл), 100 мкл реагента Элмана, перемешивали и выдерживали 10 мин. После этого добавляли 20 мкл хлорной кислоты, перемешивали интенсивным встряхиванием и центрифугировали 1 мин при 10.000 rpm. Отбирали 100 мкл

супернатанта и 12.5 мкл вводили в петлю инжектора (содержит 100 нг IS и эквивалентно 0.0005 мл эритроцитарной массы).

Определение глиоксаля и метилглиоксаля (Дутов А.А., 2017)

Стандарты и реактивы. Стандарты глиоксаля (Go) и метилглиоксаля (MGo) в виде водных 40% растворов (оба Sigma) хранили в холодильнике при 4⁰С. Для получения рабочих растворов стандартов их разбавляли водой до концентрации 100 нг/мкл и хранили при 4⁰С. Сохраняются до 1 месяца.

Дериватизационный реагент – о-фенилендиамин дигидрохлорид (Sigma) – в виде порошка хранили в морозильнике при –20⁰С. Рабочий раствор готовили в день исследования, растворяя в дистиллированной воде (5 мг/мл). Ацетонитрил (ОСЧ, Криохром, Санкт-Петербург), метанол (ХЧ, Вектон, Санкт-Петербург), диэтиловый эфир (ХЧ, Кузбассоргхим). Хлорная кислота (ХЧ, Реахим).

Биологические образцы. Кровь отбирали в вакутайнеры с ЭДТА, центрифугировали 5 мин при 3000 rpm (СМ-6М, Elmi, Латвия) и если анализ не проводился немедленно, плазму отбирали, замораживали и хранили при –20⁰С.

Депротеинизация . Производится с помощью HClO₄ (70 мкл на 1 мл плазмы или 0.33 мл + 23 мкл). В 2-мл полипропиленовую пробирку добавляют serum, HClO₄ и перемешивают 2 мин на вортексе (режим F5 или F8). Центрифугируют 2 мин при 10.000 rpm (СМ-50). Супернатант используют для дериватизации. Дериватизация. Стандарты: в 1-мл виалу из темного стекла, добавляют по 25 мкл Go and MGo, 140 мкл воды, 10 мкл HClO₄ и 50 мкл фенилендиамина, закручивают крышку и помещают в термостат на 10 мин при 50⁰С. Биопроба: к 200 мкл супернатанта, помещенного в 1-мл виалу из темного стекла, добавляют 50 мкл фенилендиамина и также помещают в термостат LLE-очистка. После охлаждения дериваты переносят в 2-мл полипропиленовую пробирку с плоским дном, добавляют 1.5 мл эфира и перемешивают 5 мин на вортексе. Органический слой переносят в 5-мл стеклянные стаканчики Simax и упаривают в термостате при

50°C. Сухой остаток растворяют в 1 мл воды (стандарты) и 4 мкл вводят в петлю инжектора (содержит по 10 нг каждого кетоальдегида). Экстракт биопробы растворяют в 100 мкл воды и 25 мкл вводят в петлю инжектора (эквивалент 0.05 мл плазмы).

Оценка уровня боли с использованием визуальной аналоговой шкалы

Оценки болевого синдрома базировались на интерпретации утверждений самих пациентов. Для этого использовали визуально-аналоговую шкалу — ВАШ, Visual Analog Scale (Новик А.А., Ионова Т.И., 2007), представленную в виде отрезка, между точками «боли нет» и «невыносимая или максимальная боль» (помощь в оценке боли оказывали пояснения, вписанные вдоль линии - «слабые, умеренные, сильные»). Пациент отмечал точку, которая, по его мнению, наиболее соответствует силе испытываемого им болевого ощущения. В основе градации лежит наличие границ категорий тяжести боли, при которых происходят качественные и количественные изменения характера влияния боли на основные параметры качества жизни. При динамической оценке изменение интенсивности боли считается объективным и существенным, если настоящее значение ВАШ отличается от предыдущего более чем на 13 мм (на неградуированной линии длиной 10 см). Очевидная субъективность такого подхода была подкреплена, не только утверждением пациента, но и врачебной оценкой этого утверждения — в комплексе с рядом клинических признаков (мимические гримасы, стоны, повышение голоса, бледность, потливость, слезотечение, расширение зрачка, тахикардия, гипертензия, дискоординация дыхания и др.) (Милушкина О.И., 2008).

Статистическая обработка данных

Полученные данные обработаны непараметрическими методами статистики, используемыми в биологии и медицине при помощи программы Statistica 6,1. При проведении описательной статистики для данных с нормальным распределением

вычисляли среднее значение, медиану и стандартное отклонение в виде $M \pm SD$ или медиана с указанием 25-го и 75-го перцентилей в виде $Me [25;75]$. Для сравнения выборок использовались критерии Манна-Уитни, Уилкоксона, Колмогорова - Смирнова. Для анализа внутригрупповых связей количественных признаков использовали корреляционный анализ Спирмана. Для выбора наиболее информативных лабораторных показателей с целью диагностики сосудистых осложнений больных СД 2 типа и в сочетании с макроангиопатией нижних был использован многофакторный анализ. Различия величин признавали статистически значимыми при критическом уровне $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Закономерности изменений показателей карбонильного стресса и состояния тиол-дисульфидной системы у мужчин с СД2 типа и макроангиопатией нижних конечностей

Во всех органах-мишенях при сахарном диабете происходят однотипные изменения в микроциркуляторном русле на уровне обменных капилляров и венул, клетки эндотелия и перицитов которых подвергаются функциональным и структурным изменениям при необратимом формировании КПГ. Основной причиной является длительное нарушение биологической функции эндоэкологии – гипергликемия и непосредственное взаимодействие гликотоксинов - глиоксаля, метилглиоксаля и МДА (бифункциональных реагентов) с аминокислотными остатками Лиз и Арг плазматических мембран клеток эндотелия и перицитов (Титов В.Н., Ширяева Ю.К., 2011). В равной мере это относится и к дистальной, диабетической нейропатии, деструктивному поражению сосудов звена микроциркуляции в области терминальных отделов аксонов и синапсов. При формировании микроангиопатии количественное определение КПГ является диагностически важным методом оценки прогноза и риска развития осложнений. При этом MGo и МДА способны быть диагностическими тестами, которые отражают гликирование не только интегральных белков плазматических мембран клеток эндотелия и перицитов, но и аминофосфолипидов в составе миелина. Нами было проведено количественное определение уровня Go и MGo у пациентов различных групп (таблица 3).

Таблица 3

Изменения показателей карбонильного стресса у пациентов с СД 2 типа и макроангиопатией нижних конечностей, (M±SD)

Показатели нг/мл	Группа 1	Группа 2	Группа 3
------------------	----------	----------	----------

	(контроль) (n=20)	(сравнения) (n=20)	(основная) (n=40)
Go	16±6	24±2,6 $p_1 \leq 0,02$	190±29 $p_1 \leq 0,001$ $p_2 \leq 0,001$
MGo	23±6	37,5±4,5 $p_1 \leq 0,04$	312±15 $p_1 \leq 0,0001$ $p_2 \leq 0,0001$

Примечание: p_1 -достоверность различий по сравнению с контролем; p_2 - достоверность различий между 2 и 3 группами.

При исследовании нами выявлено увеличение уровня Go в группе № 2 на 50% (в 1,5 раза) в сравнении с показателями 1-ой группы, а при развитии макроангиопатии нижних конечностей у пациентов в 3-ей группе данный показатель был повышен в 11 и 7 раз по сравнению с пациентами 1-ой и 2-ой групп. Содержание MGo в группе сравнения составило 37,5±4,5нг, а в основной - 312±45 нг/мл ($p_1 \leq 0,0001$), что превысило значение показателя в группе контроля в 1,6 и в 8 раз соответственно. Концентрация Go в основной группе 190±29нг/мл ($p_1 \leq 0,001$), что статистически значимо выше, чем в группе контроля в 11раз и в 7 раз соответственно к группе сравнения.

Таким образом, данные свидетельствуют об активации полиолового пути распада глюкозы. В физиологических условиях по полиоловому пути происходит метаболизм не более 1% глюкозы. В превращениях глюкозы задействованы два фермента: вначале альдоредуктаза восстанавливает глюкозу до сорбитола с образованием НАДФ⁺ и увеличением НАДФ⁺/НАДФН, снижает активность глутатионредуктазы и подавляет восстановление глутатиона (Alan N.W., 1999). На фоне СД 2 типа формирование резистентности к инсулину, активность полиолового пути увеличиваются на порядок, что и приводит к формированию большого количества глиоксаля и метилглиоксаля, которые начинают заполнять

межклеточную среду, так как клетки способны детоксицировать их медленнее, чем образовывать.

В последние годы все больше исследователей подтверждают важную роль антиоксидантной системы, как одного из защитных механизмов при многих патологических процессах, сопровождающихся накоплением гликотоксинов, в том числе и при сахарном диабете. В связи с этим важно изучить, как изменяются показатели тиол-дисульфидной системы при данном патологическом состоянии, когда на фоне компенсации основного заболевания появляются осложнения в виде макроангиопатии нижних конечностей.

Для оценки состояния тиол-дисульфидной системы у пациентов с СД 2 типа и осложненным течением заболевания нами было определено содержание различных фракций аминотиолов (общего глутатиона (GSH), восстановленного (GSHfree) и окисленного глутатиона (GSSG), общего цистеина (Cystotal), восстановленного цистеина (CysSH) и окисленного (CysSSCys)).(таблица 4).

Таблица 4

Показатели цистеина в сыворотке больных различных групп, (M±SD)

Показатели мкг/мл	Группа 1 (контроль) (n=20)	Группа 2 (сравнения) (n=20)	Группа 3 (основная) (n=40)
Cystotal	26,5±2,5	40,2±6,6 p ₁ ≤0,05	31±5,1 p ₁ ≤0,002 p ₂ ≤0,02
CysSH	17,2±2,1	25,4±3,3	14,5±2,9 p ₂ ≤0,05

CysSSCys	8,1±1,5	15,3±3,5 p ₁ ≤0,05	16,5±3,2 p ₁ ≤0,05
----------	---------	----------------------------------	----------------------------------

Примечание: p₁- достоверность различий по сравнению с контролем; p₂ - достоверность различий между 2 и 3 группами.

Оценивая концентрацию различных фракций цистеина в сыворотке больных с СД 2 типа, выявлена статистически значимая разница по уровню общего цистеина (Cystotal) и окисленного (CysSSCys). Концентрация общего цистеина в группе больных с СД 2 типа (группа №2) составила - 40,2±7,4 мкг/мл, при осложненном ангиопатией нижних конечностей (группа №3) - 31,1±5,1 мкг/мл, что превышает данный показатель в контрольной группе на 52% и 23% соответственно. Показатели свободного цистеина во 2-ой группе больных были выше на 47%, а в группе № 3 ниже на 16% в сравнении с группой контроля. Окисленный цистеин на фоне СД 2 типа (группа № 2) повышался в сравнении с контрольной группой в 1,8 раз (на 88%), а в группе с осложненным течением (группа №3) в 2 раза (на 103%). Из полученных нами данных можно говорить о том, что при исследовании уровня цистеина в сыворотке, очень важно знать, не только общее его количество, а именно уровень CysSH (восстановленной фракции) и CysSSCys (окисленной фракции), так как, общее количества цистеина в контрольной группе статистически значимо ниже, чем в основной группе и в группе сравнения. Несмотря на это, CysSH в контрольной группе больше, чем CysSSCys за счет чего и происходит нормальное протекание жизнедеятельности клетки. При СД 2 типа большее количество общего цистеина может свидетельствовать о напряжении антиоксидантной системы, которое выражается либо в медленном распаде, либо в накоплении вещества, за счет замедления прохождения реакций в клетке и утолщения базальной мембраны.

В системе глутатиона также происходят изменения. Глутатион является наиболее распространенным внутриклеточным антиоксидантом, нарушение

регуляции которого приводит к различным патологическим состояниям. Существуют доказательства (in vitro и в клинических испытаниях) того, что нарушение статуса глутатиона ведет к дисфункции β -клеток поджелудочной железы и принимает участие в патогенезе долгосрочных осложнений сахарного диабета. Обычно около 99% внутриклеточного глутатиона существует в восстановленной форме (GSHfree).

На основании вышеизложенного нами были проведены исследования уровня различных фракций глутатиона у пациентов изучаемых групп (таблица 5).

Таблица 5

Изменения параметров в системе глутатиона у пациентов с СД 2 типа и макроангиопатией нижних конечностей, (M \pm SD)

Показатели мкг/мл	Группа 1 (контроль) (n=20)	Группа 2 (сравнения) (n=20)	Группа 3 (основная) (n=40)
GSHtotal	788 \pm 147,2	631 \pm 70,1 $p_1 \leq 0,02$	433 \pm 35,1 $p_1 \leq 0,0005$ $p_2 \leq 0,0001$
GSHfree	752 \pm 146,3	576 \pm 67,2 $p_1 \leq 0,04$	342 \pm 36,1 $p_1 \leq 0,0006$ $p_2 \leq 0,0002$
GSSG	36 \pm 8,3	55 \pm 7,1 $p_1 \leq 0,001$	91 \pm 9,2 $p_1 \leq 0,001$ $p_2 \leq 0,002$

Примечание: p_1 - достоверность различий по сравнению с контролем; p_2 - достоверность различий между 2 и 3 группами.

Уровень общего глутатиона в эритроцитах у больных СД 2 типа без сосудистых осложнений и с сосудистыми осложнениями снижался соответственно на 24 и 50% соответственно. Следует подчеркнуть, что более выраженное снижение в группе с макроангиопатией нижних конечностей было статистически значимо по сравнению с таковыми без осложнений. Уровень восстановленного глутатиона также статистически больше снижается в основной группе (группа №3) на 108 и 59,3% соответственно группе контроля и группе сравнения, без сосудистых осложнений. Содержание окисленного глутатиона в группе № 2 увеличилось на 52%, а в группе № 3 резко возросло - на 70%, в сравнении с параметрами у здоровых лиц, что свидетельствует о процессах окисления в условиях хронической гипергликемии.

Тиоловые соединения - важный компонент поддержания окислительно-восстановительного гомеостаза в клетках и тканях. При различных стрессовых воздействиях и патологических состояниях наблюдается обратимая окислительная модификация SH – групп, приводящая к увеличению количества дисульфидных связей, что является неспецифической реакцией организма на экстремальное воздействие. Такая модификация изменяет состояние клеточных мембран, их проницаемость и адгезивные свойства, влияет на активность ферментов и клеточную пролиферацию, вызывает нарушения структуры цитоскелета. Поэтому соотношение восстановленных и окисленных SH – групп и их способность к окислительной модификации является важным критерием неспецифической резистентности организма. В плазме преобладающим аминотиолом является цистин (CysSS), представляющий собой окисленную форму цистеина (Cys). Коэффициент $CysSH/CysSSCys$ может служить индикатором антиоксидантного потенциала плазмы (Jones D.P. et al., 1998), а для оценки его в различных органах и тканях достаточно оценить пул тиолы/дисульфиды (Jones D.P., 2002). Внутриклеточный баланс GSH и GSSG является одним из показателей окислительного стресса и характеризует состояние

клетки на примере эритроцитов. И в сыворотке, и непосредственно в эритроцитах количество окисленных фракций намного больше, чем восстановленных, за счет этого окислительно – восстановительный потенциал в сыворотке и клетке (эритроците) изменяется в сторону увеличения окисленных продуктов (таблица 6).

Таблица 6

Коэффициенты CysSH/CysSSCys и GSH/GSSG у пациентов с СД2 типа и макроангиопатией нижних конечностей, (M±SD)

Показатели	Группа 1 (контроль) (n=20)	Группа 2 (сравнения) (n=20)	Группа 3 (основная) (n=40)
CysSH/CysSSCys	2,1±0,5	1,7±0,3	0,7±0,2 $p_1 \leq 0,003$ $p_2 \leq 0,05$
GSH/GSSG	20±1,5	10±1,2 $p_1 \leq 0,005$	6±1,1 $p_1 \leq 0,003$ $p_2 \leq 0,01$

Примечание: p_1 - достоверность различий по сравнению с контролем; p_2 - достоверность различий между 2 и 3 группами.

Динамика содержания CysSH и CysSSCys у больных сахарным диабетом 2 типа с различным течением заболевания приводила к существенным сдвигам в соотношении этих показателей. Так, значение соотношения CysSH/CysSSCys, в группе контроля составил 2,1 у.е, в группе №2 - 1,65 у.е.(уменьшение на 20%), в группе № 3 составил всего 0,7 у.е.(уменьшение на 67%), данные показатели статистически значимы.

Окислительно-восстановительный потенциал эритроцитов, так же значительно изменяется. В контрольной группе коэффициент GSH/GSSG

составил – 20 у.е, в группе с СД 2 типа (группа №2) в 1,8 раз меньше (на 55%) – 11 у.е., в группе с диабетической ангиопатией (группа №3) - всего 6 у.е. – в 3,3 раза меньше (на 70%). Окислительно-восстановительный потенциал эритроцитов пациентов с макроангиопатией нижних конечностей статистически значимо отличается от показателей группы сравнения.

Таким образом, исследуя различные фракции цистеина, глутатиона и вычисляя соотношение этих показателей можно говорить об окислительно-восстановительном потенциале в сыворотке и клетке (на примере эритроцитов). При развитии диабетической макроангиопатии нижних конечностей соотношение этих показателей резко уменьшается, за счет увеличения окисленных фракций, то есть определение общего количества веществ не может в полной мере отразить нарушения протекаемые в организме.

Резюме

Из всего вышесказанного можно сделать заключение, что непосредственно клетки, частным вариантом которого являются эритроциты, также страдают в условиях хронического окислительного стресса, а внутриклеточный баланс GSH и GSSG является его динамическим индикатором и доказывает истощение антиоксидантной системы внутри клетки, при прогрессировании сосудистых осложнений СД. Концентрация GSH и GSSG не только отражает некоторые изменения в системе антиоксидантной защиты, но и показывает изменения в окислительно-восстановительном состоянии. Полученные данные показывают, что окислительно-восстановительное состояние в эритроцитах(GSH/GSSG) и сыворотке (CysSH/CysSSCys) изменяется в зависимости от наличия осложнений СД 2 типа.

Соотношение тиол/дисульфид - окислительно-восстановительное состояние, по сути, может играть центральную роль в регуляции функций клеток. Важно отметить, что при СД 2 типа и макроангиопатии нижних конечностей, количество окисленной фракции глутатиона статистически значимо отличаются, и наглядно видно не только увеличение количества окисленных продуктов, но и

истощение потенциальных возможностей организма за счет снижения уровня общего и свободного глутатиона. Увеличение показателей карбонильного стрессов у пациентов с СД 2 типа и кратное их увеличение у пациентов с осложненным течением не только подтверждают имеющийся дисбаланс в организме, но и могут быть применены в качестве прогностических критериев. Еще одним доказательством следует считать то, что нейтрализация конечных продуктов гликирования, происходит за счет работы глиоксилазной системы, которая без глутатиона работать не будет, таким образом, происходит формирование порочного круга.

3.2 Динамика изменения показателей тиол-дисульфидной системы и показателей карбонильного стресса при применении α -липоевой кислоты у пациентов с диабетической макроангиопатией нижних конечностей

В настоящее время результаты исследований карбонильного стресса и тиол-дисульфидной системы сыворотки и клетки при диабетической макроангиопатии сосудов нижних конечностей, приведенные в доступной литературе, неоднозначны.

В связи с этим нами проведено исследование динамики уровней аминоктиолов сыворотки (таблица 7), показателей системы глутатиона в клетке, при стандартной терапии с включением α -липоевой кислоты у пациентов с диабетической макроангиопатией нижних конечностей. Интенсивность карбонильного стресса оценивали по уровню конечных продуктов гликирования Go и MGo.

Таблица 7

Динамика показателей цистеина при стандартной терапии + α -липоевая кислота у пациентов с диабетической макроангиопатией нижних конечностей (M \pm SD)

Показатели мкг/мл	Контроль (n=20)	Дни исследования (n=20)		
		1 сутки	3 сутки	7 сутки
Cystotal	26,5±2,5	31±5,1 $p_1 \leq 0,05$	32±6,2 $p_1 \leq 0,05$	31±8,1 $p_1 \leq 0,05$
CysSH	17,2±2,1	14,5±4,9 $p_1 \leq 0,05$	14,2±4,9 $p_1 \leq 0,05$	13,5±5,2 $p_1 \leq 0,05$
CysSSCys	8,1±1,5	16,5±3,2 $p_1 \leq 0,002$	16,2±5,2 $p_1 \leq 0,002$	18,3±7,2 $p_1 \leq 0,002$
CysSH/CysSSCys	2,1±0,5	0,7±0,2 $p_1 \leq 0,05$	0,6±0,2 $p_1 \leq 0,05$	0,6±0,2 $p_1 \leq 0,05$

Примечание: Примечание: p_1 - достоверность различий по сравнению с контролем; p_2 - достоверность различий по сравнению с 1-ми сутками.

При использовании стандартной терапии + α -липоевая кислота уровень различных фракций цистеина в динамике значимо не изменяется. Общее количество цистеина в первые сутки составляет 31±5 мкг/мл, к третьим суткам увеличивается до 32±6 мкг/мл и к седьмым суткам становится равным исходной цифре. Количество восстановленного цистеина снижается к седьмым суткам на 7% и равняется 13,5±5 мкг/мл. Стоит отметить об увеличении фракции окисленного цистеина на 12%, его уровень к седьмым суткам составил 18±7 мкг/мл. Коэффициент CysSH/CysSSCys составляет 0,6, что меньше единицы, тем самым доказывая, что в условиях хронической гипергликемии окислительные реакции преобладают над реакциями восстановления, а стандартная терапия в комбинации с α -липоевой кислотой в полной мере не позволяет улучшить антиоксидантную активность сыворотки, хотя является достаточно адекватной.

В эритроцитах концентрация глутатиона на несколько порядков выше по сравнению с плазмой. Важно отметить, что ключевым внутриклеточным

антиоксидантом является глутатион. Он так же принимает участие в регуляции синтеза белков теплового шока и в реализации механизмов апоптоза (Casciatiore I. et al., 2010; Wu G. et al., 2004; Townsend D.M. et al., 2003).

Глутатион участвует в преобразовании цитотоксичного продукта метилглиоксаля в лактат, осуществляя детоксикационную функцию, и именно восстановленный глутатион обеспечивает антиоксидантную защиту клеток (Wu et al., 2004). Поэтому необходимо изучение влияния в динамике компонентов стандартной терапии с α -липоевой кислотой на данный показатель (таблица 8).

Таблица 8

Динамика содержания глутатиона при стандартной терапии+ α -липоевая кислота у пациентов с диабетической макроангиопатией нижних конечностей, (M \pm SD)

Показатели мкг/мл	Контроль (n=20)	Дни исследования		
		1 сутки	3 сутки	7 сутки
GSHtotal	788 \pm 172,2	433 \pm 35,1 $p_1 \leq 0,0005$	397 \pm 44,2 $p_1 \leq 0,0005$	428 \pm 32,3 $p_1 \leq 0,0005$
GSHfree	752 \pm 146,1	342 \pm 36,1 $p_1 \leq 0,0006$	372 \pm 46,2 $p_1 \leq 0,0006$	357 \pm 79,2 $p_1 \leq 0,0006$ $p_3 \leq 0,002$
GSSG	36 \pm 8,3	91 \pm 9,2 $p_1 \leq 0,0006$	29 \pm 4,2 $p_2 \leq 0,005$	32 \pm 6,1 $p_1 \leq 0,0002$ $p_3 \leq 0,05$
GSH/GSSG	20 \pm 1,5	6 \pm 1,1 $p_1 \leq 0,05$	15 \pm 1,2 $p_1 \leq 0,05$ $p_2 \leq 0,005$	11 \pm 1,3 $p_1 \leq 0,004$ $p_3 \leq 0,005$

Примечание: p_1 - достоверность различий по сравнению с контролем; p_2 - достоверность различий между 1 и 3 сутками; p_3 - достоверность различий между 3 и 7 сутками.

Динамика изменений показателей системы глутатиона при стандартном лечении + α -липоевая кислота заключается в том, что за счет увеличения GSHfree 372 ± 46 мкг/мл, т.е. на 8% к третьим суткам от начала лечения, количество GSSG 29 ± 8 мкг/мл уменьшается на 48%, тем самым коэффициент GSH/GSSG увеличивается в 2,7 раз и становится равным 15 ($p_2\leq 0,005$). К седьмым же суткам уровень GSHtotal становится равным 428 ± 82 мкг/мл, что значимо не отличается от показателей до начала лечения. Уровень GSHfree уменьшается к седьмым суткам на 5% до 357 ± 79 мкг/мл, но остается достоверно больше по отношению к первым суткам. Окисленный глутатион увеличивается на 14% - 65 ± 32 мкг/мл, тем самым соотношение тиол/дисульфид, характеризующее окислительно-восстановительный потенциал клетки, уменьшается на 27% и становится равным 11,0.

Таким образом, в условиях хронической гипергликемии и развития таких грозных осложнений СД 2 типа, как макроангиопатия нижних конечностей при использовании стандартных консервативных методов лечения в комплексе с α -липоевой кислотой можно говорить о том, что нормализация в антиоксидантной системе сыворотки и клетке происходит не в полной мере. Прослеживается динамика увеличения изучаемых показателей к третьим суткам от начала лечения, но к седьмым суткам процессы окисления вновь начинают преобладать, что подтверждается увеличением количества окисленного глутатиона на 14% и уменьшением коэффициента GSH/GSSG на 27%.

В последние годы все больше исследователей подтверждают одну из ключевых ролей в патогенезе сосудистых осложнений при СД 2 типа карбонильному стрессу и накоплению в организме токсичных соединений -

метилглиоксаля, глиоксаля. При чем, экспериментальные и клинические данные свидетельствуют о том, что интенсивность гликирования под действием метилглиоксаля и глиоксаля нарастает при диабете непропорционально увеличению концентрации глюкозы (Thornalley P.J., 1999). Нами установлено изменение количества карбонильных соединений в динамике при использовании стандартных методов консервативной терапии+ α -липоевая кислота (таблица 9).

Таблица 9

Динамика показателей карбонильного стресса при стандартной терапии+ α -липоевая кислота у лиц с диабетической макроангиопатией нижних конечностей, (M \pm SD)

Показатели нг/мл	Контроль (n=20)	Дни исследования		
		1 сутки	3 сутки	7 сутки
Go	16 \pm 6,1	190 \pm 11,7 $p_1 \leq 0,05$	32 \pm 5,2 $p_1 \leq 0,05$ $p_2 \leq 0,005$	31 \pm 7,1 $p_1 \leq 0,05$
MGo	23 \pm 8,2	312 \pm 45,2 $p_1 \leq 0,005$	305 \pm 29,1 $p_1 \leq 0,005$	113 \pm 11,1 $p_1 \leq 0,005$ $p_3 \leq 0,005$

Примечание: p_1 - достоверность различий по сравнению с контролем; p_2 - достоверность различий между 1 и 3 сутками; p_3 - достоверность различий между 1 и 7 сутками.

Концентрация глиоксаля в группе исследуемых на момент от начала терапии в 7 раз больше, чем в группе сравнения. К третьим суткам происходит статистически значимое снижение данного показателя до 32 \pm 5,2нг/мл ($p_2 \leq 0,005$) на 84%. Статистически значимого различия в концентрации глиоксаля между третьими и седьмыми сутками мы не обнаружили, хотя прослеживается тенденция снижения уровня изучаемого вещества. При определении уровня

метилглиоксаля у пациентов с диабетической макроангиопатией нижних конечностей мы получили следующие данные, в группе контроля данный показатель составляет 23 ± 8 мкг/мл. У пациентов основной группы концентрация метилглиоксаля в первые сутки была значимо выше – в 13 раз и равнялась 312 ± 45 нг/мл ($p_1 \leq 0,005$). При использовании стандартной терапии + α -липоевая кислота к третьим суткам значимого снижения не происходит, и лишь к седьмым суткам от начала лечения отмечается статистически значимое снижение в 2,8 раза и составляет 113 ± 11 нг/мл ($p_3 \leq 0,005$). Итак, нами установлено положительное влияние компонентов стандартной терапии + α -липоевая кислота на величины, отражающие динамику карбонильного стресса в организме. Происходит уменьшение исследуемых параметров, но содержание глиоксаля, метилглиоксаля к седьмым суткам остается достоверно высоким по отношению к группе контроля и группе сравнения.

3.3 Особенности состояния тиол-дисульфидной системы и изменения концентрации уровня конечных продуктов гликирования на фоне проведения консервативной терапии с включением NAC

Учитывая полученные данные, нами было предложено к стандартной терапии добавить внутривенное применение NAC. Применяли двукратное внутривенное введение по $300 \text{ мг} \cdot 2$ раза в день в течение 7 дней. Изменение показателей также оценивали на 1, 3 и 7 сутки от начала лечения. Так как NAC является не только пролекарством, но и прекурсором GSH и сначала деацетилируется в цистеин, который в дальнейшем используется для синтеза GSH, были выявлены изменения по концентрации различных фракций цистеина от момента начала лечения (таблица 10).

Таблица 10

Изменения показателей цистеина при комбинированной терапии NAC у пациентов с диабетической макроангиопатией нижних конечностей, ($M \pm SD$)

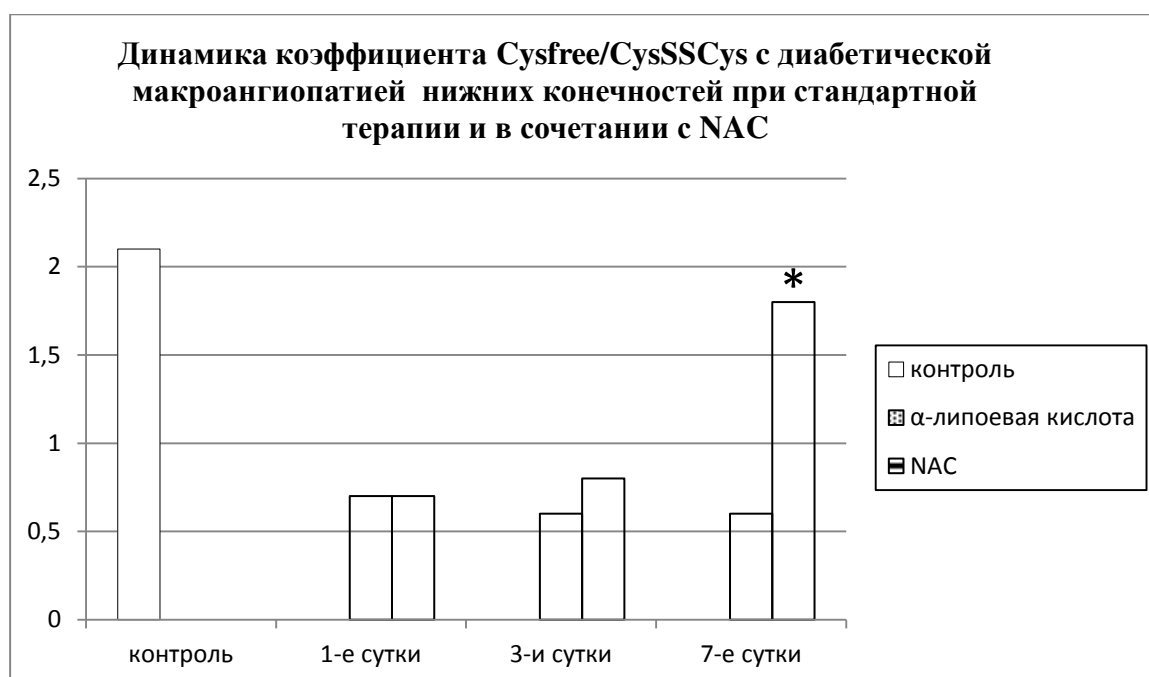
Показатели мкг/мл	Контроль (n=20)	Дни исследования		
		1 сутки	3 сутки	7 сутки
Cystotal	26,5±2,5	31±5,2 $p_1 \leq 0,005$	47±6,3 $p_1 \leq 0,002$ $p_2 \leq 0,05$	34±7,3 $p_1 \leq 0,002$
CysSH	17,2±2,1	14,5±2,9	19,1±3,2 $p_1 \leq 0,05$	24,1±2,4 $p_1 \leq 0,05$ $p_4 \leq 0,003$
CysSSCys	8,1±1,5	16,5±3,2 $p_1 \leq 0,05$	23,2±4,2 $p_1 \leq 0,05$ $p_2 \leq 0,05$	15,3±4,3 $p_1 \leq 0,05$
CysSH/Cys SSCys	2,1±0,5	0,7±0,2 $p_1 \leq 0,005$	0,8±0,3 $p_1 \leq 0,05$	1,8±0,2 $p_3 \leq 0,05$ $p_4 \leq 0,005$

Примечание: p_1 - достоверность различий по сравнению с контролем; p_2 - достоверность различий между 1 и 3 сутками; p_3 - достоверность различий между 3и 7 сутками, p_4 - достоверность различий между 1 и 7 сутками.

На фоне применения комбинированной терапии происходят весомые изменения в динамике различных фракций цистеина. Общее количество цистеина в первые сутки составляет 31 ± 5 мкг/мл, к третьим суткам происходит значительное увеличение до 42 ± 7 мкг/мл (на 35%) ($p_1 \leq 0,002$) и к седьмым суткам снижается практически до первоначального значения, что может свидетельствовать о повышенном расходовании цистеина для синтеза глутатиона. Количество восстановленного цистеина к третьим суткам значимо увеличивается на 27% до $19,1 \pm 3,2$ мкг/мл ($p_1 \leq 0,05$) и продолжает увеличиваться к седьмым суткам еще на 66% и становится равным $24,1 \pm 4,4$ мкг/мл ($p_4 \leq 0,003$). Уровень окисленного цистеина к третьим суткам повышается на 42%, это еще раз подтверждает тот факт, что процессы окисления в организме преобладают и

антиоксидантная система испытывает колоссальное напряжение. К седьмым суткам происходит уменьшение уровня окисленного цистеина на 35% и становится равным $15,1 \pm 8$ мкг/мл. Коэффициент CysSH/CysSSCys в первые сутки исследования составляет 0,6, значимого изменения данного показателя к третьим суткам не происходит, но к седьмым суткам за счет увеличения количества восстановленного цистеина и уменьшения окисленной фракции коэффициент уже равняется 1,8 ($p_4 \leq 0,005$). На фоне проводимой комбинированной терапии нам удалось скорректировать данный коэффициент и приблизить его значение к значению в группе здоровых исследуемых, тем самым улучшить состояние антиоксидантной системы в плазме (рис. 6).

Рис. 6



N-ацетилцистеин способствует повышению синтеза глутатиона, который является важным антиоксидантным фактором внутриклеточной защиты и обеспечивает поддержание функциональной активности и морфологической целостности клетки. Исследованы величины различных форм глутатиона при использовании предложенной нами схемы лечения (таблица 11).

Таблица 11

Динамика показателей глутатиона при комбинированной терапии НАС у пациентов с диабетической макроангиопатией нижних конечностей, (M±SD)

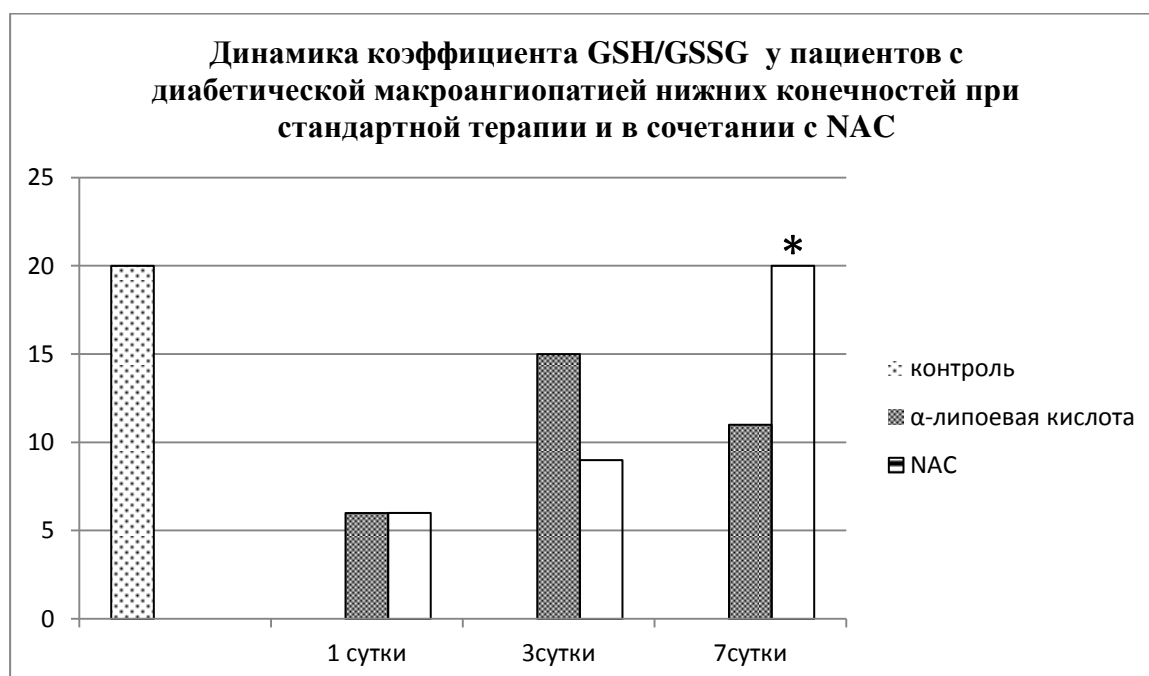
Показатели мкг/мл	Контроль (здоровые) (n=20)	Дни исследования		
		1 сутки	3 сутки	7 сутки
GSHtotal	788±172,2	433±35,1 p ₁ ≤0,005	440±41,3 p ₁ ≤0,005	404±43,3 p ₁ ≤0,005
GSHfree	752±146,3	342±36,1 p ₁ ≤0,005	381±38,3 p ₁ ≤0,005 p ₂ ≤0,05	387±42,2 p ₁ ≤0,005 p ₄ ≤0,05
GSSG	36±8,3	91±9,2 p ₁ ≤0,005	45±13,2 p ₁ ≤0,005 p ₂ ≤0,05	20±4,3 p ₁ ≤0,005 p ₃ ≤0,005 p ₄ ≤0,05
GSH/GSSG	20±1,5	6±1,1 p ₁ ≤0,05	9±1,3 p ₁ ≤0,05	20±2,1 p ₃ ≤0,005 p ₄ ≤0,005

Примечание: p₁- достоверность различий по сравнению с контролем; p₂ - достоверность различий между 1 и 3 сутками; p₃ достоверность различий между 3 и 7 сутками, p₄ - достоверность различий между 1 и 7 сутками.

При использовании предложенной нами терапии исследуемые показатели изменялись следующим образом: на третьи сутки общее количество глутатиона незначимо увеличилось на 1% и стало равным 440±41мкг/мл, к седьмым суткам происходит уменьшение до 404±43мкг/мл (на 7%). Несмотря на снижение общего количества глутатиона в эритроцитах, следует отметить о статистически значимом увеличении восстановленного глутатиона и уменьшении окисленной

фракции. Так величина восстановленной формы к третьим суткам увеличилась на 11% и стала равной 381 ± 38 мкг/мл ($p_2 \leq 0,05$), к седьмым суткам уже на 13% - 387 ± 42 мкг/мл ($p_4 \leq 0,05$). Более показательны изменения окисленного глутатиона, так уже к третьим суткам от момента начала терапии происходит уменьшение на 50% до 45 ± 13 мкг/мл ($p_2 \leq 0,05$), эта тенденция сохраняется и к седьмым суткам, величина окисленной формы уменьшается еще на 79% и становится равной 20 ± 4 мкг/мл ($p_4 \leq 0,05$). За счет этих изменений нам удалось добиться того, что к седьмым суткам происходит увеличение значения коэффициента GSH/GSSG с 6 до 20 ($p_4 \leq 0,005$), эта цифра сопоставима с таковым значением в группе контроля. Исходя из вышеизложенного, можно говорить о том, что предложенная нами консервативная терапия эффективнее влияет на процессы активации антиоксидантной системы у пациентов с сосудистыми осложнениями СД 2 типа (рис. 7) (таблица 12).

Рис. 7



**Сравнительная характеристика различных способов лечения у больных с
диабетической макроангиопатией нижних конечностей, (M±SD)**

Показатели, мкг/мл	контроль	+α-липоевая кислота			+НАС		
		1-е сутки	3-и сутки	7-е сутки	1-е сутки	3-и сутки	7-е сутки
Cys total p ₁	26,5±2,5	31±5,1 p≤0,05	32±6,2 p≤0,05	31±8,1 p≤0,05	31±5,1 p≤0,05	47±6,3 p≤0,002 p ₂ ≤0,05	34±7,3 p≤0,002
CysSH	17,2±2,1	14,5±4,9 p≤0,05	14,2±4,9 p≤0,05	13,5±5,2 p≤0,05	14,5±4,9 p≤0,05	19,1±3,2 p≤0,05	24,1±2,4 p≤0,05 p ₃ ≤0,05
CysSSCys	8,1±1,5	16,2±3,4 p≤0,05	16,2±5,2 p≤0,05	18,3±7,2 p≤0,05	16,2±3,4 p≤0,05	23,2±4,2 p≤0,05 p ₂ ≤0,05	15,3±4,3 p≤0,05
CysSH/ CysSSCys	2,1±0,5	0,7±0,2 p≤0,05	0,6±0,2 p≤0,05	0,6±0,2 p≤0,05	0,7±0,2 p≤0,05	0,8±0,3 p≤0,05	1,8±0,2 p ₃ ≤0,05

**Сравнительная характеристика различных способов лечения у больных с
диабетической макроангиопатией нижних конечностей (M±SD)**

GSHtotal	788±172,2	433±35,1 p≤0,0005	397±44,2 p≤0,0005	428±32,3 p≤0,0005	433±35,1 p≤0,0005	440±41,3 p≤0,005 p ₂ ≤0,05	404±43,3 p≤0,005
GSHfree	752±146,3	342±36,1 p≤0,0006	372±46,2 p≤0,0006	357±79,2 p≤0,006	342±36,1 p≤0,0006	381±38,3 p≤0,005	387±42,2 p≤0,005
GSSG	36±8,3	91±9,2 p≤0,001	29±4,2 p≤0,05	32±6,1	91±9,2 p≤0,001	45±13,2 p≤0,005 p ₂ ≤0,05	20±4,3 p≤0,005 p ₃ ≤0,05
GSH/GSSG	20±1,5	6±1,1 p≤0,005	15±1,2 p≤0,05	11±1,3 p≤0,05	6±1,1 p≤0,005	9±1,3 p≤0,05 p ₂ ≤0,05	20±2,1 p ₃ ≤0,05

Примечание: p - достоверность различий по сравнению с контролем; p₁ - достоверность различий между различными способами лечения на 3-и сутки; p₂ - достоверность различий между различными способами лечения на 7-е сутки.

Активация при гипергликемии гексозаминового пути метаболизма глюкозы приводит к образованию глиоксаля, метилглиоксаля, а позже и малонового диальдегида (Титов В.Н., Ширяева Ю.К., 2011). Все они являются бифункционально активными и ковалентно, химически взаимодействуют с белками одновременно двумя своими концами. Однако препараты, содержащие гуанидиновые, амино- и тиоловые группы, способны связывать и удалять карбонильные соединения. Они способны связать глиоксаль, метилглиоксаль и малоновый диальдегид с образованием нетоксичных гетероциклических веществ. Нами было проведено исследование по влиянию НАС, как вещества содержащего SH-группу, способной вступать во взаимодействие и нейтрализовать различные альдегиды (таблица 13).

Таблица 13

Уровень Go и MGo при комбинированной терапии НАС у пациентов с диабетической макроангиопатией нижних конечностей, (M±SD)

Показатели нг/мл	Контроль (n=20)	Дни исследования		
		1 сутки	3 сутки	7 сутки
Go	16±6,1	190±11,7 $p_1 \leq 0,05$	58,5±8,5 $p_1 \leq 0,005$ $p_2 \leq 0,05$	37±11,4 $p_1 \leq 0,005$ $p_3 \leq 0,05$ $p_4 \leq 0,005$
MGo	23±8,2	312±45,2 $p_1 \leq 0,05$	312±32,3 $p_1 \leq 0,005$	67±13,5 $p_1 \leq 0,05$ $p_3 \leq 0,05$ $p_4 \leq 0,005$

Примечание: p_1 - достоверность различий по сравнению с контролем; p_2 - достоверность различий между 1 и 3 сутками; p_3 достоверность различий между 3 и 7 сутками, p_4 - достоверность различий между 1 и 7 сутками.

Величина глиоксаля статистически значимо уменьшается к третьим суткам на 69% и к седьмым суткам еще уменьшается до $37 \pm 11,4$ ($p_4 \leq 0,005$). Значение же глиоксаля к седьмым суткам равно 37 ± 11 нг/мл на 19% выше, чем в группе пациентов, получавших стандартную терапию с α -липоевой кислотой, тем не менее, предложенная нами терапия так же эффективна. Статистически значимые изменения происходят и с уровнем метилглиоксаля, к третьим суткам показатель не изменяется, но к седьмым суткам количество кратно уменьшается в 5 раз и становится равным 67 ± 13 нг/мл ($p_4 \leq 0,005$).

Применение предложенной схемы позволяет максимально уменьшить количество глиоксаля и метилглиоксаля (таблица 14).

Сравнительная характеристика различных способов лечения у больных с диабетической макроангиопатией нижних конечностей, (M±SD)

Показатели нг/мл	Контроль (n=20)	+α-липоевая кислота			+NAC		
		1 сутки	3 сутки	7 сутки	1 сутки	3 сутки	7 сутки
Go	16±6,1	190±11,7 p≤0,05	32±5,2 p≤0,05	31±7,1 p≤0,05	190±11,7 p≤0,05	58,8±8,5 p≤0,005 p ₂ ≤0,05	37±11,4 p≤0,005
MGo	23±8,2	312±45,2 p≤0,005	305±29,1 p≤0,005	113±11,1 p≤0,005	312±45,2 p≤0,005	312±32,3 p≤0,005	67±13,5 p≤0,05 p ₂ ≤0,05

Примечание: p - достоверность различий по сравнению с контролем; p₁ - достоверность различий между различными способами лечения на 3-и сутки, p₂ - достоверность различий между различными способами лечения на 7-е сутки.

Резюме

Таким образом, при сравнительном анализе динамики показателей карбонильного стресса и тиол-дисульфидной системы, следует сделать следующее заключение. При проведении консервативной терапии с включением N-ацетилцистеина были выявлены более выраженные изменения исследуемых показателей по сравнению с терапией α -липоевой кислотой. На седьмые сутки от момента начала терапии с использованием NAC показатели, характеризующие тиол-дисульфидную систему сыворотки и эритроцитов, изменялись следующим образом: восстановленная фракция цистеина повысилась на 66% а восстановленная фракция глутатиона на 13%. Окисленная фракция цистеина, наоборот, уменьшается на 35%, а окисленная часть глутатиона падает на 79%. Тем самым коэффициенты, характеризующие окислительно-восстановительный потенциал клетки, возросли в 2,5 и 3,3 раза соответственно. CysSH/CysSSCys становится равным $1,8 \pm 0,3$ ($p \leq 0,05$), GSH/GSSG увеличивается с $6 \pm 0,2$ до $20 \pm 0,3$ ($p \leq 0,05$). Показатели, отражающие проявления карбонильного стресса, также снижаются более эффективно. Концентрация глиоксаля, метилглиоксаля на седьмые сутки уменьшилась в 5 раз. Это может служить доказательством того, что препарат N-ацетилцистеина не только благоприятно влияют на антиоксидантные показатели, но и участвует в обезвреживании конечных продуктов гликирования, возможно за счет активации глиоксилазной системы.

3.4 Сравнительный анализ изменения функциональных связей показателей карбонильного стресса и тиол-дисульфидной системы у мужчин контрольной группы и пациентов с СД 2 типа, осложненным и неосложненным макроангиопатией нижних конечностей

Для анализа внутри- и межсистемных отношений в группах здоровых мужчин и пациентов с различным течением СД 2 типа был проведен корреляционный анализ.

Проведенное исследование показало наличие в группе практически здоровых мужчин 5 (4 положительных и 1 отрицательной) статистически значимых

корреляционных связей, в группе больных СД 2 типа без макроангиопатии нижних конечностей число связей равнялось 10 (5 положительных и 5 отрицательных), в группе пациентов с СД 2 типа, осложненным макроангиопатией нижних конечностей статистически значимых внутри и межсистемных взаимосвязей установлено не было.

Между показателями карбонильного стресса и тиол-дисульфидной системы распределение корреляционных взаимосвязей было следующим.

В группе больных СД 2 типа по отношению к группе практически здоровых мужчин отмечалось увеличение корреляционных связей между показателями как внутри тиол-дисульфидной системы, так и с показателями карбонильного стресса. Так, в группе здоровых было установлено 5 зависимостей: положительные корреляционные связи между Cystotal и GSH ($r=0,71$; $p=0,021$), Cystotal и GSHfree ($r=0,747$ $p=0,013$), GSH и GSHfree ($r=0,98$; $p=0,0001$), GSH и GSSG ($r=0,64$; $p=0,044$). Наличие сильной отрицательной связи между GSH/GSSG и MGo ($r=-0,68$; $p=0,031$) указывают на наличие баланса в системе ПОЛ – АОЗ, когда в ответ на увеличение продуктов гликирования, непосредственно MGo, повышается активность тиол-дисульфидной системы, проявляющаяся в увеличении GSH, а также восстановленной фракции, как цистеина, так и глутатиона, что имеет место в физиологических условиях. На наш взгляд, это представляется закономерным и свидетельствует об этапности процессов функционирования тиол-дисульфидной системы (рис. 8).

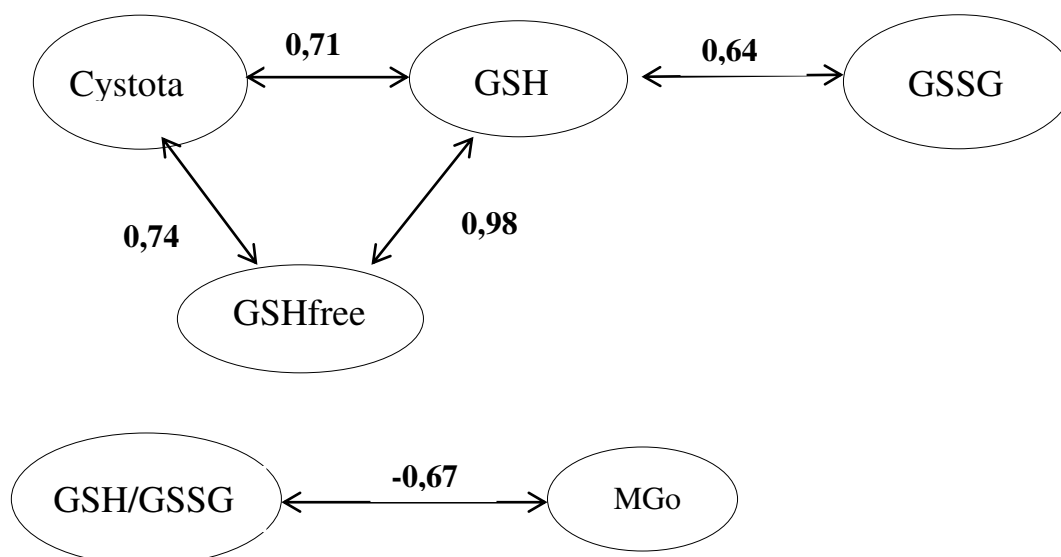


Рисунок 8– Корреляционные связи в группе практически здоровых мужчин

В группе больных с СД 2 типа без макроангиопатии нижних конечностей происходило увеличение количества обратных связей между показателями тиол-дисульфидной связи и приобретение новых. Появились следующие отрицательные связи: CysSSCys и GSH ($r=-0,702$; $p=0,023$), CysSSCys и GSH/GSSG ($r=-0,684$; $p=0,029$), GSSG и GSHfree ($r=-0,671$; $p=0,034$). Сохраняются положительные корреляционные связи между Cystotal и GSH ($r=0,710$; $p=0,021$), Cystotal и GSHfree ($r=0,633$; $p=0,049$), GSH и GSHfree ($r=0,988$; $p=0,000$) и добавляется положительная внутрисистемная связь между GSH и GSH/GSSG ($r=0,705$; $p=0,023$). Полученные данные свидетельствуют о том, что при СД 2 типа в условиях хронической гипергликемии преобладают процессы окисления, вследствие чего появляются сильные обратные внутрисистемные связи между окисленными и восстановленными компонентами тиол-дисульфидной системы. При оценке взаимодействия показателей карбонильного стресса и антиоксидантной защиты, выявлена отрицательная связь между MGo и GSHfree ($r=-0,657$; $p=0,039$). Выявленные данные показывают сильную межсистемную связь, так как в физиологических условиях обезвреживание конечных продуктов гликирования происходит за счет работы глиоксилазной системы, основным компонентом которой является восстановленный глутатион. При СД 2 типа концентрация восстановленного глутатиона уменьшается, следовательно увеличивается количество метилглиоксаля и появляются отрицательные межсистемные связи (рис. 9).

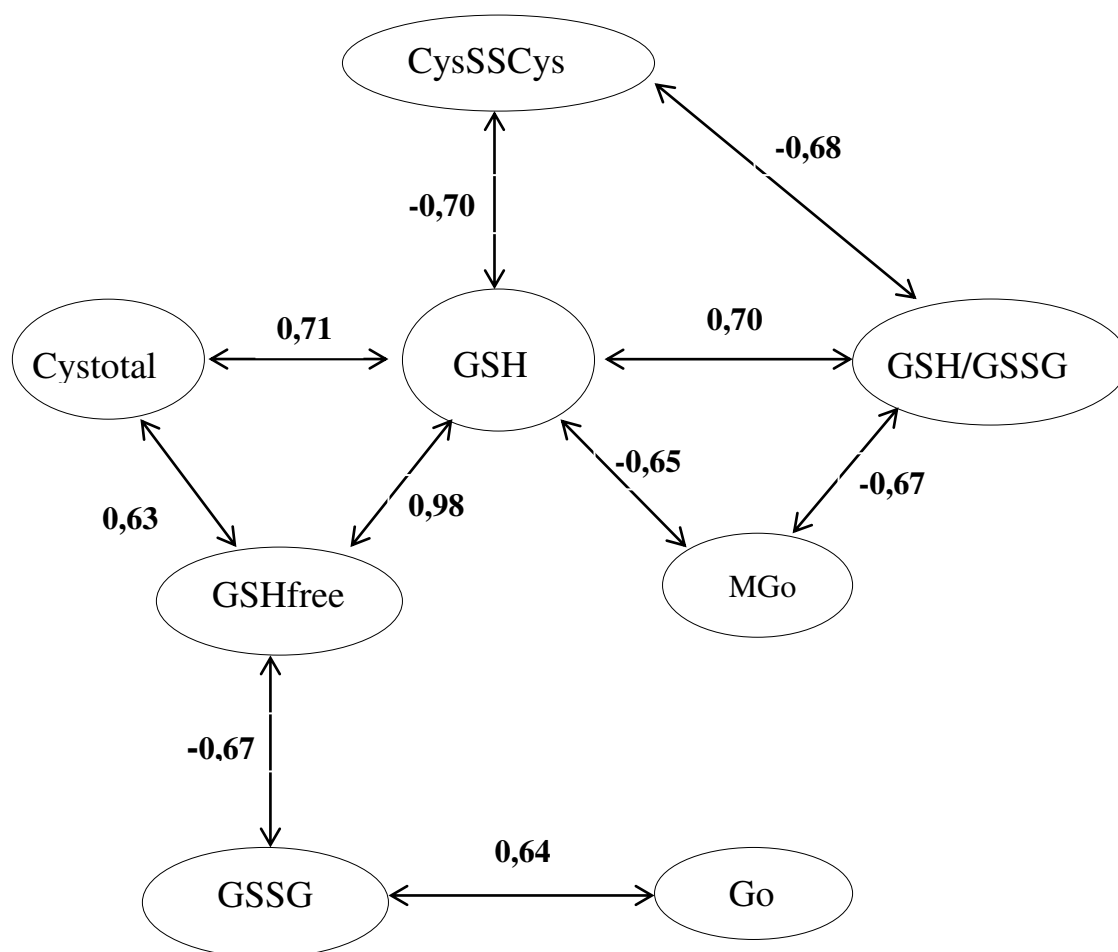


Рисунок 9– Корреляционные связи в группе мужчин с СД 2 типа

Таким образом, нами показано, что в группе с СД 2 типа происходит увеличение обратных связей тиол-дисульфидной системы с показателями карбонильного стресса, что может косвенно свидетельствовать о компенсации проявлений показателей карбонильного стресса, являющегося составной частью окислительного стресса, и свидетельствовать об адаптивной реакции макроорганизма, направленного на восстановление и поддержание нарушенного гомеостаза организма.

В группе пациентов с СД 2 типа, осложненным макроангиопатией нижних конечностей, при анализе внутри и межсистемных взаимосвязей между показателями карбонильного стресса и показателями тиол-дисульфидной системы, статистически значимых зависимостей выявлено не было. Данный факт может быть объяснен мощным срывом компенсаторно-приспособительных

реакций в организме. Повышение уровня конечных продуктов гликирования - глиоксаля и метилглиоксаля, сопровождается увеличением окисленных фракций цистеина и глутатиона и уменьшением восстановленной их части. Соответственно, значения коэффициентов $GSH/GSSG$, $CysSH/CysSSCys$ уменьшаются, что говорит об увеличении интенсивности процессов липопероксидации и снижении антиоксидантной защиты. Данное состояние требует проведения коррекции выявленных нарушений, которые будут направлены на активацию глиоксилазной системы и инактивацию продуктов карбонильного стресса.

3.5. Наиболее информативные показатели метаболических изменений у больных СД 2 типа с макроангиопатией нижних конечностей

Актуальной задачей нашего исследования стал поиск наиболее значимых лабораторных показателей, которые позволили бы определить риск развития макроангиопатии нижних конечностей у мужчин с сахарным диабетом 2 типа. С этой целью была выполнена регрессионная многофакторная модель, позволяющая вычислить наиболее информативные показатели и разработать интегральный коэффициент риска развития макроангиопатии нижних конечностей при СД 2 типа.

В состав регрессионной модели входили следующие изучаемые параметры – уровень $Cystotal$, $CysSH$, $CysSSCys$, $Cysfree/CysSSCys$, $GSHtotal$, $GSHfree$, $GSSG$, $GSH/GSSG$, MGo и Go .

Результаты данного многофакторного пошагового регрессионного анализа показали, что наиболее близко связанного с развитием макроангиопатии нижних конечностей у пациентов с СД 2 типа оказалось выявление уровни MGo (шаг 1). Точность предсказания увеличилась при добавлении данных об уровне восстановленного глутатиона (шаг 2), уровне окисленного глутатиона (шаг 3) и данных коэффициента $GSH/GSSG$ (шаг 4). При добавлении других показателей в

дополнение к уже отобраным, нарастания значимой прогностической мощности не отмечалось (таблица 15).

Таблица 15

Прогностическое значение в многофакторной модели развития макроангиопатии нижних конечностей

N=40	*БЕТА	Ст.Ош. БЕТА	В	Ст. Ош. В	** p-уров
Св.член			1,894696	0,415502	0,000535
MGo	0,548397	0,113497	0,001971	0,000408	0,000328
GSHfree	-0,254226	0,106315	-0,001063	0,000444	0,032615
GSSG	0,258914	0,086184	0,006819	0,002270	0,010156
GSH/GSSG	0,086464	0,037096	0,015519	0,006658	0,036506

Примечание. *beta – регрессионный коэффициент; **p – уровень статистической значимости (достоверен при $p \leq 0,05$).

Значение множественного коэффициента корреляции составило 0,996, коэффициент детерминации (R-квадрат) – 0,9, а уровень значимости регрессионной модели составил 0,0000001

При анализе прогностической модели, полученной в результате проведенного многофакторного регрессионного анализа, значение множественного коэффициента корреляции составило 0,996, что говорит о значительной линейной зависимости между факторами влияния и откликом (развитием макроангиопатии). Коэффициент детерминации (R-квадрат) – 0,9, данный факт свидетельствует о высокой степени соответствия регрессионной модели эмпирическим данным.

Уровень значимости регрессионной модели $p < 0,0000001$, что еще раз подтверждает ее высокую чувствительность и достоверность (Михалевич И.М., 2012).

Наряду с вышеизложенным, с целью ранней диагностики макроангиопатий нижних конечностей у больных с сахарным диабетом 2 типа, нами предложен способ прогнозирования развития макроангиопатий, основанный на определении в крови пациентов содержания низкомолекулярного α -кетоальдегида - метилглиоксаля и свободного глутатиона. Рассчитывали их относительные величины по отношению к средним значениям у здоровых лиц и вычисляли прогностический коэффициент (К) по формуле $K = \frac{P_1}{P_2}$ где, P_1 - соотношение относительного содержания метилглиоксаля у больных и здоровых лиц, P_2 - соотношение относительного содержания свободного глутатиона у больных и здоровых лиц и при значении коэффициента меньше 2,8 прогнозируют благоприятное течение заболевания, а при значении коэффициента равном и выше 2,8 прогнозируют развитие макроангиопатий нижних конечностей.

Показатели рассчитывали следующим образом:

1) относительное содержание метилглиоксаля – P_1 по формуле: $P_1 = \frac{MG_{oi}}{MG_{on}}$,

2) относительное содержание свободного глутатиона – P_2 по формуле

$$P_2 = \frac{GSH_{freei}}{GSH_{freen}}$$

где i – содержание метилглиоксаля и свободного глутатиона у больных;

n – среднее значение содержания метилглиоксаля и свободного глутатиона у здоровых лиц.

Предложенный способ прогнозирования развития макроангиопатии нижних конечностей апробирован у 30 пациентов с сахарным диабетом 2 типа (таблица 16).

Прогнозирование диабетической макроангиопатии нижних конечностей

Группы	К-во больных (n)	К	Прогноз	Осложнение (боль, трофическая язва) (абс/%)
I	21	2,81±0,10	Неблагоприятный	19/90
II	9	2,51±0,28	Благоприятный	1/11,1

Таким образом, чувствительность предлагаемого способа прогнозирования составляет - $19/21 \times 100 = 90,5\%$, точность - $8+19/30 \times 100 = 89,0\%$, специфичность - $8/9 \times 100 = 88,9$.

3.6 Сравнительная характеристика изменений клинических проявлений макроангиопатии нижних конечностей у больных СД 2 типа под влиянием различных методов терапии

Контроль за течением ранозаживления при используемых методах лечения осуществляли путем постоянного клинического наблюдения на 1-ые, 3-и и 7-ые сутки (общее состояние, температура тела, визуальная оценка раны). О характере репаративных процессов судили по макроскопической оценке, срокам очищения раны, появления грануляций, эпителизации.

У всех пациентов 2 и 3-ей групп при поступлении в стационар превалировал болевой синдром, локализованный в области трофической язвы, а так же в икроножных мышцах. Оценивая по шкале ВАШ при поступлении пациентов в стационар, 60% больных оценили интенсивность боли как умеренные, 30% как сильные, 10% как слабые. После проведения стандартной терапии+ α -липоевая кислота болевые ощущения у большинства пациентов не

изменялись, значение ВАШ после лечения изменялось на 5-7 мм. При проведении стандартной терапии + НАС значение ВАШ увеличилось в среднем до 12, что может свидетельствовать о положительном влиянии препарата.

Трофические язвы характеризовались неправильной формой, поверхностным повреждением, без вовлечения мышц и костей, а также без признаков инфицирования. Поверхность трофических язв была покрыта фибрином.

При использовании консервативных методов лечения в комплексе с α -липоевой кислотой на третьи сутки лечения больных продолжали беспокоить умеренные "тянущие" боли в области язв. Сохранялась отечность и гиперемия краев ран, на стенках ран имелись очаги струпа, покрытые большим количеством фибрина, грануляции отсутствовали, на стенках и дне ран прослеживалось едва заметное разрастание островков грануляционной ткани вялой консистенции, бледно-розового цвета.

Таким образом, при динамическом наблюдении за течением раневого процесса у больных основной группы №3 (подгруппа 1) средние сроки очищения ран составили $10,4 \pm 0,3$ суток, появление грануляционной ткани происходило на $12,4 \pm 0,1$ сутки.

При использовании консервативных способов лечения в сочетании с НАС в группе пациентов №3 (подгруппа 2) на третьи сутки лечения наступало значительное улучшение в состоянии большинства больных - боли в области язв уменьшались.

К седьмым суткам исчезал отек и гиперемия окружающих тканей, стенки и дно ран покрывались островками яркой грануляционной ткани, отмечалась краевая эпителизация.

При визуальной оценке ран средний срок очищения во 2-ой подгруппе равнялся $7,0 \pm 0,1$, появление грануляций происходило на $8,2 \pm 0,1$ сутки.

Грануляция раны – сложный контролируемый процесс, в котором обязательно участие таких клеток, как лейкоцитов, гистиоцитов, тучных клеток, плазматиков, фибробластов. Особенно незаменимыми являются фибробласты, которые обеспечивают вставку коллагена, после того, как достигнут краев раны. В норме образование коллагена фибробластами происходит на вторые сутки и наибольшую активность проявляют на 6 сутки заживления раны. Особенно важным является достаточное содержание в раневом дефекте цитокинов, кислорода, в организме – железа, витамина С, цинка. Когда процесс созревания походит к концу, то наблюдается эпителиальная выстилка поверх дефекта.

При активации метаболизма глюкозы по полиоловому пути в цитозоле эндотелия накапливается органический осмолит спирт сорбитол, который вызывая гипергидратацию, увеличивает высоту клеток эндотелия. Уменьшение просвета артериол и капилляров повышает периферическое сопротивление кровотоку с развитием гипоперфузии и хронической гипоксии. Взаимодействие глиоксаля и метилглиоксаля с белками и формирование поперечных сшивок между волокнами коллагена в интерстициальном матриксе сосудов приводит к увеличению ригидности стенки артериол и капилляров, что в последующем приведет к нарушению продвижения крови по капиллярам, тем самым усугубляя гипоперфузию и гипоксию. При сахарном диабете гипергликемия становится постоянной и гликирование увеличивается (Титов В.Н., Ширяева Ю.К., 2011). Логичным представляется применение препаратов, действие которых будет направлено, на уменьшение концентрации этих веществ, а значит и образование грануляционной ткани, за счет нормализации обменных процессов в капиллярах, будет происходить быстрее.

Таким образом, применение в комплексной терапии НАС у пациентов с диабетической макроангиопатией нижних конечностей приводит к уменьшению конечных продуктов гликирования, что сопровождается улучшением репаративных процессов в ране и, наряду с субъективным уменьшением болевого синдрома, улучшается качество жизни пациента, сокращается количество койко-

дней пребывания в стационаре на 3 суток, сокращаются сроки очищения в среднем на 4 суток, что позволяет в более ранние сроки проводить реконструктивно-восстановительные операции.

ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема СД 2 типа и сосудистых осложнений является одной из самых актуальных и требует мультидисциплинарного подхода в его лечении. Это обусловлено широкой распространенностью заболевания, самой ранней из всех хронических заболеваний инвалидизацией больных и высокой их смертностью (третье место после сердечно – сосудистой патологии и злокачественных новообразований), ранним выходом на инвалидность лиц молодого, трудоспособного возраста, а также большими экономическими затратами, связанными с лечением (Балаболкин М.И., 2000). Прогнозирование и своевременная профилактика сосудистых осложнений является важным направлением клинической медицины, которая позволит улучшить и продлить качество жизни пациентов, страдающих СД 2 типа. Учитывая, что организм человека представляет собой сложно-структурируемую систему, возникает необходимость включения в прогностические комплексы неспецифических маркеров, определяющих адаптационные возможности организма в условиях развития тяжелого патологического процесса. Это значительно увеличивает вероятность совпадения прогнозируемых и реальных осложнений.

Одна из причин прогрессирования СД 2 типа и возникновение сосудистых осложнений является хроническая гипергликемия в сочетании с вариабельностью гликемии, что приводит к окислительному стрессу (Балаболкин М.И., 2002; Аметов А.С., 2011; Monnier L., 2006). Основными процессами окислительного стресса являются перекисное окисление липидов и окислительная модификация белков (Ланкин В.З. и соавт., 2008; Колесникова Л.С., 2010). Окислительный стресс, возможно, не является симптомом в начале заболевания, а, скорее всего, является одним из патогенетических механизмов, лежащим в основе заболевания и способствующим прогрессированию болезни (Балаболкин М.И., 2005; Ланкин В.З., 2008). Мишенями окислительного стресса являются все клеточные структуры. Инсулиновый аппарат поджелудочной железы находится в зоне

высокого риска, так как β - клетки содержат мало антиоксидантов (Смирнова О.М., Никонова Т.В., 2003; Недосугова Л.В., 2006; Аметов А.С., 2011). Свободные радикалы генерируются в условиях гипергликемии и подавления активности ферментов гликолиза, а глюкоза окисляется по шести альтернативным путям (Балаболкин, М. И., 2002). В связи с этим открытием, применение антиоксидантов при терапии сахарного диабета и его сосудистых осложнений является обоснованным (Занозина О.В., 2010). К сожалению, до настоящего времени отсутствуют методы, позволяющие непосредственно определять уровень окислительного стресса в организме. В этой связи состояние окислительного стресса и вызванные им нарушения и различные повреждения белков организма определяются косвенно по содержанию различных гликоокисленных продуктов, к которым относятся белковые карбонилы, липидные пероксиды.

Биологически активные карбонилы, особенно альдегиды с высоким реактивным потенциалом также возрастают при СД 2 типа (Shangari N., O'Brien P.J., 2004; Vander J., 2008). Они включают 2-оксоальдегиды (глиоксаль, метилглиоксаль и 3-деоксиглюкозон) и α/β ненасыщенные альдегиды (акролеин и 4-гидроксиноненаль) (O'Brien P.J. et al., 2005; Shibamoto T., 2006; Novo E., Parola M., 2008). Акролеин, малоновый диальдегид и 4-гидроксиноненаль являются продуктами пероксидации липидов, а 3-деоксиглюкозон продукт разложения гликированных протеинов. В результате запускается процесс неферментативного гликозилирования белков с образованием конечных продуктов-AGE. AGE-продукты играют ключевую роль в развитии диабетических осложнений. Гликирование белков дыхательной цепи митохондрий приводит к нарушению ее работы и поддержанию образования избытка супероксид-ионов независимо от уровня гликемии. Кроме того, формирование AGE-продуктов в структуре митохондрий, будучи необратимым процессом, также может объяснять длительное существование метаболической памяти. Избыток AGE инициирует апоптоз клетки, что подтверждает взаимосвязь окислительного и карбонильного стрессов (Конторщикова К.Н., 2000; Ланкин В.З. 2008; Недосугова Л. В. 2006;

Сорокина Ю.А., 2016). Активация полиольного пути метаболизма глюкозы приводит не только к генерации свободных радикалов (СР), но и к снижению активности восстановленного глутатиона - основного антиоксиданта клетки. Восстановленный же глутатион способен деактивировать метилглиоксаль путем превращения его в лактат, данный процесс еще раз подтверждает общность окислительного и карбонильного стрессов (Балаболкин М. И., 2005; Недосугова Л.В., 2006). Необходимо учитывать еще и тот факт, что источником образования MGo является не только глюкоза, но и протеины и триглицериды (Han S. et al., 2007).

В настоящее время в клиниках широко используется определение HbA 1c%. Диабетологами всего мира признается необходимость регулярных (4 раза в год) исследований гликированного гемоглобина (ADA. Diabetes Care «Standards of Medical Care in Diabetes–2006 V. 29”, suppl. 1, 2006., Diabetes, “National Service Framework for Diabetes: Standards”, 2001). Те же требования к частоте исследований предъявляются и в России, но прогнозирование хода патологического процесса проводится с использованием параметров состояния одной из физиологических систем организма, что значительно снижает достоверность прогноза (Thornalley P.J., 2003). В исследовании (Lapolla A. et al., 2003) установлено, что эффективность гликемического контроля мало влияет на концентрацию оксоальдегидов. Улучшение гликемического контроля заметно снижало содержание глюкозы и гликированного гемоглобина в крови (на 50 и 41% соответственно), в то время как концентрации Go и MGo снижались в среднем на 15 и 8% (Fleming T. et al., 2007). Причем у пациентов с диабетом без осложнений уровень AGE-продуктов повышен на 20–30%, а при диабете в сочетании с сердечно-сосудистыми осложнениями или микроальбуминурией – на 40–100% по сравнению со здоровыми людьми (Lieuw A.F., 2004). В ходе исследования EDIC уровень AGE-продуктов, определяемый путем биопсии кожи, достоверно коррелировал с распространенностью ретинопатии и нефропатии (Kilhovd B.K., 2003).

Количественный анализ продуктов гликирования с технической точки зрения представляет собой серьезную проблему. Наиболее точным методом их количественного определения является хроматография с масс-спектрометрической детекцией и количественной оценкой с использованием стабильных изотопов в качестве заменяемых стандартов, в особенности жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС) (Lieuw A.F., 2000). В большом количестве исследований определение конечных продуктов гликирования производилось с помощью иммунологического анализа. Несмотря на то, что при использовании иммунологических методов были получены обширные данные, и информация по диабету продолжает поступать, иммунологический анализ рекомендуется проводить по валидированной методике в сочетании с масс-спектрометрией. Существует целый ряд серьезных проблем, ограничивающих применение иммунологического анализа для обнаружения конечных продуктов гликирования (Koito W., 2004; Thornalley P.J, 2000).

Учитывая вышесказанное, мы попытались оценить и скорректировать показатели, характеризующие не только антиоксидантную защиту, но и показатели, отражающие проявления карбонильного стресса у пациентов, страдающих СД 2 типа, а так же с осложнениями в виде макроангиопатии нижних конечностей.

Для этого мы использовали методики ВЭЖХ, часть из которых разработаны непосредственно в нашей лаборатории, часть из них была усовершенствована, так как на сегодняшний день данные, полученные при помощи хроматографических исследований, являются наиболее точными (Дутов А.А., 2015-2017).

В доступной литературе работ по изучению взаимосвязи между антиоксидантной системой и проявлениями карбонильного стрессов не так много. В результате нами проведены исследования содержания различных фракций цистеина в плазме, глутатиона в эритроцитах, глиоксаля и метилглиоксаля в плазме у больных с СД 2 типа и осложненным течением в виде макроангиопатии

нижних конечностей в первые, третьи, а в последующем на седьмые сутки с целью оценки состояния тиол-дисульфидной системы, уровня конечных продуктов гликирования и рассмотреть возможные способы коррекции.

В группе больных как с неосложненным, так и с осложненным течением СД 2 типа отмечено снижение концентрации общего глутатиона в эритроцитах в среднем на 20% и составило 613 ± 70 мкг/мл и 433 ± 35 мкг/мл (контроль 788 ± 147 мкг/мл). По некоторым данным у больных СД 2 типа с длительностью заболевания до 5 лет была снижена концентрация GSH до $1,09 \pm 0,09$ ммоль/л (контроль - $1,78 \pm 0,15$ ммоль/л), уменьшение составило 39% (Бардымова Т.П. и соавт., 2009). Вместе с тем, мы должны обратить внимание на то, что восстановленная часть глутатиона у пациентов с диабетической макроангиопатией нижних конечностей уменьшается на 45%, а окисленная фракция увеличивается на 70%, несмотря на компенсацию уровня глюкозы крови. Коэффициент GSH/GSSG подтверждает напряжение антиоксидантной системы, так как при наличии осложнений данный показатель уменьшается в 3,3раза. В большинстве работ, посвященных изучению активности антиоксидантной системы при СД 2 типа, оценивается за счет изменения показателей ферментов (КТ, СОД, ГПО, ГР, ГТ), установлена зависимость увеличения этих параметров и от продолжительности заболевания, и от наличия осложнений. Так, у больных СД 2 типа с длительностью заболевания до 5 лет была отмечена реакция только на компоненты системы глутатиона (снижение GSH, активация ГР и ГТ), а при длительности заболевания более 5 лет — к снижению GSH и повышению активности ГР в эритроцитах дополнительно присоединялись изменения в плазме (снижались GSH и глутатионтрансферазная активность на фоне активации ГПО). При наличии же гнойно-некротических изменений, происходит увеличение СОД в 2,5раза, КТ в 2раза, ГПО в 1,5раза и ГТ в 10 раз (Чарданцев Д.В., 2009). А так как ферменты, по сути, являются катализаторами реакций промежуточного синтеза, не в полной мере отражая количество конечных продуктов, нами принято было решение по изучению различных фракций, как цистеина, так и глутатиона.

Цистеин выступает в качестве резерва глутатиона в клетке. То есть, чем больше цистеина в сыворотке, тем больше количество глутатиона в клетке. Поддержание адекватной концентрации последнего возможно только при наличии цистеина. Выявлены достоверные изменения по уровню различных фракций цистеина в сравниваемых группах пациентов. Несмотря на достоверно большее содержание уровня общего цистеина как в группе с СД 2 типа, так и с макроангиопатией сосудов нижних конечностей в среднем на 30%, коэффициент CysSH/CysSSCys, служащий индикатором антиоксидантного потенциала плазмы, в первой группе составил 1,7, а в группе с осложнениями всего лишь 0,7 (контроль 2,1). Это может быть подтверждением нарушения окислительно-восстановительного состояния плазмы, за счет увеличения окисленной фракции.

Таким образом, складывается четкая картина состояния тиол-дисульфидной системы у пациентов страдающих СД, проявления недостаточности которой появляются уже на стадии доклинических проявлений и выражаются в увеличении окисленных фракций, как цистеина, так и глутатиона. При наличии же осложнений данные показатели изменяются кратно. Поэтому антиоксидантная система организма не справляется с имеющимися нарушениями и требуется коррекция.

Следующим этапом нашей работы явилась оценка показателей карбонильного стресса. До настоящего времени в большинстве работ отмечается лишь процентное увеличение количества КПГ. Нам удалось определить уровень глиоксаля и метилглиоксаля в сыворотке и выяснить, как изменяются данные показатели при наличии осложнений СД 2 типа. Так, содержание глиоксаля в группе сравнения повышен до $24 \pm 2,6$ нг/мл (на 50%) по сравнению с группой контроля, при наличии макроангиопатии происходит увеличение в 10 раз до 190 ± 29 нг/мл. Уровень метилглиоксаля при диабетической макроангиопатии нижних конечностей повышен в 13 раз, тогда как при СД 2 типа без осложнений, его уровень повышается всего лишь на 16%. (рис. 10)

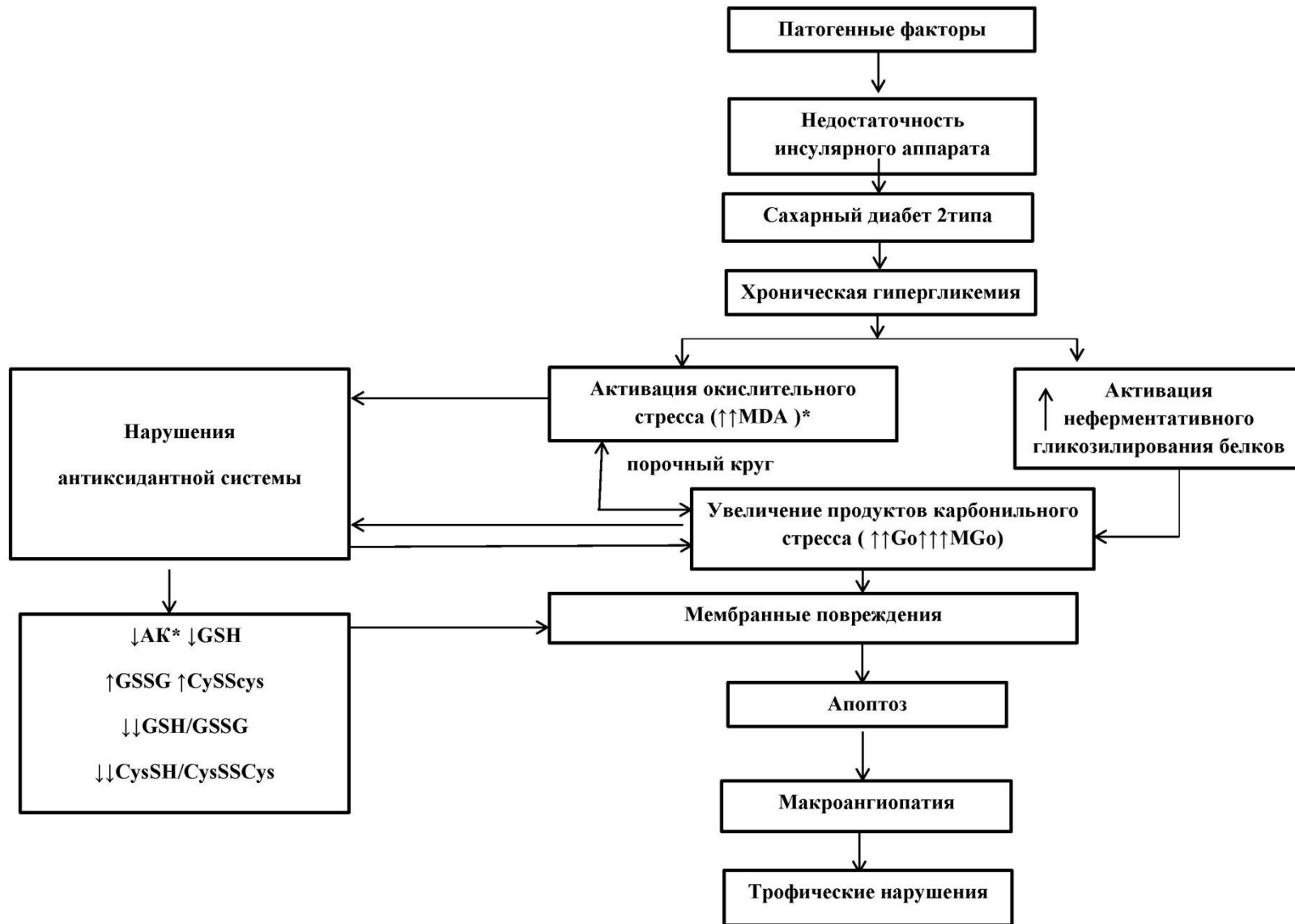


Рис.10 Концептуальная схема изменения антиоксидантной системы и влияние показателей карбонильного стресса на развитие диабетической макроангиопатии нижних конечностей. * - литературные данные

Применение стандартных способов лечения, включающих в себя нормализацию уровня гликемии, применение непрямых антикоагулянтов, антибиотиков широкого спектра действия (по показаниям), статинов, дезагрегантов, вазоактивных препаратов, согласно протоколу ведению больных с СД 2 типа, оказывают положительный эффект, но, к сожалению, носит недолговременный эффект. Применение препаратов α -липоевой кислоты в комплексном лечении сопровождаются увеличением количества восстановленного глутатиона к третьим суткам от начала проведения терапии на 8%, уменьшении окисленной фракции на 48%, увеличении коэффициента GSH/GSSG с 6 до 15. Показатели, характеризующие карбонильный стресс, также изменяются и тенденция по их уменьшению прослеживается и на 3, и на 7 сутки. Так уровень глиоксаля уменьшается на 80%. Информативно изменяется содержание метилглиоксаля - уменьшается к седьмым суткам в 2,8 раза. Однако при динамическом изучении выбранных нами показателей достоверных изменений со стороны цистеина не происходит. Следует отметить то, что к седьмым суткам уровень окисленной фракции цистеина увеличивается на 12%, соотношение же CysSH/CysSSCys вовсе не изменяется и остается равным 0,6 на протяжении всего лечения. Так же к седьмым суткам уменьшается уровень восстановленного глутатиона на 5%, а окисленная часть напротив увеличивается на 14%, тем самым приводя к уменьшению коэффициента GSH/GSSG до 11. Возможно, это связано с тем что, попадая в организм, α -липоевая кислота восстанавливается до гидролипоевой и именно она осуществляет антиоксидантные свойства. У пациентов же с диабетической макроангиопатией происходит утолщение базальной мембраны, и реакции восстановления происходят медленнее.

Для коррекции изменений в антиоксидантной системе и уменьшении проявлений карбонильного стресса нами был использован плеiotропный эффект препарата N-ацетилцистеина. N-ацетилцистеин широко известен как муколитическое средство и применяется главным образом при заболеваниях

легких, сопровождающихся образованием вязкой мокроты. Однако NAC также способен оказывать антиоксидантный эффект благодаря увеличению уровня внутриклеточного глутатиона, поскольку содержит необходимый для его синтеза цистеин. Сульфгидрильная группа NAC ответственна за его метаболическую активность, ацетильная группа делает молекулу более устойчивой к окислению и деструкции пищеварительными ферментами. NAC чаще рассматривают как пролекарство глутатиона, который в клетках деацетируется, превращаясь в L-цистеин, который в свою очередь идет на построение глутатиона. Глутатион - эндогенный трипептид - защищает клетки от свободных радикалов и химически активных молекул пероксидов, тем самым образуя одну из мощных систем антиоксидантной защиты (Wu G. et al., 2004; Cacciatore I. et al., 2010). В настоящее время проводится множество исследований плейотропного, антиоксидантного действия NAC при множестве заболеваний, сопровождающихся оксидативным стрессом. Среди них сердечно-сосудистая патология, заболевания почек, осложнения сахарного диабета, проблемы трансплантологии, иммунологии, вопросы спортивной медицины.

В доступной литературе имеются данные по влиянию NAC не только как отхаркивающего и противовоспалительного вещества, но и препарата, который используется для лечения интоксикаций ацетоминофеном, свинцом (Nolin T.D., 2010). Учитывая химическое строение молекулы NAC, особенность которой заключается в наличии SH-группы, нами было предположено, что данный препарат выступит в роли прекурсора внутриклеточного глутатиона и сначала деацетируется в цистеин. Чем больше уровень цистеина, тем больше уровень внутриклеточного глутатиона. В последнее десятилетие установлено благотворное влияние N-ацетилцистеина на ранних стадиях сахарного диабета 2 типа. Это может быть обусловлено его способностью смягчать инсулино-резистентность за счет увеличения чувствительности клеток к инсулину (Lasram M.M., 2015). Необходимо учесть и тот факт, что NAC может выполнять самостоятельную роль по нейтрализации свободных радикалов и химически

активных молекул пероксидов, превращаясь в итоге в дисульфид N-ацетилцистеина. Так же неоднократно показано, что препараты, содержащие тиоловую группу, способны связывать и удалять карбонильные соединения (Титов А.В., 2011). Связывая глиоксаль и метилглиоксаль, они образуют нетоксичные гетероциклические вещества. В экспериментах аминогуанидин и цистеин в концентрациях, эквивалентных содержанию метилглиоксаля, предотвращают образование карбонилированных белков. Известно также, что основной механизм нейтрализации MGo в клетке – глиоксилазная система. Эта же глиоксилазная система нейтрализует Go, конечным продуктом его является гликолат, а в случае MGo – D-лактат. Активность цитозольной глиоксилазы I, примерно пропорциональна концентрации GSH в цитозоле (Shangari N. and O'Brien P.J., 2004). В общем, глиоксилазная система без глутатиона работать не будет. Показано, к примеру, что снижение внутриклеточного уровня GSH при окислительном стрессе приводит к повышению уровней Go и MGo (Abordo E.A. et al., 1999). Из вышесказанного следует вывод о том, что повлиять на синтез MGo, особенно в условиях хронической гипергликемии, очень трудно, и остается только вариант воздействия, который будет способствовать наиболее быстрому его распаду. Логично будет предположить, что необходимо активировать глиоксилазную систему, за счет увеличения восстановленной фракции глутатиона под влиянием соединений, содержащих SH группу. Для этого терапевтического подхода предлагается использовать антиоксиданты без ссылки на конкретные фармакологические препараты (Lapolla A. et al., 2003).

В нашем исследовании отдельного критерия для назначения NAC не было, учитывались противопоказания к применению препарата (язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки в фазе обострения; повышенная чувствительность к ацетилцистеину, варикозное расширение вен пищевода, кровохарканье, легочное кровотечение, бронхиальная астма, заболеваниях надпочечников, печеночной и/или почечной недостаточности), при применении у пожилых пациентов (больных старше 65 лет) использовали минимально

эффективные дозы, а так же учитывали лекарственное взаимодействие с другими препаратами.

В подгруппе больных с диабетической макроангиопатией нижних конечностей отмечались изменения в состоянии тиол-дисульфидной системы, т.е. активация интенсивности процессов защиты клетки на фоне применения НАС, проявлялась в увеличении количества восстановленных фракций, как цистеина, так и глутатиона. Максимальное увеличение происходит на седьмые сутки, содержание CysSH увеличивается на 66%, а GSH на 13%. Вместе с тем, эти же показатели при терапии с α -липоевой кислотой несколько уменьшаются на 7% и 5% соответственно. Значимо уменьшается и окисленная форма цистеина и глутатиона, к седьмым суткам CysSSCys снижается на 35%, поэтому коэффициент CysSH/CysSSCys становится равным 1,8 ($p \leq 0,05$). GSSG уменьшается к третьим суткам на 50%, к седьмым на 79%, коэффициент достоверно увеличивается с 6 до 20 ($p \leq 0,05$) и становится равным контрольным параметрам. При терапии с использованием α -липоевой кислоты таких изменений не происходит. А тот факт, что окислительно-восстановительный потенциал клетки изменяется за счет увеличения восстановленных фракций цистеина и глутатиона, подтверждает необходимость изучения именно разных форм аминотиолов.

Изменения, характеризующие проявления карбонильного стресса, также подвергаются более выраженным изменениям. Количество MGo уменьшается в 5 раз до $67,5 \pm 13$ ($p_4 \leq 0,005$) по сравнению с консервативной терапией с α -липоевой кислотой. Уровень Go статистически значимо снижается до $37 \pm 11,4$ ($p_4 \leq 0,005$)

Представленные данные, свидетельствуют о том, что НАС уменьшает проявления карбонильного стресса за счет уменьшения конечных продуктов гликирования, а увеличение расхода восстановленной фракции цистеина и увеличение количества восстановленного глутатиона следует считать

благоприятным признаком, характеризующим нормализацию антиоксидантного потенциала и в сыворотке, и непосредственно в клетке.

Таким образом, применение NAC в комплексной терапии у пациентов с диабетической ангиопатией нижних конечностей приводит к стабилизации тиол-дисульфидной системы, тем самым может способствовать предотвращению развития и прогрессирования имеющихся осложнений СД 2 типа. Это способствует предотвращению развития гнойно-воспалительных осложнений и улучшению репаративных процессов в ране у пациентов с трофическими язвами, позволяя в более ранние сроки проводить реконструктивно-восстановительные операции и значительно сокращать пребывание пациента в стационаре, а качество жизни пациентов улучшается за счет уменьшения болевого синдрома (рис. 11)

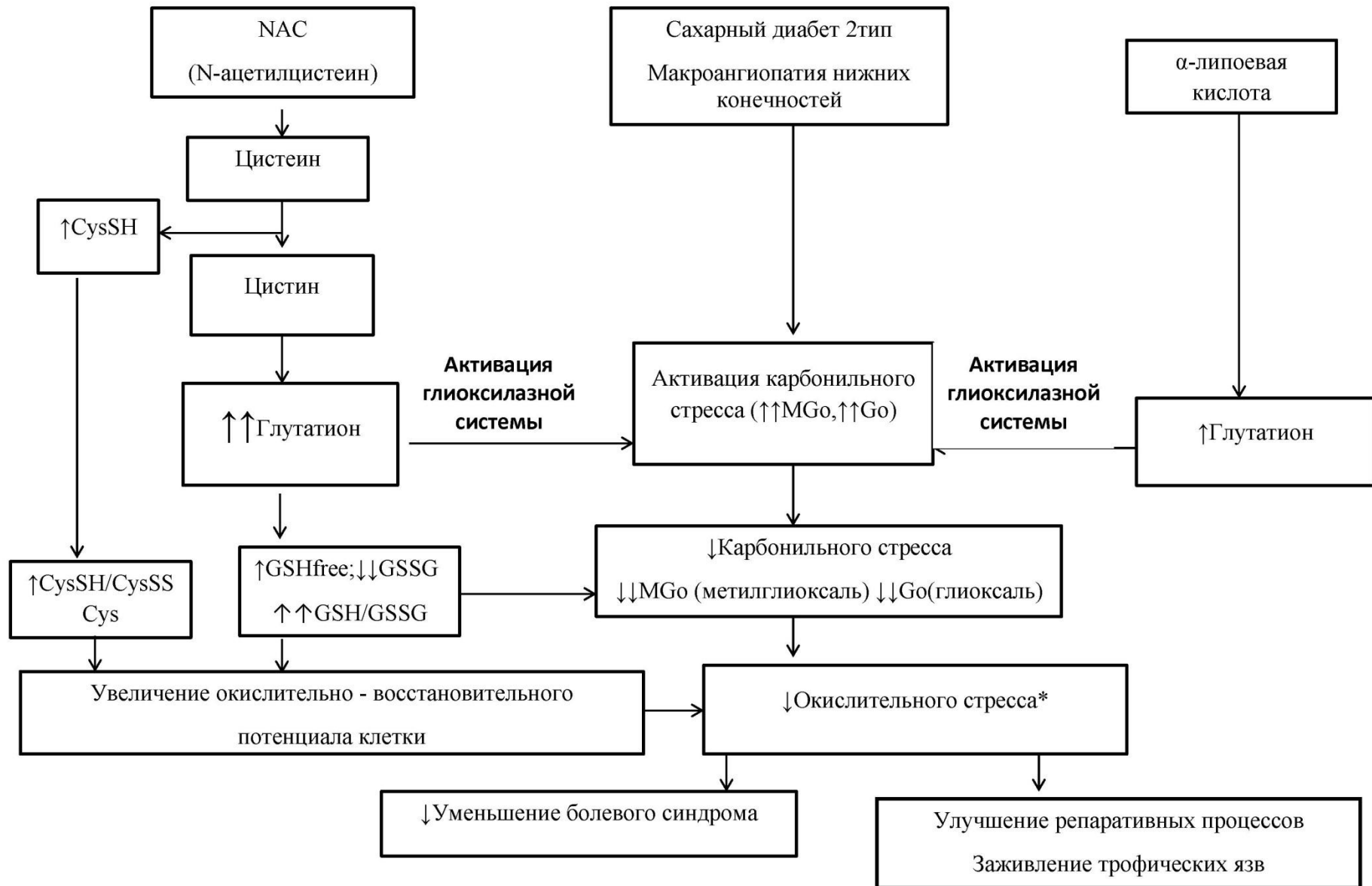


Рис. 11 Концептуальная схема точек приложения действия исследуемых препаратов у пациентов с диабетической макроангиопатией нижних конечностей. * - литературные данные

ВЫВОДЫ

1. У больных СД 2 типа с макроангиопатией нижних конечностей установлено повышение в сыворотке крови уровня глиоксаля в 11 раз ($p \leq 0,001$), метилглиоксаля в 13 раз ($p \leq 0,0001$) по сравнению с таковыми показателями у больных СД 2-типа без сосудистых нарушений.
2. Развитие макроангиопатии нижних конечностей у больных СД 2 типа сопровождается уменьшением концентрации общего глутатиона на 50% ($p_2 \leq 0,0001$) и восстановленного глутатиона на 55% ($p_2 \leq 0,002$), подтверждая тем самым повышенный расход субстрата в системе глутатиона.
3. У больных СД 2-го типа, осложненного макроангиопатией нижних конечностей, применение NAC способствует повышению окислительно-восстановительного потенциала тиол-дисульфидной системы до нормы (в клетке - GSH/GSSG и в сыворотке - CysSH/CysSSCys).
4. У больных СД 2 типа отмечается увеличение количества внутрисистемных взаимосвязей и числа межсистемных отрицательных зависимостей между параметрами тиол-дисульфидной системы и показателями карбонильного стресса, а при СД 2 типа, осложненном макроангиопатией нижних конечностей, статистически значимых корреляционных взаимосвязей не выявлено, что свидетельствует о разрушении внутри- и межсистемных взаимоотношений.
5. При анализе регрессионной многофакторной модели концентрация метилглиоксаля, восстановленная и окисленная фракции глутатиона и их соотношение GSH/GSSG явились наиболее значимыми в диагностике развития макроангиопатии нижних конечностей у больных СД 2 типа.
6. Включение в комплексную терапию сосудистых осложнений у больных сахарным диабетом 2 типа N – ацетилцистеина способствует снижению

концентраций в сыворотке крови глиоксаля и метилглиоксаля в 5раз ($p \leq 0,005$), увеличению восстановленной формы цистеина на 66% ($p \leq 0,05$) и глутатиона на 13% ($p \leq 0,005$) соответственно.

7. Более выраженная клиническая эффективность лечения сосудистых осложнений у больных сахарным диабетом 2 типа наблюдается при включении в комплексную терапию N-ацетилцистеина по сравнению с альфа-липоевой кислотой (средний срок очищения раны составил $7,0 \pm 0,1$ суток, появление грануляций в ране происходило на $8,2 \pm 0,1$ сутки).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С целью предупреждения развития сосудистых осложнений у пациентов с СД 2 типа, рекомендуется проведение комплексной оценки показателей карбонильного стресса (глиоксаля, метилглиоксаля), так как эти показатели кратно увеличиваются еще на стадии доклинических проявлений.

2. Расчёт соотношений CysSH/CysSSCys и GSH/GSSG может быть использован для оценки окислительно-восстановительного потенциала сыворотки/клетки (на примере эритроцитов) и мониторинга качества консервативной терапии при лечении сосудистых осложнений СД 2 типа.

3. Проведенный расчет интегральных показателей метилглиоксаля и свободного глутатиона по отношению их содержания у больного к среднему значению у здоровых лиц объективно отражает степень ишемии тканей конечности, что повышает точность прогноза риска развития сосудистых осложнений (заявка на изобретение № 2017118835).

4. При выявлении представленных показателей, рекомендуется назначение препарата N-ацетилцистеина, внутривенно в суточной дозе 600мг (курс 7 дней).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АОЗ – антиоксидантная защита;

АФК - активные формы кислорода

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГТ – глутатионтрансфераза

ГПО – глутатионпероксидаза

ГР - глутатионредуктаза

ИП - инфекционный процесс

ИФА – иммуноферментный анализ

КПГ – конечные продукты гликирования

ЛПВ – липопротеиды высокой плотности

ЛНП – липопротеиды низкой плотности

МДА – малоновый диальдегид

ПОЛ – перекисное окисление липидов

РСТ – рыхлая соединительная ткань

СД – сахарный диабет

СДС – синдром диабетической стопы

СОД – супероксиддисмутаза

ФНО – фактор некроза опухоли

AGE and AGEs (Advances Glycation End-products) – это конечные продукты гликирования

CYSTotal – общий цистеин

CYSfree – свободный цистеин

CYS-S-S-CYS-окисленный цистеин

HbAc – гликированный гемоглабин

IG – иммуноглобулин

IL– интерлейкин

GO – глиоксаль

GSHtotal -общий глутатион

GSHfree – восстановленный глутатион

GSSG – окисленный глутатион

γ -GCS- γ -глутамилцистеинсинтетаза

LPO – перекисное окисление липидов

MGO – метилглиоксаль

NAC – N-ацетилцистеин

PAF (platelet-activating factor) – фактор активирующий тромбоциты

SIRS - синдром системного воспалительного ответа;

ROS(REACTIVE OXYGEN SPECIES) активные формы кислорода

RNS (REACTIVE NITROGEN SPECIES) активные азотсодержащие молекулы

TNF – фактор некроза опухолей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом / под ред. И.И. Дедова, М.В. Шестаковой. – М. : УП ПРИНТ, 2017. – Вып. 8. - 112 с.
2. Алешин, С.В. Метаболический синдром X: состояния высокого риска / С.В. Алешин // Ортомолекулярная медицина. – М., 2003. – С. 48.
3. Альфа-липоевая кислота (Эспалипон) в комплексном лечении диабетической нейропатии / М.И. Балаболкин, Э.Р. Хасанова, А.М. Мкртумян [и др.] // Клиническая фармакология и терапия. - 1998. - № 2. - С. 78-82.
4. Аметов, А.С. Сахарный диабет 2 типа. Проблемы и решения / А.С. Аметов. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 1032 с.
5. Андреев, Л.И. Методика определения малонового диальдегида / Л.И. Андреев, Л.А. Кожемякин // Лаб. дело. - 1988. - № 11. - С. 41-43.
6. Ахохова, А.В. Показатели малонового диальдегида в плазме крови у больных рецидивирующей розеой / А.В. Ахохова, Б.С. Нагоев // Вестн. новых мед. технологий. - 2006. - Т. 13, № 3. - С. 144-145.
7. Балаболкин, М.И. Лечение сахарного диабета и его осложнений : рук. для врачей / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова, В.М. Креминская. – М. : Медицина, 2005. - 512 с.
8. Балаболкин, М.И. Патогенез ангиопатий при сахарном диабете / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова, В.М. Креминская // Сахарный диабет. – 1999. - № 1. – С. 2-8.
9. Балаболкин, М.И. Роль гликирования белков, окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений при сахарном диабете / М.И. Балаболкин // Сахарный диабет. - 2002. - № 4. - С. 5-16.

10. Бустаманте, Дж. Механизм α -липоевой кислоты в печени при различных формах патологии / Дж. Бустаманте, Дж. Лодж, Л. Мариоччи // Международный мед. журнал. - 2001. - № 2. - С. 133-141.
11. Бутрова, С.А. Метаболический синдром : патогенез, клиника, диагностика, подходы к лечению / С.А. Бутрова // Рус. мед журнал. – 2001. – Т. 9, № 2. - С 56-60.
12. Газин, И.К. Критерии интоксикации в оценке тяжести эндотоксикоза, эффективности озонотерапии и традиционного лечения у больных сахарным диабетом, осложненным гнойно-некротическими поражениями нижних конечностей / И.К. Газин // Клиническая лабораторная диагностика. - 2008. - № 6. - С. 21-22.
13. Галенок, В.А. Об особенностях иммуногенеза и иммунокоррекции сахарного диабета / В.А. Галенок, Е.А. Жук // Тер. архив. – 1995. - № 10. – С. 7-12.
14. Глутатион и ферменты его метаболизма у больных сахарным диабетом / Л.С. Колисниченко, Т.П. Бардымова, Е.С. Сергеева [и др.] // Сиб. мед. журн. (Иркутск). - 2009. - Т. 85, № 2. – С. 56-58.
15. Глутатионовая антиоксидантная система у больных сахарным диабетом / Л.С. Колисниченко, Т.П. Бардымова, Н.В. Верлан [и др.] // Сиб. мед. журн. (Иркутск). – 2009. - Т. 84, № 1 - С. 31-33.
16. Горожанская, Э.Г. Свободнорадикальное окисление и механизмы антиоксидантной защиты в нормальной клетке и при опухолевых заболеваниях / Э.Г. Горожанская // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. - № 6. - С. 28-44.
17. Дедов, И.И. Диабетическая стопа / И.И. Дедов, О.В. Удовиченко, Г.Р. Галстян. – М. : Практическая медицина, 2005. – 197 с.

18. Дедов, И.И. Сахарный диабет в Российской Федерации: проблемы и пути решения / И.И. Дедов // Сахарный диабет. – 1998. - № 1. – С. 2-12.
19. Деньгин, В.В. Перспективные направления клинического применения N-ацетилцистеина / В.В. Деньгин // Фарматека. – 2008. – № 4. – С. 56-61.
20. Дуданов, И.П. Критическая ишемия нижних конечностей / И.П. Дуданов // 80 лекций по хирургии / под ред. В.С Савельева. – М. : Литтера, 2008. – С. 3-12.
21. Дутов, А.А. N-ацетилцистеин: фармакокинетические параметры и влияние на концентрацию эндогенных аминотиолов / А.А. Дутов, Д.А. Никитин, Н.А. Шемякина // Фармакокинетика и фармакодинамика. - 2016. - № 2. – С. 34-38.
22. Дутов, А.А. Простой ВЭЖХ метод анализа глиоксаля и метилглиоксаля в плазме / А.А. Дутов, Д.А. Никитин, Н.А. Шемякина // European Journal of Analytical and Applied Chemistry. – 2017. - № 1. – С. 14-20.
23. Дутов, А.А. Простой ВЭЖХ-анализ глутатиона в эритроцитах / А.А. Дутов, Н.А. Шемякина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2015. - № 6. - С. 12-15.
24. Занозина, О.В. Роль окислительного стресса в развитии и прогрессировании поздних осложнений сахарного диабета 2 типа. Возможности антиоксидантной терапии : дис. ... д-ра мед. наук : 14.01.04 / Занозина Ольга Владимировна. - Нижний Новгород, 2010. - 326 с.
25. Изучение состояния процесса липопероксидации у женщин различных этнических групп с угрозой прерывания беременности / Л.И. Колесникова, М.А. Даренская, Л.А. Гребенкина [и др.] // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. - № 6(76). – С. 31-33.

26. Колобова, О.И. Комплексное оперативно-медикаментозное лечение при ишемической форме синдрома диабетической стопы / О.И. Колобова, А.В. Козлов // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2013 – № 8. - С. 36-42.
27. Конторщикова, К.Н. Перекисное окисление липидов в норме и патологии / К.Н. Конторщикова. – Н. Новгород, 2000. - 23 с.
28. Корымасов, Е.А. Реваскуляризация при синдроме диабетической стопы / Е.А. Корымасов, А.М. Аюпов, С.Ю. Пушкин // Диабетическая стопа: хирургия, терапия, реабилитация : материалы международного симп. – СПб., 2008. - 53 с.
29. Ланкин, В.З. Важная роль свободнорадикальных процессов в этиологии и патогенезе атеросклероза и сахарного диабета / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе // Кардиология. – 2016. - Т. 56, № 12. – С. 97-105.
30. Ланкин, В.З. Итоги изучения патофизиологических последствий нарушения регуляции свободнорадикальных процессов: тупик или новый импульс? / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2016. – Т. 1, № 3-2 (109). – С. 160-167.
31. Ланкин, В.З. Особенности модификации липопротеинов низкой плотности в развитии атеросклероза и сахарного диабета типа 2 / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Е.М. Кумскова // Кардиологический вестник. – 2008. – Т.3, № 1. – С. 60 – 67.
32. Либман, Е.С. Современные задачи социальной офтальмологии / Е.С. Либман // Труды VII съезда офтальмологов России. – М., 2000. – Ч. 2. – С. 250.
33. Машковский, М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. – 16-е изд., перераб. и доп. – М. : Изд. Умеренков, 2010. – 1216 с.
34. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-18.
35. Милушкина, О.И. Количественная оценка выраженности боли при синдроме раздраженного кишечника методом компьютерной электроакупунктуры : дис. ...

канд. мед. наук : 14.00.05 / Милушкина Ольга Ивановна. — Ульяновск, 2008. — 102 с.

36. Михалевич, И.М. Регрессионный анализ (использование в медицинских исследованиях с применением ППП Statistica) : пособие для врачей / И.М. Михалевич. – Иркутск : РИО ГБОУ ДПО ИГМАПО, 2012. – 32 с.
37. Нагоев, Б.С. Показатели малонового диальдегида в плазме крови у больных рожей / Б.С. Нагоев, А.В. Ахохова // Клин. лаб. диагностика. - 2007. - № 8. - С. 39-40.
38. Недосугова, Л.В. Окислительный стресс при сахарном диабете типа 2 и возможности его медикаментозной коррекции : дис. ... д-ра мед. наук : 14.00.03 / Недосугова Людмила Викторовна. – М., 2006. – 356 с.
39. Номоконова, И.Н. Влияние различных факторов на течение синдрома диабетической стопы / И.Н. Номоконова, Д.Г. Болотова // Вестник РГМУ. - 2007. - № 2. - С. 120-121.
40. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания / В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков [и др.]. – Новосибирск : АРТА, 2008. - 284 с.
41. Осложнения сахарного диабета (клиника, диагностика, лечение, профилактика) / М.Б. Анцыферов, Г.Р. Галстян, Т.М. Миленькая [и др.] ; под ред. И.И. Дедова. – М., 1995. - 24 с.
42. Пат. №2456601. Российская Федерация, МПК G01N 33/49. Способ оценки течения раневого процесса при синдроме диабетической стопы / Е.В. Намоконов, С.Т. Кохан, А.М. Мироманов, М.Ю. Швецов ; ГОУ ВПО ЧГМА. – № 2010150054/15 ; заявл. 06.12.2010 ; опубл. 20.07.2012, Бюл. №.20.
43. Пашина, С.Н. Клинические и гемолимфатические нарушения при гнойно-деструктивных процессах у больных с синдромом диабетической стопы : автореф.

- дис. ... канд. мед. наук : 14.00.03 / Пасина Светлана Николаевна. – Новосибирск, 2007. - 20 с.
- 44.Поберезкина, Н.Б. Биологическая роль супероксид дисмутазы / Н.Б. Поберезкина, Л.Ф. Осинская // Укр. биохим. журнал. – 1989. – № 2. – С. 58-62.
- 45.Реваскуляризирующие операции при нейроишемической форме синдрома диабетической стопы / И.Н. Игнатович, Г.Г. Кондратенко, Г.А. Сергеев [и др.] // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2012. - № 3. - С. 38-42.
- 46.Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений сахарного диабета / Д.В. Черданцев, Л.П. Николаева, А.В. Степаненко, В.Ю. Дятлов // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2010. - № 5. – С. 127-129.
- 47.Роль реконструктивных сосудистых операций у больных с диабетической ангиопатией / М.Д. Дибиров, Б.С. Брискин, Ф.Ф. Хамитов [и др.] // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2009. - № 2. - С. 59-63.
- 48.Саклаков А.В. Патогенетическое обоснование рационального применения препаратов липоевой кислоты в комплексной терапии атеросклероза нижних конечностей : автореф. дис. ...канд. мед. наук : 14.03.16. / Саклаков Алексей Викторович. – Чита, 2004. – 22 с.
- 49.Сергеева, Е.С. Система глутатиона и ее коррекция у больных сахарным диабетом : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.03 / Сергеева Елена Сергеевна. - М., 2009. - 22 с.
- 50.Серебрякова, О.В. Отчет главного внештатного эндокринолога по Забайкальскому краю / О.В. Серебрякова. – Чита, 2016. – 23 с.

- 51.Смирнова, О.М. Свободно – радикальное окисление и антиоксидантная защита при сахарном диабете / О.М. Смирнова, Т.В. Никонова. – М. : Медицина, 2003. – 40 с.
- 52.Соколовский, В.В. Тиол-дисульфидное соотношение крови как показатель состояния неспецифической резистентности организма / В.В. Соколовский. – СПб., 1996 – 30 с.
- 53.Сорокина, Ю.А. Фармакогенетические аспекты эффективности метформина при сахарном диабете 2 типа : дис. ... канд. биол. наук : 14.03.06 / Сорокина Юлия Андреевна. – Н. Новгород, 2016. – 130 с.
- 54.Титов, В.Н. Артериолосклероз и атеросклероз. Патология дистального и проксимального отделов артериального русла. Патогенез диабетической микроангиопатии / В.Н. Титов, Ю.К. Ширяева // Клиническая лабораторная диагностика. - 2011. - № 4. - С.3-14.
- 55.Характеристика боли и её влияния на качество жизни больных гемобластозами / А.А. Новик, Т.И. Ионова, С.А. Калядина [и др.] // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. — 2007. — Т. 2, № 1. — С. 32—37.
- 56.Шемякина, Н.А. «Новый взгляд» на состояние антиоксидантной системы при различных сосудистых осложнениях сахарного диабета 2 типа / Н.А. Шемякина, А.В. Ермолина, Е.В. Намоконов // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. - 2016. - Т. 9, № 3 (32). – С. 204-208.
- 57.Abordo, E.A. Accumulation of alphaoxoaldehydes during oxidative stress: a role in cytotoxicity / E.A. Abordo, H.S. Minhas, P.J. Thornalley // Biochem. Pharmacol. – 1999. - Vol. 58, № 4. - P. 641–648.

58. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health (Invited Review) / M.W. Poulsen, R.V. Hedegaard, J.M. Andersen [et al.] // *Food and Chemical Toxicology*. – 2013. - Vol. 60. - P. 10–37.
59. Akerboom, T.P. The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused liver / T.P. Akerboom, M. Bilzer, H. Sies // *J. Biol. Chem.* – 1982. - Vol. 257, № 8. - P. 4248–4252.
60. Altered thiol pattern in plasma of subjects affected by rheumatoid arthritis / D. Giustarini, S. Lorenzini, R. Rossi [et al.] // *Clin. Exp. Rheumatol.* – 2005. – Vol. 23, № 2. – P. 205-12.
61. Amino acid specificity of glycation and protein-AGE crosslinking reactivities determined with a dipeptide SPOT library / G. Munch, D. Schick Tanz, A. Behme [et al.] // *Nat. Biotechnol.* - 1999. - Vol. 17, № 10. - P. 1006–1010.
62. Analysis of cysteine and N-acetylcysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography at the basal state and after oral administration of N-acetylcysteine / D. Tsikas, J. Sandmann, M. Ikic [et al.] // *Journal of Chromatography B*. – 1998. - Vol. 708, № 1-2. - P. 55–60.
63. Analytical methods involving separation techniques for determination of low-molecular-weight biothiols in human plasma and blood / M. Isokawa, T. Kanamori, T. Funatsu, M. Tsunoda // *J. Chromatogr B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2014. – Vol. 964. – P. 103-115.
64. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification / A. Pastore, G. Federici, E. Bertini, F. Piemonte // *Clin. Chim. Acta.* – 2003. - Vol. 333, № 1. - P. 19–39.
65. Analytical method for lipoperoxidation relevant reactive aldehydes in human sera by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection / M.H. El-Maghrabey, N. Kishikawa, K. Ohyama, N. Kuroda // *Anal. Biochem.* – 2014. - Vol. 464. - P. 36-42.

66. Antibodies to oxidized LDL predict coronary artery disease in type 1 diabetes: a nested case-control study from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study / T.J. Orchard, G. Virrella, K.Y-Z. Forrest [et al.] // *Diabetes*. – 1999. – Vol. 48, № 7. - P. 1454-1458.
67. An antioxidant tetrapeptide UPF1 in rats has a neuroprotective effect in transient global brain ischemia / P. Poder, M. Zilmer, J. Starkopf [et al.] // *Neurosci. Lett.* – 2004. - Vol. 370, № 1. - P. 45–50.
68. Assay of malondialdehyde in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry / H.C. Yeo, H.J. Helbock, D.W. Chyu, B.N. Ames // *Anal. Biochem.* – 1994. - Vol. 220, № 2. - P. 391-396.
69. Automated derivatization and analysis of malondialdehyde using column switching sample preparation HPLC with fluorescence detection / H.L. Lord, J. Rosenfeld, S. Raha, M.J. Hamadeh // *J. Sep. Sci.* – 2008. - Vol. 31, № 2. - P. 387-401.
70. Ball, G.F.M. *Vitamins: Their Role in the Human Body* / G.F.M. Ball. – London : Blackwell, 2004. – 432 p.
71. Banks, W.A. Peptides and blood brain barrier: lipophilicity as predictor of permeability / W.A. Banks, A.J. Kastin // *Brain Res. Bull.* – 1985. - Vol. 15, № 3. - P. 287-292.
72. Baynes, J. Perspectives in diabetes. Role of oxidative stress in development of complication in diabetes / J. Baynes // *Diabetes*. - 1991. - Vol. 40, № 4. - P. 405-412.
73. Borgstrom, L. Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man / L. Borgstrom, B. Kagedal, O. Paulsen // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 1986. - Vol. 31, № 2. - P. 217-222.
74. Ghezzi, P. Thiol-disulfide balance: from the concept of oxidative stress to that of redox regulation / P. Ghezzi, V. Bonetto, M. Fratelli // *Antioxid Redox Signal.* – 2005. – Vol. 7, № 7-8. – P. 964-72.

75. Choudhary, D. Influence of methylglyoxal on antioxidant enzymes and oxidative damage / D. Choudhary, D. Chandra, R.K. Kale // *Toxicol. Lett.* – 1997. - Vol. 93, № 2-3. - P. 141–152.
76. Chromatographic determination of aliphatic aldehydes in human serum after pre-column derivatization using 2,2'-furyl, a novel fluorogenic reagent / M. Fathy Bakr Ali, N. Kishikawa, K. Ohya [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2013. - Vol. 1300. - P. 199-203.
77. Claeson, K. Methyl malondialdehyde as internal standard for the determination of malondialdehyde / K. Claeson, G. Thorsen, B. Karlberg // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* – 2001. - Vol. 751, № 2. - P. 315–323.
78. Conventional antibody against Ne-(carboxymethyl) lysine (CML) shows cross-reaction to Ne-(carboxyethyl) lysine (CEL): Immunochemical quantification of CML with a specific antibody / W. Koito, T. Araki, S. Horiuchi, R. Nagai // *J. Biochem. (Tokyo).* – 2004 – Vol. 136. – P. 831–837.
79. Cordis, G.A. High-performance liquid chromatographic peak identification of 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives of lipid peroxidation aldehydes by photodiode array detection / G.A. Cordis, D.K. Das, W. Riedel // *J. Chromatogr. A.* – 1998. - Vol. 798, № 1-2. - P. 117-123.
80. Del Rio, D. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress / D. Del Rio, A.J. Stewart, N. Pellegrini // *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* – 2005. - Vol. 15, № 4. - P. 316-328.
81. Design, synthesis and properties of novel powerful antioxidants, glutathione analogues / K. Enrich, S. Viirlaid, R. Mahlapuu [et al.] // *Free Radical. Research.* – 2007. - Vol. 41, № 7. - P. 779–787.
82. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for

- hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits / R. Mateos, E. Lecumberri, S. Ramos[et al.] // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2005. - Vol. 827. - P. 76-82.
- 83.Determination of malondialdehyde in human plasma by fully automated solid phase analytical derivatization / H.L. Lord, J. Rosenfeld, V. Volovich [et al.] // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2009. - Vol. 877, № 13. – P. 1292–1298.
- 84.Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum / J.P. Steghens, A.L. van Kappel, I. Denis, C. Collombel // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. - Vol. 31, № 2. - P. 242-249.
- 85.Distler, M.G. Role of glyoxalase 1 (Glo1) and methylglyoxal (MG) in behavior: recent advances and mechanistic insights / M.G. Distler, A.A. Palmer // *Front. Genet.* - 2013. - Vol. 3. - P. 250–255.
- 86.Duarte, T.L. Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C / T.L. Duarte, J. Lunec // *Free Rad. Res.* – 2005. - Vol. 39, № 7. - P. 671-686.
- 87.Economic costs of diabetes in the U. S. in 2007 / American Diabetes Association // *Diabetes Care.* – 2008. - Vol. 31, № 3. –P. 596-615.
- 88.Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation endproducts / N. Verzijl, J. DeGroot, S.R. Thorpe [et al.] // *J. Biol. Chem.* - 2000. - Vol. 275, № 50. - P. 39027–39031.
- 89.Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation endproducts / N. Verzijl, J. DeGroot, S.R. Thorpe [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 39027–39031.

90. Effect of High-Dose Intravenous N-acetylcysteine on the Concentration of Plasma Sulfur-Containing Amino Acids / S-Y. Hong, H-W. Gil, J-O. Yang [et al.] // *The Korean Journal of Internal Medicine*. – 2005. - Vol. 20, № 3. - P. 217-223.
91. Effects of S-acetylglutathione in cell and animal model of herpes simplex virus type 1 infection / J.U. Vogel, J. Cinatl, N. Dauletbaev [et al.] // *Med. Microbiol. Immunol.* – 2005. - Vol. 194, № 1-2. - P. 55–59.
92. Effects of supplementation with vitamin C or E on albuminuria, glomerular IGF-beta and glomerular size in diabetics / J. Eriksson, A. Kohvakka, V.E. Kagan [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 1997. - Vol. 8, № 9. - P. 1405-1414.
93. Elizarova, T.P. Effects of taurine on calcium in platelets and their aggregation. *Taurine 2* / T.P. Elizarova ; ed. R. Huxtable. - New York : Plenum Press, 1996. – P. 589-595.
94. Esterbauer, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes / H. Esterbauer, R.J. Schaur, H. Zollner // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1991. - Vol. 11. - P. 81–128.
95. Esterbauer, H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal / H. Esterbauer, K.H. Cheeseman // *Methods in Enzymology*. - 1990. - Vol. 186. - P. 407–421.
96. Evidence-based antioxidant activity of the essential oil from *Fructus A. zerumbet* on cultured human umbilical vein endothelial cells' injury induced by ox-LDL / X.C. Shen, L. Tao, W.K. Li [et al.] // *BMC Complement. Altern. Med.* – 2012. – Vol. 12. – P. 174. doi: 10.1186/1472-6882-12-174.
97. Fahey, RC. Evolution of glutathione metabolism / R.C. Fahey, A.R. Sundquist // *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* – 1991. - Vol. 64. - P. 1–53.
98. A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters / H. Tsukaguchi, T. Tokui, B. Mackenzie [et al.] // *Nature*. - 1999. - Vol. 399, № 6731. - P. 70-75.

99. Fang, Y.Z. Free radicals, antioxidants, and nutrition / Y.Z. Fang, S. Yang, G. Wu // Nutrition. – 2002. - Vol. 18, № 10. - P. 872–879.
100. Free and Bound Malondialdehyde Measured as Thiobarbituric Acid Adduct by HPLC in Serum and Plasma / M.A. Carbonneau, E. Peuchant, D. Sess [et al.] // Clin. Chem. – 1991. - Vol. 37, № 8. - P. 1423-1429.
101. Frei, B. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma / B. Frei, L. England, B.N. Ames // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. - Vol. 86, № 16. - P. 6377-6381.
102. Frei, B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action / B. Frei // Am. J. Med. – 1994. - Vol. 97, № 3A. - P. 5S-13S.
103. Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes / E.S. Samiec, C. Drews-Botsch, E.W. Flagg [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 1998. - Vol. 24, № 5. - P. 699-704.
104. Glutathione measurement in human plasma. Evaluation of sample collection, storage and derivatization conditions for analysis of dansyl derivatives by HPLC / D.P. Jones, J.C. Kurtz, E.S. Samiec [et al.] // Clin. Chem. Acta. – 1998. – Vol. 275, № 2. – P. 175-84.
105. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health (review) / G. Wu, Y-Z. Fang, S. Yang [et al.] // J. Nutr. – 2004. - Vol. 134, № 3. – P. 489–492.
106. Glutathione Monoethyl Ester: Preparation, Uptake by Tissues, and Conversion to Glutathione / M.E. Anderson, F. Powrie, R.N. Puri, A. Meister // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1985. - Vol. 239, № 2. - P. 538-548.
107. Glycated albumin increased oxidative stress, activates NF-kappa B and extracellular signal-regulated kinase (ERK), and stimulates ERK-dependent transforming growth factor-beta 1 production in macrophage RAW cells / M.P. Cohen,

- E. Shea, S. Chen, C.W. Shearman // *J. Lab. Clin. Med.* - 2003. - Vol. 141, № 4. - P. 242-249.
108. Glyoxal and Methylglyoxal Levels in Diabetic Patients: Quantitative Determination by a New GC/MS Method / A. Lapolla, R. Flamini, A.D. Vedova [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2003. – Vol. 41, № 9. - P. 1166–1173.
109. Griffith, O.W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis / O.W. Griffith // *Free Radic. Biol. Med.* - 1999. – Vol. 27, № 9-10. – P. 922–935.
110. Gutteridge, J.M.C. The characterisation of thiobarbituric acid reactivity in human plasma and urine / J.M.C. Gutteridge, T.R. Tickner // *Anal. Biochem.* - 1978. - Vol. 91, № 1. - P. 250-257.
111. Hacisevki, A. An overview of ascorbic acid biochemistry / A. Hacisevki // *J. Fac. Pharm. Ankara.* – 2009. - Vol. 38, № 3. - P. 233-255.
112. Halliwell, B. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance / B. Halliwell, S. Chirico // *American Journal of Clinical Nutrition.* – 1993. - Vol. 57. - P. 715–725.
113. Halliwell, B. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problem and concepts / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge // *Arch. Biochem. Biophys.* - 1986. - Vol. 246, № 2. - P. 501-514.
114. *Handbook of Derivatives for Chromatography* / eds. K. Blau, J.M. Halket. - New York : Wiley, 1993. – 369 p.
115. Hankinson, S.E. Nutrient intake and cataract extraction in women: a prospective study / S.E. Hankinson // *Br. Med. J.* - 1992. – Vol. 305, № 6849. - P. 335-359.
116. Hellman, L. Metabolism of L-ascorbic acid-1- C_{14} in man / L. Hellman, J.J. Burns // *J. Biol. Chem.* – 1958. - Vol. 230, № 2. - P. 923-930.

117. Holdiness, M.R. Clinical Pharmacokinetics of N-Acetylcysteine / M.R. Holdiness // Clin. Pharmacokinet. – 1991. - Vol. 20, № 2. - P. 123-134.
118. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand / E. Mavric, S. Wittmann, G. Barth, T. Henle // Mol. Nutr. Food Res. – 2008. – Vol. 52, № 4. - P. 483 – 489.
119. Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard / A.S. Sim, C. Salonikas, D. Naidoo, D.E. Wilcken // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2003. - Vol. 785, № 2. - P. 337-344.
120. Increased levels of Ne-(carboxymethyl) lysine and Ne-(carboxyethyl) lysine in type 1 diabetic patients with impaired renal function: correlation with markers of endothelial dysfunction / A.F. Liew, V.W.M van Hinsbergh, T. Teerlink [et al.] // Nephrol. Dial. Transplant. - 2004. - Vol. 19, № 3. - P. 631–636.
121. Increased levels of Ne-(carboxymethyl) lysine and Ne-(carboxyethyl) lysine in type 1 diabetic patients with impaired renal function: correlation with markers of endothelial dysfunction / A.F. Liew, V.W.M. van Hinsbergh, T. Teerlink [et al.] // Nephrol. Dial. Transplant. – 2004. – Vol. 19. – P. 631–636.
122. Increased plasma malondialdehyde level in glomerular disease as determined by a fully validated HPLC method / J. Templar, S.P. Kon, T.P. Milligan [et al.] // Nephrol. Dial. Transplant. – 1999. - Vol. 14, № 4. - P. 946-951.
123. Increased serum levels of the specific AGE-compound methylglyoxal-derived hydroimidazolone in patients with type 2 diabetes / B.K. Kilhovd, I. Giardino, P.A. Torjesen [et al.] // Metabolism. - 2003. - Vol. 52, № 2. - P. 163–167.

124. Inflammation in the vascular wall as an early event in atherosclerosis / S. Prescott, G. Zimmerman, T. McIntyre [et al.] // *Diabetologia*. – 1997. – Vol. 40. – Suppl. 2. - P. S111 – S112.
125. Inhibition of cell proliferation and glutathione-S-transferase by ascorbyl esters and interferon in mouse glioma / A.K. Naidu, M. Wiranowska, S.H. Kori [et al.] // *J. Neuro - Oncol.* - 1993. - Vol. 16, № 1. - P. 1-10.
126. Inhibition of human glioma cell proliferation and glutathione-S-transferase by ascorbyl esters and interferon / A.K. Naidu, M. Wiranowska, S.H. Kori [et al.] // *Anticancer Res.* – 1993. - Vol. 13, № 5A. - P. 1469-1471.
127. Is diabetes an acquired disorder of reactive glucose metabolites and their intermediates? / T. Fleming, J. Cuny, G. Nawroth [et al.] // *Diabetologia*. – 2012. - Vol. 55, № 4. - P. 1151-1155.
128. Janero, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury / D.R. Janero // *Free Radic. Biol. Med.* – 1990. - Vol. 9, № 6. - P. 515-540.
129. Jialal, I. Physiologic levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein / I. Jialal, G.L. Vega, S.M. Grundy // *Atherosclerosis*. – 1990. - Vol. 82, № 3. - P. 185-191.
130. Jones, D.P. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance / D.P. Jones // *Methods Enzymol.* – 2002. – Vol. 348. – P. 93–112.
131. Kagan, V.E. Dihydrolipoic acid – a universal antioxidant in the membrane and in the aqueous phase. Reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radical / V.E. Kagan, A. Shvedova, E. Serbinova // *Biochem. Pharmacol.* - 1992. - Vol. 44, № 8. - P. 1637-1649.

132. Kim, S-S. Lipophilic Aldehydes and Related Carbonyl Compounds in Rat and Human Urine / S-S. Kim, D.D. Gallaher, A.S. Csallany // *Lipids*. – 1999. - Vol. 34, № 5. - P. 489-496.
133. Klannemark, M. The putative role of the hormone-sensitive lipase gene in the pathogenesis of type II diabetes mellitus obesity / M. Klannemark, M. Orho, D. Langin // *Diabetologia*. - 1998. – Vol. 41. – P. 1516-1522.
134. Klein, R. Relation of glycemic control to diabetic microvascular complications in diabetes mellitus / R. Klein, B. Klein, S. Moss // *Ann. Intern. Med.* – 1996. – Vol. 124. – P. 90 - 96.
135. Kontush, A. Antioxidant and prooxidant activity of alpha-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein / A. Kontush // *J. Lipid Res.* – 1996. - Vol. 37, № 7. - P. 1436-1448.
136. Korchazhkina, O. Measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography of malondialdehyde in normal human urine following derivatisation with 2,4-dinitrophenylhydrazine / O. Korchazhkina, C. Exley, S.A. Spencer // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2003. - Vol. 794, № 2. - P. 353–362.
137. Laakso, M. Cardiovascular disease in type 2 diabetes from population to man to mechanisms: the Kelly West Award Lecture 2008 / M. Laakso // *Diabetes Care*. – 2010. – Vol. 33, № 2. – P. 442-449.
138. Levin, M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid / M. Levin // *New Engl. J. Med.* – 1986. - Vol. 314, № 14. - P. 892-902.
139. Low Total Vitamin C Plasma Level Is a Risk Factor for Cardiovascular Morbidity and Mortality in Hemodialysis Patients / R. Deicher, F. Ziai, C. Bieglmayer [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2005. - Vol. 16, № 6. - P. 1811–1818.

140. Lu, S.C. Regulation of glutathione synthesis / S.C. Lu // *Curr. Top. Cell Regul.* – 2000. - Vol. 36. - P. 95–116.
141. Lu, S.C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies / S.C. Lu // *FASEB J.* – 1999. - Vol. 13, № 10. - P. 1169–1183.
142. Lykkesfeldt, J. Determination of Malondialdehyde as Dithiobarbituric Acid Adduct in Biological Samples by HPLC with Fluorescence Detection: Comparison with Ultraviolet-Visible Spectrophotometry / J. Lykkesfeldt // *Clinical Chemistry.* – 2001. - Vol. 47, Is. 9. - P. 1725-1727.
143. Maessen, D.E.M. The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases (review article) / D.E.M. Maessen, C.D.A. Stehouwer, C.G. Schalkwijk // *Clinical Science.* – 2015. - Vol. 128, № 12. - P. 839–861.
144. Maillard reactions in lens proteins: methylglyoxal-mediated modifications in the rat lens / F.A. Shamsi, E. Sharkey, D. Creighton, R.H. Nagaraj // *Exp. Eye Res.* - 2000. - Vol. 70, № 3. - P. 369–380.
145. Malins, D.C. Progression of human breast cancers to the metastatic state is linked to hydroxyl radical-induced DNA damage / D.C. Malins // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1996. - Vol. 93. - P. 2557-2563.
146. Marnett, L.J. Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde / L.J. Marnett // *Mutation Research.* - 1999. - Vol. 424, № 1-2. - P. 83–95.
147. Mass spectrometric monitoring of albumin in uraemia / P.J. Thornalley, M. Argirova, N. Ahmed [et al.] // *Kidney Int.* – 2000. – Vol. 58. – P. 2228–2234.
148. McCarty, M.F. Oxidants downstream from superoxide inhibit nitric oxide production by vascular endothelium – a key role for selenium-dependent enzymes in vascular health / M.F. McCarty // *Med. Hypotheses.* - 1999. - Vol. 53. - P. 313-325.

149. Meister, A. Glutathione metabolism and its selective modification / A. Meister // *J. Biol. Chem.* – 1988. - Vol. 263, № 33. - P. 17205-17208.
150. Meister, A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection / A. Meister // *Cancer Res.* – 1994. - Vol. 54. - Suppl. 7. - P. 1969–1975.
151. Metabolism, not autoxidation, plays a role in alpha-oxoaldehyde- and reducing sugarinduced erythrocyte GSH depletion: relevance for diabetes mellitus / K.M. Beard, N. Shangari, B. Wu, P.J. O'Brien // *Mol. Cell Biochem.* - 2003. - Vol. 252, № 1-2. - P. 331–338.
152. Methylglyoxal: its presence in beverages and potential scavengers / D. Tan, Y. Wang, C.Y. Lo [et al.] // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2008. – Vol. 1126. – P. 72–75.
153. Minhas, H.S. Comparison of the delivery of reduced glutathione into P388D1 cells by reduced glutathione and its mono- and diethyl ester derivatives/ H.S. Minhas, P.J. Thornalley // *Biochem. Pharmacol.* – 1995. - Vol. 49, № 10. - P. 1475–1482.
154. Modified LDLs induce proliferation-mediated death of human vascular endothelial cells through MAPK pathway / E.O. Apostolov, A.G. Basnakian, X. Yin [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2007. – Vol. 292, № 4. – P. 1836-1846.
155. Monnier, L. Contribution of postprandial glucose to chronic hyperglycaemia: from the "glucose triad" to the trilogy of "sevens" / L. Monnier, C. Colette, H. Boniface // *Diabetes Metab.* – 2006. – Vol. 32, Spec. № 2. – P. 11-6.
156. Moser, U. Vitamin C / U. Moser, A. Bendich // *Handbook of Vitamins* / ed L.J. Machlin. - New York : Marcel Dekker, 1991. – P. 195-232.
157. Multiple-Dose Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of N-Acetylcysteine in Patients with End-Stage Renal Disease / T.D. Nolin, R. Ouseph, J. Himmelfarb [et al.] // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2010. - Vol. 5, № 9. - P. 1588–1594.

158. N-acetylcysteine amide, a novel cell-permeating thiol, restores cellular glutathione and protects human red blood cells from oxidative stress / L. Grinberg, E. Fibach, J. Amer, D. Atlas // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2005. - Vol. 38, № 1. - P. 136–145.
159. N-Acetylcysteine ethyl ester (NACET): A novel lipophilic cell-permeable cysteine derivative with an unusual pharmacokinetic feature and remarkable antioxidant potential / D. Giustarini, A. Milzani, I. Dalle-Donne [et al.] // *Biochemical Pharmacology*. – 2012. - Vol. 84, № 11. - P. 1522–1533.
160. Naidu, K.A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview / K.A. Naidu // *Nutrition Journal*. - 2003. - Vol. 2. - P. 2-10.
161. Nair, U. Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adducts types and levels in humans / U. Nair, H. Bartsch, J. Nair // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2007. - Vol. 43, № 8. - P. 1109–1120.
162. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins / M.U. Ahmed, F.E. Brinkmann, T.P. Degenhardt [et al.] // *Biochem J*. – 1997. - Vol. 324. - Pt 2. - P. 565–570.
163. Ness, A. Role of antioxidant vitamins in prevention of cardiovascular disease / A. Ness, M. Egger, G. Davey-Smith // *Br. Med. J*. - 1999. - Vol. 319, № 7209. - P. 577-579.
164. New method for HPLC separation and fluorescence detection of malonaldehyde in normal human plasma / J. Mao, H. Zhang, J. Luo, L. Li [et al.] // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*. – 2006. - Vol. 832. - P. 103-108.

165. Novo, E. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and Fibrogenesis. Review / E. Novo, M. Parola // *Fibrogenesis and Tissue Repair*. – 2008. - Vol. 1, № 1. - P. 5.
166. Nyssonen, K. Vitamin C deficiency and risk of myocardial infarction: prospective population study of men from eastern Finland / K. Nyssonen // *Br. Med. J.* - 1997. - Vol. 314, № 7081. - P. 634.
167. O'Brien, P.J. Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health / P.J. O'Brien, A.G. Siraki, N. Shangari // *Crit. Rev. Toxicol.* – 2005. - Vol. 35, № 7. - P. 609-662.
168. Oguntibeju, O.O. Serum ascorbate, cholesterol and total protein levels in newly diagnosed non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) among Nigerians / O.O. Oguntibeju, M.A. Fafunso // *Med. Tech.* - 2002. - Vol. 16, № 1. - P. 358-360.
169. Oxidative stress in experimental diabetes induced by streptozotocin/ B. Matkovics, M. Kotorman, I.S. Varga [et al.] // *Acta Physiol. Hung.* – 1997. - Vol. 85, № 1. - P. 29–38.
170. Oxidized LDL upregulates angiotensin II type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: the potential role of transcription factor NF-kappaB / D. Li, T. Saldeen, F. Romeo, J.L. Mehta // *Circulation*. – 2000. – Vol. 102, № 16. – P. 1970-1976.
171. Pacher, P. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease / P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet // *Physiol. Rev.* - 2007. - Vol. 87, № 1. - P. 315-424.
172. Pathobiology of the human atherosclerotic plaque / eds. S. Glogov [et al.]. – Berlin : Springer, 1990. - Vol. 14. - P. 839 - 855.
173. Periprandial systemic and regional lipase activity in normal humans / S. Coppack, T. Yost, R. Fisher [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 1996. – Vol. 270. – P. 718 - 722.

174. Pharmacokinetics and bioavailability of reduced and oxidized N-acetylcysteine / B. Olsson, M. Johansson, J. Gabrielsson, P. Bolme // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 1988. - Vol. 34, № 1. - P. 77–82.
175. Pharmacokinetics of N-acetylcysteine are altered in patients with chronic liver disease / A.L. Jones, D.R. Jarvie, D. Simpson [et al.] // *Aliment Pharmacol Ther.* – 1997. - Vol. 11, № 4. - P. 787-791.
176. Phillips, S.A. The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal / S.A. Phillips, P.J. Thornalley // *Eur. J. Biochem.* – 1993. - Vol. 212, № 1. - P. 101–105.
177. Pilz, J. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative / J. Pilz, I. Meineke, C.H. Gleiter // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* – 2000. – Vol. 742, № 2. - P. 315-325.
178. Plasma α -oxoaldehyde levels in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease patients / K. Nakayama, M. Nakayama, M. Iwabuchi [et al.] // *Am. J. Nephrol.* - 2008. - Vol. 28, № 6. - P. 871–878.
179. Plasma methylglyoxal and glyoxal are elevated and related to early membrane alteration in young, complication-free patients with Type 1 diabetes / Y. Han, E. Randell, S. Vasdev [et al.] // *Mol. Cell. Biochem.* – 2007. - Vol. 305, № 1-2. - P. 123–131.
180. Posfon, L. Endothelial control of vascular tone in diabetes mellitus / L. Posfon // *Diabetologia.* – 1997. – Vol. 40. – Suppl. 2. – P. S113 – S114.
181. Preparative Steps Necessary for the Accurate Measurement of Malondialdehyde by High-Performance Liquid Chromatography / G. Lepage, G. Munoz, J. Champagne, C.C. Roy // *Anal. Biochem.* – 1991. – Vol. 197, № 2. - P. 277-283.

182. Prodrug Approach for Increasing Cellular Glutathione Levels (review) / I. Cacciatore, C. Cornacchia, F. Pinnen [et al.] // *Molecules*. – 2010. - Vol. 15, № 3. - P. 1242-1264.
183. Protection from oxidized LDL induced leukocyte adhesion to microvascular and macrovascular endothelium in vivo by vitamin C but not by vitamin E / H.A. Lehr, B. Frei, A.M. Olofsson [et al.] // *Circulation*. – 1995. - Vol. 91, № 5. - P. 1525-32.
184. Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL - application to various biological samples / A.M. Domijan, J. Ralić, S. Radić Brkanac [et al.] // *Biomed. Chromatogr.* – 2015. - Vol. 29, № 1. - P. 41-46.
185. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry / P.J. Thornalley, S. Battah, N. Ahmed [et al.] // *Biochem. J.* – 2003. – Vol. 375. – P. 581–592.
186. Rabbani, N. Glyoxalase in diabetes, obesity, and related disorders / N. Rabbani, P.J. Thornalley // *Sem. Cell Dev. Biol.* - 2011. - Vol. 22, № 3. - P. 309–317.
187. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography–visible detection / D. Grotto , L.D. Santa Maria, S. Boeira [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2007. - Vol. 43, № 2. - P. 619–624.
188. Reactive oxygen species as a signal in glucosestimulated insulin secretion / J. Pi, Y. Bai, Q. Zhang, [et al.] // *Diabetes*. – 2007. - Vol. 56, № 7. - P. 1783-1791.
189. Recent advances in the biochemistry and clinical relevance of the isoprostane pathway / E.S. Musiek, H. Yin, G.L. Milne, J.D. Morrow // *Lipids*. – 2005. - Vol. 40, № 10. - P. 987-994.
190. Risk factors, ethnic differences and mortality associated with lower extremity gangrene and amputation in diabetes. The WHO multinational study of vascular disease

- in diabetes / N. Chaturvedi, L.K. Stevens, J.H. Fuller [et al.] // *Diabetologia*. – 2001. – Vol. 44. - P. 65-71.
191. Rodriguez, M.C. Plasma Malondialdehyde Increases Transiently after Ischemic Forearm Exercise / M.C. Rodriguez, J. Rosenfeld, M.A. Tarnopolsky // *Med. Sci. Sports Exerc.* – 2003. - Vol. 35, № 11. - P. 1859-1865.
192. S-acetyl and S-phenylacetyl-glutathione in rat brain tissue / V. Rizzoli, P. Schiappelli, C. Moretto, L. Galzigna // *Eur. J. Lab. Med.* – 1995. - Vol. 3. - P. 11–13.
193. Savanne, M. Lipids and lipoproteins as coronary risk factors in non-insulin-dependent diabetes mellitus / M. Savanne, M. Taskinen // *Lancet*. - 1997. - Vol. 350. – P. 20 – 23.
194. Schwartz, J.L. The dual roles of nutrients as antioxidants and prooxidants: their effects on tumour cell growth / J.L. Schwartz // *J. Nutr.* - 1996. - Vol. 126, № 4. - P. 1221-1227.
195. Separation and Characterization of the Aldehydic Products of Lipid Peroxidation Stimulated by ADP-Fe²⁺ in Rat Liver Microsomes / H. Esterbauer, K.H. Cheeseman, M.U. Dianzani [et al.] // *Biochem. J.* – 1982. - Vol. 208, № 1. - P. 129–140.
196. Shangari, N. The cytotoxic mechanism of glyoxal involves oxidative stress / N. Shangari, P.J. O'Brien // *Biochem. Pharmacol.* – 2004. - Vol. 68, № 7. - P. 1433–1442.
197. Shantaram, V. Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes and hypertension / V. Shantaram // *Clin. Exp. Hypertension*. - 1999. – Vol. 21, № 1-2. - P. 69-77.
198. Shemiakina, N.A. Pleotropic action of N-acetylcysteine as an antioxidant in acute and chronic oxidative stress / N.A. Shemiakina, Yu. L. Lukianova, A.V. Ermolina // *Materials of the XI International Research and Practice Conference on SCIENS and EDUCATION (April 06-07.2016, Munich, Germany)*. - Munich, Germany, 2016. - P. 176-181.

199. Shibamoto, T. Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. Review / T. Shibamoto // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2006. - Vol. 41, № 1. - P. 12–25.
200. Shukla, S.P. Level of ascorbic acid and its oxidation in the liver of Scorpion *Palamnaeus bengalensis* / S.P. Shukla // Experientia. - 1969 - Vol. 25, № 6. - P. 602-604.
201. Sies, H. Vitamins E and C, beta-carotene and other carotenoids as antioxidants / H. Sies, W. Stahl // Am. J. Clin. Nutr. - 1995. - Vol. 62. - P. 1315-1321.
202. A specific, accurate, and sensitive measure of total plasma malondialdehyde by HPLC / H.F. Moselhy, R.G. Reid, S. Yousef, S.P. Boyle // Journal of Lipid Research. – 2013. - Vol. 54, № 3. - P. 852-858.
203. Spencer, R.P. In vitro transport of radiolabeled vitamins by the small intestines / R.P. Spencer, T.M. Bow // J. Nucl. Med. - 1964. - Vol. 5 - P. 251-258.
204. Studies on the regulation of glutathione level in rat liver / N. Tateishi, T. Higashi, S. Shinya [et al.] // J. Biochem. – 1974. - Vol. 75, № 1. - P. 93–103.
205. Susceptibility to diabetic nephropathy is related to dicarbonyl and oxidative stress / P.J. Beisswenger, K.S. Drummond, R.G. Nelson [et al.] // Diabetes. - 2005. - Vol. 54, № 11. - P. 3274–3281.
206. Thomas, J.P. Involvement of preexisting lipid hydroperoxides in Cu²⁺-stimulated oxidation of low-density lipoprotein / J.P. Thomas, B. Kalyanaraman, A.W. Girotti // Arch. Biochem. and Biophys. - 1994. - Vol. 315. - P. 244-254.
207. Thornalley, P.J. Endogenous α -oxoaldehydes and formation of protein and nucleotide advanced glycation endproducts in tissue damage / P.J. Thornalley // Novartis Found. Symp. - 2007. - Vol. 285. - P. 229–246.

208. Thornalley, P.J. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose / P.J. Thornalley, A. Langborg, H.S. Minhas // *Biochem. J.* – 1999. - Vol. 344. - Pt 1. - P. 109–116.
209. Thornalley, P.J. Modification of the glyoxalase system in human red blood cells by glucose in vitro / P.J. Thornalley // *Biochem. J.* – 1988. - Vol. 254, № 3. - P. 751–755.
210. Thornalley, P.J. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems - role in ageing and disease / P.J. Thornalley // *Drug Metabol. Drug Interact.* – 2008. - Vol. 23, № 1-2. - P. 125–150.
211. Townsend, D.M. The importance of glutathione in human disease / D.M. Townsend, K.D. Tew, H. Tapiero // *Biomedicine & Pharmacotherapy.* – 2003. – Vol. 57, № 3-4. – P. 145–155.
212. Trevisan, R. Genetic factors in development. Of diabetic nephropathy / R. Trevisan, G. Veberti // *J. Lab. Clin. Med.* – 1995. – Vol. 126. – P. 342-349.
213. Trujillo, M. Peroxynitrite reaction with the reduced and the oxidized forms of lipid acid: new insight into the reaction of peroxynitrite with thiols / M. Trujillo, R. Radi // *Arch. Biochem. Biophys.* - 2002. - Vol. 397. - P. 91-98.
214. Turk, Z. Glycotoxines, Carbonyl Stress and Relevance to Diabetes and Its Complications. Review / Z. Turk // *Physiol. Res.* - 2010. - Vol. 59, № 2. - P. 147-156.
215. Uddin, S. Antioxidants protection against cancer and other human diseases / S. Uddin, S. Ahmad // *Comprehensive Therapy.* - 1995. -Vol. 21, № 1. - P. 41-45.
216. URPDS Group. Association of glycemia with microvascular complications of type 2 diabetes (URDS 35): prospective observational study / I.M. Stratton [et al.] // *Br. Med. J.* – 2000. – Vol. 321. – P. 405-412.

217. Use of Methyl Malondialdehyde as an Internal Standard for Malondialdehyde Detection: Validation by Isotope-Dilution Gas Chromatography–Mass Spectrometry / G. Cighetti, P. Allevi, L. Anastasia [et al.] // *Clin. Chem.* – 2002. - Vol. 48, № 12. - P. 2266-2269.
218. Vander Jagt, D.L. Methylglyoxal, diabetes mellitus and diabetic complications (review) / D.L. Vander Jagt // *Drug Metabolism and Drug Interactions.* – 2008. - Vol. 23, № 1-2. - P. 93-124.
219. Vitamin E ingestion does not improve arterial endothelial dysfunction in older adults / D. Simons, M. von Konigsmark, J. Simons [et al.] // *Atherosclerosis.* - 1999. - Vol. 143, № 1. – P. 193 – 199.
220. Wang, Y. Flavour chemistry of methylglyoxal and glyoxal (tutorial review) / Y. Wang, C.T. Ho // *Chem. Soc. Rev.* – 2012. - Vol. 41, № 11. - P. 4140–4149.
221. Weber, C. Increased adhesiveness of isolated monocytes to endothelium is prevented by vitamin C intake in smokers / C. Weber // *Circulation.* - 1996. - Vol. 93. - P. 1488-1492.
222. Wendel, A. The level and half-life of glutathione in human plasma / A. Wendel, P. Cikryt // *FEBS Lett.* – 1980. - Vol. 120, № 2. - P. 209–211.
223. Wise, J. Small rise in vitamin C intake could greatly reduce heart disease / J. Wise // *Br. Med. J.* - 2001. - Vol. 322. - P. 576.
224. Yin, H. New techniques to detect oxidative stress markers: mass spectrometry-based methods to detect isoprostanes as the gold standard for oxidative stress in vivo / H. Yin // *Biofactors.* – 2008. - Vol. 34, № 2. - P. 109-124.