

УДК 615.273+616.379-008.64+616-092.6

К.В. Розова, О.О. Гончар, Ю.В. Путій, І.М. Маньковська

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, м. Київ

ВПЛИВ α -ЛІПОЄВОЇ КИСЛОТИ НА ПРО- ТА АНТИОКСИДАНТНИЙ БАЛАНС І АКТИВНІСТЬ ТРОМБОЦИТІВ У ПАЦІЄНТІВ З ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2-ГО ТИПУ

Проведено обстеження 20 осіб обох статей віком 50–70 років, хворих на цукровий діабет 2-го типу, до та після двотижневого лікування препаратом Діаліпон Турбо (діюча речовина – меглюлеїнова сіль α -ліпоєвої кислоти). Застосування препарату сприяло зменшенню проявів оксидативного стресу в плазмі крові пацієнтів, а також відмічалось підвищення активності тромбоцитів, зростання кількості серотоніну в δ -гранулах, зниження здатності до тромбоутворення, збільшення енергетичної потужності мітохондріального апарату тромбоцитів.

Ключові слова: цукровий діабет 2-го типу, α -ліпоєва кислота, про- та антиоксидантний баланс, тромбоцити.

Цукровий діабет (ЦД) відноситься до захворювань, що супроводжуються хронічною гіперглікемією і, як наслідок, зростанням швидкості аутоокиснення глюкози з подальшим ростом продукції вільних радикалів, порушенням про- та антиоксидантного балансу. Гіперглікемія та інсулінорезистентність сприяють формуванню окисного стресу, який призводить до появи й розвитку ускладнень ЦД, таких як нейропатія, нефропатія, ретинопатія, ангіопатія [1, 2].

Окрім вказаних патогенетичних ознак, на клітинному і тканинному рівнях ЦД характеризується формуванням мітохондріальної й ендотеліальної дисфункцій, котрі, як правило, є підґрунтям для патологічних змін у функціонуванні органів і систем у пацієнтів з діабетом [3].

Для вивчення мітохондріальної дисфункції та морфофункціонального стану інших клітинних органел у здорових людей і пацієнтів з різною патологією практично єдиними об'єктами (за відсутності оперативного втручання) є клітини крові, зокрема тромбоцити. Вони являють собою високоспеціалізовані без'ядерні клітини, на думку деяких дослідників – клітинні фрагменти, що утворюються з клітин-попередників – мегакаріоцитів [4]), котрі приймають участь у багатьох процесах, окрім пов'язаних з гемостазом, що відбуваються в організмі: в регенерації тканин, роз-

витку запальних і імунних реакцій, забезпеченні первинного гомеостазу [5]. Окрім значної кількості різноманітних гранул, що включають глікопротеїни, білки, фактори росту, АДФ, АТФ, іони кальцію, серотонін, гістамін тощо, тромбоцити містять певну кількість мітохондрій, які достаються їм у спадок від мегакаріоцитів, що дозволяє досліджувати структуру та функції даних органел при розвитку патологічних станів різного генезу [6, 7].

На сьогодні зв'язок між ЦД і окисним стресом та мітохондріальною дисфункцією залишається до кінця не з'ясованим, що ускладнює пошук ефективних терапевтичних заходів для корекції цих патологічних станів у пацієнтів. Зазначене зумовлює значний науковий і практичний інтерес до цієї проблеми.

Метою дослідження було вивчення стану про- та антиоксидантної системи крові і ультраструктури тромбоцитів у пацієнтів з ЦД і коригуючих можливостей α -ліпоєвої кислоти.

Матеріал і методи. Обстежено 20 осіб обох статей віком 50–70 років, хворих на ЦД 2-го типу. Перше обстеження виконували до початку двотижневого лікування препаратом Діаліпон Турбо (діюча речовина – меглюлеїнова сіль α -ліпоєвої кислоти), друге – через одну добу після останнього застосування препарату. Контрольна група обстежених, рандомізована за віком і статтю, складалася з 10 осіб.

Стан про- та антиоксидантної системи досліджували в плазмі крові пацієнтів за загальноприйнятими методами. Вміст ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) у плазмі крові визначали згідно з [8], активність каталази – згідно з [9], Cu, Zn-супероксиддисмутази – згідно з [10], глутатіонпероксидази – згідно з [11].

Дослідження ультраструктури тромбоцитів проводили в тромбоцитарній масі, отриманій з крові обстежених осіб, шляхом центрифугування цільної крові при кімнатній температурі протягом 10 хв при 1000 g на центрифугу лабораторній Т-30 (Україна). Відділену плазму центрифугували при 5000 g протягом 15 хв за допомогою міні-центрифуги Vortecs Combispin FVL-2400N (Латвія).

Приготування зразків для електронно-мікроскопічного дослідження виконували згідно із загальноприйнятою методикою [12] і аналізували за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-124С (Україна). Морфометричні підрахунки виконували за допомогою комп'ютерної програми Image Tool Version 3 (США) у відповідності до підходів Вейбеля.

Отримані результати оброблялися статистично з використанням t-критерію Стьюдента. Різницю між середніми величинами вважали статистично значущою при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Згідно результатів наших досліджень у хворих на ЦД 2-го типу спостерігалось зростання вмісту ТБК-АП у плазмі крові на 82 % ($p < 0,05$) у порівнянні з групою контролю (рис. 1), що

свідчить про активацію процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Це впливає на розвиток патологій, що супроводжують захворювання. Так, відомо, що малоновий діальдегід інгібує простагліциклін, що сприяє агрегації тромбоцитів і тромбоутворенню, а також взаємодіє з апобілкою ліпопротеїнів низької щільності, викликаючи хімічну модифікацію останнього. Інтенсифікація ПОЛ викликає пошкодження еритроцитів і ендотелію судин та, як наслідок, формування діабетичних ангиопатій [1,13].

Ступінь деструктивно-метаболических порушень клітин за цих умов залежить від стану ферментативних антиоксидантних систем, які зазвичай регулюють рівень кисневих вільних радикалів. Ряд досліджень показали, що інтенсифікація процесів ПОЛ у хворих на ЦД супроводжувалася зниженням активності головних ферментів антиоксидантного захисту – СОД, каталази та глутатіонпероксидази [1, 14].

Після застосування препарату Діаліпон Турбо в крові пацієнтів спостерігалось зниження вмісту ТБК-АП на 26 % ($p < 0,05$) і зростання активності СОД на 32 % ($p < 0,05$), каталази на 8 % та ГП на 57 % ($p < 0,05$) у порівнянні з відповідними показниками до лікування.

Відомо, що α -ліпоева кислота є потужним природним ліпофільним антиоксидантом. Її здатність служити в якості «пастки» вільних радикалів підтверджена у дослідях на тваринах і в клінічних дослідженнях [15]. Окрім того, вона сприяє нормалізації функції

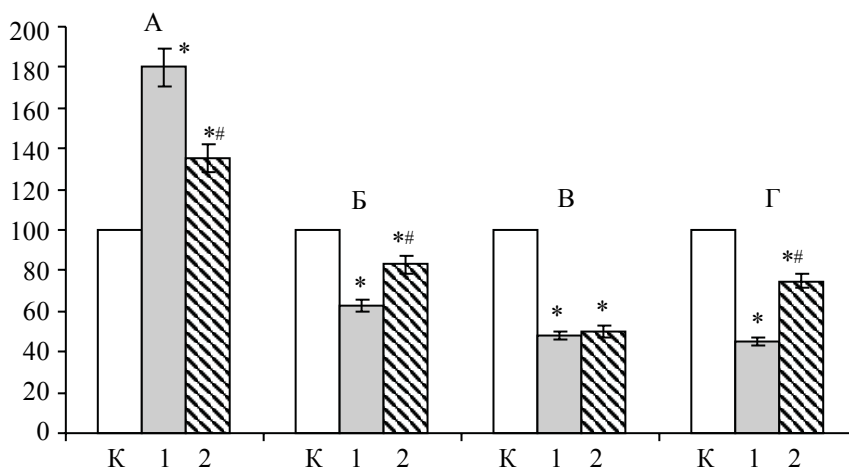
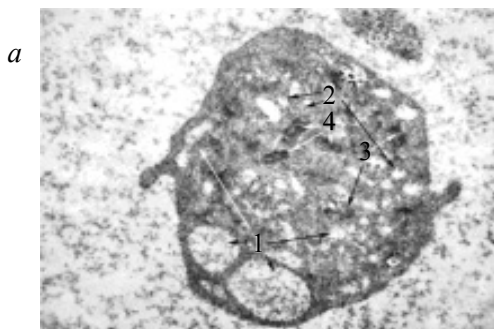


Рис. 1. Вміст ТБК-активних продуктів (А) і активність антиоксидантних ферментів: Cu,Zn-супероксиддисмутази (Б), каталази (В), глутатіонпероксидази (Г) в плазмі крові здорових людей (К) та хворих на цукровий діабет 2-го типу до (1) та після лікування (2) препаратом Діаліпон Турбо. Показники здорових людей прийняті за 100 %. $p < 0,05$ * на відміну від контролю; # $p < 0,05$ на відміну від показників до лікування

глутатіонової системи антирадикального захисту, виступаючи як донор SH-груп і замінюючи відновлений глутатіон в реакціях, що відбуваються за участю глутатіонпероксидази [16].

Тромбоцити пацієнтів з ЦД характеризуються зміщенням α - та δ -гранул, а також мітохондрій мікротрубочок, котрі складають цитоскелет, на периферію клітини (рис. 2, а), що розглядають як показник низької активності тромбоцитів. Кількість оптично щільних δ -гранул є незначною –



Що стосується мітохондрій, то в тромбоцитах спостерігаються одиничні органели, часто частково вакуолізовані або септовані (рис. 2, а, таблиця), що поряд з малою кількістю δ -гранул вказує на знижений енергетичний метаболізм.

Тромбоцити мають добре розвинений внутрішній скелет, про що свідчить наявність значної кількості (5–10 Од/кл) оптично прозорих трубочок (так званих каналців, які представляють щільну тубулярну систему (рис. 2, а). Остання є місцем синтезу цикло-

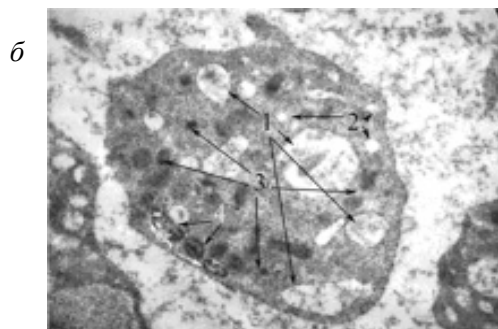


Рис. 2. Ультраструктура тромбоцитів у пацієнтів з цукровим діабетом до (а) та після лікування (б): 1 – α -гранули, 2 – мікротрубочки, 3 – δ -гранули, 4 – мітохондрії, 5 – аутофагосоми, $\times 12000$

2–5 Од/кл (рис. 2, а, таблиця). Вважають, що такі гранули містять серотонін, АДФ та АТФ, а також акумулюють Ca^{2+} . Причому кількість щільних гранул залежить саме від кількості серотоніну, котрий справляє безпосередній вплив на м'язові клітини в стінках великих судин, що є особливо важливим при ЦД у зв'язку з розповсюдженістю при цій патології судинних ускладнень [17].

Натомість, кількість великих δ -гранул, які містять білки й глікопротеїни, котрі приймають участь у процесах згортання крові, фактори росту, літичні ферменти в тромбоцитах пацієнтів, є значною: 10–17 Од/кл (таблиця). Можна припустити, що значна кількість таких гранул вказує на можливість тромбоутворення у пацієнтів з ЦД.

оксигенази та простагландинів, окрім цього трубочки селективно зв'язують двовалентні катіони і є резервуарами Ca^{2+} . Ймовірно, значна кількість мікротрубочок до певної міри компенсує незначну кількість δ -гранул у плані накопичення кальцію.

Застосування діаліпону у пацієнтів з ЦД призводило до активації тромбоцитів – спостерігався зсув гранул до центра клітини (рис. 2, б). Більшість тромбоцитів (>60 %) можна було віднести до молодих форм з площею >42 мкм (до лікування таких тромбоцитів було близько 38 %, таблиця).

Кількість α -гранул зменшувалася (таблиця), що, ймовірно, вказує на зниження здатності до тромбоутворення. Натомість вміст δ -гранул достовірно зростав. Якщо

Ультраструктури тромбоцитів у пацієнтів з цукровим діабетом

Показник	Групи пацієнтів	
	до лікування	після лікування
Середня площа тромбоцитів, мкм ²	33,6 \pm 2,0	53,7 \pm 3,6*
Кількість δ -гранул, Од/кл	3,8 \pm 0,1	5,3 \pm 0,4*
Кількість α -гранул, Од/кл	15,2 \pm 2,1	8,7 \pm 1,4*
Кількість мітохондрій, Од/кл	3,1 \pm 0,8	6,6 \pm 1,2*
Середній діаметр мітохондрій, мкм	0,41 \pm 0,04	0,54 \pm 0,05*
Середня площа мітохондрій, 10 ⁻² мкм ²	32,5 \pm 2,8	44,2 \pm 3,1*

Примітка: * $p < 0,05$.

вважати цей показник безпосередньо пов'язаним з кількістю серотоніну, можливо, виявлений факт відображає збільшення його вмісту, а відтак, і зміни скоротливості судинної стінки [18].

Висновок про підвищення активності тромбоцитів, вірогідно, може бути поширений і на деякі інші клітини крові, оскільки тромбоцити, являючись «уламками» мегакаріоцитів, можуть давати уявлення про зміни, що мають місце в клітинах кісткового мозку.

В тромбоцитах збільшувалася кількість мітохондрій, зростав їх середній діаметр. Органели мали електронно-щільний матрикс, були добре структурованими, що свідчить про можливість мітохондрій ефективно виконувати синтез макроергів (рис. 2, б, таблиця). Зростала також середня площа мітохондрій – такі зміни слід розглядати як набування малої амплітуди (не більше 30–40 %), котре супроводжується збільшенням енергетичної потужності мітохондріального апарату клітин. Такі зміни мітохондрій за умов збереження цілісності мітохондріальних мембран супроводжуються зростанням як концентрації АТФ, так і її синтезу [19].

В тромбоцитах виявляли помірну активацію аутофагії з лізисом мітохондрій (рис. 2, б). В ситуації розвитку у пацієнтів з ЦД цей процес можна розглядати як позитивний, спрямований на позбавлення клі-

тин від структурно або функціонально пошкоджених органел [20]. Окрім того, вважають, що завдяки аутофагії клітина може поповнювати нестачу пластичних речовин і енергії та повернутися до нормальної життєдіяльності.

Висновки

При обстеженні хворих на цукровий діабет 2-го типу в крові пацієнтів було виявлено маркери оксидативного стресу та порушення антиоксидантного балансу. Дослідження ультраструктури тромбоцитів за такої патології виявило структурні передумови розвитку судинних ускладнень, можливість посиленого тромбоутворення та зниження енергетичного метаболізму.

Застосування препарату Діаліпон Турбо (α -ліпоєва кислота) показало його позитивний вплив, котрий виражався у зменшенні в крові вторинних продуктів ПОЛ, зростанні активності антиоксидантних ферментів – Cu, Zn-супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази. Відбувалося підвищення активності тромбоцитів, ознаками якої можна вважати переважання в тромбоцитарній масі молодих форм тромбоцитів; зростання кількості серотоніну в δ -гранулах, що може вказувати на зміни скоротливості судинної стінки; зниження здатності до тромбоутворення; збільшення енергетичної потужності мітохондріального апарату тромбоцитів.

Література

1. Балаболкин М.И. Диабетическая невропатия / М.И. Балаболкин, В.М. Кремнинская // Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова. – 2000. – Т. 100, № 4. – С. 57–64.
2. Baynes J.W. Oxidative stress in diabetes / J.W. Baynes, S.R. Thorpe // Antioxidants in diabetes management. Ed. L. Packer, N.Y. M Dekker Inc. – 2000. – P. 77–92.
3. Шевчук В.В. Зміни функціонального стану ендотелію, гемокоагуляційної ланки гомеостазу та морфофункціональних властивостей еритроцитів у хворих на неалкогольний стеатогепатит із метаболічним синдромом / В.В. Шевчук, О.І. Федів // Буковинський медичний вісник. – 2012. – Т. 16, № 4 (64). – С. 175–180.
4. Данилов И.П. Тромбоциты: новый взгляд на их роль в организме / И.П. Данилов // Мед. новости. – 2008. – № 9. – С. 17–19.
5. Колосова Е.Н. Оценка морфофункционального состояния тромбоцитов у больных идиопатической тромбоцитопенической пурпурой методом витальной компьютерной морфометрии / Е.Н. Колосова, И.А. Василенко, Л.Г. Ковалева // Бюллетень СО РАМН. – 2011. – Т. 31, № 2. – С. 58–63.
6. Вашкинель В.К. Ультраструктура и функция тромбоцитов человека / В.К. Вашкинель, М.Н. Петров. – Л.: Наука, 1982. – 88 с.
7. Watso S.P. Platelets / S.P. Watso, K.S. Authi. – Oxford, 1996. – 370 p.
8. Стальная И.Д. Современные методы в биохимии / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.
9. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.

10. Misra H. The role of superoxide anion in the autoxidation of Epinephrine and a simple assay superoxide dismutase / H. Misra, I. Fridovich // J. Biol. Chem. – 1972. – Vol. 247, № 10. – P. 3170–3175.
11. Olinescu R. Influence of hemoproteins on glutathione peroxidase activity/ R. Olinescu, S. Nita // Rev. Roum. Biochem. – 1973. – Vol. 10, № 2. – P. 119–129.
12. Карупу В.Я. Электронная микроскопия / В.Я. Карупу. – К.: Вища шк., 1984. – 208 с.
13. Mosaad A. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients/ A. Mosaad, Abou-Seif, Abd-Allah Youssef // Clinica Chimica Acta. – 2004. – Vol. 346. – P. 161–170.
14. Evaluation of plasma superoxide dismutase and glutathione peroxidase in type 2 diabetic patients / P. Hisalkar, A.B. Patne, M.M. Fawade, A.C. Karnik // Biology and Medicine. – 2012. – Vol. 4 (2). – P. 65–72.
15. α -липоевая кислота (эспа-липон) в комплексном лечении диабетической нейропатии / М.И. Балаболкин, Э.Р. Хасанова, А.М. Мкртумян, В.М. Кремская // Клиническая фармакология и терапия. – 1998. – № 2. – С. 78–82.
16. Packer L. Alfa-lipoic acid as a biological antioxidant / L. Packer, E. Witt, H. Tritschler // Free Radic Biol Med. – 1995. – Vol. 19. – P. 227–250.
17. Ультраструктура тромбоцитов и дисфункция NO-системы у больных с ревматоидным артритом / В.Н. Коваленко, А.С. Гавриш, Н.М. Гулая и др. // Укр. мед. часопис. – 2001. – № 3. – С. 129–132.
18. Role of platelet electron microscopy in the diagnosis of platelet disorders / S. Clauser, E. Cramer-Borde // Semin. Thromb. Hemost. – 2009. – № 35 (2). – P. 213–223.
19. Резников К.М. Общие механизмы формирования ответных реакций организма на воздействие факторов окружающей среды / К.М. Резников // Прикладные информационные аспекты медицины: Сб. научн. работ. – Воронеж, 1998. – Т. 1. – С. 4–9.
20. Huang J. Autophagy and human disease / J. Huang, D.J. Klionsky // Cell Cycle. – 2007. – Vol. 1, № 6. – P. 1837–1849.

К.В. Розова, О.А. Гончар, Ю.В. Путий, И.Н. Маньковская

ВЛИЯНИЕ α -ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ НА ПРО- И АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС И АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-го ТИПА

Проведено обследование 20 человек обоих полов в возрасте 50–70 лет, больных сахарным диабетом 2-го типа, до и после двухнедельного лечения препаратом Диалипон Турбо (действующее вещество – меглюлеиновая соль α -липоевой кислоты). Применение препарата способствовало уменьшению проявлений оксидативного стресса в плазме крови пациентов, а также отмечалось повышение активности тромбоцитов, рост количества серотонина в δ -гранулах, снижение способности к тромбообразованию, увеличение энергетической мощности митохондриального аппарата тромбоцитов.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа; α -липоевая кислота; про- и антиоксидантный баланс, тромбоциты.

K.V. Rozova, O.A. Gonchar, Yu.V. Putiy, I.N. Mankovska

EFFECTS OF α -LIPOIC ACID ON PRO- AND ANTIOXIDANT BALANCE AND PLATELETS ACTIVITY IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE II

The study involved 20 people of both sexes aged 50–70 years, patients with diabetes mellitus type II, before and after a 2-week treatment Dialipon Turbo (active ingredient – salt of α -lipoic acid). Use of the drug has helped to reduce the manifestations of oxidative stress in the blood plasma of patients, and there was an increase of platelet activity, growth in the number of serotonin in δ -grains, reduced ability to thrombosis, increase energy capacity platelet mitochondrial apparatus.

Key words: diabetes mellitus type II, α -lipoic acid, pro- and antioxidative balance, platelets.

Поступила 12.05.16