

в качестве одного из ведущих критериев для разработки долгосрочных прогностических сценариев при ЦП.

Полученные данные могут быть использованы как для прогнозирования самого факта развития ЦП у лиц, входящих в группу повышенного риска, так и для разработки индивидуальных прогностических сценариев дальнейшего развития и вероятного исхода уже имеющегося ЦП в каждом конкретном случае. Создание таких прогностических сценариев должно учитывать расовую и популяционную принадлежность пациентов, полиэтиологичность заболевания, а также наличие возрастной (в некоторых случаях и половой) рестрикции аллельных вариантов генов HLA.

Диагностическая ценность метода при ЦП может быть существенно расширена за счет использования при разработке прогностических сценариев помимо продуктов HLA и других показателей, в первую очередь критериев класса тяжести по Child-Pugh.

Следует отметить, что особая привлекательность использования HLA-системы в качестве инструмента долгосрочного прогноза связана с тем, что, определив однократно у пациента фенотип HLA (стабильный в течение всей жизни человека), в дальнейшем можно делать многочисленные прогностические выводы, касающиеся индивидуального течения заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко А. Л. HLA и болезни. – Киров, 1999. – 194 с.
2. Ильченко Л. Ю., Винницкая Е. В., Васнев О. С. и соавт. Проблемы диагностики и лечения основных осложнений цирроза печени // Фарматека. – 2007. – № 2. – С. 71–78.
3. Павлов Ч. С. Принципы диагностики и подходы к терапии фиброза и цирроза печени // Рос. мед. журн. – 2007. – Т. 9. № 1. – С. 11–15.
4. Северов М. В. Обратимость фиброза и цирроза печени при HCV-инфекции // Гепатологический форум. – 2008. – № 1. – С. 2–6.
5. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей: Практическое руководство. Пер. с англ. / Под ред. З. Г. Апросиной, Н. А. Мухина. – М.: ГЭОТАР Медицина – 2002. – 864 с.
6. Яковенко А. В., Яковенко Э. П. Цирроз печени: вопросы терапии // Consilium medicum. – 2006. – Т. 8. № 7. – С. 13–17.
7. Brewerton D. A. Discovery: HLA and disease // Curr. Opin. Rheumatol. – 2003. – V. 15. № 4. – P. 369–373.
8. Donaldson P. T., Czaja A. J. Genetic effects on susceptibility, clinical expression, and treatment outcome of type 1 autoimmune hepatitis // Clin. Liver Dis. – 2002. – V. 6. № 3. – P. 419–437.
9. Fattovich G., Bortolotti F. A. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors // J. Hepatol. – 2008. – V. 48. № 2. – P. 335–352.
10. Mendez C., Marsano L., Hill D. et al. Alcoholic liver disease. Therapy. Gastroenterology and liver disease. Fifth Edition T. M. Bayless. – 2005. – P. 665–671.

Поступила 11.12.2009

З. И. МИКАШИНОВИЧ, О. Г. ИШОНИНА, Е. В. ОЛЕМПИЕВА

БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Кафедра общей и клинической биохимии № 1

ГОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет»,

Россия, 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29. E-mail: olempieva@yandex.ru

Цель исследования – оценка выраженности окислительного стресса и особенности функционирования антиоксидантной защиты организма пациентов с СД 2-го типа в стадии субкомпенсации и декомпенсации. Установлено, что при СД 2-го типа отмечается развитие окислительного стресса вследствие дисрегуляции системы «прооксиданты – антиоксиданты», более выраженного при декомпенсированной форме. Рост окисленно-модифицированных форм ЛП обусловлен усилением их окислительной модификации за счет как неферментативного гликозилирования апо-белков, так и в результате повреждения их липидного компонента активными формами кислорода. Изменение активности гл-6-ФДГ может служить биохимическим маркером степени компенсации гипергликемии.

Ключевые слова: сахарный диабет, окислительный стресс, антиоксидантная защита, липопропротеиды.

Z. I. MIKASHINOVICH, O. G. ISHONINA, E. V. OLEMPIEVA

BIOCHEMICAL MECHANISM OXIDATIVE STRESS DEVELOPMENT AT PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS

*SEE HPE «Rostov State Medical University», general and clinic biochemistry department № 1,
Russia, 344022, Rostov-on-Don, str. Nahichevansky, 29. E-mail: olempieva@yandex.ru*

The purpose of the investigation is the estimation of the evidence of oxidative stress and fermentative antioxidant protection of the patient's organism with subcompensated and decompensated type II diabetes. Resumed that at type II diabetes take place development of the oxidative stress because occur dysregulation of prooxidant-antioxidant systems and at decompensated type II diabetes this processes more marked. Increase of modified forms of lipoproteins conditioned intensification of they oxidant modification as occur nonenzyme glycosylation of apoprotein and injuries they lipidic component by active forms of oxigens. The

change of the activity of the glucose 6-phosphate dehydrogenase may serve of biochemical marker of the degree of the compensation of the hyperglycemia.

Key words: type 2 diabetes, oxidative stress, antioxidant protection, lipoproteins.

Введение

Сахарный диабет (СД) на сегодняшний день является актуальной медико-социальной проблемой различных областей медицинской науки. Патогенетической основой СД служит деструкция β -клеток островков Лангерганса, которая приводит к недостаточной секреции инсулина (СД 1-го типа), или нарушения функциональной активности организма, которые изменяют чувствительность клеток к инсулину (СД 2-го типа). Клиническая значимость метаболических нарушений, возникающих при сахарном диабете, заключается в том, что они сопровождаются поражением макро- и микрососудистого русла. Высокий риск развития осложнений при данном заболевании значительно ухудшает качество жизни пациентов с разной степенью компенсации уровня гипергликемии. Актуальность проблемы диабетических ангиопатий наглядно подтверждается тем, что среди пациентов с СД в возрасте до 20 лет смертность в 7 раз превышает таковую среди населения в целом, а после достижения 20-летнего возраста среднегодовой риск смертности в 20 раз выше по сравнению с общей популяцией [1].

На основе многочисленных исследований установлена ведущая роль свободнорадикального окисления в процессах структурно-функциональной дестабилизации многих органов и систем при различных патологических состояниях. При сахарном диабете абсолютная или относительная недостаточность инсулина и гипергликемия повышают уровень окислительного стресса. В работе [2] показано, что при гипергликемии существует несколько механизмов развития окислительного стресса:

вследствие повышенного образования реактивных оксидантов, образующихся при окислении как самих углеводов, так и углеводов, образующих комплексы с различными белками;

вследствие снижения активности антиоксидантной системы организма;

вследствие нарушения функционирования ферментов обмена глюкозы, митохондриального окисления, обмена простагландинов и лейкотриенов;

вследствие нарушения обмена витаминов и некоторых металлов.

В исследованиях последних лет выдвигается гипотеза о том, что локальное развитие окислительного стресса в области самой поджелудочной железы вызывает снижение секреции инсулина и может индуцировать повреждение β -клеток [16]. Следует подчеркнуть, что окислительный стресс ассоциирован с инсулинорезистентностью и у пациентов с риском развития СД еще до дебюта заболевания [2].

Однако, несмотря на многочисленные исследования свободнорадикальных процессов у пациентов с разными формами СД, остается неясным вопрос, как изменяются ферментативная активность и липопротеидный статус организма у пациентов с СД в стадии субкомпенсации и декомпенсации.

В этой связи целью нашего исследования явилась изучение биохимических механизмов развития окисли-

тельного стресса у пациентов с СД 2-го типа с разной стадией компенсации гипергликемии.

Материалы и методы

Общепризнанным критерием, который позволяет оценивать уровень компенсации СД, является содержание гликозилированного гемоглобина. Так, при содержании данного параметра 6–8,9% от общего гемоглобина уровень гипергликемии признан субкомпенсированным, тогда как превышение его величины более чем на 9% свидетельствует о декомпенсированном состоянии. На основании этого все пациенты с СД 2-го типа были условно разделены на две группы. В группу сравнения вошли 30 пациентов с верифицированным СД 2-го типа в стадии субкомпенсации в возрасте $67,1 \pm 2,5$ года. В клиническую группу вошли 30 пациентов с верифицированным СД 2-го типа в стадии декомпенсации в возрасте $67,6 \pm 2,4$ года. Все пациенты находились в эндокринологическом отделении клиники Ростовского государственного медицинского университета с целью подбора эффективных схем коррекции гипергликемии и на момент забора биологического материала не получали медикаментозной терапии.

Материалом для исследования нами выбраны эритроциты, сыворотка и плазма венозной крови, стабилизированной гепарином, взятые натощак. Для достижения поставленной цели определяли активность супероксиддисмутазы (СОД) по Н. Р. Misra, J. Fridovich в описании З. И. Микашинович [8], каталазы по М. А. Королюк [6], глутатионпероксидазы (ГПО) по методу В. М. Моина [7], глутатионредуктазы (ГР) по методу Л. В. Юсуповой [14], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (гл-6-ФДГ) по методу А. Корнберга в модификации Ю. Л. Захарьина [3], количество восстановленного глутатиона по методу S. L. Ellman [15]. Для оценки степени выраженности деструкции клеточных элементов мы определяли концентрацию малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови по методу И. Д. Стальной [11], а также концентрацию внеэритроцитарного гемоглобина (ВЭГ) плазмы по методу [5].

Липопротеидный статус оценивали по количеству гепариносаждаемой фракции β -лиipoproteидов (β -ЛП) в описании И. Тодорова [13], окисленных ЛП по Г. И. Музе [9], резистентных к окислению ЛП по И. Ю. Рагино [10], а также по уровню холестерина липопротеидов высокой плотности (ХСЛПВП) по методу, описанному Н. У. Тицей [12].

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили согласно общепринятым методам с определением средней арифметической, ошибки средней с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft). О достоверности показателей контрольной и клинических групп судили по величине t -критерия Стьюдента после проверки распределения на нормальность. Статистически достоверными считали отличия, соответствующие оценке ошибки вероятности $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В данном исследовании проведен сравнительный анализ изменений метаболического обеспечения организма при разных стадиях компенсации СД. Нами установлено, что возникающая гипергликемия у пациентов с СД 2-го типа в стадии декомпенсации приводит к более значительному усилению процессов свободнорадикального окисления вследствие дисрегуляции ферментов антиоксидантной защиты (АОЗ). В частности, отмечается выраженный рост концентрации ВЭГ плазмы у пациентов клинической группы – на 21,6% ($p < 0,05$) на фоне более значительного роста концентрации МДА – на 30,6% ($p < 0,05$), что свидетельствует об интенсификации процессов липидной пероксидации и развитии выраженного окислительного стресса. Значительное накопление ТБК-активных продуктов в сыворотке крови приводит, в свою очередь, к формированию эндотелиальной дисфункции и является молекулярной основой развития сосудистых осложнений у пациентов с СД 2-го типа.

При этом в эритроцитах отмечается снижение ферментативной активности СОД на 24,1% ($p < 0,05$) относительно группы сравнения. Причем данные изменения сопровождаются более значительным угнетением активности каталазы – на 48,5% ($p < 0,05$) относительно той же группы. Такие нарушения ферментативной активности первой линии антиоксидантной защиты у пациентов с декомпенсированной формой СД 2-го типа мы расцениваем как результат неферментативного гликозилирования аминокислотных остатков лизина в структуре данного фермента.

Необходимо указать, что декомпенсированная форма СД характеризуется неоднозначными изменениями ферментов и второй линии АОЗ. Так, нами зарегистрировано статистически достоверное снижение активности ГР – на 19,7% ($p < 0,05$) на фоне выраженного роста активности гл-6-ФДГ – на 61,5% ($p < 0,05$). При этом отмечается тенденция к снижению концентрации GSH на 6,0% при отсутствии значимых изменений активности ГПО относительно группы сравнения. Очевидно, данные перестройки метаболизма обусловлены истощением глутатионзависимого ферментативного звена АОЗ вследствие длительного воздействия стресс-лимитирующего фактора – гипергликемии. Однако в данной группе пациентов зарегистрирован рост активности гл-6-ФДГ, что может быть связано с резким угнетением гликолиза и компенсаторным увеличением утилизации глюкозы по пентозофосфатному пути в условиях более значимой гипергликемии. Следовательно, можно полагать, что изменение активности гл-6-ФДГ у пациентов с СД 2-го типа может служить биохимическим маркером уровня компенсации гипергликемии и использоваться в качестве критерия эффективности проводимого лечения.

Для оценки эффективности работы АОЗ мы рассчитывали коэффициент СОД/ГПО. Оказалось, что у пациентов с СД в стадии декомпенсации он уменьшается на 26,2% ($p < 0,05$) относительно группы сравнения, что свидетельствует о снижении функциональной активности антиоксидантной защиты клеток.

Нарушение динамического равновесия в системе «прооксиданты – антиоксиданты» неизбежно приводит к формированию окислительного стресса и способствует развитию деструктивных изменений в органах и тканях. На сегодняшний день общепризнанным критерием интенсификации процессов сво-

боднорадикального окисления помимо МДА является уровень окислительной модификации липопротеидных частиц. Так, нами установлено, что у обследуемой группы пациентов дисфункция антиоксидантной системы характеризуется нарушениями липопротеидного статуса. В частности, у пациентов с СД 2-го типа в стадии декомпенсации отмечается выраженный статистически достоверный рост общего количества атерогенных β -липопротеидов – на 58,9% ($p < 0,05$) относительно группы сравнения. Такие изменения свидетельствуют о высоком риске развития атеросклеротических изменений сосудистой стенки. Данное предположение документировано снижением концентрации ХСЛПВП на 20,9% ($p < 0,05$) относительно той же группы.

Известно, что ЛП-частицы, циркулируя в кровотоке, могут подвергаться окислительной модификации как непосредственно активными кислородными метаболитами, так и другими компонентами, в частности, металлами переменной валентности. Важно указать, что отмечается выраженный рост концентрации окисленно-модифицированных форм ЛП – на 36,6% ($p < 0,05$) на фоне более значительного снижения концентрации резистентных к окислению форм – на 72,3% ($p < 0,05$). Очевидно, что выраженный рост окисленно-модифицированных форм ЛП обусловлен усилением их окислительной модификации за счет как неферментативного гликозилирования апо-белков при выраженной гипергликемии, так и в результате повреждения их липидного компонента непосредственно активными формами кислорода при развитии системного окислительного стресса. Снижение же резистентных к окислению форм ЛП мы расцениваем как неблагоприятный прогностический признак, так как оно обусловлено уменьшением субстратов для процессов свободнорадикального окисления и свидетельствует об истощении их резерва. Очевидно, данные изменения являются молекулярной основой развития сосудистых осложнений, а особая роль в этом принадлежит окисленным ЛП, так как они повышают тонус сосудистой стенки за счет роста концентрации цитозольного кальция в эндотелиальных клетках, подавляют действие эндотелиальных факторов релаксации за счет угнетения синтеза нитроксильного радикала, повышают экспрессию эндотелина I. Принимая во внимание данные, свидетельствующие о статистическом росте концентрации ВЭГ плазмы, можно утверждать, что окислительная модификация циркулирующих в кровотоке липопротеидных комплексов при декомпенсированной форме СД 2-го типа осуществляется не только активными кислородными метаболитами, но и металлами переменной валентности.

Одним из механизмов компенсации нарушений микроциркуляторного русла при эндотелиальной дисфункции у пациентов с СД 2-го типа в стадии декомпенсации является рост концентрации пероксида водорода. Так, нами установлено, что у данной группы пациентов отмечается выраженный рост коэффициента СОД/каталаза – на 47,1% ($p < 0,05$) относительно группы сравнения. Такие изменения можно считать компенсаторно-приспособительной реакцией, направленной на стимуляцию эндотелийнезависимой вазодилатации, а данный коэффициент может служить лабораторным критерием эффективности функционирования микроциркуляторного русла у данной группы пациентов.

В заключение можно сказать, что:

сахарный диабет 2-го типа характеризуется развитием окислительного стресса, более выраженным при декомпенсированной форме,

рост окисленно-модифицированных форм ЛП у пациентов с СД 2-го типа в стадии декомпенсации обусловлен усилением их окислительной модификации как за счет неферментативного гликозилирования апо-белков, так и в результате повреждения их липидного компонента активными формами кислорода,

изменение активности гл-6-ФДГ у пациентов с СД 2-го типа может служить биохимическим маркером уровня компенсации гипергликемии и использоваться в качестве критерия эффективности проводимого лечения,

рост коэффициента СОД/каталаза у пациентов с СД 2-го типа в стадии декомпенсации можно считать компенсаторно-приспособительной реакцией, направленной на стимуляцию эндотелийнезависимой вазодилатации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин М. И., Клебанова Е. М., Кремская В. М. Дифференциальная диагностика и лечение эндокринных заболеваний. – М.: МИА, 2008. – С. 752.
2. Бондарь Т. П., Козинец Г. И. Лабораторно-клиническая диагностика сахарного диабета и его осложнений. – М., 2003. – С. 88.
3. Захарьина Ю. Л. Метод определения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы // Лабораторное дело. – 1967. – № 6. – С. 327–330.
4. Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньщикова Е. Б. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспект. – М.: Наука, 2001. – С. 340.
5. Карахеев А. В., Вячев Е. П. Микрометоды в клинической лаборатории. – София: Медицина и физкультура. – 1973. – С. 256.

6. Королюк М. А., Иванова Л. И., Монтарева В. Е. Метод определения каталазы // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.

7. Моин В. М. Простой и специфичный метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лабораторное дело. – 1986. – № 12. – С. 724–727.

8. Микашинович З. И., Олемпиева Е. В. Состояние антиоксидантного статуса крови при физиологическом и осложненном течении беременности // Бюллетень сибирской медицины. – 2008. – Т. 7. № 2. – С. 101–105.

9. Музы Г. И., Куликов В. И., Пономарева И. В. и соавторы. Окисление липопротеинов в крови женщин при патологическом течении беременности // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – № 3. – С. 8–10.

10. Рагино Ю. Н., Дудкин М. И. Резистентность к окислению гепарин-осажденных β-липопротеидов сыворотки крови при ишемической болезни сердца // Клиническая лабораторная диагностика. – 1998. – № 11. – С. 3–5.

11. Стальная И. Д., Гаришвили М. Г. Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1974. – С. 66–68.

12. Тица Н. У. Клиническая оценка лабораторных тестов. – М.: Медицина, 1986. – С. 478.

13. Тодоров Й. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. – София, 1963. – С. 726–728.

14. Юсупова Л. Б. О повышении точности определения активности глутатионредуктазы эритроцитов // Лабораторное дело. – 1989. – № 4. – С. 19–21.

15. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups // Arch. Biochem. Biophys. – 1959. – Vol. 82. – P. 70–77.

16. Rossen P., Zink S., Tschöpe D. Vascular damage due to oxidative stress: a pathogenetic concept for diabetic macro- and microangiopathy // Structural and Functional Abnormalities in Subclinical Diabetic Angiopathy. – Basel, 1992. – Vol. 22. – P. 23–31.

Поступила 08.01.2010

Г. М. МОГИЛЬНАЯ¹, В. А. ПОРХАНОВ^{2, 3}, А. А. ЕВГЛЕВСКИЙ¹, Н. А. ШКОЛЯР^{1, 3}

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ КАТИОННОГО БЕЛКА И УРОВНЯ ОПТИЧЕСКОЙ АНИЗОТРОПИИ ХРОМАТИНА НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ИСКУССТВЕННОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

¹Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии Кубанского государственного медицинского университета,

Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4;

²кафедра онкологии с курсом торакальной хирургии

ФПК и ППС Кубанского государственного медицинского университета,

Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4;

³краевая клиническая больница № 1 им. профессора С. В. Очаповского,

Россия, 350086, г. Краснодар, ул. 1 Мая, 167. E-mail: nwe200477@mail.ru

Методами поляризационной микроскопии и цитохимии изучены топологические характеристики ядер НГ периферической крови у 116 кардиохирургических больных в условиях искусственного кровообращения, а также содержание катионного белка в их цитоплазме. Показано, что в период первых 30 минут искусственного кровообращения наблюдается прогрессивное снижение уровня анизотропии ядерного хроматина НГ, свидетельствующее об увеличении его биологической активности и уменьшении содержания катионного белка НГ, что, видимо, связано с активным его расходом в системе кровотока. В период с 60-й минуты ИК и до конца исследования происходит постепенное уменьшение биологической активности хроматина НГ при достаточно высоком уровне расходования КБ.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, искусственное кровообращение, катионный белок, анизотропия хроматина.