

АКТИВНОСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ, КАТАЛАЗЫ И СОДЕРЖАНИЕ А-ТОКОФЕРОЛА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА, ОСЛОЖНЕННЫМ СТЕАТОГЕПАТИТОМ, ПРИ ПРОВЕДЕНИИ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ С ЭПИФАМИНОМ

© Попов С.С., Пашков А.Н.¹, Шульгин К.К.², Перегудова А.Ю.²

Кафедра госпитальной терапии и эндокринологии, ¹ кафедра биологии Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н. Бурденко, Воронеж; ² кафедра медицинской биохимии и микробиологии Воронежского государственного университета, Воронеж

E-mail: popov-endo@mail.ru

Проведено исследование активностей аминотрансфераз, супероксиддисмутазы, каталазы и содержания α -токоферола в сыворотке крови больных стеатогепатитом, развивающемся при сахарном диабете 2 типа, на фоне базисного лечения и комбинированной терапии, включающей эпифамин. Выявлено снижение активности супероксиддисмутазы и возрастание активности каталазы при данной патологии, что указывает на возникновение дисбаланса в антиоксидантной системе. Применение эпифамина на фоне базисной терапии приводило к более существенному изменению активности исследуемых ферментов, а также уровня α -токоферола в сторону контрольных значений по сравнению с группой больных, находящихся на стандартном лечении. Вместе с тем прием эпифамина усиливал гепатопротекторное действие базисной терапии, о чем свидетельствовала наиболее выраженная нормализация активности аминотрансфераз. Результаты указывают на позитивное действие эпифамина при его применении в ходе базисного лечения стеатогепатита, развивающегося на фоне сахарного диабета 2 типа, что, очевидно, сопряжено с антиоксидантным действием мелатонина, коррекция уровня которого происходит под действием данного препарата.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, стеатогепатит, эпифамин, супероксиддисмутазы, каталаза, α -токоферол.

ACTIVITY OF SUPEROXIDE DISMUTASE, CATALASE AND A-TOCOPHEROL CONTENT IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES COMPLICATED BY STEATONEPATITIS IN COMBINED TREATMENT WITH EPIFAMIN

Popov S.S., Pashkov A.N.¹, Shulgin K.K.², Peregudova A.Yu.²

Department of Hospital Therapy and Endocrinology, ¹ Department of Biology of N.N. Burdenko Voronezh State Medical Academy, Voronezh;

² Department of Medical Biochemistry and Microbiology of Voronezh State University, Voronezh

The activities of aminotransferases, superoxide dismutase, catalase and α -tocopherol content in blood serum of patients with steatohepatitis developed in type 2 diabetes against a background of the basic treatment and combined therapy including Epifamin have been investigated. The decrease in superoxide dismutase activity and the increase in catalase activity in the pathology were revealed, that indicated the antioxidant system imbalance. Epifamin application against a background of the basic therapy resulted in a more significant changes of the activities of the enzymes studied, as well as α -tocopherol level toward the control values in comparison with the patients undergoing the standard treatment. Besides, the treatment with Epifamin strengthened the hepatoprotective effect of the basic therapy, which was evidenced by the most pronounced normalization of aminotransferases' activities. The results indicate the positive action of Epifamin in its application during the basic treatment of steatohepatitis developed in type 2 diabetes. It is obvious that it is connected with the antioxidant effect of melatonin, whose level is corrected due to this preparation.

Keywords: type 2 diabetes mellitus, steatohepatitis, Epifamin, superoxide dismutase, catalase, a-tocopherol.

Жировая дистрофия печени часто развивается у больных сахарным диабетом (СД) 2 типа с ожирением и дислипидемией. Неалкогольный стеатогепатит чаще всего протекает доброкачественно и бессимптомно, однако в ряде случаев развиваются цирроз печени, портальная гипертензия и печеночная недостаточность. Накопление липидов в гепатоцитах может быть следствием избыточного поступления свободных жирных кислот в печень, а также усиления синтеза и снижения скорости β -окисления жирных кислот. Повышенное содержание свободных жирных кислот может быть

причиной нарушения функции печени, поскольку жирные кислоты химически активны и стимулируют свободнорадикальное окисление (СО) биомолекул. Образующиеся при этом активные формы кислорода (АФК) могут повреждать биологические мембраны клеток печени [3]. При этом активизируется пероксидное окисление липидов, что приводит к усиленному образованию свободных радикалов и окислительному стрессу.

Известно, что от губительного действия АФК организм защищает антиоксидантная система организма (АОС), которая включает в себя фермен-

тативное и неферментативное звенья. К одним из основных ферментативных компонентов АОС относятся супероксиддисмутаза (СОД: КФ 1.15.1.1) и каталаза (КФ 1.11.1.6). СОД катализирует превращение супероксидного анионрадикала с образованием пероксида водорода и кислорода. Наивысшая активность СОД обнаружена в печени и эритроцитах крови. Каталаза катализирует разложение пероксида водорода до воды, препятствуя образованию из H_2O_2 гидроксильного радикала в реакции Фентона.

Одно из важнейших мест в неферментативном звене АОС занимает α -токоферол. Свою антиоксидантную функцию он может осуществлять за счет создания компактной мембранной архитектуры, предотвращающей атаку АФК на ненасыщенные жирнокислотные остатки мембранных фосфолипидов; разрушая образующиеся липидные перекисные и кислородные радикалы [6].

В связи с необходимостью поиска новых эффективных средств антиоксидантной терапии приобретает актуальность исследование антирадикальной активности гормона диффузной нейроэндокринной системы – мелатонина. Известно, что данный гормон играет роль регулятора многих физиологических функций: участвует в формировании суточных биоритмов, торможении некоторых функций гипофиза, регуляции иммунных реакций, оказывает снотворный и седативный эффекты [5]. В данной работе мы использовали эпифамин. Препарат эпифамин относится к классу цитомединов и является пептидным биорегулятором, тропным к эпителиально-эпифизарной области и способным обеспечивать коррекцию содержания мелатонина в организме. В предыдущих работах нами было выявлено существенное влияние эпифамина на АОС организма при лекарственном гепатите [2].

Таким образом, целью настоящей работы явилась оценка активности аминотрансфераз, каталазы, супероксиддисмутаза и содержания α -токоферола в сыворотке крови пациентов с неалкогольным стеатогепатитом, развивающимся на фоне СД 2 типа, а также после проведения базисного лечения и комбинированной терапии, включающей прием эпифамина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В клиническое исследование был включен 61 человек с неалкогольным гепатитом, развивающимся вследствие СД 2 типа. Из них 20 мужчин (32,8%) и 41 женщина (67,2%). Возраст больных составлял от 45 до 80 лет: средний возраст – $62,5 \pm 17,5$ года. Средняя продолжительность забо-

леванием СД 2 типа составила $3,3 \pm 8,7$ года. Диагноз неалкогольного стеатогепатита был поставлен на основании клинических признаков заболевания, биохимического исследования крови, данных ультразвукового исследования печени. Из сопутствующих заболеваний чаще всего регистрировались следующие: ожирение – 61 больной (100%), гипертоническая болезнь – 51 больной (83,6%), хроническая сердечная недостаточность – 42 больных (68,9%), хронический гастрит – 30 больных (49,2%).

Контрольную группу составили 65 практически здоровых лиц с нормальными показателями общего и биохимического анализов крови.

Критериями исключения из исследования явились: вирусные гепатиты, злокачественные новообразования, острый инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения.

Больные были разделены на 2 группы. Первая группа пациентов (33 человека) находилась на базисном лечении: сахароснижающая терапия (таблетированные препараты сульфонилмочевины и бигуаниды), гепатопротекторы: карсил (эквивалент силимарина 35 мг) по 2 таблетки 3 раза в день во время еды, эссливер форте (эссенциальные фосфолипиды 300 мг) по 2 таблетки 3 раза в день в течение 10 дней. Вторая группа пациентов (28 человек) дополнительно к базисной терапии получала эпифамин (ООО «Клиника Института биорегуляции и геронтологии», Санкт-Петербург, Россия; удостоверение качества и безопасности № 103, регистрационное удостоверение № 004471.P.643.04.2003, биологически активная добавка) по 1 таблетке (10 мг) 3 раза в день за 10-15 минут до еды в течение 7 дней.

В ходе клинического исследования использовали сыворотку крови больных, находящихся на лечении в стационаре. Кровь для исследования забиралась в пробирки типа «вакутейнер» в утреннее время, натощак, из локтевой вены.

Активность ферментов определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Hitachi U-1900 (Япония). Активность каталазы измеряли при длине волны 410 нм, с помощью метода, основанного на способности пероксида водорода образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс. Активность СОД определяли по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия в неэнзиматической системе феназинметасульфата и НАДН при длине волны 540 нм [4]. За единицу активности СОД принимали количество фермента, необходимого для 50%-го ингибирования восстановления нитросинего тетразолия. Активность ферментов выражали в ферментативных единицах (Е) в расчете на мл сыворотки и в виде удельной активности. Общий белок определяли унифицированным ме-

тодом по биуретовой реакции [7]. Концентрацию α -токоферола определяли по методу, основанному на фотометрировании хромогенного комплексного соединения Fe^{2+} и ортофенотролина при 510 нм. Активность аланинаминотрансферазы (АлАт) и аспатаминотрансферазы (АсАт) определяли с помощью набора реактивов «Витал Диагностик» (Санкт-Петербург).

В работе использовали НАДН, феназинметасульфат (Sigma, США), трис, ЭДТА, нитросиний тетразолий («Reanal», Венгрия), остальные реактивы отечественного производства марки «ХЧ» или «ЧДА». Статистическая обработка материала включала использование стандартных методов вариационной статистики (расчет средних значений (M), ошибки средних значений (m), t -критерия Стьюдента) и непараметрического теста Вилкоксона с использованием прикладных программ «STATISTICA 6.0». Достоверными считались различия при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Состояние функции печени у больных первой и второй групп до лечения по сравнению с контрольной группой характеризовалось возрастанием уровня активности АлАт в 1,7 и 1,6 ($p < 0,05$) раза соответственно, и АсАт в 1,3 и 1,2 ($p < 0,05$) раза соответственно, по сравнению с верхней границей нормы (40 МЕ/л). Данные биохимические показатели подтверждают, что у больных с неалкогольным стеатогепатитом происходило нарушение метаболизма и повреждение гепатоцитов, что сопровождалось цитолизом клеток и выходом в кровь аминотрансфераз. После базисного лечения наблюдалось уменьшение активности АлАт и АсАт в 1,8 и 1,4 ($p < 0,05$) раза соответственно. В сыворотке крови второй группы пациентов, принимавших, помимо базисной терапии, эпифамин, происходило снижение уровня АлАт в 1,9 ($p < 0,05$) раза, а АсАт – в 1,5 ($p < 0,05$) раза. Таким образом, как базисная терапия, так и комбинированное лечение с эпифамином снижали активность аминотрансфераз в сторону нормы. Однако назначение эпифамина усиливало гепатопротекторное действие базисной терапии, по видимому, за счет коррекции уровня мелатонина в организме и усиления антиоксидантного эффекта.

При неалкогольном стеатогепатите, развивающемся при СД 2 типа, активность СОД, выраженная в Е на мл сыворотки крови, уменьшалась в 1,4 ($p \leq 0,05$) раза по сравнению с нормой. При этом удельная активность фермента снижалась на 30,6% ($p \leq 0,05$). Выявленные изменения могут быть связаны как с истощением активности дан-

ного компонента АОС, так и с повышением уровня антител к СОД в условиях патологии, что может приводить к угнетению функционирования фермента [1].

После базисной терапии имела место тенденция к повышению как активности СОД, выраженной в виде Е на мл сыворотки (в среднем на 9,6%), так и удельной ферментативной активности (в среднем на 6,3%) по сравнению с соответствующими показателями, полученными до проведения лечения. Комбинированное лечение с эпифамином способствовало увеличению активности СОД, выраженной на Е на мл сыворотки, на 10,9%; удельная активность фермента возрастала в среднем на 9,8%. Согласно полученным результатам, при неалкогольном стеатогепатите, развивающемся на фоне СД 2 типа, прием эпифамина способствует более существенному изменению активности СОД в сторону нормы. Это, вероятно, может быть связано с антиоксидантным действием мелатонина, уровень которого корригируется при назначении эпифамина, и снижением уровня антител к ферменту. Как следствие, происходила стимуляция ферментативной активности СОД, обеспечивающей торможение процессов СО биомолекул.

При неалкогольном стеатогепатите, развивающемся при СД 2 типа, активность каталазы, выраженная в Е на мл сыворотки крови, возрастала в 2,2 ($p \leq 0,05$) раза по сравнению с нормой. При этом удельная активность фермента повышалась в 1,4 ($p \leq 0,05$) раза. Полученные данные отражают мобилизацию данного звена АОС в ответ на развитие оксидативного стресса в организме пациентов. После базисной терапии достоверных изменений как удельной ферментативной активности, так и активности каталазы, выраженной в расчете на мл сыворотки, не наблюдалось. При комбинированном лечении с эпифамином наблюдалась тенденция к увеличению активности, выраженной в виде Е на мл сыворотки, в среднем на 8%, удельной активности – на 7%. Можно предполагать, что при приеме эпифамина, сопровождающемся возрастанием уровня мелатонина в организме, могла происходить индукция фермента под действием данного гормона [9]. Кроме того, в литературе имеются сведения о том, что мелатонин при окислительном стрессе защищает молекулу каталазы от свободнорадикального повреждения [8]. Вместе с тем незначительные изменения активности каталазы могли определяться влиянием вышеотмеченных факторов, с одной стороны, и снижением степени мобилизации активности данного антиоксидантного фермента в условиях торможения свободнорадикальных процессов под действием эпифамина – с другой.

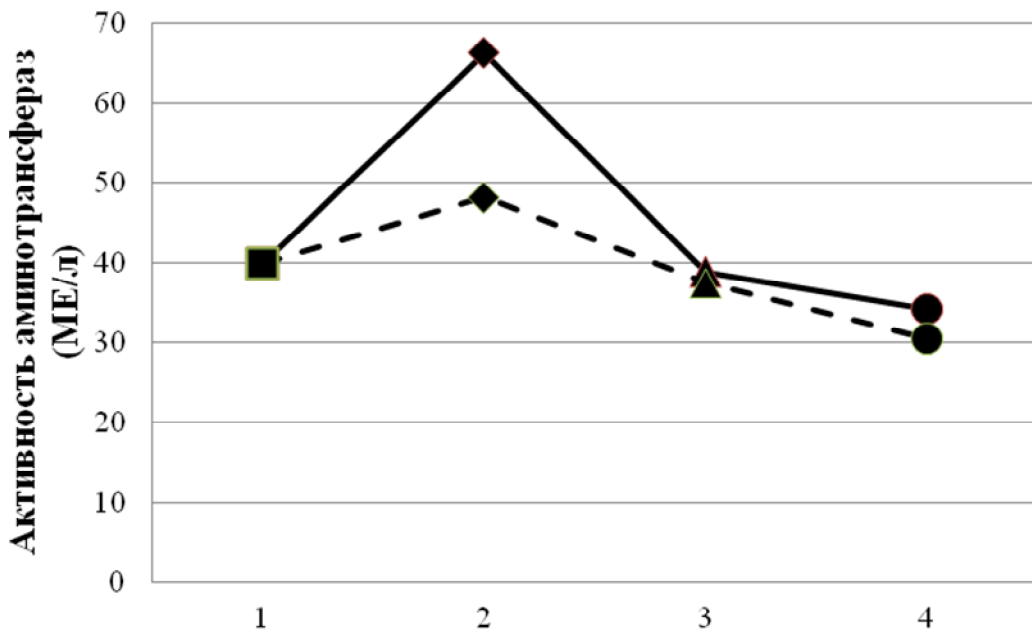


Рис. 1. Активность аланинаминотрансферазы (— —) и аспартатаминотрансферазы (—) в сыворотке крови: 1 – контрольная группа; 2 – пациенты со стеатогепатитом, развивающемся при СД 2 типа, до лечения; 3 – пациенты со стеатогепатитом, развивающемся при СД 2 типа, после базисной терапии; 4 – пациенты со стеатогепатитом, развивающемся при СД 2 типа, после комбинированного лечения с эпифамином.

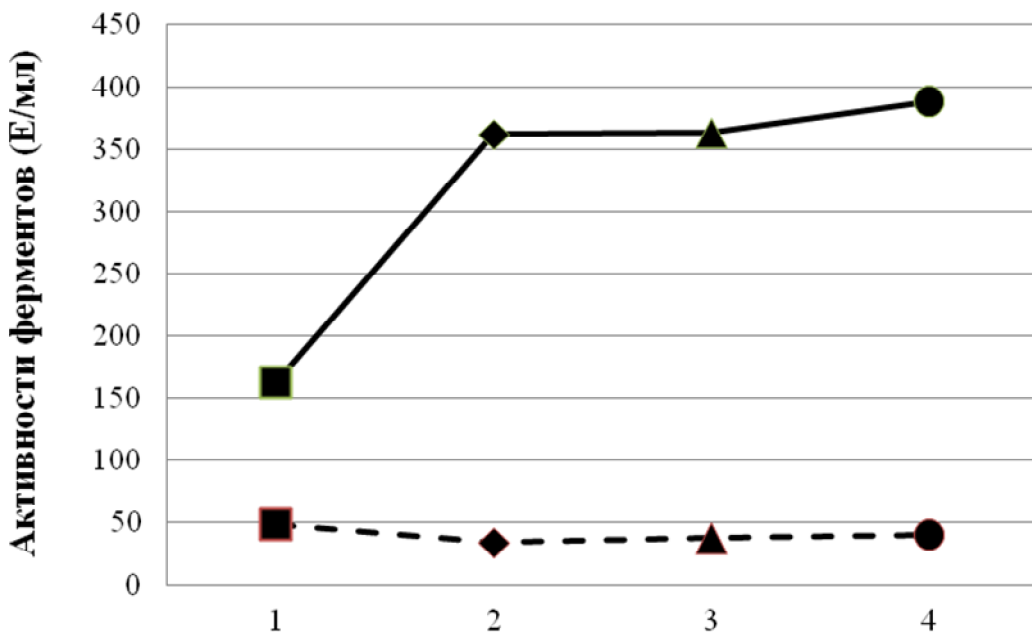


Рис. 2а. Активности каталазы (— —) и супероксиддисмутазы (—), выраженные в виде Е на мл сыворотки крови: 1 – контрольная группа; 2 – пациенты со стеатогепатитом, развивающемся при СД 2 типа, до лечения; 3 – пациенты со стеатогепатитом, развивающемся при СД 2 типа, после базисной терапии; 4 – пациенты со стеатогепатитом, развивающемся при СД 2 типа, после комбинированного лечения с эпифамином.

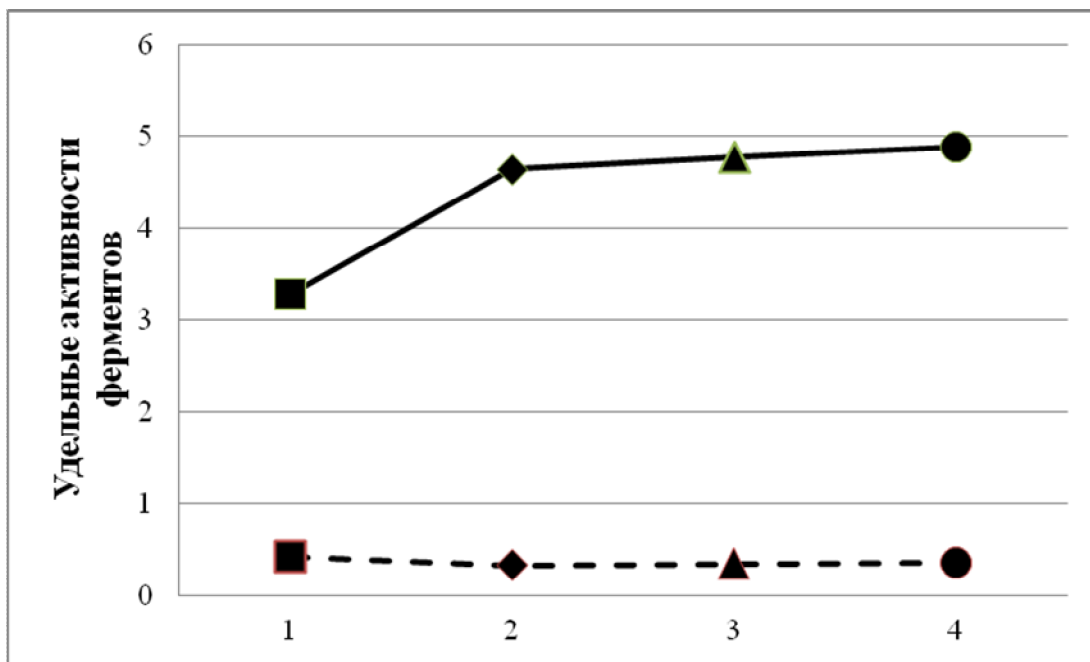


Рис. 26. Удельные активности каталазы (—) супероксиддисмутазы и (- -), выраженные в виде Е на мл сыворотки крови: 1 – контрольная группа; 2 – пациенты со стеатогепатитом, развивающемся при СД 2 типа, до лечения; 3 – пациенты со стеатогепатитом, развивающемся при СД 2 типа, после базисной терапии; 4 – пациенты со стеатогепатитом, развивающемся при СД 2 типа, после комбинированного лечения с эпифамином.

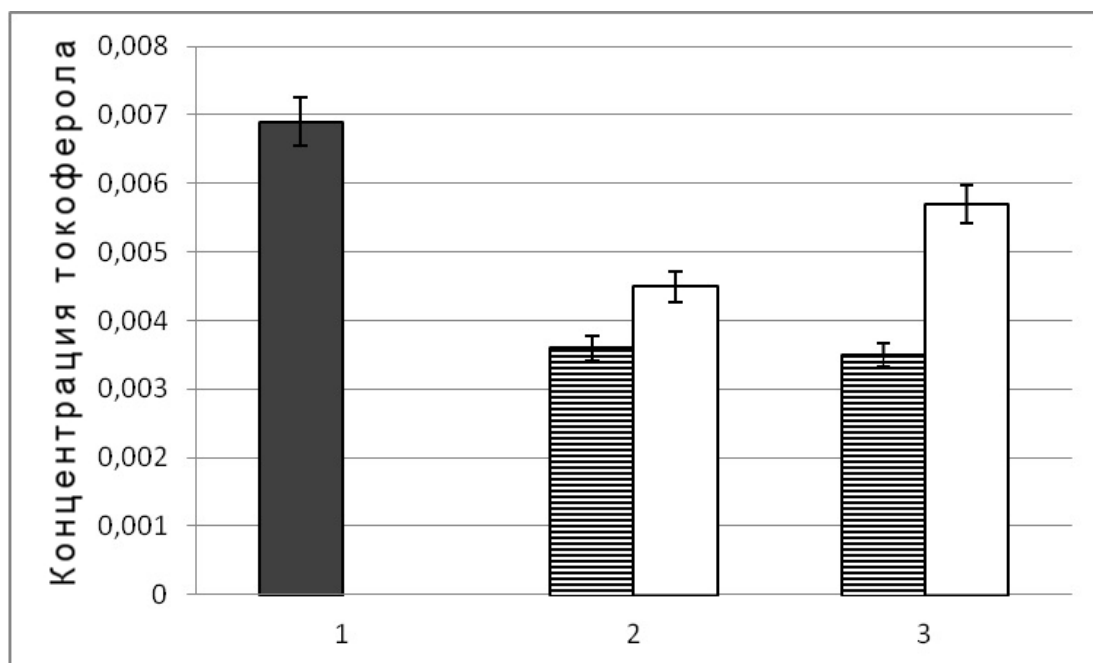




Рис. 3. Содержание α -токоферола в сыворотке крови: 1 – контрольная группа; 2 – пациенты со стеатогепатитом, развивающемся при СД 2 типа, до лечения; 3 – пациенты со стеатогепатитом, развивающемся при СД 2 типа, после базисной терапии; 4 – пациенты со стеатогепатитом, развивающемся при СД 2 типа, после комбинированного лечения с эпифамином (до лечения , после лечения .

ЛИТЕРАТУРА

Таким образом, при включении эпифамина в лечение наблюдалась тенденция дальнейшего возрастания каталазной активности, что могло иметь значение с точки зрения коррекции свободнорадикального гомеостаза при патологии.

В сыворотке крови больных 1-й группы до проведения лечения содержание α -токоферола было в 1,9 ($p \leq 0,05$) раза меньше по сравнению с контролем. Очевидно, это было связано с расхождением данного метаболита в ответ на чрезмерное образование АФК. После проведения базисной терапии концентрация α -токоферола увеличивалась в 1,3 ($p \leq 0,05$) раза. Таким образом, базисное лечение благоприятно влияло на АОС и как следствие, способствовало восстановлению уровня α -токоферола, изменяя его содержание в крови в сторону нормы. В сыворотке крови пациентов 2-й группы перед проведением лечения наблюдалось аналогичное снижение концентрации α -токоферола. После комбинированной терапии с эпифамином содержание α -токоферола увеличивалось в 1,6 ($p \leq 0,05$) раза, что выше, чем в 1-й группе. Поскольку α -токоферол является основным антиоксидантом, находящимся в липидной фазе мембран и защищающим клетку от АФК, то, очевидно, возрастание его концентрации свидетельствует о позитивном действии мелатонина, уровень которого корректируется под действием эпифамина, на свободнорадикальный гомеостаз организма.

Таким образом, включение эпифамина в базисную терапию, по-видимому, приводит к уменьшению выраженности окислительного стресса, нормализации метаболизма и снижению цитолитического синдрома у больных с жировой дистрофией печени, развивающейся при СД 2 типа.

1. Арушанян Э.Б., Арушанян Л.Г., Симонов И.А. Физиологические и фармакологические особенности эпифизарных пептидов // Экспер. и клин. фармакол. – 2001. – Т. 64, № 4. – С. 73–79.
2. Матасова Л.В. Лабораторные работы и задачи по биохимии / Воронеж : ВГУ, 2006.
3. Матюшин Б.Н. Определение супероксиддисмутазной активности в материале пункционной биопсии печени при ее хроническом поражении // Лаб. дело. – 1991. – № 7. – С. 16-19.
4. Морозкина Т.С., Мойсеёнок А.Г. Витамины. – Минск : Асар, 2002. – С. 66-72.
5. Попов С.С., Шульгин К.К., Пашков А.Н. Особенности функционирования глутатионовой системы и NADPH-генерирующих ферментов в крови больных лекарственным гепатитом при комбинированной терапии с эпифамином // Биомедицинская химия – 2012. – Т. 58, № 1. – С. 104-111.
6. Шилова Л.Н., Емельянов Н.Н. Значение антител к эритроцитарной супероксиддисмутазе в изменении ее активности при системной склеродермии // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2011. – № 3. – С. 39-41.
7. Dianzani M.U. Biochemical aspects of fatty liver // Hepatotoxicology / Ed. Meeks R.G., Harrison S.D., Bull R.J. – Boca Raton, FL: CRC Pr. – 1991. – P. 327-399.
8. Pei Z., Pang S.F., Cheung T.F. Administration of melatonin after onset of ischemia reduces the volume of cerebral infarction in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model // Stroke – 2003. – Vol. 34, N 3. – P. 770-775.
9. Tomas-Zapico C., Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes // J. Pineal Res. – 2005. – Vol. 39, N 2. – P. 99-104.