

На правах рукописи

Одинокова Ольга Александровна

**КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ
ПАРАМЕТРОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО/КАРБОНИЛЬНОГО СТРЕССА
ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА**

03.01.04 – Биохимия

14.01.02 – Эндокринология

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) и в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор
доктор медицинских наук

Ланкин Вадим Зиновьевич
Недосугова Людмила Викторовна

Официальные оппоненты:

Колесникова Любовь Ильинична, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», научный руководитель

Бирюкова Елена Валерьевна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры эндокринологии и диабетологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»

Защита диссертации состоится «___» _____ 2019 г. в ___ на заседании диссертационного совета Д 208.084.05 при ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, по адресу: 390026, г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (390026, г. Рязань, ул. Шевченко, 34, корп. 2) и на сайте www.rzgmu.ru

Автореферат разослан «___» _____ 20___ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, доцент

Фомина М.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Сахарный диабет по распространенности занимает второе место после заболеваний сердечно-сосудистой системы среди неинфекционных болезней, в связи с этим сахарный диабет называют «неинфекционной эпидемией». В 2017 г. в мире было зарегистрировано 425 млн. человек, страдающих сахарным диабетом, причем по прогнозам к 2045 г. эта цифра увеличится до 629 млн. (diabetes atlas.org). Сахарный диабет является фактором риска возникновения атеросклероза, причем, основной причиной смертности пациентов с сахарным диабетом 2 типа (СД2) являются сердечно-сосудистые осложнения, развивающиеся вследствие прогрессирования атеросклероза (по данным ВОЗ более 75% пациентов с диабетом умирают в результате сердечно-сосудистых катастроф (Foley R.N. et al., 1997). Поскольку прогрессирование атеросклероза сопровождается развитием окислительного стресса (Lankin V.Z. et al., 2000,2017), достаточно давно было высказано предположение о том, что и при СД2 возможна активация свободнорадикальных процессов (Oberley L.W., 1988). Это представляется тем более вероятным, поскольку автоокисление глюкозы при гипергликемии может способствовать образованию активных форм кислорода (АФК) и органических свободных радикалов, являющихся мощными повреждающими факторами в организме (Lankin V.Z. et al., 2016). Несмотря на то, что интенсификация свободнорадикальных процессов в присутствии возрастающих концентраций глюкозы была продемонстрирована экспериментально (Lankin V.Z. et al., 2016), наличие окислительного стресса при СД2 было постулировано лишь на основании косвенных показателей, главным образом, на основании регистрации повышенного уровня вторичного продукта свободнорадикального окисления липидов - малонового диальдегида (МДА) в плазме крови больных (Piconi L. et al, 2003). Тем не менее, реакция с 2-тиобарбитуровой кислотой (2-ТБК), обычно используемая для анализа содержания МДА, обладает низкой специфичностью, поскольку с 2-ТБК в условиях определения могут реагировать различные вещества плазмы крови

отличные от МДА (Lankin V.Z., Tikhaze A.K., 2017). В связи с этим, в англоязычной литературе при таких определениях предлагается использовать термин не МДА, а thiobarbituric acid-reactive substances – TBARS. Таким образом, только увеличенный уровень TBARS не может рассматриваться в качестве абсолютно корректного критерия наличия окислительного стресса при СД2. В связи с этим, в имеющихся до настоящего времени публикациях, постулирование наличия окислительного стресса у больных СД2 основывается, главным образом, на теоретических предположениях, либо данных, которые не могут однозначно свидетельствовать о развитии окислительного стресса, таких как увеличение уровня TBARS и изопростанов, увеличение генерирования АФК, образование нитро-производных белков и т.п. При окислительных превращениях глюкозы в крови больных СД2, прежде всего, накапливаются низкомолекулярные реакционноспособные карбонильные соединения, отличные от МДА, что рассматривается как проявление карбонильного стресса. Действительно, образующиеся при СД2 природные дикарбонилы, такие как глиоксаль (гомолог МДА) и метилглиоксаль (изомер МДА), могут модифицировать структуру и нарушать нормальное функционирование белков, а образование разнообразных свободных радикалов при соокислении липидов и глюкозы может вызывать окислительную деструкцию молекул ДНК (в частности, вызывать укорочение длины теломерных повторов ДНК, что может рассматриваться как проявление преждевременного старения). Очевидно, что любое логичное теоретическое предположение для того, чтобы оно стало научным фактом, необходимо подтвердить конкретными экспериментальными данными. Исходя из вышеизложенного, нам представлялось важным в рамках комплексного исследования больных СД2 с нарушениями углеводного обмена провести одновременное изучение параметров, характеризующих выраженность окислительного и карбонильного стресса, т.е. показателей, ответственных за окислительную модификацию белков и окислительный катаболизм молекул ДНК с целью получения возможно более убедительных и

неопровержимых доказательств развития окислительного и карбонильного стресса при СД2.

Кроме того, представлялось необходимым исследовать информативность ряда параметров, характеризующих выраженность окислительного и карбонильного стресса, для оценки эффективности терапии СД2. Исходя из выше изложенного, тема настоящей работы представляется весьма актуальной в связи с чрезвычайной теоретической и практической важностью проблемы. Основные пути окислительных превращений глюкозы при СД2 и возможные патогенетические последствия этих процессов представлены на рис. 1.



Рисунок 1 – Свободнорадикальное окисление липидов и глюкозы при атеросклерозе и сахарном диабете, а также возможные патогенетические последствия интенсификации свободнорадикальных процессов (окислительный и карбонильный стресс)

Степень разработанности темы исследования

Теоретическое обоснование возможности развития окислительного стресса при сахарном диабете было сделано в обзоре L.W. Oberley (1988). С использованием модели аллоксанового диабета на экспериментальных животных было показано, что бета-клетки поджелудочной железы весьма чувствительны к действию АФК, причем резистентность морских свинок к действию аллоксана объяснима высоким уровнем активности антиоксидантных ферментов в панкреасе этих животных (Корчин В.И., Ланкин В.З. и др., 1992). В последующие годы было установлено, что в плазме крови больных СД2 повышен уровень TBARS (Piconi L. et al, 2003), что было трактовано как проявление признаков окислительного стресса, хотя только этот критерий не может быть признан в качестве абсолютного доказательства наличия окислительного стресса. Таким образом, назрела необходимость комплексного исследования параметров окислительного стресса при СД2.

Цель исследования

Изучить информативность параметров окислительного и карбонильного стресса при сахарном диабете и возможность их использования для оценки эффективности сахароснижающей терапии.

Задачи исследования

1. Исследовать параметры окислительного стресса: содержание МДА, активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГП), а также длину теломерных повторов у практически здоровых людей и больных с впервые выявленным СД2 .
2. Исследовать показатели окислительной модификации белков и окислительной деструкции ДНК у больных с ИБС без нарушений углеводного обмена и больных СД2 с нарушениями углеводного обмена.
3. Исследовать влияние природных дикарбонилов, образующихся при окислительных превращениях глюкозы (глиоксаль, метилглиоксаль) на активность СОД эритроцитов человека в условиях *in vitro*.

4. Исследовать возможность использования показателей окислительного/карбонильного стресса для оценки эффективности терапии больных СД2 с нарушениями углеводного обмена.

5. Исследовать корреляционные зависимости между уровнем HbA_{1c} и показателями, характеризующими выраженность окислительного и карбонильного стресса (МДА, ок-ЛНП, активность СОД) у больных СД2.

Научная новизна исследования

Впервые проведено комплексное исследование ключевых параметров окислительного и карбонильного стресса у больных СД2 с выраженными нарушениями углеводного обмена с целью получения корректных доказательств того, что свободнорадикальные реакции играют важную роль в этиологии и патогенезе СД2. Кроме того, впервые проведено комплексное исследование окислительной модификации белков и окислительной деструкции ДНК при СД2 с целью выявления наиболее информативных показателей для оценки эффективности терапии этого заболевания. Впервые при исследовании одной и той же группы больных СД2 с выраженными нарушениями углеводного обмена было установлено наличие окислительных модификаций белковых молекул в плазме крови пациентов, а именно: увеличение уровня модифицированного апопротеина В-100 липопротеидов низкой плотности (ЛНП) и снижение содержания восстановленных белковых тиолов. Впервые в качестве еще одного параметра, свидетельствующего о наличии окислительной модификации белков при СД2 использовали обнаруженное нами снижение активности ключевого антиоксидантного фермента эритроцитов – СОД, поскольку в модельных экспериментах *in vitro* было установлено, что снижение активности СОД может быть вызвано модификацией молекул этого фермента природными дикарбонилами – глиоксалем и метилглиоксалем, образующимися при окислительных превращениях глюкозы в процессе диабетической гипергликемии. При исследовании этой же группы больных СД2 также было выявлено увеличение окислительного катаболизма молекул ДНК, заключающегося в снижении длины теломерных повторов в хромосомах

лейкоцитов крови и увеличении содержания конечного продукта окислительной деструкции ДНК – 8-гидрокси-гуанина в плазме крови и моче больных. Исследование, в котором одновременно изучали столь большое число информативных параметров, однозначно свидетельствующих о значительной окислительной модификации белков и деструкции молекул ДНК при СД2 проведено впервые. У больных СД2 выявлено наличие положительной корреляции между уровнем HbA_{1c} и величиной активности СОД эритроцитов ($r=0,65$; $p<0,0001$). Показано, что в процессе сахароснижающей терапии больных СД2 с использованием бигуанидов, препаратов сульфонилмочевины и инсулинотерапии, снижается содержание окислительно модифицированных липопротеидов низкой плотности (ок-ЛНП) в плазме крови, что может быть использовано в качестве информативных параметров для оценки эффективности проводимой терапии.

Теоретическая значимость работы

В диссертационной работе при выполнении комплексного исследования выявлено наличие окислительной модификации белков и окислительной деструкции ДНК у больных СД2 при использовании разнообразных объективных параметров, что позволяет уточнить механизмы поражения стенки сосудов при этом заболевании.

Практическая значимость

Обнаруженное повышение уровня окислительно модифицированных ЛНП в плазме крови больных СД2 является наиболее корректным показателем, свидетельствующим о наличии окислительного стресса, что может быть использовано в качестве дополнительного критерия тяжести заболевания. Выявленная корреляция между активностью СОД и уровнем HbA_{1c} в эритроцитах больных СД2 может служить основой для разработки принципиально нового метода диагностики и определения тяжести СД2, причем этот метод выгодно отличается простотой осуществления, отсутствием

необходимости дорогостоящей аппаратуры и возможность длительного хранения замороженных образцов.

Методология и методы исследования

В работе были использованы разнообразные современные биохимические методы, методы молекулярной биологии и иммунохимические методы. Об окислительной модификации белков при СД2 судили на основании увеличения степени карбонильной модификации молекул апопротеина В-100 частиц ЛНП, снижения активности СОД и снижения концентрации восстановленных тиолов. Об окислительной деструкции молекул ДНК судили на основании снижения длины теломерных повторов и увеличении содержания конечного продукта окислительной деструкции ДНК - 8-гидроксигуанидина.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Наличие окислительного/карбонильного стресса у больных СД2 подтверждено достоверным увеличением окислительной модификации белков и одновременным достоверным увеличением окислительного катаболизма ДНК.

2. Повышенный уровень окислительно модифицированных ЛНП плазмы крови свидетельствует о наличии и степени выраженности окислительного стресса у больных СД2.

3. Снижение активности эритроцитарной СОД у больных СД2 свидетельствует о развитии карбонильного стресса и на основании этого критерия может быть предложен дополнительный метод биохимической диагностики этого заболевания.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты диссертационного исследования были получены с использованием современных методов с применением высокоточного оборудования. Объем выборки и количество проведенных исследований позволили получить достоверные результаты при статической обработке данных. Результаты работы были доложены на 2-х конференциях:

Международной заочной научно-практической конференции «Наука и образование в XXI веке» (Тамбов, 2013) и VIII Всероссийском диабетическом конгрессе с Международным участием «Сахарный диабет – пандемия XXI века» (Москва, 2018).

Личный вклад автора

Соискатель самостоятельно проводила анализ литературных источников по теме работы, сформулировала цель и задачи исследования, участвовала в выборе методов исследования. Автором были набраны 158 пациентов в исследование, проведен анализ их историй болезни. Соискателем проведен осмотр и обследование пациентов, больные были разделены на группы. Автор проводила измерение активности антиоксидантных ферментов. Также произведена интерпретация полученных данных, систематизация и статистическая обработка результатов. Подготовлены публикации по результатам выполненной работы.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК Минобрнауки РФ.

Сведения о внедрении

Материалы исследования используются в практической работе I и II эндокринологических отделений ГКБ №67 им. Л.А. Ворохобова, эндокринологического отделения ФКУЗ ЦКБ МВД России, а также в качестве лекционного и практического материала на кафедре эндокринологии лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России.

Объем работы

Диссертация изложена на 99 страницах, состоит из введения, трех глав и списка литературы, включающего 216 источников (отечественных – 45, иностранных – 171). Работа иллюстрирована 23 рисунками и содержит 8 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на кафедре эндокринологии лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России на базе ГБУЗ ГКБ № 67 имени Л.А. Ворохобова ДЗМ, а также в Отделе биохимии свободнорадикальных процессов НИИ кардиологии имени А.Л. Мясникова ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава РФ. Всего было обследовано 158 пациентов, из них: 66 больные СД2 (у 41 пациента диагноз установлен впервые, 25 пациентов в различном стаже заболевания), а также 25 больных артериальной гипертонией (АГ) и ИБС без нарушений углеводного обмена и 67 практически здоровых людей, не имеющих нарушений углеводного и липидного обмена (без АГ и ИБС). В первую часть исследования были включены 16 пациентов с впервые выявленным СД2 с нарушениями углеводного обмена (9 муж./7 жен.; $55,4 \pm 1,4$ лет; индекс массы тела (ИМТ) $30,7 \pm 1,2$ кг/м²), не получавших ранее сахароснижающую терапию и высоким уровнем $HbA_{1c} = 10,7\% \pm 1,4$ (на момент исследования имели макрососудистые осложнения). Контрольную группу составили 67 практически здоровых людей (30 муж./37 жен.; $53,8 \pm 3,7$ лет) без нарушений липидного обмена и признаков ИБС, а также без каких-либо клинических проявлений сахарного диабета 2 типа ($HbA_{1c} = 5,5\% \pm 0,1$) (рис.2).

Во вторую часть исследования было включено 50 больных СД2 с выраженными нарушениями углеводного обмена ($HbA_{1c} = 10,7\% \pm 0,3$), из которых 25 пациентам диагноз СД2 был установлен впервые (14 муж./11 жен.; $54,1 \pm 2,4$ лет; ИМТ $31,6 \pm 1,25$ кг/м²; $HbA_{1c} = 11,4\% \pm 0,45$) и которые ранее не получали сахароснижающую терапию. У всех этих больных СД2 были диагностированы макрососудистые осложнения; у 64% - ИБС и у 72% - АГ в анамнезе. Еще 25 больных СД2 с длительным (5-15 лет) течением заболевания (12 муж./13 жен.; $68,4 \pm 2,0$ лет; ИМТ $32,4 \pm 0,79$ кг/м²), у которых $HbA_{1c} = 10,1\% \pm 0,34$, несмотря на получаемую сахароснижающую терапию. У всех больных этой подгруппы были диагностированы макрососудистые

осложнения; у 88% - ИБС, у 96% - АГ. Контролем в этой части исследования были 25 больных ИБС и АГ (16 муж./9 жен.; $62 \pm 1,8$ лет) без каких-либо клинических проявлений СД2 ($HbA_{1c} = 4,6\% \pm 0,05$).

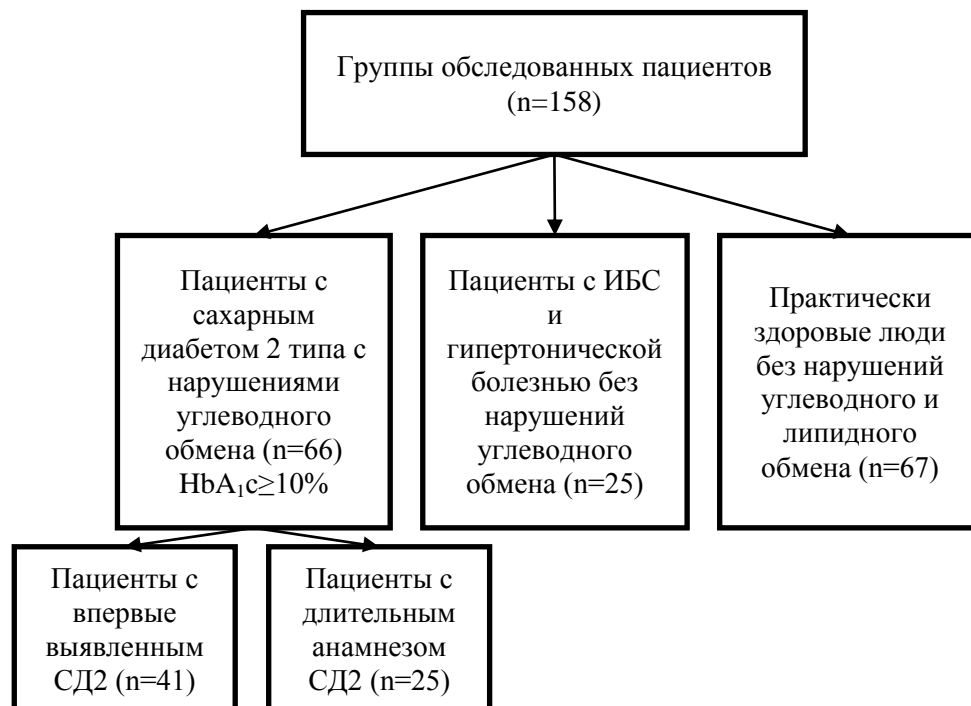


Рисунок 2 – Схема дизайна исследования

Биохимические и иммунохимические методы исследования

1. Исследование параметров липидного обмена проводили на биохимическом анализаторе Beckman Coulter AU 680 (США) при помощи тест-наборов фирмы BioSystems (США);
2. Уровень гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) определяли при помощи капиллярного электрофореза на приборе Capillarys 2 (Франция);
3. Уровень окислительно модифицированных липопротеидов низкой плотности (ок-ЛНП) плазмы крови определяли при помощи тест-наборов Merckodia Oxidized LDL ELISA (содержащих моноклональные антитела к МДА-модифицированным ЛНП) на планшетном спектрофотометре BioTek EL808 (США);

4. Содержание малонового диальдегида (МДА) в плазме крови определяли при помощи реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (2-ТБК) на спектрофотометре Hitachi 220A (Япония);
5. Активность глутатионпероксидазы (ГП) в эритроцитах определяли по окислению NADPH в GSSG-редуктазной системе с использованием гидропероксида трет-бутила в качестве субстрата на анализаторе FP-900 Labsystems Oy (Финляндия);
6. Активность супероксиддисмутазы (СОД) в эритроцитах определяли по ингибированию восстановления синего нитротетразолия супероксидным анион-радикалом, генерируемым в системе ксантин/ксантиноксидаза; активность каталазы в эритроцитах – по утилизации H_2O_2 ; уровень восстановленных тиолов в плазме крови – с помощью реактива Ellman. Все определения проводили на спектрофотометре Hitachi-557 (Япония);
7. Содержание 8-гидрокси-гуанина (8-охо-dG) в плазме крови и моче определяли при помощи тест-наборов Trevigen (США) на планшетном спектрофотометре BioTek EL808 (США);
8. Длину теломерных повторов хромосом лейкоцитов крови определяли при помощи полимеразно-цепной реакции в реальном времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У больных СД2 с выраженными нарушениями углеводного обмена ($HbA_{1c}=10,7\% \pm 1,4$) обнаружено резкое увеличение (почти в 3 раза) содержания вторичного продукта свободнорадикального окисления – МДА в плазме крови по сравнению с группой практически здоровых, у которых уровень гликированного гемоглобина ($HbA_{1c}=5,5\% \pm 0,1$) был в пределах нормы (рис.3) .

У больных СД2 наблюдали также проявление окислительной деструкции ДНК в лейкоцитах крови – уменьшение относительной длины теломеров (почти на 30%) по сравнению с группой практически здоровых пробандов. Одновременно в эритроцитах больных СД2 в этой группе было выявлено снижение активности ключевых антиоксидантных ферментов: СОД (более, чем

в 4 раза) и ГП (почти в 2 раза) по сравнению с группой практически здоровых обследованных (рис.3).

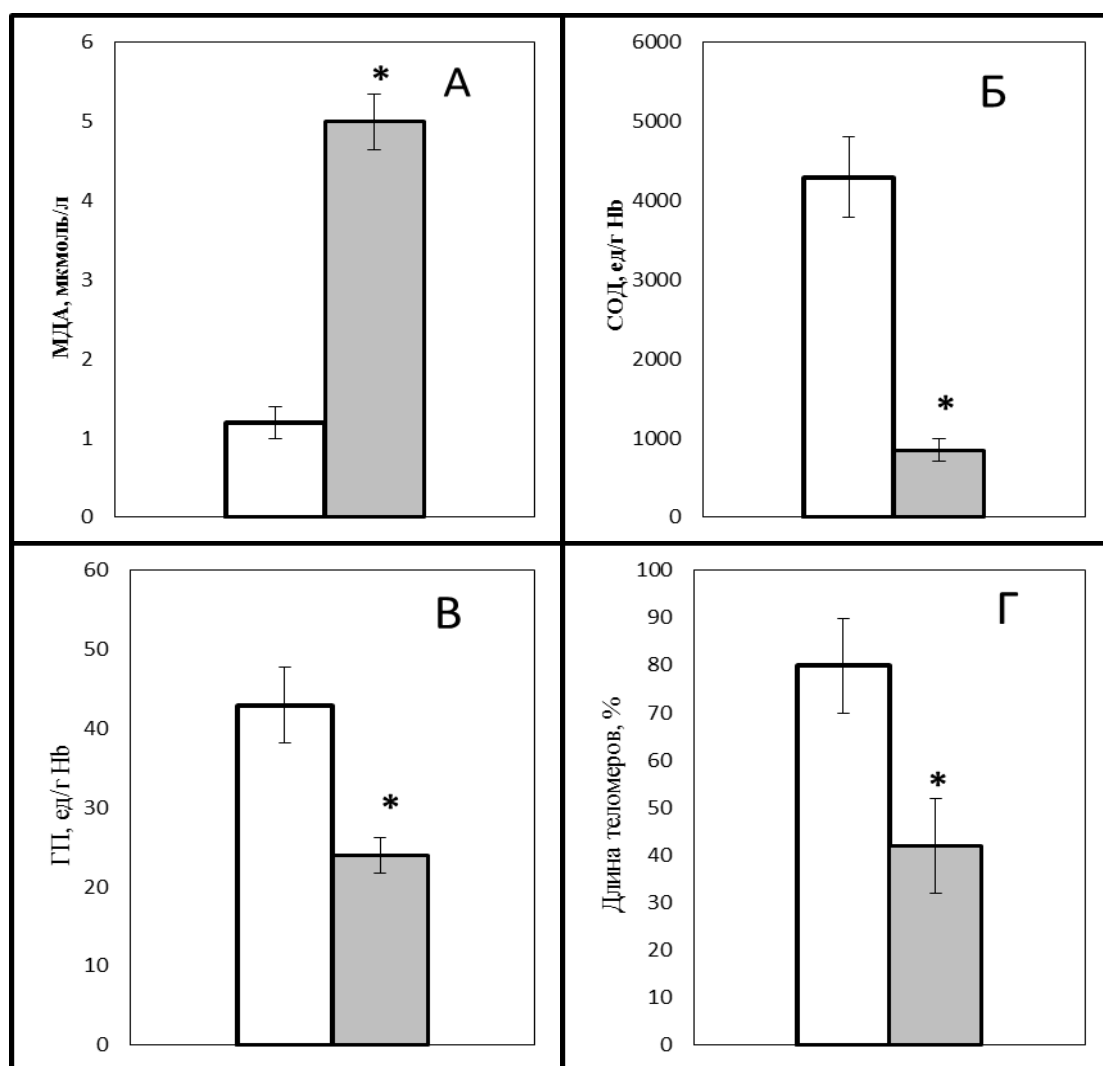


Рисунок 3 – Параметры окислительного стресса: содержание МДА (А), активность СОД (Б), активность ГП (В) и длина теломеров (Г) в крови практически здоровых людей (светлые столбики) и больных СД2 с нарушениями углеводного обмена $\text{HbA}_{1c}=10,7\% \pm 1,4$ (темные столбики) (* $p < 0,05$)

Причина столь резкого снижения активности ключевых антиоксидантных ферментов в эритроцитах больных СД2, с нашей точки зрения, могла быть объяснена ингибированием ферментативной активности вследствие модификации белков природными низкомолекулярными дикарбонилами, накапливающимися в плазме крови при диабете (Lankin V.Z., Tikhaze A.K., 2017).

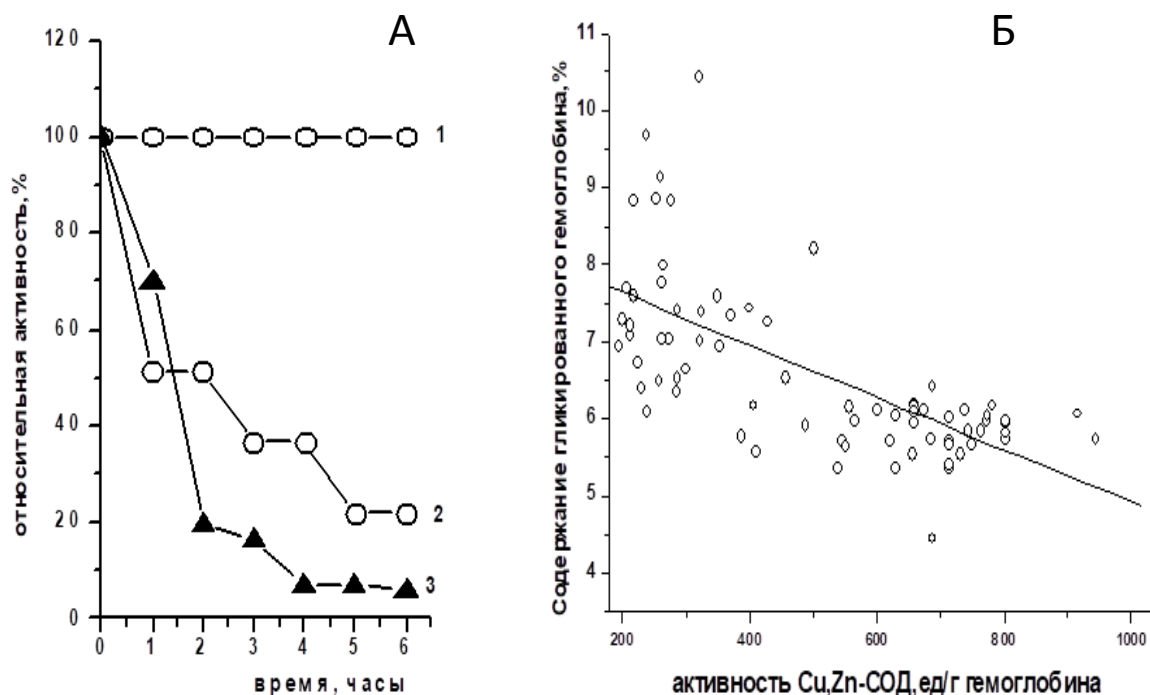


Рисунок 4 – **А** – Влияние глиоксаля (2) и метилглиоксаля (3) на активность СОД в эритроцитах человека *in vitro* (1- контроль без дикарбониллов); **Б** – Корреляция между уровнем HbA_{1c} и активностью СОД в эритроцитах больных СД2

Действительно, в наших экспериментах *in vitro* при инкубации эритроцитов человека в присутствии глиоксаля и метилглиоксаля было обнаружено резкое подавление активности СОД в красных кровяных клетках (рис.4 А).

В связи с тем, что для СОД не существует прямых методов определения активности, анализ параметров ферментативной кинетики невозможен, тем не менее, при исследовании влияния дикарбониллов на другой антиоксидантный фермент – ГП было установлено изменение K_m и V_{max} , свидетельствующее о химической модификации активного центра (Ланкин В.З. и др., 2017). Кроме того, нами была выявлена сильная отрицательная корреляция ($r=0,65$; $p<0,0001$) между активностью СОД и уровнем гликированного гемоглобина в эритроцитах больных СД2, что также может свидетельствовать о модификации молекул фермента, проходящей одновременно с модификацией молекул гемоглобина (рис.4 Б). Следует отметить, что обнаруженный факт может

служить основой для разработки дополнительного метода биохимической диагностики СД2 по падению активности СОД, который имеет преимущества по сравнению с определением HbA_{1c} вследствие простоты, возможности длительного хранения замороженных образцов до проведения анализа и отсутствия необходимости в специальной дорогостоящей аппаратуре.

В исследованной группе больных СД2 мы наблюдали сильную положительную корреляцию между уровнем HbA_{1c} и длительностью анамнеза заболевания ($r=0,83$; $p<0,001$). Эти данные не являются неожиданными, однако показательно, что в этой группе больных СД2 нами была выявлена отрицательная корреляция ($r=0,48$; $p<0,02$) между активностью СОД в эритроцитах и продолжительностью заболевания (рис.5). Очевидно, что эти данные могут являться еще одним аргументом, свидетельствующим о наличии связи между окислительной модификацией СОД и степенью нарушений углеводного обмена при СД2, причем эти данные подтверждают важность и информативность определения активности эритроцитарной СОД в качестве дополнительного биохимического критерия выраженности декомпенсации углеводного обмена при СД2.

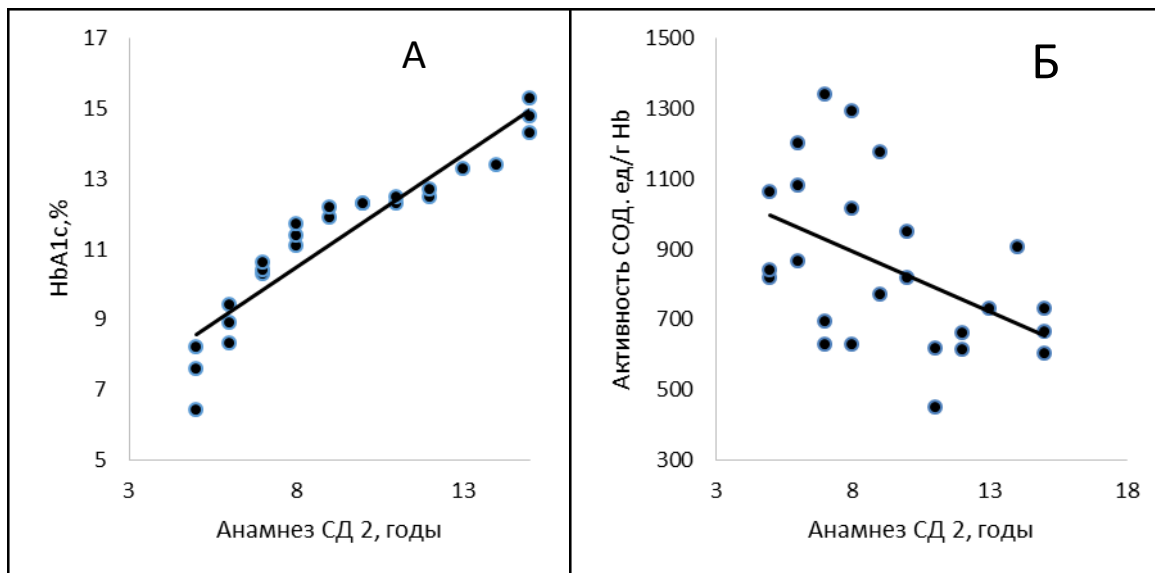


Рисунок 5 – Корреляционные зависимости между уровнем HbA_{1c} (А), а также величиной активности СОД (Б) в эритроцитах и продолжительностью заболевания СД2

Таким образом, данные проведенного нами исследования (рис.3) убедительно свидетельствуют о наличии проявлений окислительного стресса у

больных СД2 с выраженными нарушениями углеводного обмена. Отмеченное нами увеличение уровня МДА в плазме крови больных СД2 (рис.3) согласуется с ранее полученными данными других исследований (Oberley L.W., 1988; Piconi L. et al., 2003), в которых увеличение содержания МДА было выявлено как в крови животных с экспериментальным диабетом, так и в плазме крови больных с СД2. Следует отметить, что наличие окислительного стресса при СД2, постулированное в этих работах, было основано на анализе исключительно косвенных показателей, главным образом, на основании регистрации повышенного уровня МДА в плазме крови больных. Поскольку реакция с 2-ТБК использованная в этих работах для определения содержания МДА обладает низкой специфичностью, в этих работах мог определяться не только МДА, но и различные вещества плазмы крови, способные реагировать с 2-ТБК - TBARS (Lankin V.Z., Tikhaze A.K.,2017). Следовательно, увеличенный уровень TBARS не может рассматриваться в качестве абсолютно корректного критерия наличия окислительного/карбонильного стресса при СД2. Исходя из вышеизложенного, нам представлялось важным в рамках комплексного исследования групп больных СД2 с нарушениями углеводного обмена и больных ИБС без нарушений углеводного обмена провести одновременное изучение параметров, определяющих выраженность окислительного/карбонильного стресса (в том числе, отличных от МДА), характеризующих влияние свободнорадикальных процессов на окислительную модификацию белков и окислительный катаболизм молекул ДНК. В качестве показателей окислительной модификации белков исследовали уровень окислительной модификации апопротеина В-100 частиц ЛНП плазмы крови (ок-ЛНП), уровень восстановленных тиолов в пептидах и протеинах плазмы крови, а также активность СОД и ГП в эритроцитах, падение активности которых при СД2, в соответствии с нашими данными (рис.4А), может быть обусловлено модификацией этих ферментов накапливающимися при диабете низкомолекулярными дикарбонилами (Ланкин В.З. и др., 2017) (рис.3). Кроме того, исследовали показатели, свидетельствующие об окислительной

деструкции молекул ДНК: относительную длину теломеров лейкоцитов крови, а также содержание конечного продукта окислительной деструкции ДНК – 8-охо-dG в плазме крови и моче больных СД2. Полученные данные убедительно свидетельствуют об окислительной модификации белков при СД2 по сравнению с больными ИБС (у которых наблюдается выраженный окислительный стресс (Lankin V., Tikhaze A., 2017), т.к. уровень модифицированного апопротеина В-100 в частицах ЛНП был увеличен на 29,5%, содержание восстановленных тиолов снижено почти на 20% и активность СОД уменьшена более чем на 17% (рис.6).

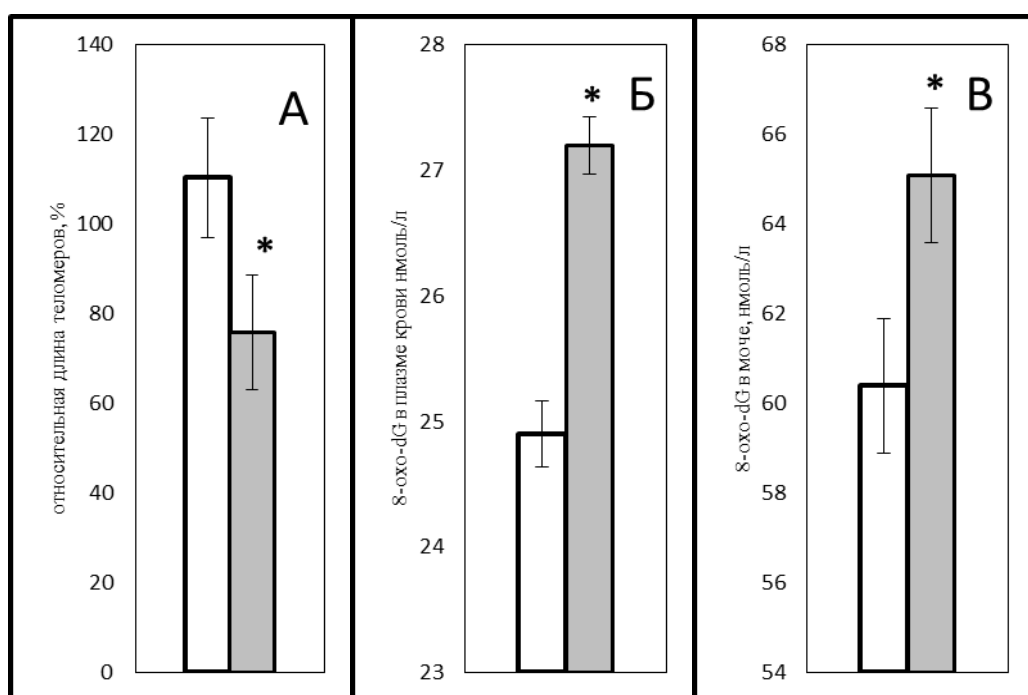


Рисунок 6 – Окислительная модификация белков: увеличение уровня ок-ЛНП (А) и уменьшение содержания восстановленных тиолов (Б) в плазме крови, а также активности СОД в эритроцитах (В) пациентов с ИБС (светлые столбики) и СД2 (темные столбики) (* $p < 0,05$)

У больных по сравнению с больными ИБС также более активно протекает окислительный катаболизм молекул ДНК, о чем свидетельствует снижение относительной длины теломеров в лейкоцитах крови более чем на 30% и достоверное снижение содержания 8-охо-dG в плазме крови и, особенно, в моче обследованных пациентов (рис.7).

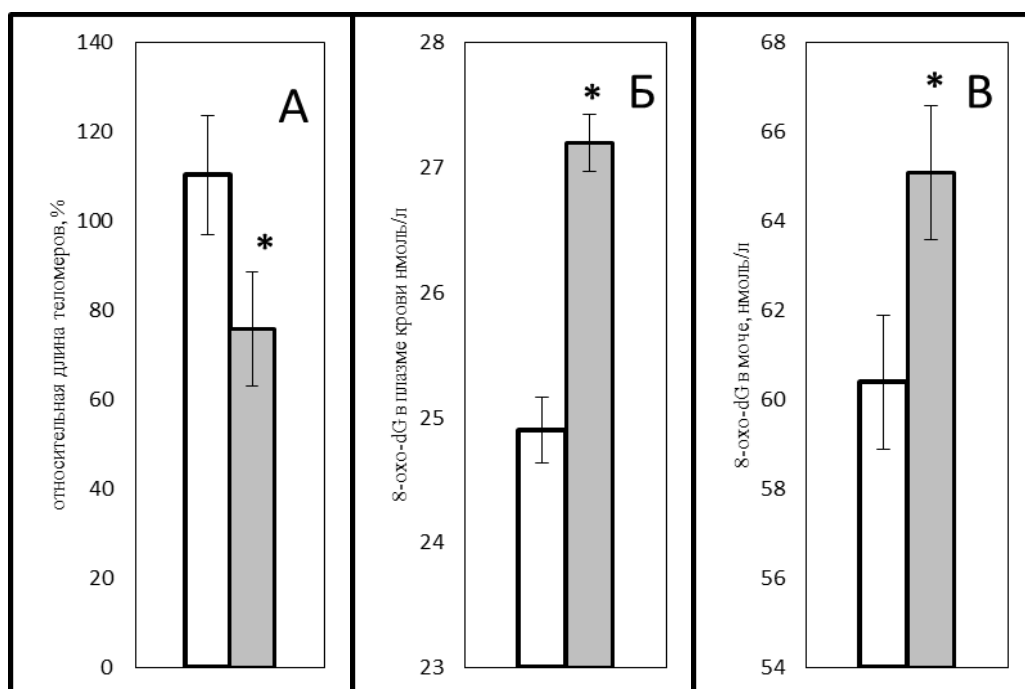


Рисунок 7 – Окислительный катаболизм ДНК: снижение относительной длины теломеров в лейкоцитах крови (А), а также увеличение содержания 8-гидрокси-гуанина в плазме крови (Б) и моче (В) пациентов с ИБС (светлые столбики) и СД2 (темные столбики) (* $p < 0,05$)

Пациентам на момент госпитализации назначали инсулинотерапию в интенсивном режиме с последующим переводом на монотерапию метформином (4 пациента) или комбинированную терапию метформином с инсулином (3 пациента), либо метформином в комбинации с производными сульфонилмочевины (9 пациентов). За 3 месяца у всех пациентов был достигнут целевой уровень HbA_{1c} (снижение на 31%). Одновременно в процессе терапии у больных СД2 наблюдали значительное снижение содержания МДА на 38% и уровня ок-ЛНП на 22% (рис.8).

В процессе сахароснижающей терапии была выявлена положительная корреляция между уровнем HbA_{1c} и концентрацией МДА ($r=0,57$; $p < 0,0001$), а также между уровнем HbA_{1c} и содержанием ок-ЛНП ($r=0,51$; $p < 0,003$) (рис.9).

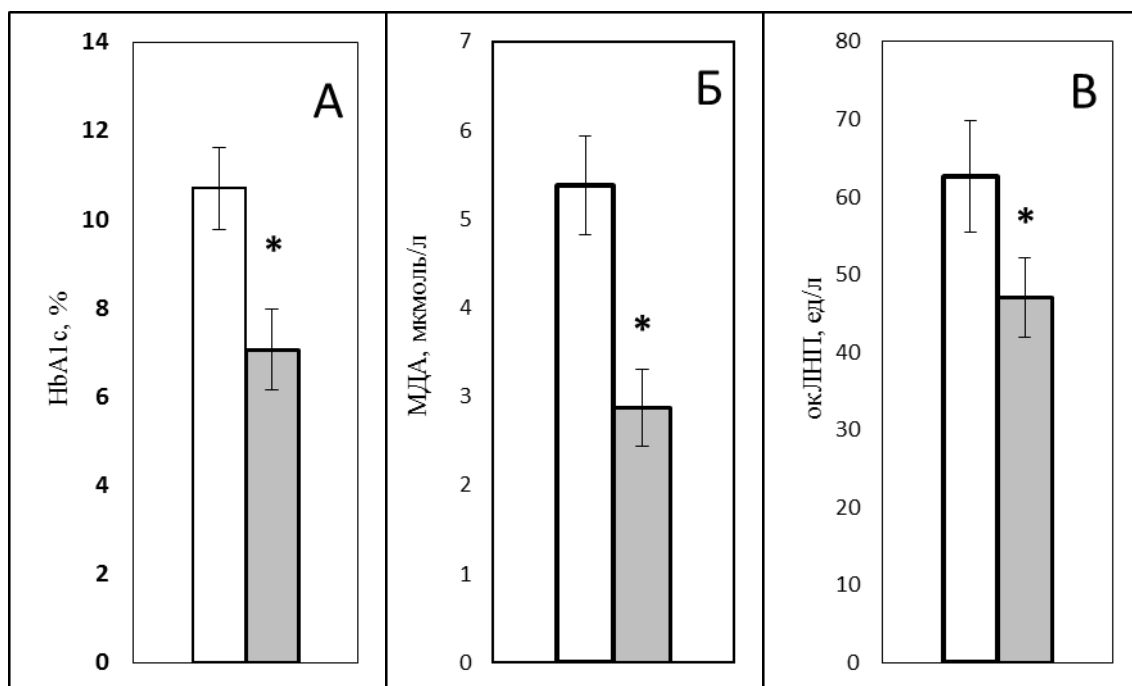


Рисунок 8 – Влияние сахароснижающей терапии на параметры окислительного стресса у больных СД2 с нарушениями углеводного обмена (А - HbA_{1c}): снижение содержания МДА (Б) и ок-ЛНП (В) в плазме крови (светлые столбики - до терапии, темные столбики - после проведения курса сахароснижающей терапии) (* p<0,05)

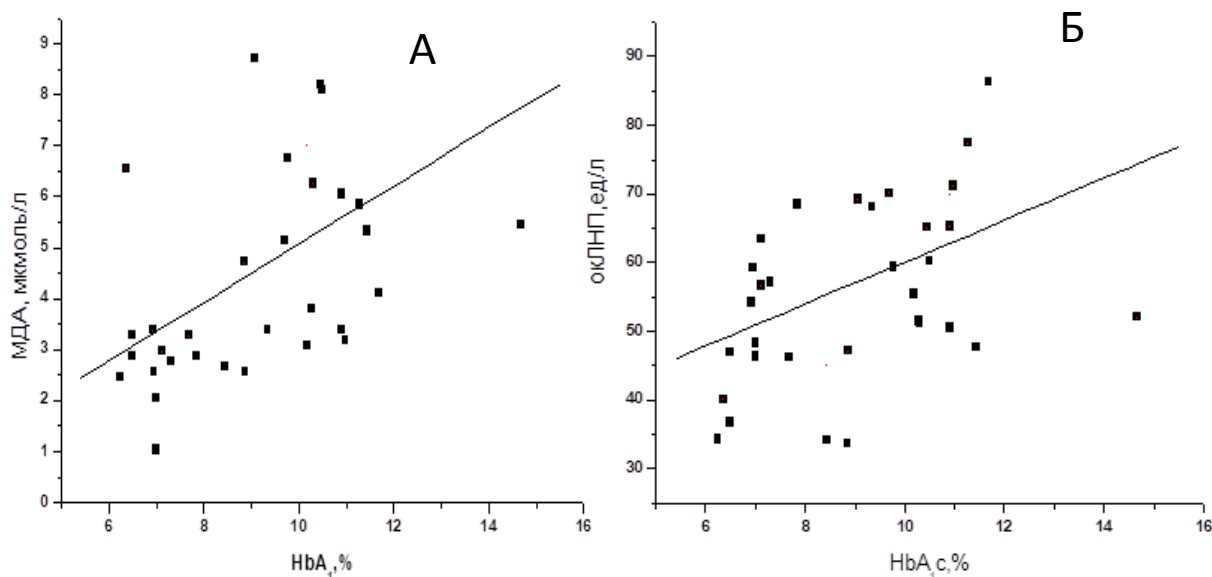


Рисунок 9 – Корреляционная взаимосвязь между уровнем HbA_{1c} и содержанием МДА (А) и ок-ЛНП (Б) у больных СД2, получавших сахароснижающую терапию

Таким образом, успешная сахароснижающая терапия больных СД2 сопровождается достоверным снижением таких параметров окислительного/карбонильного стресса как содержание МДА и уровень ок-ЛНП в плазме крови, что может быть критерием подавления окислительных повреждений белков и ДНК вследствие проведения лечебных мероприятий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В проведенном исследовании убедительно продемонстрировано, что у больных СД2 с выраженными нарушениями углеводного обмена выявлены существенные нарушения регуляции свободнорадикальных процессов по сравнению с практически здоровыми людьми (увеличение содержания МДА в плазме крови, снижение активности СОД и ГП в эритроцитах, снижение длины теломерных повторов в хромосомной ДНК лейкоцитов крови).

2. В экспериментах *in vitro* показано, что снижение активности антиоксидантных ферментов (прежде всего, СОД) в эритроцитах больных СД2 может быть обусловлено химической модификацией активного центра этих белков низкомолекулярными природными дикарбонилами (такими как глиоксаль и метилглиоксаль). В соответствии с этим выявлена сильная отрицательная корреляция между содержанием гликированного гемоглобина и активностью СОД в эритроцитах больных СД2, что может служить основой для разработки нового биохимического теста для диагностики и оценки эффективности терапии СД2. В соответствии с этим установлено, что снижение активности СОД в эритроцитах больных СД2 зависит от продолжительности заболевания.

3. Несмотря на то, что у больных ИБС проявление окислительного стресса резко возрастает (Lankin V., Tikhaze A., 2017), у больных СД2 с нарушениями углеводного обмена выявлены множественные изменения, свидетельствующие о том, что выраженность окислительного стресса у этих больных превышает таковую у больных ИБС. Более того, было установлено,

что у больных СД2 наблюдаются характерные изменения, отражающие химическую модификацию биополимеров: окислительную модификацию белков (апопротеина В-100 частиц ЛНП и тиолсодержащих протеинов и пептидов плазмы крови, равно как молекул ключевых антиоксидантных ферментов эритроцитов - СОД и ГП), а также окислительные повреждения молекул ДНК (снижение длины теломерных повторов в лейкоцитах крови и увеличение уровня конечного продукта окислительной деструкции ДНК - 8-гидрокси-гуанина в плазме крови и моче). Полученные результаты комплексного исследования на основании анализа объективных биохимических параметров впервые убедительно демонстрируют наличие окислительного стресса у больных СД2 с нарушениями углеводного обмена.

4. Впервые показано, что сахароснижающая терапия больных СД2 на фоне снижения уровня гликированного гемоглобина сопровождается достоверным уменьшением выраженности окислительного стресса: значительным снижением уровня ок-ЛНП и МДА в плазме крови. При этом в процессе сахароснижающей терапии больных СД2 отмечено наличие достоверной положительной корреляции ($r=0,51-0,57$) между уровнем гликированного гемоглобина и содержанием ок-ЛНП и МДА в плазме крови, что может быть использовано в качестве дополнительного биохимического теста для контроля эффективности лечения.

ВЫВОДЫ

1. В комплексном биохимическом исследовании показано достоверное увеличение содержания МДА в плазме крови (почти в 3 раза, $p<0,0001$), снижение активности СОД (более чем в 4 раза, $p<0,0001$) и ГП (почти в 2 раза, $p<0,001$), а также уменьшение длины теломерных повторов в ДНК лейкоцитов крови (почти на 30%, $p<0,001$) у больных впервые выявленным СД2 ($HbA_{1c}=10,7\%\pm 1,4$) по сравнению с практически здоровыми людьми без нарушений липидного и углеводного обмена.

2. У больных СД2 ($HbA_{1c}=10,7\%\pm 0,3$) по сравнению с группой больных с ИБС было установлено достоверное увеличение уровня ок-ЛНП

(почти в 1,5 раза, $p < 0,0001$) и содержания 8-гидрокси-гуанина в плазме крови и моче (почти на 10% и 8% соответственно, $p < 0,001$), а также снижение уровня восстановленных тиолов в плазме крови (на 20%, $p < 0,0001$), активности СОД в эритроцитах (на 17%, $p < 0,001$) и длины теломерных повторов в лейкоцитах крови (на 31%, $p < 0,0001$).

3. Показано, что природные дикарбонилы, образующиеся при окислительных превращениях глюкозы – глиоксаль и метилглиоксаль, ингибируют активность СОД в эритроцитах человека в процессе инкубации с этими дикарбонилами.

4. У больных СД2 с выраженными нарушениями углеводного обмена ($HbA_{1c} = 10,7\% \pm 1,4$) выявлена положительная корреляция между уровнем HbA_{1c} и содержанием МДА в плазме крови ($r = 0,57$; $p < 0,0001$; $n = 32$) и содержанием ок-ЛНП ($r = 0,51$; $p < 0,003$; $n = 32$), а также отрицательная корреляция между уровнем HbA_{1c} и активностью эритроцитарной СОД ($r = -0,652$; $p < 0,0001$; $n = 44$). Кроме того, установлено, что снижение активности СОД в эритроцитах больных СД2 зависит от продолжительности заболевания.

5. Показано, что сахароснижающая терапия больных СД2 с использованием бигуанидов, препаратов сульфонилмочевины и инсулинотерапии, приводит к значительному уменьшению уровня МДА (на 38%, $p < 0,0001$) и ок-ЛНП (на 22%, $p < 0,001$) в плазме крови.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сахароснижающая терапия подавляет интенсификацию свободнорадикального окисления липопротеидов низкой плотности у больных сахарным диабетом типа 2 [Текст] / А.К. Тихазе [и др.] // **Кардиологический вестник** – 2014. – Т.9, №4. – С.72-77. – (Соавт.: О.А. Одинокова, Г.Г. Коновалова, Л.В. Недосугова, В.З. Ланкин).

2. Окислительный стресс и укорочение теломер в лейкоцитах крови больных с впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа [Текст] / Н.А. Дорошук [и др.] // **Кардиологический вестник** . – 2016. – Т. 11, №2. – С.56-60. – (Соавт.: В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, О.А. Одинокова, Г.Г. Коновалова, А.Ю. Постнов).

3. **Одинокова О.А.** Окислительный стресс и укорочение теломер при сахарном диабете 2 типа / О.А. Одинокова, Л.В. Недосугова, В.З. Ланкин // Сборник тезисов VIII Всероссийского диабетологического конгресса с

Международным участием «Сахарный диабет – пандемия XXI века». – М., 2018. – С. 534-535.

4. Окислительный и карбонильный стресс как факторы модификации белков и деструкции ДНК при сахарном диабете [Текст] / В.З. Ланкин [и др.] // **Терапевтический архив.** – 2018. – Т. 90, №10. – С.46-50. – (Соавт.: А.К. Тихазе, Г.Г. Коновалова, **О.А. Одинокова**, Н.А. Дорошук, И.Е. Чазова).

5. Одинокова О.А., Недосугова Л.В., Ланкин В.З., Петунина Н.А., Тихазе А.К., Коновалова Г.Г. **Компенсация углеводного обмена приводит к снижению уровня окисленных липопротеидов низкой плотности у пациентов с сахарным диабетом типа 2.** Наука и образование в XXI веке. Сборник научных трудов по материалам международной научно-практической конференции. г. Тамбов. 30 сентября 2013 г. Часть 30. С. 106-107.

ПАТЕНТ

Патент 2629398 РФ, МПК G01N33/15, G01N33/48. Способ экспресс-скрининга потенциальных антиоксидантов с использованием кинетической модели медь-инициированного свободнорадикального окисления липопротеидов низкой плотности плазмы крови человека [Текст] / В.З. Ланкин [и др.]; патентообладатель: ФГБУ «РКНПК» Минздрава России (RU). – № 2016129527. – заявл. 19.07.2016. – опубл. 29.08.2017. – Бюл. №25 – (Соавт.: Н.В. Кандалинцева, Г.Г. Коновалова, А.К. Тихазе, С.В. Хольшин, С.Е. Ягунов, **О.А. Одинокова**).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2-ТБК - 2-тиобарбитуровая кислота

8-охо-dG - 8-гидрокси-гуанин

АГ - артериальная гипертония

АФК - активные формы кислорода

ГП - глутатионпероксидаза

ИБС - ишемическая болезнь сердца

ИМТ - индекс массы тела

ЛНП - липопротеиды низкой плотности

МДА - малоновый диальдегид

ок-ЛНП - окислительно модифицированные ЛНП

СД2 - сахарный диабет 2 типа

СОД - супероксиддисмутаза

HbA_{1c} - гликированный гемоглобин

TBARS - вещества, реагирующие с 2-тиобарбитуровой кислотой