

УДК 616.379-008.64-06:617.586:616.61.

ЧАК Т.А.¹, СОРОКИНА В.Н.¹, ПАВЛЮЩИК Е.А.², АНИСОВИЧ М.В.², ХАПАЛЮК А.В.¹, АФОНИН В.Ю.², БИЛОДИД И.К.¹, ЧЕРЕНКЕВИЧ С.А.³

¹ Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск

² Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск

³ Учреждение здравоохранения «Городской эндокринологический диспансер», г. Минск

ОЦЕНКА МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ДИСТАЛЬНОЙ СЕНСОМОТОРНОЙ НЕЙРОПАТИЕЙ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2-го ТИПА

Резюме. Определение клеточной гибели методом проточной цитометрии широко распространено в современной диагностике, однако недостаточно изучено применительно к сахарному диабету (СД) 2-го типа.

Цель: оценить гибель клеток периферической крови, распределение по клеточному циклу и уровень микроядер методом проточной цитометрии у пациентов с СД 2-го типа при наличии и отсутствии дистальной сенсомоторной нейропатии.

Материалы и методы. Обследовано 176 пациентов с СД 2-го типа и 67 относительно здоровых лиц. В обеих группах были определены гибель лейкоцитов периферической крови, клетки с микроядрами и характер распределения клеток по клеточному циклу методом проточной цитометрии. Пациенты с СД 2-го типа были обследованы с целью диагностики диабетической сенсомоторной периферической полинейропатии (ДПНП). Степень тяжести ДПНП оценивалась с помощью общей шкалы неврологических симптомов (Total Symptoms Score — TSS), шкалы нейропатического дисфункционального счета (Neuropathy Disability Score — NDS) и по данным электромиографии. Показатели клеточной гибели в группе пациентов с СД 2-го типа дополнительно анализировались относительно возраста обследуемых, длительности заболевания и степени компенсации. Для анализа использовался пакет программ Statistica 10.

Результаты. Обнаружена прямая корреляционная связь между процентом клеток с признаками апоптоза и процентом клеток с микроядрами, что позволяет использовать оба показателя в качестве диагностического критерия единых патологических изменений в организме. Статистически достоверные различия по клеточной гибели обнаружены при сравнении групп с длительностью СД до 10 лет и 10 лет и более. Также обнаружена прямая корреляционная связь между процентом клеток с признаками апоптоза и длительности СД.

Выводы. Уровень апоптоза лейкоцитов периферической крови и количество клеток с микроядрами нарастает при увеличении длительности СД 2-го типа независимо от наличия или отсутствия диабетической дистальной полинейропатии, а также компенсации СД, возраста пациента. Определение апоптоза и проведение микроядерного теста лейкоцитов периферической крови могут служить интегральным маркером патологических изменений в организме при СД 2-го типа, но не при диабетической полинейропатии. Распределение клеток периферической крови по клеточному циклу у пациентов с СД 2-го типа существенным образом не зависит от наличия или отсутствия полинейропатии.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, диабетическая нейропатия, апоптоз, микроядра, пролиферация клеток, клеточный цикл.

Адрес для переписки с авторами:

Чак Т.А.

E-mail: tatyachak@mail.ru

© Чак Т.А., Сорокина В.Н., Павлющик Е.А., Анисович М.В., Хапалюк А.В., Афонин В.Ю., Билодид И.К., Черенкевич С.А., 2015

© «Международный эндокринологический журнал», 2015

© Заславский А.Ю., 2015

Практически во всех странах мира регистрируется рост заболеваемости сахарным диабетом (СД), причем СД 2-го типа составляет порядка 80–90 % всех случаев данной патологии [1, 2]. Пристальное внимание к данной проблеме определяется большими экономическими и моральными потерями, которые несет не только сам пациент, но и государство в целом [3]. Признано, что именно СД 2-го типа является лидирующей патологией, которая ведет к увеличению частоты сердечно-сосудистых заболеваний и сосудистых катастроф в разных странах и популяциях [4]. При хронической гипергликемии, наблюдаемой при СД, подвергаются повреждению нейроны и шванновские клетки периферических нервов, эндотелиальные клетки сетчатки глаза и мезангиальные клетки почек, которые не способны самостоятельно регулировать трансмембранный транспорт глюкозы [5]. Ангиопатии и нейропатии у больных с СД следует рассматривать как взаимообусловленные процессы. По мере прогрессирования заболевания поражение сосудов способствует нарастанию тяжести нейропатии, а последняя усугубляет сосудистую патологию [6].

Несмотря на множество инструментальных и лабораторных диагностических методик в данной области, наполненность фармацевтического рынка современными и достаточно эффективными препаратами, проблема лечения СД и его осложнений остается открытой. Соответственно, использование новых методов обследования может позволить продвинуться вперед в лечении СД.

Метод проточной цитометрии позволяет исследовать клеточный цикл, определять уровень апоптоза по гиподиплоидному содержанию ДНК в клетке, количество клеток с микроядрами, одним из путей образования которых также является апоптоз клеток [7]. Измерение содержания ДНК является одним из самых простых и распространенных применений проточной цитометрии. Анализ ДНК-гистограмм позволяет четко различать клетки, находящиеся в G1-, S-, G2/M-фазах клеточного цикла [8]. Увеличение клеток в S-фазе клеточного цикла может свидетельствовать о высокой пролиферативной активности и/или аресте клеток с повреждениями ДНК, что может служить одним из диагностических критериев некоторых патологических состояний.

Исследование апоптоза активно проводится в медицине, особенно применительно к онкологическим заболеваниям, ишемической болезни сердца, процессам старения.

Наличие микроядер в клетках и степень апоптоза также могут быть использованы в качестве своеобразного маркера патологических изменений в организме. Микроядерный тест с успехом используется в клинической практике для выявления и прогнозирования течения ряда заболеваний [9], однако его применение при СД 2-го типа мало изучено.

Существуют также данные эпидемиологических исследований, показывающие, что гипергликемия и инсулинорезистентность (ИР), важнейшие харак-

теристики СД 2-го типа, являются факторами риска развития рака [10, 11]. Другие авторы указывают на отсутствие прямой связи онкологических заболеваний с гипергликемией и ИР [12, 13], предполагая зависимость от косвенных факторов риска СД, таких как ожирение или курение [14].

Учитывая тот факт, что апоптоз клеток является маркером онкологических заболеваний, можно предположить актуальность использования данного показателя для оценки риска возникновения рака при СД 2-го типа.

Таким образом, несмотря на относительно длительное существование метода проточной цитометрии, а также использование его в медицине для определения уровня апоптоза и характера пролиферации клеток при различных заболеваниях, при СД 2-го типа метод изучен недостаточно, что не позволяет на данный момент рекомендовать методику для применения в клинической практике. Некоторые ученые отмечают увеличение растворимого Fas-рецептора, играющего важную роль в активации апоптоза, при наличии у пациента с СД полинейропатии [15]. По данным индийских исследований, отмечена взаимосвязь Fas-опосредованного апоптоза и тяжести нейрональной дегенерации при диабетической полинейропатии [16]. Однако недостатком данного исследования является небольшая выборка контрольной и опытной групп. Fas-опосредованный апоптоз относится к рецепторзависимому сигнальному пути апоптоза и является одним из возможных путей гибели клеток. У позвоночных (в том числе у человека) большинство форм апоптоза реализуется по митохондриальному пути, а не через рецепторы клеточной гибели [17], либо комбинацией описанных путей [18]. Помимо двух вышеперечисленных путей апоптотической гибели клеток, существует еще несколько менее распространенных, например, за счет активации прокаспазы-12, локализованной в эндоплазматическом ретикулуле [19]. Соответственно, оценка степени апоптоза только по уровню Fas-рецептора не отражает полную картину повреждения клеток при какой-либо патологии.

Именно по этой причине нами была предпринята попытка изучить возможности проточной цитометрии для дополнительной диагностики патологических изменений при СД 2-го типа, с помощью которой гибель клеток оценивалась многосторонне и по наличию уже возникшего повреждения.

Цель исследования: оценить гибель клеток периферической крови, распределение по клеточному циклу и уровень микроядер методом проточной цитометрии у пациентов с СД 2-го типа при наличии и отсутствии дистальной сенсомоторной нейропатии.

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе Городского эндокринологического диспансера г. Минска и Республиканского госпиталя МВД Республики Беларусь.

Обследовано 176 пациентов с СД 2-го типа, среди которых 68,75 % (121 человек) составили мужчины и

31,25 % (55 человек) — женщины. Критериями исключения из исследования были сопутствующие заболевания, способные вызывать нейропатию: алкоголизм, СПИД, активные формы гепатита, гипо- и гипертиреоидные состояния, онкологические заболевания в момент исследования или в анамнезе; нарушения психики; возраст старше 65 лет; а также наличие диабетической периферической полинейропатии (ДПНП) третьей степени с ампутациями и/или трофическими изменениями нижних конечностей.

Контрольную группу составили 67 обследуемых: 83,58 % (56 человек) — мужчины, 16,42 % (11 человек) — женщины, которые не имели хронических заболеваний.

Обследование пациентов опытной группы включало опрос с уточнением анкетных данных, длительности СД и особенностей его течения, наследственности, наличия жалоб. Для количественной оценки жалоб использовалась общая шкала неврологических симптомов (Total Symptoms Score — TSS), которая включает исследование четырех нейропатических симптомов: онемения, жжения, парестезии, боли в конечностях. Проводилась диагностика ДПНП. Для этого применялась шкала нейропатического дисфункционального счета (Neuropathy Disability Score — NDS), используемая для оценки коленного и ахиллова рефлексов, порога вибрационной, температурной, болевой и тактильной чувствительности, а также уровня поражения. Для определения обширности поражения периферических нервов и для разграничения двух основных патоморфологических изменений (аксональной дегенерации и демиелинизации) у 133 пациентов опытной группы была проведена стимуляционная электромиография (ЭМГ) с помощью 2-канального электронейромиографа «Нейро-ЭМГ-Микро» фирмы «Нейрософт» (Россия). Оценивались амплитуда М-ответа и скорость распространения возбуждения (СРВ) по *n. peroneus*, амплитуда потенциала действия и СРВ по *n. suralis* и *n. peroneus superficialis*. На основании результатов обследования выставлялся диагноз ДПНП, а также определялась степень тяжести нейропатии с использованием классификации по Р. Дуск [20], согласно которой ДПНП имеет следующие степени тяжести: стадия 0 — нет объективных данных ДПНП; стадия 1 — бессимптомная ДПНП (1a — нет симптомов и признаков ДПНП, но есть нарушения неврологических тестов; 1b — нет симптомов и признаков ДПНП, но есть нарушения неврологических тестов, а также нарушения, выявленные при неврологическом осмотре); стадия 2 — симптоматическая нейропатия (2a — есть симптомы и признаки ДПНП, а также положительные результаты неврологических тестов; 2b — признаки стадии 2a + слабость тыльных сгибателей стопы); стадия 3 — стадия осложнений полинейропатии (высокий риск образования язвенных дефектов, нейроостеоартропатия, нетравматические ампутации, нарушения трудоспособности).

У пациентов опытной и контрольной групп проводился однократный забор венозной крови. В лаборатории фармакогенетики Института биоорганической

химии НАН Беларуси определяли молекулярно-биологические показатели: апоптоз лейкоцитов, митохондрия, распределение клеток по фазам клеточного цикла. В лаборатории Городского эндокринологического диспансера и Республиканского госпиталя МВД РБ проводили биохимический анализ крови (гликемия, гликированный гемоглобин (HbA1c), билирубин, аланин- и аспаратаминотрансфераза, креатинин, мочевины, холестерин, липопротеиды низкой плотности (ЛПНП), триглицериды). У обследуемых обеих групп проводились антропометрические измерения: рост, масса тела, окружность талии.

Так как СД 2-го типа является хроническим заболеванием, склонным к прогрессированию, для более полного и адекватного анализа опытная группа была разделена на подгруппы А и Б. Подгруппа А включала пациентов с длительностью СД 2-го типа до 10 лет, а подгруппа Б — с длительностью заболевания 10 лет и более.

Учитывая различные нормы показаний ЭМГ, описанные в литературе, а также особенности используемых приборов и методик проведения обследования, для установления диапазона нормальных значений электромиографических показателей данного исследования была набрана отдельная контрольная группа из 35 человек: 68,6 % (24 человека) составили женщины, 31,4 % (11 человек) — мужчины. Средний возраст группы — $43,50 \pm 9,88$ года. Обследуемые данной группы не имели неврологических жалоб и диагноза нейропатии любого генеза. Критерием исключения также служили облитерирующий атеросклероз, варикозная болезнь нижних конечностей, радикулопатия, алкоголизм и другие заболевания, способные приводить к изменениям сенсорных и моторных волокон нервов нижних конечностей.

Пациенты опытной группы (133 человека), обследованные методом ЭМГ, были разделены на подгруппы N (норма) и P (патология) в зависимости от полученных показателей ЭМГ по *n. peroneus*, *n. suralis*, *n. peroneus superficialis*. В случае нормального распределения показателей ЭМГ за нижнюю границу нормы принималось значение $M - 1\sigma$, при распределении признака, отличном от нормального, нижней границей нормы считался 25% квартиль. Опираясь на полученные данные, в группу N были включены пациенты с СД 2-го типа с электромиографическими показателями, соответствующими полученной норме, а в группу P — пациенты с СД, имеющие снижение амплитуд потенциала действия и/или скоростей распространения возбуждения по нервным волокнам относительно контрольной группы.

Обработка полученных данных проводилась на персональной ЭВМ с использованием статистических пакетов Excel, Statistica 10.0. Гипотезу о нормальности распределения признаков, характеризующихся количественными значениями, считали подтвержденной, если в интервал $M \pm 2\sigma$ попадало не менее 95 % всех значений признаков. При нормальном распределении признака использовали методы параметрической ста-

тистики. Оценку достоверности разности сравниваемых величин проводили на основании величины критерия Стьюдента (t). Результаты представляли в виде средней \pm ошибка среднего ($M \pm m$). Если гипотезу о нормальности распределения признака в совокупности отвергали, для обработки данных использовали методы непараметрической статистики Манна — Уитни (U). Данные представляли в виде медианы и квартильного размаха — Me (25–75 %). Для определения связи между явлениями использовали коэффициенты корреляции Спирмена (ρ). Результаты исследования считали достоверными, различия между показателями значимыми при вероятности безошибочного прогноза не менее 95 % ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение

В работе представлены изменения уровня апоптоза лейкоцитов венозной крови у пациентов с СД 2-го типа при наличии или отсутствии дистальной полинейропатии, а также в зависимости от возраста пациентов и компенсации СД. Сопоставлены показатели микроядерного теста лейкоцитов венозной крови с наличием или отсутствием диабетической полинейропатии. Проанализирован характер распределения клеток периферической крови по клеточному циклу у пациентов с СД 2-го типа при наличии или отсутствии полинейропатии.

Клиническая и лабораторная характеристика контрольной и опытной групп представлена в табл. 1.

Как видно из табл. 1, опытная группа имела больший индекс массы тела (ИМТ), что свидетельствует о частом наличии ожирения у пациентов с СД 2-го типа. Средняя длительность СД в опытной группе составила $7,50 \pm 0,41$ года. При обследовании пациентов с СД 2-го типа на наличие ДПНП были получены следующие данные: суммарный балл шкалы NDS составил 6,0 (3,0–10,0), а шкалы TSS — 1,0 (0,0–4,3). Для объективизации признаков поражения периферических нервов при ДПНП была проведена стимуляционная ЭМГ. Значения показателей контрольной группы

были приняты за норму в нашем исследовании. В случае нормального распределения значений для каждого показателя ЭМГ был рассчитан интервал $M \pm \sigma$. За нижнюю границу нормы было принято значение $M - 1\sigma$. В случае отличного от нормального распределения значений рассчитывался интервал Me (25–75 %). В данном случае за нижнюю границу нормы принималось значение 25% квартиля.

Данные, полученные при электромиографическом обследовании в группах N и P, а также нижняя граница нормы показателей ЭМГ представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, показатели ЭМГ пациентов группы P по всем исследуемым нервам были значительно ниже, чем в группе N.

В указанных группах проводился анализ молекулярно-биологических показателей лейкоцитов венозной крови. При анализе гибели лейкоцитов по уровню апоптоза и количеству клеток с микроядрами между данными показателями обнаружена прямая корреляционная связь умеренной степени ($r = 0,54$ при $p < 0,001$). Учитывая тот факт, что одним из путей образования микроядер является именно апоптоз [7], количественная оценка микроядер может служить его косвенной характеристикой. Таким образом, степень апоптоза и количество клеток с микроядрами — два взаимосвязанных маркера патологических изменений в организме. При корреляционном анализе была выявлена прямая связь апоптоза, клеток, находящихся в S-фазе, и длительности СД 2-го типа ($r = 0,15$ при $p < 0,05$, слабая корреляция). При проведении корреляционного анализа данных апоптоза с показателями ЭМГ статистически достоверная прямая слабая корреляционная связь была отмечена лишь по некоторым позициям и не носила системный характер, соответственно, не может считаться клинически значимой.

Для более детального изучения взаимосвязи клеточной гибели и СД обследуемые пациенты были разделены на две группы в зависимости от длительности СД: группа А — до 10 лет, группа Б — 10 лет и более. В

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика контрольной и опытной групп

Показатели		Опытная группа	Контрольная группа
Возраст, годы	Me (25–75 %)	55 (49–60)	43 (41–45)
Индекс массы тела, кг/м ²	$M \pm m$	$31,60 \pm 0,40^{\#}$	$27,3 \pm 0,5^{\#}$
Гликемия, ммоль/л	Me (25–75 %)	7,6 (6,4–9,7)	5,3 (4,8–5,6)
HbA1c, %	$M \pm m$	$7,70 \pm 0,16$	$13,40 \pm 0,71^*$
Билирубин, ммоль/л		$12,30 \pm 0,40^*$	
Мочевина, ммоль/л		$5,50 \pm 0,12$	
Креатинин, ммоль/л	Me (25–75 %)	87,0 (76,0–98,0)	80,5 (77,0–86,5)
Холестерин, ммоль/л		5,7 (4,8–6,4)	5,8 (5,1–6,4)
ЛПНП, ммоль/л		3,1 (2,6–3,7)	3,2 (2,8–4,1)
Триглицериды, ммоль/л		2,0 (1,3–2,9)	1,6 (1,2–2,7)

Примечания: * — $p < 0,05$ при сравнении опытной и контрольной групп; # — $p < 0,001$ при сравнении опытной и контрольной групп.

Таблица 2. Характеристика показателей ЭМГ в контрольной группе и группах N и P

Показатель		Нижняя граница нормы	Группа N		Группа P		
			1 – справа	2 – слева	3 – справа	4 – слева	
Амплитуда М-ответа <i>n. peroneus</i> (мВ) (Ме (25–75 %))	Точки стимуляции <i>n. peroneus</i>	1	3,4	4,6 (3,3–5,3)*	5,3 (3,8–5,4)**	3,0 (1,4–5,2)	4,8 (1,9–5,4)
		2	3,3	5,3 (3,6–5,4)*	5,3 (3,3–5,4)**	3,4 (2,5–5,3)	2,9 (1,3–5,3)
		3	3,5	5,3 (3,6–5,4)*	5,3 (3,3–5,4)**	3,8 (2,8–5,3)	5,3 (1,9–5,3)
СРВ по <i>n. peroneus</i> (м/с) (M ± m)		1–2	47,2	53,40 ± 1,33*	50,00 ± 0,89**	48,60 ± 0,71	46,00 ± 0,79
		2–3	46,8	50,30 ± 1,62	50,80 ± 1,51	48,50 ± 0,80	47,6 ± 1,1
		1–3	47,9	52,30 ± 1,12*	49,50 ± 0,79**	48,3 ± 0,63	46,50 ± 0,64
Амплитуда ПД <i>n. suralis</i> (мкВ) (Ме (25–75 %))		8,1	11,6 (10,5–15,4)*	12,8 (11,2–22,4)**	6,4 (3,7–8,6)	7,2 (4,7–9,5)	
СРВ по <i>n. suralis</i> (м/с) (Ме (25–75 %))		52,4	59,4 (53,8–61,5)*	53,8 (52,9–61,5)**	52,5 (42,9–57,7)	52,8 (44,7–57,7)	
Амплитуда ПД по <i>n. peroneus superficialis</i> (мкВ) (Ме (25–75 %))		11,2	14,2 (9,6–16,9)*	14,2 (11,7–19,5)**	5,7 (2,6–8,5)	6,1 (2,8–8,7)	
СРВ по <i>n. peroneus superficialis</i> (м/с) (Ме (25–75 %))		55,0	60,0 (55,3–61,5)*	56,0 (51,4–60,4)	50,0 (43,8–57,1)	52,6 (42,5–60,7)	

Примечания: * – $p_{1-3} < 0,05$ при сравнении групп N и P; ** – $p_{2-4} < 0,05$ при сравнении групп N и P; ПД – потенциал действия; 1 – предплюсна; 2 – голень малоберцовой кости; 3 – подколенная ямка; 1–2 – интервал предплюсна – голень малоберцовой кости; 2–3 – голень малоберцовой кости – подколенная ямка; 1–3 – предплюсна – подколенная ямка.

данных группах проводился сравнительный анализ по нескольким позициям. При сравнении степени групп А и Б получены достоверные различия по уровню апоптоза, который в группе А составил 2,8 (1,9–4,7) %, а в группе Б – 3,7 (2,1–6,0) % ($p = 0,03$). Статистически достоверных различий при сравнении групп по количеству микроядер не обнаружено ($p > 0,05$), однако имеется тенденция к небольшому нарастанию количества клеток с микроядрами в группе Б, что показано на рис. 1.

Учитывая приведенные выше данные, можно предположить, что степень апоптоза нарастает с увеличением длительности СД.

При проведении сравнительного анализа данных групп по клиническим и лабораторным показателям было обнаружено несколько статистически достоверных различий, представленных в табл. 3.

Как видно из табл. 3, группы А и Б статистически различимы по возрасту и уровню гликированного гемоглобина ($p < 0,001$ и $p < 0,01$ соответственно). В группе Б возраст пациентов был больше, однако в данном случае статистическое различие в возрасте можно считать клинически не существенным, так как пациенты обеих групп относятся к одной возрастной категории. При проведении корреляционного анализа связь возраста и степени апоптоза отсутствует ($p > 0,05$). Также группа Б характеризовалась увеличением суммарных баллов шкал NDS и TSS, что лишь подтверждает данные о прогрессировании ДПНП с увеличением длительности СД.

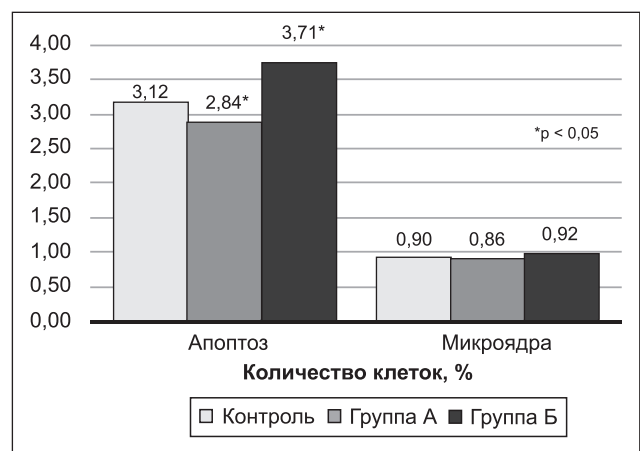


Рисунок 1. Сравнительный анализ уровня апоптоза лейкоцитов и количества клеток с микроядрами в группах А и Б: * – $p < 0,05$

Статистическую достоверность различия групп по HbA1c можно считать клинически важной, так как большинство пациентов группы Б находились в состоянии декомпенсации (HbA1c = 7,7 (6,8–9,6) %), а большинство пациентов группы А укладывались в рамки состояния компенсации и субкомпенсации, где HbA1c = 7,5 % считается пограничным, при превышении которого значительно возрастает количество осложнений. Однако при проведении корреляционного анализа статистически достоверная связь апоптоза и уровня гликемии отсутствовала.

Таблица 3. Клинико-лабораторная характеристика подгрупп А и Б

Показатели		Группа А	Группа Б
Возраст, годы	M ± m	52,50 ± 0,63 [#]	57,70 ± 0,77 [#]
Длительность СД, годы	Me (25–75 %)	5 (3–7) [#]	13 (11–17) [#]
ИМТ, кг/м ²	M ± m	31,20 ± 0,44	32,40 ± 0,80
TSS	Me (25–75 %)	0,0 (0,0–3,7) [#]	3,0 (1,0–5,7) [#]
NDS		4,5 (3,0–8,0) [#]	8,5 (6,0–11,5) [#]
Гликемия, ммоль/л		7,5 (6,2–9,4)	7,7 (6,6–12,0)
HbA1c, %		7,1 (6,4–8,2) [*]	7,7 (6,8–9,6) [*]
Билирубин, мкмоль/л		12,0 (9,0–14,3)	10,6 (8,1–13,6)
Мочевина, ммоль/л		5,30 ± 0,14	5,80 ± 0,23
Креатинин, мкмоль/л	88,20 ± 2,07	89,00 ± 2,72	
Триглицериды, ммоль/л	2,0 (1,3–3,1)	1,9 (1,3–2,8)	
Холестерин, ммоль/л	M ± m	5,70 ± 0,12	5,60 ± 0,18
ЛПНП, ммоль/л		3,16 ± 0,13	3,10 ± 0,17

Примечания: * – $p < 0,05$ при сравнении групп А и Б; [#] – $p < 0,001$ при сравнении групп А и Б.

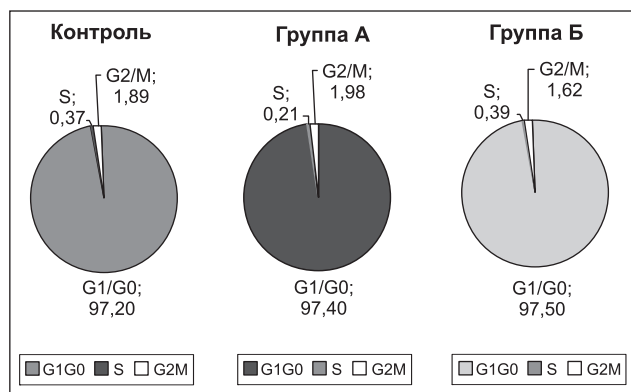


Рисунок 2. Распределение лейкоцитов по фазам клеточного цикла

Как правило, в клеточной популяции с высокой пролиферативной активностью число клеток в S-фазе увеличивается [9]. Количество клеток в данной фазе клеточного цикла может также накапливаться с увеличением повреждений ДНК и при дифференцировке в органах кроветворения. В отсутствие полной репарации повреждений генетического материала происходит гибель клеток в очаге кроветворения, периферической крови или органах окончательной дифференцировки и депонирования. С учетом обнаруженной прямой корреляционной связи между клетками S-фазы и длительностью СД при прогрессировании СД отмечаются изменения по распределению клеток по циклу. Максимальное количество клеток, находящихся в S-фазе, было в группе Б (0,39 %), что практически не отличалось от контрольной группы, где клетки S-фазы составили 0,37 %. Несколько меньшее количество клеток было в группе А – 0,21 %, однако различие не носило статистической достоверности. Как видно на рис. 2, распределение лейкоцитов по фазам клеточного цикла в группах А и Б, а также контрольной груп-

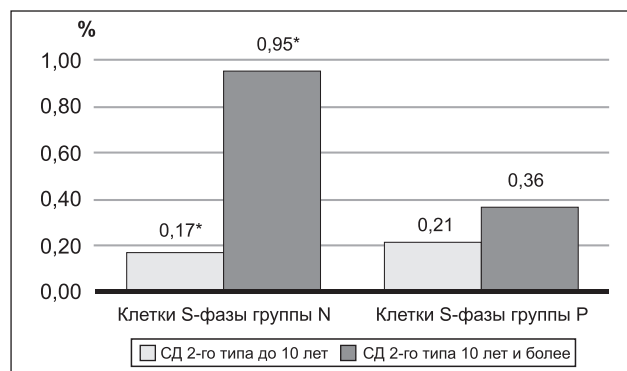


Рисунок 3. Распределение клеток S-фазы в группах N и P в зависимости от длительности СД 2-го типа: * – $p < 0,05$

пе не имеет статистических и клинических различий ($p > 0,05$). Статистической достоверности не было выявлено при анализе клеточного цикла с учетом степени компенсации СД, липидограммы, наличия ДПНП ($p > 0,05$). При анализе распределения клеток S-фазы в зависимости от длительности диабета в группах P и N, сформированных на основании данных исследования ЭМГ, также было обнаружено увеличение числа клеток в S-фазе в подгруппе Б по отношению к подгруппе А. В группе N относительное количество клеток S-фазы подгруппы Б составило 0,95 (0,70–2,08) % против 0,17 (0,0–1,05) % подгруппы А ($p < 0,05$). Группа P: относительное количество клеток S-фазы подгруппы Б составило 0,36 (0,0–0,52) % против 0,21 (0,0–0,47) % подгруппы А ($p > 0,05$). Описанные данные наглядно отражены на рис. 3.

Таким образом, незначительный рост числа клеток в S-фазе отмечается с увеличением длительности СД 2-го типа.

Молекулярно-биологические показатели были проанализированы также в группах P и N, сформиро-

Таблица 4. Оценка апоптоза и микроядер в подгруппах А и Б группы N

	Апоптоз (% клеток) (Ме (25–75 %))	Микроядра (% клеток) (Ме (25–75 %))
Контроль (n = 68)	3,12 (1,8–5,35)	0,90 (0,51–1,54)
Подгруппа А (n = 26)	3,0 (2,0–5,1)	1,10 (0,81–1,58)
Подгруппа Б (n = 5)	6,7 (4,4–6,9)	0,92 (0,44–1,20)

Таблица 5. Оценка апоптоза и микроядер в подгруппах А и Б группы P

	Апоптоз (% клеток) (Ме (25–75 %))	Микроядра (% клеток) (Ме (25–75 %))
Контроль (n = 68)	3,12 (1,8–5,35)	0,90 (0,51–1,54)
Подгруппа А (n = 61)	2,57 (1,71–4,0)*	0,73 (0,47–1,30)
Подгруппа Б (n = 35)	3,45 (2,07–6,0)*	0,86 (0,66–1,50)

Примечание: * — $p < 0,05$ при сравнении апоптоза группы P подгрупп А и Б.

ванных на основании данных исследования ЭМГ. При сравнительном анализе уровня апоптоза и результатов микроядерного теста в указанных группах статистически достоверных различий получено не было. Следовательно, клеточная гибель, оцененная по уровню апоптоза лейкоцитов и количеству микроядер, не зависит от наличия или отсутствия полинейропатии.

Для более детального анализа пациенты данной выборки также были разделены на подгруппы А и Б по длительности СД. Статистически достоверное различие по уровню апоптоза было получено только в группе P ($p < 0,05$), однако, как видно из табл. 4, в группе N сохранялась аналогичная тенденция по увеличению уровня апоптоза в подгруппе Б по сравнению с подгруппой А.

Выводы

1. Уровень апоптоза лейкоцитов периферической крови и количество клеток с микроядрами нарастает при увеличении длительности СД 2-го типа независимо от наличия или отсутствия диабетической дистальной полинейропатии, а также компенсации СД, возраста пациента.

2. Определение апоптоза и проведение микроядерного теста лейкоцитов периферической крови может служить интегральным маркером патологических изменений в организме при СД 2-го типа, но не при диабетической полинейропатии.

3. Распределения клеток периферической крови по клеточному циклу у пациентов с СД 2-го типа существенным образом не зависит от наличия или отсутствия полинейропатии.

Информация о конфликте интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта (двойственности) интересов при написании данной статьи.

Информация о спонсорстве

Научная работа выполнялась при финансировании Национальной академии наук Беларуси и привлеченных внебюджетных средств в рамках Государственной

программы научных исследований на 2011–2015 годы «Изучение закономерностей функционирования организма в норме и при патологии, причин и механизмов развития социально значимых заболеваний, разработка новых медицинских технологий и лекарственных средств», подпрограммы 3 «Фармакология и фармация».

Соответствие нормам этики. Участники исследования давали устное согласие, информированное согласие не подписывали.

Список литературы

1. Silventoinen K., Tuomilehto J. Obesity and diabetes: increasing epidemic challenges / Luc van Gaal // *Managing Obesity and Diabetes*. — 2003. — P. 1-11.
2. Valle T., Tuomilehto J., Eriksson J. Epidemiology of NIDDM in Europids // *International Textbook of Diabetes Mellitus*. — 2nd ed. — 1997. — № 2. — P. 125-142.
3. Шувалова И.Г. Роль систематического обучения пациентов в профилактике поздних сосудистых осложнений у больных сахарным диабетом 2-го типа [Диссертация]. — М., 2006.
4. Данилова Л.И. Сахарный диабет 2-го типа: современные подходы к коррекции. — Минск: БелМАПО, 2010.
5. Торнелли П.Дж. Осложнения сахарного диабета: патофизиология и варианты патогенетического лечения // *Материалы Международной рабочей встречи экспертов*. — Штутгарт, 2010.
6. Ефимов А.С., Скробонская Н.А. Клиническая диабетология. — К., 1998.
7. Voitovich A.M., Afonin V.Y., Krupnova E.V., Trusova V.D., Dromashko E.S. The level of aberrant cells in various tissues of bank vole depending on doses and radionuclide balance in organism // *Tsitol. Genet.* — 2003. — № 37(4). — P. 10-15.
8. Van Dilla M.A., Trujillo T.T., Mullaney P.F., Coulter J.R. Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement // *Science*. — 1969. — № 163(3872). — P. 1213-1214.
9. Ильин Д.А. Аспекты формирования микроядер // *Естественствознание и гуманизм*. — 2006. — № 3(3). — С. 67-73.
10. Grote V.A., Becker S., Kaaks R. Diabetes mellitus type 2 — an independent risk factor for cancer? // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*. — 2010. — № 118. — P. 4-8.

11. Mullner E., Brath H., Toferer D., Adrigan S., Bulla M.T., Stieglmayer R., Wallner M., Wagner R.M. Genome damage in peripheral blood lymphocytes of diabetic and non-diabetic individuals after intervention with vegetables and plant oil // *Oxford Journals Medicine & Health & Science & Mathematics. Mutagenesis.* — 2013. — № 28(2). — P. 205-211.

12. Miao Jonasson J., Cederholm J., Eliasson B., Zethelius B., Eeg-Olofsson K., Gudbjornsdottir S. HbA1c and cancer risk in patients with type 2 diabetes — a nationwide population-based prospective cohort study in Sweden // *PLoS ONE.* — 2012. — № 7(6). — E38784.

13. Giovannucci E., Harlan D.M., Archer M.C., Bergenstal R.M., Gapstur S.M., Habel L.A., Pollak M., Regensteiner J.G., Yee D. Diabetes and cancer: a consensus report // *Diabetes Care.* — 2010. — № 33. — P. 1674-1685.

14. Kowall B., Rathmann W., Strassburger K., Heier M., Holle R., Thorand B., Giani G., Peters A., Meisinger C. Association of passive and active smoking with incident type 2 diabetes mellitus in the elderly population: the KORA S4/F4 cohort study // *Eur. J. Epidemiol.* — 2010. — № 25(6). — P. 393-402.

15. Guillot R., Bringuier A.F., Porokhov B., Guillausseau P.J., Feldmann G. Increased levels of soluble Fas in serum from diabetic patients with neuropathy // *Diabetes Metab.* — 2001. — № 27(3). — P. 315-321.

16. Mondal A., Sen S., Chanda D., Kundu S., Chatterjee M., Mukherjee S. Evaluation of diabetic polyneuropathy in Type 2 diabetes mellitus by nerve conduction study and association of severity of neuropathy with serum sFasL level // *Indian J. Endocrinol. Metab.* — 2012. — № 16(Suppl. 2). — P. 465-467.

17. Льюин Б., Кассимерис Л., Линганна В.П., Плоннер Д., Филиппович И.В. Клетки. — М.: БИНОМ, 2011.

18. [humbio.ru \[интернет\]. База знаний по биологии человека \[доступ от 11.10.2014\]. Доступ по ссылке: http://humbio.ru/humbio/apon/000079c2.htm](http://humbio.ru/humbio/apon/000079c2.htm)

19. [humbio.ru \[интернет\]. База знаний по биологии человека \[доступ от 11.10.2014\]. Доступ по ссылке: http://humbio.ru/humbio/apon/00007ebd.htm](http://humbio.ru/humbio/apon/00007ebd.htm)

20. Dyck J.B., Dyck P.J. *Diabetic Neuropathy.* — Philadelphia: WB Saunders, 1999.

Получено 25.06.15 ■

Чак Т.А.¹, Сорокіна В.Н.¹, Павлюшчик Е.А.², Анісовіч М.В.², Хапалюк А.В.¹, Афонін В.Ю.², Білодід І.К.¹, Черенкевіч С.А.³

¹ Установа освіти «Білоруський державний медичний університет», м. Мінськ

² Державна наукова установа «Інститут біоорганічної хімії Національної академії наук Білорусі», м. Мінськ

³ Установа охорони здоров'я «Міський ендокринологічний диспансер», м. Мінськ

ОЦІНКА МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ЛЕЙКОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ПАЦІЄНТІВ ІЗ ДИСТАЛЬНОЮ СЕНСОМОТОРНОЮ НЕЙРОПАТІЄЮ ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ 2-ГО ТИПУ

Резюме. Визначення загибелі клітин методом проточної цитометрії значно поширене в сучасній діагностиці, однак недостатньо вивчено щодо цукрового діабету (ЦД) 2-го типу.

Мета: оцінити загибель клітин периферичної крові, розподіл за клітинним циклом і рівень мікроядер методом проточної цитометрії у пацієнтів із ЦД 2-го типу за наявності і відсутності дистальної сенсомоторної нейропатії.

Матеріали і методи. Обстежено 176 пацієнтів із ЦД 2-го типу і 67 відносно здорових осіб. В обох групах були визначені загибель лейкоцитів периферичної крові, клітини з мікроядрами і характер розподілу клітин за клітинним циклом методом проточної цитометрії. Пацієнти з ЦД 2-го типу були обстежені з метою діагностики діабетичної сенсомоторної периферичної полінейропатії (ДПНП). Ступінь тяжкості ДПНП оцінювався за допомогою загальної шкали неврологічних симптомів (Total Symptoms Score — TSS), шкали нейропатичного дисфункціонального рахунку (Neuropathy Disability Score — NDS) і за даними електроміографії. Показники клітинної загибелі в групі пацієнтів із ЦД 2-го типу додатково аналізувалися щодо віку обстежених, тривалості захворювання і ступеня компенсації. Для аналізу використовувався пакет програм Statistica 10.

Результати. Виявлений прямий кореляційний зв'язок між

відсотком клітин з ознаками апоптозу і відсотком клітин з мікроядрами, що дозволяє використати обидва показники як діагностичний критерій єдиних патологічних змін в організмі. Статистично вірогідні відмінності щодо клітинної загибелі виявлені при порівнянні груп з тривалістю ЦД до 10 років і 10 років і більше. Також виявлений прямий кореляційний зв'язок між відсотком клітин з ознаками апоптозу і тривалістю ЦД.

Висновки. Рівень апоптозу лейкоцитів периферичної крові і кількість клітин із мікроядрами нарастає при збільшенні тривалості ЦД 2-го типу незалежно від наявності або відсутності діабетичної дистальної полінейропатії, а також компенсації ЦД, віку пацієнта. Визначення апоптозу і проведення мікроядерного тесту лейкоцитів периферичної крові можуть слугувати інтегральним маркером патологічних змін в організмі при ЦД 2-го типу, але не при діабетичній полінейропатії. Розподіл клітин периферичної крові за клітинним циклом у пацієнтів з ЦД 2-го типу істотно не залежить від наявності або відсутності полінейропатії.

Ключові слова: цукровий діабет 2-го типу, діабетична нейропатія, апоптоз, мікроядра, проліферація клітин, клітинний цикл.

Chak T.A.¹, Sorokina V.N.¹, Pavliushchik Ye.A.², Anisovich M.V.², Khapaliuk A.V.¹, Afonin V.Yu.², Bilodid I.K.¹, Cherenkevich S.A.³

¹ Educational Institution «Belarusian State Medical University», Minsk

² State Scientific Institution «Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus», Minsk

³ Healthcare Institution «Municipal Endocrinology Dispensary», Minsk, Belarus

EVALUATION OF MOLECULAR BIOLOGICAL INDICATORS OF PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES INPATIENTS WITH SENSORIMOTOR POLYNEUROPATHY IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS

Summary. Detection of cell death by flow cytometry is commonly used in modern diagnostics, but is not enough studied in relation to type 2 diabetes mellitus (DM).

Objective: to assess the death of peripheral blood cells, the distribution in cell cycle and the level of micronuclei by flow cytometry in patients with type 2 DM with and without distal sensorimotor neuropathy.

Materials and methods. The study involved 176 patients with type 2 DM and 67 relatively healthy individuals. In both groups, we have determined the death of peripheral blood leukocytes, cells with micronuclei and the nature of cell distribution in the cell cycle by flow cytometry. Patients with type 2 DM were examined for diagnosis of diabetic sensorimotor peripheral polyneuropathy (DSPN). The severity of DSPN has been assessed using TSS (Total Symptom Score), the scale of features that make up the so-called Neuropathy Disability Score (NDS), and according to electromyography. Indicators of cell death in patients with type 2 DM were also analyzed in terms of age of the patients, duration of the disease and the degree of compensation. For the analysis, Statistica 10 software package has been used.

Results. A direct correlation between the percentage of cells with signs of apoptosis and the number of cells with micronuclei has been revealed that allows the use of both measures as a diagnostic criterion of common pathological changes in the body. Statistically significant

differences in cell death were detected when comparing the groups with DM duration up to 10 years and 10 years or more. Also, we have found a direct correlation between the percentage of cells with apoptosis signs and duration of DM.

Conclusions. The level of apoptosis of peripheral blood leukocytes and the number of cells with micronuclei increases with increasing duration of DM type 2, regardless of the presence or absence of diabetic distal polyneuropathy, as well as DM compensation, the patient's age. Detection of apoptosis and micronucleus test in peripheral blood leukocytes may serve as integral marker of pathological changes in the body in DM type 2, but not in diabetic polyneuropathy. Distribution of peripheral blood cells in the cell cycle in patients with type 2 DM is not substantially influenced by the presence or absence of polyneuropathy.

Key words: type 2 diabetes mellitus, diabetic neuropathy, apoptosis, micronuclei, cell proliferation, cell cycle.