

Gozhenko A. I., Kuznetsova H. S., Kuznetsova K. S., Kuznetsova O. M., Byts T. M., Zukow W. Morpho-functional basis of endothelial dysfunction in diabetes mellitus. Journal of Education, Health and Sport. 2017;7(6):516-524. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.822050>
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/4578>

The journal has had 7 points in Ministry of Science and Higher Education parametric evaluation. Part B item 1223 (26.01.2017).
1223 Journal of Education, Health and Sport eISSN 2391-8306 7

© The Author 2017;

This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland
Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.
This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.
The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.
Received: 03.06.2017. Revised: 20.06.2017. Accepted: 30.06.2017.

MORPHO-FUNCTIONAL BASIS OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN DIABETES MELLITUS

A. I. Gozhenko, H. S. Kuznetsova, K. S. Kuznetsova, O. M. Kuznetsova, T. M. Byts,
* W. Zukow

State Enterprise "Ukrainian Research Institute of Transport Medicine, Ministry of
Health of Ukraine", Odessa, Ukraine

*Wydział Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Abstract

The diabetes mellitus (DM) inevitably progresses and leads to complications, among which the main place is occupied by micro- and macroangiopathies. The presence of endothelial damage in DM can be established even before macroscopically significant damage to the vessel. At the same time, there is no summary ED characteristic for diabetes. The aim of the study is to make a comprehensive evaluation of ED in DM -1 and DM-2 types.

Materials and methods of research. 60 persons, including 53 DM type 1 and type 2, with a severe course (state of decompensation) participated in the present study. We used the method of estimating ED by the number of circulating desquamation endothelial cells (CECs) at the stages of decomposition with simultaneous determination of NO₂- and NO₃- metabolites of nitric oxide.

Results and discussion. In patients with diabetes, the level of CECs increased in 3-5 times and ranged from 1800 to 11,200 cells / ml. The average amount of CECs in patients with diabetes was 3358.5 ± 366.3 cells / ml.

Conclusions: Endothelium is involved in the pathological process at DM. This is evidenced by a significant increase in CECs in the blood plasma. The use of this method

allows to detect ED before clinically considerable vascular impairment and reflects the severity of the course and duration of DM.

Key words: diabetes mellitus, endothelial dysfunction, circulating endothelial cells, vascular endothelium, nitric oxide

МОРФО - ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

**А. И. Гоженко, А. С. Кузнецова, Е. С. Кузнецова, Е. Н. Кузнецова, Т. Н. Быць,
В. Жуков**

**Украинский научно-исследовательский институт медицины транспорта
МЗ Украины, г.Одесса**

***Wydział Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Резюме

Цель. Наличие повреждения эндотелия при сахарном диабете (СД) можно установить еще до макроскопически значимых повреждений сосуда. Вместе с тем, суммарной характеристики эндотелиальной дисфункции (ЭД) при СД нет. Целью исследования является комплексная оценка ЭД у больных СД.

Материалы и методы исследования. В исследовании принимали участие 60 человек, среди которых 53 – больные с сахарным диабетом 1 и 2 типа, с тяжелым течением в стадии декомпенсации. Нами использован метод оценки ЭД по количеству циркулирующих десквамационных эндотелиальных клеток (ЦЭК) на стадиях распада с одновременным определением метаболитов оксида азота NO_2^- и NO_3^- .

Результаты и обсуждение. У больных СД, количество ЦЭК возрастает в 3-5 раз и находится в пределах от 1800 до 11200 клеток/мл. Среднее количество ЦЭК у больных СД составляет $3358,5 \pm 366,3$ клеток/мл.

Выводы: При СД в патологический процесс вовлекается эндотелий. Об этом свидетельствует достоверное увеличение ЦЭК в плазме крови. Использование данного метода может позволить выявлять ЭД до клинически значимых повреждений сосудов и отображает тяжесть течения и длительность СД.

Ключевые слова: эндотелиальная дисфункция, сахарный диабет, циркулирующие эндотелиальные клетки, сосудистый эндотелий, оксид азота.

Введение. Распространенность сахарного диабета (СД) приобрела характер неинфекционной пандемии XXI века. С 1980 года численность людей, болеющих СД, возросла почти в четыре раза до 422 миллионов человек, и продолжает стремительно увеличиваться во всех регионах мира. [1]

Заболевание неизбежно прогрессирует и приводит к осложнениям, среди которых основное место занимают микро- и макроангиопатии [2]. Одним из ранних и ключевых поражений при кардиоваскулярной патологии признается нарушение функций и повреждение сосудистого эндотелия – формирование эндотелиальной дисфункции [3, 4, 5].

Эндотелиальная дисфункция (ЭД) - это дисбаланс между биоэффекторными веществами, синтезируемыми эндотелиоцитами сосудистой стенки и обеспечивающими в норме оптимальное течение всех эндотелийзависимых процессов, при котором происходит постепенное истощение и/или извращение компенсаторной дилатирующей способности сосуда и свертывания крови [6, 3].

О высокой физиологической значимости ЭД дает возможность судить огромная общая протяженность эндотелиального слоя (около 7 км) в организме человека с весом около 1,8 кг, клетки которого выстилают не только кровеносные, но и лимфатические сосуды, а также полости сердца [7, 8].

Многочисленными исследованиями установлена важная роль сосудистого эндотелия как эндокринного органа с ауто-и паракринной активностью [10, 11], которой обладают продуцируемые им биоэффекторы, регулирующие сосудистый тонус, гемостаз, ангио-и тромбогенез, участвующие в воспалении, апоптозе и многих других процессах в системе кровообращения. Показано, что эндокринная активность эндотелия зависит от его функционального состояния [7, 9, 12].

С возрастом сосудистая система претерпевает глубокие структурные и функциональные изменения [13, 14, 15], которые затрагивают эндотелиальную выстилку сосудов, снижается пролиферативная активность эндотелия и его компенсаторная перестройка, затрудняется регенерация одноименных клеток, утолщается базальная мембрана, изменяются ее физико- химические свойства [16, 17, 18]. Как правило, возрастным изменениям сопутствует патология сердечно-сосудистой системы [20].

ДЭ является одним из самых ранних признаков поражения сосудов у больных СД и может быть выявлена на начальных стадиях заболевания, еще до появления атеросклеротических бляшек [21]. Она имеет также большое значение и на поздних

стадиях атеросклеротического поражения, так как нарушения эндотелийзависимой релаксации и повышенная адгезивность эндотелиальной выстилки могут способствовать спазму, развитию бляшки и последующему разрыву ее поверхности [22].

К настоящему времени разработаны способы определения значительного количества маркеров эндотелиальной дисфункции. Одним из важных критериев поражения эндотелиальной выстилки сосудов является определение количества десквамированных циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК), количество которых повышается при многих состояниях, сопровождающихся поражением сосудистого эндотелия. Считается, что этот показатель — один из самых объективных показателей поражения эндотелия, так как отражает повышение процессов апоптоза и некроза в нем [23]. В связи с этим представляло интерес к изучению.

Материалы и методы

В исследовании принимали участие 60 человек, среди которых 53 – больные сахарным диабетом 1 и 2 типа, с тяжелым течением в стадии декомпенсации. Средний уровень гликозилированного гемоглобина (Hb1cA) составил $8,3 \pm 0,3\%$.

Нами был использован метод оценки ЭД по количеству ЦЭК как по общему числу, так и на стадиях распада с одновременным определением уровня стабильных метаболитов NO — нитрит- (NO_2^-) и нитрат-анионов (NO_3^-). Плазменную концентрацию NO_2^- определяли методом Грина с использованием реактива Грисса, концентрацию NO_3^- — после их восстановления в нитриты с использованием цинковой пыли [24].

Среди пациентов с СД были 32 мужчины (60,4 %) и 21 женщины (39,6 %), в возрасте от 19 до 80 лет. Средний возраст пациентов с СД составил $55,6 \pm 3,9$ лет. В группу контроля входили лица без эндокринной патологии, в возрасте от 32 до 80, средний возраст – $62,57 \pm 15$.

Установлено, что у группы контроля ЦЭК присутствуют в количестве от 200 до 800 ^{леток/}мл, в среднем составляя 500 ± 200 . И уровень эндотелиоцитемии повышался с возрастом, что дает основание рассматривать ЭД как одно из первичных проявлений старения у людей, не страдающих эндокринными и сердечно-сосудистыми заболеваниями [25, 26].

Одновременно с этим, содержание NO_2^- у лиц без эндокринной патологии колебалось от 0,2 до 4,5 мкмоль/л при норме 0,05-4,2 мкмоль/л со средним показателем $2,2 \pm 1,5$ мкмоль/л. Уровень NO_3^- находился в пределах 21,2 до 81,7

мкмоль/л при норме для человека 20-40 мкмоль/л, в среднем составляя $37,7 \pm 23$ мкмоль/л [27].

Результаты и обсуждение

У больных СД наблюдается аналогичная динамика по содержанию нитритов в плазме крови, где показатели NO_2^- находятся в пределах нормы или несколько повышены. Уровень NO_2^- в плазме крови больных СД составил в среднем $3,2 \pm 1,8$ мкмоль/л, повышается максимально до 8,0 мкмоль/л, что, однако, не дает оснований трактовать это изменение как позитивное, так как увеличение концентрации оксида азота вследствие активации индуцибельной NOS в крови способствует усилению реакций нитрозилирования с образованием пероксинитрита - одного из сильнейших клеточных ядов, повреждающих эндотелиоциты [28].

Содержание нитратов колеблется от 7,8 до 78,5 мкмоль/л и в среднем составляет $30,8 \pm 17$ мкмоль/л. У 30% больных СД наблюдается снижение уровня NO_3^- , в среднем составляя $13,2 \pm 3,8$ мкмоль/л.

У больных СД, количество ЦЭК возрастает в 3-5 раз и находится в пределах от 1800 до 11200 клеток/мл. Среднее количество ЦЭК у больных СД составляет $3358 \pm 366,4$ клеток/мл, что достоверно превышает количество клеток у здоровых лиц ($p < 0,05$).

Мы определяли уровень эндотелиоцитемии, NO_2^- и NO_3^- в зависимости от длительности СД. Все пациенты были разделены на 3 группы. В 1ую группу входили пациенты со стажем СД менее 10 лет, во вторую – от 10 до 15 лет, в 3ую – более 15 лет.

Таблица 1. Показатели ЭД в плазме крови в зависимости от длительности СД.

Длительность СД	Контроль	менее 10 лет	10-15 лет	более 15 лет
ЦЭК в 1 мл плазмы крови	500 ± 200	$3100 \pm 713,8$	3166 ± 526	$3859 \pm 660,8$
NO_2^- мкмоль/л	$2,2 \pm 1,5$	$3,4 \pm 0,5$	$2,4 \pm 0,3$	$3,4 \pm 0,6$
NO_3^- мкмоль/л	$37,7 \pm 23$	$33 \pm 6,1$	$22 \pm 2,8$	$34,3 \pm 3,8$

На табл 1. видна прямая зависимость между стажем СД и количество ЦЭК, которые повышались согласно длительности СД. Изменения уровня NO_2^- и NO_3^- были не показательными.

На клеточном уровне ЭД связана с повреждением и ускоренным апоптозом эндотелиоцитов. Поэтому особенно важным является изучение характера структурно-функциональных нарушений эндотелия в зависимости от стадии распада ЦЭК (Рис. 1).

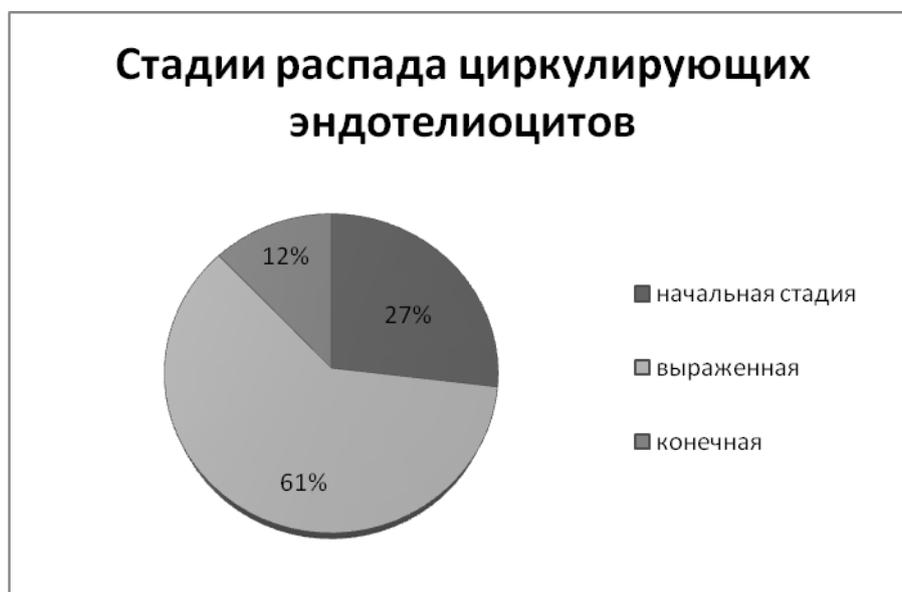


Рис. 1 Концентрация ЦЭК в плазме в зависимости от стадии распада

На начальной стадии распада концентрация ЦЭК в плазме крови составила 12 % при среднем уровне эндотелиоцитемии $849 \pm 137,3$ клеток/мл. На 2ой, выраженной стадии, уровень ЦЭК был самым высоким, 61 %, а средняя концентрация ЦЭК – $1926,4 \pm 243,6$. Количество ЦЭК на конечной стадии было $583 \pm 79,3$, что составило 27%.

Важно подчеркнуть, что морфо-функциональные нарушения эндотелиальных клеток, судя по количеству ЦЭК, более значимы. На наш взгляд, достаточный уровень метаболитов NO может быть обусловлен компенсаторным повышением функции эндотелия, несмотря на то, что часть эндотелиоцитов повреждена. Также можно предположить, что те эндотелиоциты, которые остались, работают в режиме повышенной активации, что в последствие может усугубить явления ЭД.

Выводы: Биомаркером повреждения эндотелия и начала ЭД у больных с СД может быть снижение метаболизма и продукции эндотелием оксида азота. Но еще более значимым и точным способом диагностики этих повреждений следует считать как общее количество ЦЭК, так и количество ЦЭК с учетом распределения по стадиям распада.

Использование данного метода является прямой объективизацией наличия явления ЭД и повреждения эндотелиальных клеток и является основанием для необходимости проведения соответствующих методов ангиопротекции.

Reference

1. Global report on diabetes. WHO, 2016.
2. Kuznetsova ES, Kuznetsova AS, Shukhtin VV, Gozhenko AI. Osobennosti osmoreguliruyushchey funktsii pochek u bol'nykh s sakharnym diabetom 2 tipa [Features of osmoregulatory renal function in patients with type 2 diabetes]. *Ukrainian Journal of Nephrology and Dialysis*, 2015;4(49):21-26. (in Russian)
3. Petrisheva NN. Disfunktsiya endoteliya. Prichiny, mekhanizmy, farmakologicheskaya korrektsiya [Endothelial Dysfunction. Causes, mechanisms, pharmacological correction], SpB: *St. Petersburg State Medical University*; 2003:184. (in Russian)
4. Malaya LT, Korzh AN, Balkova LB. Endotelial'naya disfunktsiya pri patologii serdechno- sosudistoy sistemy [Endothelial dysfunction in the pathology of the cardiovascular system], Kharkov: Foliant; 2000;432. (in Russian)
5. Shishkin AN, Lyndina ML. Endotelial'naya disfunktsiya i arterial'naya gipertenziya [Endothelial dysfunction and hypertension]. *Arterial'naya gipertenziya*, 2008;14(4): 315-319. (in Russian)
6. Kotyuzhinskaya SG, Gozhenko AI. Kharakteristika lipidtransportnoy sistemy u bol'nykh pri gipogeparinemii [Characteristics of the lipid transport system in patients with hypogaparinemia]. *Bukovins'kiy medichniy visnik*, 2014;18(2):57-59.
7. Gomazkov OA. Endoteliy — endokrinnoye derevo [Endothelium-endocrine tree]. *Priroda*, 2000;5:38-46. (in Russian)
8. Luscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. *Clin. Cardiology*, 1997;20:310.
9. Kirichuk VF, Rebrov AP, Rossoshanskaya SI. Funktsii endoteliya sosudistoy stenki [Endothelial functions of the vascular wall] *Tromboz, gemostaz, reologiya*, 2005; 2:23-29. (in Russian)
10. Zateyshchikova AA, Zateyshchikov DA. Endotelial'naya regulyatsiya sosudistogo tonusa: metody issledovaniya i klinicheskoye znachenie [Endothelial regulation of vascular tone: research methods and clinical significance]. *Kardiologiya*, 1998;9:68-80. (in Russian)

11. Inagami T, Naruse M, Hoover R. Endothelium as an endocrine organ. *Annu.Rev. Physiol*, 1995; 57: 171-189.
12. Duvall WL. Endothelial dysfunction and antioxidants *Mt. Sinai J.Med.*, 2005;72(2):71-80.
13. Tret'yakov SV, Shpagina LA. Strukturno–funktsional'noye sostoyaniye serdechno –sosudistoy sistemy u lits pozhilogo i starchyeskogo vozrasta [Structurally functional state of the cardiovascular system in persons of elderly and senile age]. *Klinicheskaya gerontologiya*, 2006;10:23-28. (in Russian)
14. Greenwald SE. Aging of the conduit arteries. *J. Pathol*, 2007; 211(2): 157-172.
15. Jani B, Rajkumar C. Ageing and vascular ageing. *Postgrad Med J*, 2006;82(967):357-362.
16. Vishnevskaya VY. Endotelial'naya disfunktsiya i vozrast [Endothelial dysfunction and age]. *Vrachebnaya praktika*, 2003;4:5-10. (in Russian)
17. Gorshunova NK. Strukturnyye i funktsional'nyye osobennosti mikrotsirkulyatornogo zvena gemostaza pri starenii [Structural and functional features of the microcirculatory component of hemostasis in aging]. *Mater. Vseross. konf. Aktual'nyye problemy professional'noy i ekologicheskoy patologii*. Kursk, 1994;252-257. (in Russian)
18. Ostroumova OD, Dubinskaya RE. Starenie i disfunktsiya endoteliya [Aging and dysfunction of the endothelium]. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*, 2004;4:83-89. (in Russian)
19. Bulpitt CJ, Rajkumar C, Cameron JD. Vascular compliance as a measure of biological age. *J. Am. Geriat. Soc*, 1999;47:657-663.
20. Hinderliter AL, Caughey M. Assessing endothelial function as a risk factor for cardiovascular disease. *Curr. Atheroscler. Rep.*, 2003;5(6):506-513.
21. Storey AM, Perry CJ, Petrie JR. Endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *The british j. of diabetes and vascular disease*, 2001;1(1):22-27.
22. Tadtayeva NY, Basiyeva OO. Diagnosticheskoye znachenie markerov povrezhdeniya endoteliya sosudov pri sakharnom diabete 2-go tipav sochetanii s arterial'noy gipertenziyey [Diagnostic value of markers of vascular endothelium damage in type 2 diabetes mellitus combined with arterial hypertension]. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik*, 2014;3(145):109-113. (in Russian)
23. Petrishchev NN, Berkovich OA, Vlasov TD. Diagnosticheskaya tsennost' opredeleniya deskvamirovannykh endotelial'nykh kletok v krovi [Diagnostic value of the

definition of desquamated endothelial cells in the blood]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*, 2001,1:50-52. (in Russian).

24. Susla OB, Misula IR. Pat. 57841 Ukraïna, MPK A61V 10/00 Sposib viznachennya vmistu tsirkulyuyuchikh yendotelial'nikh klitin u plazmi krovi [Method for determining the content of circulating endothelial cells in the blood plasma]; zayavnik i patentovlasnik Derzhavniy vishchiy navchal'niy zaklad Ternopil's'kiy derzhavniy medichniy universitet imeni I. YA. Gorbachevs'kogo, № 2010 11243 ; zayavl. 20.09.2010 ; opubl. 10.03.2011,5. (in Ukrainian)

25. Kuznetsova AS, Kvasnevskaya NF, Kuznetsova ES, Byts TN, Gozhenko AI.. Morpho-functional state of endothelium in diabetes mellitus. *Current issues of development of new drugs, abstracts XXIV International scientific conference of young scientists and students (20 April 2017)*. 2017;2:84.

26. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation*, 1995;91:1981-1987.

27. Kobylyanskiy AG, Kuznetsova TV, Soboleva GN. Opredeleniye oksida azota v syvorotke i plazme krovi cheloveka. Metod vysokoeffektivnoy zhidkostnoy khromatografii [Determination of nitric oxide in the serum and plasma of the human blood. Method of high-efficient liquid chromatography]. *Biomeditsinskaya khimiya*, 2003;49(6):597-603. (in Russian)

28. Mauyer SS. Involyutivnaya vazotonicheskaya endotelial'naya disfunktsiya, yeyo osobennosti [Involute vasotonic endothelial dysfunction, its features]. *Mater. IV Mezhd.nauch. konferentsiya molodykh uchenykh medikov*, Kursk,2010;11:272-274. (in Russian)