

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БИОХИМИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ В ОРГАНИЗМЕ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА И САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Литвинова М.Г., Басов А.А., Аكوпова В.А.

ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Россия (350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4); e-mail: ilyamb@ksma.ru

В ходе проведенных исследований установлено, что при ишемической болезни сердца (ИБС) и сахарном диабете (СД) 2 типа наблюдается снижение потенциала антиоксидантной системы (АОС) и усиление процессов свободнорадикального окисления (СРО). Выявлена корреляционная взаимосвязь показателей липидного (липопротеины низкой плотности (ЛПНП), триглицериды (ТрГ)) и углеводного (гликозилированный гемоглобин (HbA_{1c})) обменов в крови при ИБС и СД 2 типа с изменениями показателей СРО и АОС в ротовой жидкости (РЖ) при данных патологических состояниях. В работе показано, что для оценки степени декомпенсации в прооксидантно-антиоксидантной системе при ИБС и СД 2 типа, а также при сочетанном течении этих заболеваний необходимо определять в качестве дополнительных показателей: ферментное звено антиоксидантной системы (АОС) крови – активность каталазы (КАТ), супероксиддисмутазы (СОД), а также низкомолекулярные субстраты в РЖ: содержание продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП), уровень глутатиона (GSH), что повысит эффективность диагностики при данных патологических состояниях, а, кроме того, позволит своевременно назначать корригирующие мероприятия и контролировать эффективность проводимой терапии.

Ключевые слова: антиоксидантная система (АОС), перекисное окисление, глутатион, ишемическая болезнь сердца (ИБС), сахарный диабет (СД), липопротеины, ротовая жидкость (РЖ).

LABORATORY DIAGNOSIS OF BIOCHEMICAL DISORDERS OF PEROXIDATION IN THE BODY IN ISCHEMIC HEART DISEASE AND DIABETES

Litvinova M.G., Basov A.A., Akopova V.A.

Kuban state medical university, Krasnodar, Russia (350063, Krasnodar, M. Sedina street, 4), e-mail: ilyamb@ksma.ru

In research we found that decrease of anti-oxidant system (AOS) potential and strengthening of free-radical oxidation (FRO) is observed in ischemic heart disease (IHD) and diabetes II type. Also we found a correlation between lipid (low density lipoproteins (LDL), three-glycosides (TG)) and carbohydrate (glycosylated hemoglobin (HbA_{1c})) blood indicators in IHD and diabetes II type and FRO, AOS indicators of oral fluid (OF) in these pathological conditions. Study is showed that for to assess the degree of decompensation in prooxidant-antioxidant system in IHD and diabetes II type and also in merger of these diseases it is necessary to determine additional indicators: enzymatic blood AOS – catalase activity (CAT), super-oxide dismutase activity (SOD) and also low molecular weight substance in OF: content of product reacting with thiobarbituric acid (TBA-RP), glutathione level (GSH) that increases efficiency of diagnosis these pathological conditions, and lets to prescribe timely corrective arrangements and to control efficiency of the therapy.

Key words: anti-oxidant system (AOS), peroxidation, glutathione, ischemic heart disease (IHD), diabetes, lipoproteins, oral fluid (OF).

Введение

В настоящее время во многих работах показано, что ишемическая болезнь сердца (ИБС), особенно в сочетании с нарушениями углеводного обмена, является социально значимым заболеванием и часто приводит к развитию неблагоприятных исходов у пациентов [9]. Усиление процессов перекисной модификации биомолекул нередко играет ключевую роль в прогрессировании осложнений при ИБС и сахарном диабете (СД), что связано с формированием окислительного стресса (ОС), возникающего в условиях дисбаланса

функционирования прооксидантно-антиоксидантной системы [5]. Субстратами при усилении свободнорадикального окисления (СРО), помимо клеточных мембран, могут являться полиненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав циркулирующих липопротеиновых комплексов. Кроме того, увеличение концентрации циркулирующих липопротеиновых комплексов может оказывать дополнительное повреждающее действие на сами клетки. В научной литературе показана важность контроля за липидными показателями крови как при лечении ИБС, так и при терапии СД [10]. Состояние гомеостаза в крови и полости рта при СД имеет ряд особенностей: повышенное содержание глюкозы оказывает негативное влияние на ткани, снижая потенциал их АОС, особенно в крови и ротовой жидкости (РЖ) [8]. Не менее важным аспектом лабораторной диагностики является поиск удобного биологического субстрата, который позволит осуществлять систематический мониторинг и скрининг состояния АОС и уровня СРО в организме [6]. РЖ может быть использована наряду с кровью в качестве такого альтернативного биосубстрата, отвечающего требованиям: неинвазивности, безопасности, возможности многократного забора в практически неограниченном количестве. В настоящее время в научной литературе еще не имеется достаточно сведений о возможности применения РЖ для оценки уровня ОС в организме и прогнозирования развития неблагоприятных исходов, что требует разработки новых алгоритмов лабораторной диагностики.

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы явилось изучение взаимосвязи показателей липидного и углеводного обменов в крови, перекисного окисления и состояния АОС в крови и РЖ пациентов с ИБС и СД 2 типа для создания алгоритма лабораторной диагностики нарушений СРО при данных патологических состояниях.

Материалы и методы

Биологическим материалом для исследования были кровь и РЖ больных с ИБС (группа 1, n=30, средний стаж заболевания 9,3 года), СД 2 типа (группа 2, n=20, средний стаж заболевания 8,9 года) и при сочетании ИБС и СД 2 типа (группа 3, n=30, средний стаж заболеваний 14,1 года); контрольную группу составили 20 человек.

Отбор и обследование пациентов осуществлялись на базе отделений кардиологии 1 и 2 ГБУЗ «Краснодарский краевой клинический госпиталь для ветеранов войн им. профессора В.К. Красовитова» (г. Краснодар), отделение эндокринологии ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского». Распространенность осложнений оценивали, исходя из поставленных в лечебных учреждениях клинических диагнозов.

Для оценки уровня ОС в биологических жидкостях определяли продукты перекисной модификации биомолекул, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), а также глутатион (GSH) как ключевой низкомолекулярный субстрат, характеризующий состояние

эндогенной АОС. Среди показателей ферментного звена АРЗ определяли активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ). Определение продуктов окислительной модификации биомолекул проводили на основании количественной оценки окрашенного комплекса, полученные результаты выражали в микромолях ТБК-продуктов (ТБК-РП) на 1 л РЖ или плазмы крови [2]. Определение глутатиона проводили на основании его взаимодействия с 5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой [1; 7]. Активность СОД определяли по методу В.А. Костюка и соавт. [4]. Метод основан на способности СОД тормозить реакцию аутоокисления кверцетина за счет дисмутации супероксидного анион-радикала, образующегося при окислении кверцетина в присутствии N,N,N1,N1-тетраметилэтилендиамина в аэробных условиях. Активность каталазы определяли колориметрическим методом по М.А. Королюку и соавт. [3]. Принцип метода основан на способности пероксида водорода давать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс.

Состояние липидного обмена определяли по уровню холестерина (ХС), триглицеридов (ТрГ), липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), липопротеинов высокой плотности (ЛПВП); состояние углеводного обмена оценивали по уровню глюкозы и содержанию HbA1c. Исследования проводили на биохимическом анализаторе с помощью стандартных наборов и реактивов фирмы Sigma.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли методами вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента. Достоверным считали различие при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Проведенными исследованиями установлено, что у пациентов в группах 1, 2 и 3 наблюдалось развитие ОС, которое сопровождалось повышением уровня продуктов перекисной модификации биомолекул и уменьшением антиоксидантного потенциала в крови и РЖ (табл. 1). В крови пациентов в этих группах наблюдалось закономерное снижение показателей антиоксидантной защиты, наиболее выраженное в третьей группе для показателей супероксиддисмутазы (на 55,6%, $p < 0,05$), каталазы (на 50,1%, $p < 0,05$), глутатиона (на 29,5%, $p < 0,05$), что отражает существенные нарушения в функционировании АОС, особенно при сочетанном течении ИБС и СД 2 типа. При этом увеличение продуктов перекисной модификации у них в крови составило: у больных с ИБС – 114,1% ($p < 0,05$), у больных с СД 2 типа – 182,4% ($p < 0,05$), а при сочетании ИБС и СД 2 типа количество ТБК-продуктов возрастало на 285,5% ($p < 0,05$), что свидетельствует об усилении процессов СРО, особенно у больных с патологией сердечно-сосудистой системы на фоне нарушений углеводного обмена (табл. 1).

Таблица 1 – Показатели липидного и углеводного обменов в крови, уровня СРО и состояния АОС крови и ротовой жидкости у пациентов с ИБС и СД 2 типа

Показатель/ биосустрат	Контроль (M±m)	ИБС (M±m)	СД 2 типа (M±m)	ИБС+СД 2 типа (M±m)
<i>показатели в крови</i>				
Каталаза, мкмоль/(мин*г)	69,39±0,93	50,31±0,49*	42,30±0,44*	34,63±0,41*
СОД, ед./г	23,58±0,51	15,88±0,24*	12,76±0,21*	10,47±0,15*
GSH, мкмоль/г	6,61±0,29	6,01±0,03*	5,46±0,07*	4,66±0,04*
ТБК-РП, мкмоль/л	2,55±0,1	5,46±0,11*	7,20±0,1*	9,83±0,14*
Холестерин, ммоль/л	4,82±0,34	6,24±0,17*	5,44±0,30	5,63±0,19*
ЛПНП, ед	2,87±0,26	2,98±0,18	3,04±0,21	3,71±0,18*
ЛПВП, ед.	1,97±0,15	1,39±0,10*	1,98±0,22	1,47±0,09*
Триглицериды, моль/л	1,30±0,33	2,48±0,14*	1,71±0,19	2,43±0,21*
Глюкоза, ммоль/л	4,51±0,67	4,98±0,07	11,43±1,04*	9,73±0,65*
Гликозилированный Hb, %	4,09±0,78	5,10±0,25	7,32±0,36*	7,50±0,47*
<i>показатели в ротовой жидкости</i>				
Каталаза, мкмоль/(мин*г)	63,10±1,48	49,63±0,77*	39,31±0,45*	31,37±0,71*
СОД, ед./г	22,95±0,93	15,13±0,29*	12,60±0,25*	11,72±0,23*
GSH, мкмоль/г	70,38±1,64	61,45±0,91*	53,73±0,48*	47,56±0,46*
ТБК-РП, мкмоль/л	0,57±0,05	1,17±0,03*	1,86±0,04*	2,53±0,05*

* – p<0,05 в сравнении с показателями контрольной группы.

При исследовании таких же показателей в РЖ были выявлены аналогичные изменения для показателей антиоксидантной защиты, более выражены они также в третьей группе для показателей каталазы (снижение на 50,3%, p<0,05), супероксиддисмутазы (снижение на 48,9%, p<0,05) и GSH (снижение на 32,4%, p<0,05), что сопровождалось увеличением содержания продуктов окислительной модификации – уровень ТБК-РП повышался при ИБС на 105,3% (p<0,05), при СД 2 типа – на 226,3% (p<0,05), при сочетании ИБС и СД 2 типа – на 343,9% (p<0,05). Это может быть связано как с рекреторной функцией слюнных желез и накоплением в РЖ моносахаридов при декомпенсации СД, так и с выраженными нарушениями функционирования гематосаливарного барьера при диабете в условиях формирования макро- и микроангиопатий. Подобные изменения в целом

соответствуют степени тяжести патологического процесса, что требует применения в комплексной терапии данных заболеваний препаратов с антиоксидантными свойствами.

Принимая во внимание полученные результаты, характеризующие уровень СРО и состояние АОС, для разработки оптимального алгоритма диагностики и мониторинга ОС при ИБС и СД 2 типа, был проведен корреляционный анализ между ними и показателями липидного и углеводного обменов. Установлено, что коэффициент корреляции ТБК-РП, отражающего базальный уровень СРО, составил для крови: $r_{\text{ТБК-РП/ХС}} = +0,43$ ($p < 0,05$), $r_{\text{ТБК-РП/ЛПНП}} = +0,88$ ($p < 0,05$), $r_{\text{ТБК-РП/ЛПВП}} = -0,45$ ($p < 0,05$), $r_{\text{ТБК-РП/ТрГ}} = +0,66$ ($p < 0,05$), $r_{\text{ТБК-РП/глюкоза}} = +0,78$ ($p < 0,05$), $r_{\text{ТБК-РП/НbA1c}} = +0,94$ ($p < 0,05$), что подтверждает существенную роль неконтролируемых свободнорадикальных процессов в развитии нарушений липидного и углеводного обменов. При оценке диагностической значимости неинвазивных методов обследования с помощью корреляционного анализа уровня СРО в РЖ и показателей липидного и углеводного обменов крови было установлено, что коэффициенты корреляции ТБК-РП и показателей липидного обмена статистически значимо не отличаются от аналогичных данных в крови, хотя и несколько меньше их в абсолютных значениях ($r_{\text{ТБК-РП/ХС, ЛПНП, ЛПВП, ТрГ}} = +0,33, +0,88^*, -0,35, +0,57^*, *-p < 0,05$), в то время как корреляции ТБК-РП и показателей углеводного обмена даже превышают аналогичные данные по крови ($r_{\text{ТБК-РП/глюкоза, НbA1c}} = +0,83^*, +0,96^*, *-p < 0,05$), что позволяет использовать РЖ в лабораторном алгоритме оценки тяжести метаболических нарушений у данных категорий пациентов. Такие данные показывают, что более значимую роль в инициации и поддержании повышенного уровня СРО у пациентов играют именно нарушения углеводного обмена, особенно при декомпенсации СД они могут иметь решающее значение при формировании поздних осложнений (микроангиопатия, полинейропатия). Исходя из вышесказанного логично предположить, что увеличение содержания глюкозы в крови при диабетической гипергликемии может способствовать интенсификации пероксидации ЛПНП с их последующей атерогенной модификацией. Хотя в научной литературе сведения о влиянии глюкозы на процессы пероксидации ЛПНП немногочисленны и неоднозначны [8].

Среди показателей липидного обмена следует указать, что содержание общего ХС умеренно коррелирует с показателями СРО, в то время как уровень ЛПНП, являющихся атерогенной фракцией липидного спектра, коррелирует с ТБК-РП значительно сильнее ($r = +0,88$, $p < 0,05$), что указывает на большую диагностическую информативность для клиники именно определения показателей липидного спектра (ЛПНП, ЛПВП) крови совместно с ТБК-РП и ТБК-РП (Fe^{2+}) в крови и РЖ, нежели традиционного общего ХС в крови. При анализе состояния эндогенной АОС и показателей углеводного и липидного обменов установлено, что наибольшая обратная корреляционная взаимосвязь наблюдается

также между содержанием GSH в крови и уровнем ЛПНП ($r = -0,91^*$ в крови, $r = -0,84^*$ в РЖ, $*-p < 0,05$), в то время как коэффициенты корреляции GSH с другими фракциями липидного спектра существенно ниже: $r_{\text{GSH}/(\text{ХС}, \text{ЛПВП}, \text{ТрГ})} = -0,35, +0,41, +0,61^*$ ($*-p < 0,05$), что показывает большую уязвимость фракции ЛПНП для СРО в условиях истощения ключевых тиоловых компонентов эндогенной АОС и может вести к формированию осложнений у таких пациентов. Содержание GSH в крови также имело обратную корреляционную взаимосвязь и с показателями углеводного обмена, причем наибольшее значение было у коэффициента для $\text{GSH}/\text{HbA}_{1\text{c}}$ ($r_{\text{ГБК-РП}/(\text{глюкоза}, \text{HbA}_{1\text{c}})} = -0,79^*, -0,93^*$, $*-p < 0,05$). При анализе взаимосвязей между показателями АОС в РЖ и состоянием липидного и углеводного обменов в крови установлено ($r_{\text{GSH}/(\text{ХС}, \text{ЛПНП}, \text{ЛПВП}, \text{ТрГ}, \text{глюкоза}, \text{HbA}_{1\text{c}})} = -0,40, -0,84^*, +0,37, -0,60^*, -0,84^*, -0,97^*$, $*-p < 0,05$), что они статистически значимо не отличаются от аналогичных коэффициентов корреляции в крови, а следовательно, могут быть использованы как неинвазивные лабораторные тесты для оценки метаболического статуса в условиях ОС.

С целью дополнительного подтверждения данных, полученных при корреляционном анализе лабораторных показателей, был также проведен анализ взаимосвязи уровня биохимических показателей ферментного звена АОС и частоты поздних осложнений (макро- и микрососудистых) у пациентов 1, 2 и 3 групп (табл. 2), в результате которого установлено, что активность КАТ и СОД в крови статистически значимо коррелирует с суммарной частотой микроангиопатий (ангиоретинопатия, нефропатия, ангиопатия нижних конечностей, полинейропатия: $r_{(\text{КАТ}, \text{СОД})/\text{микроангиопатии}} = -0,81^*, -0,80^*$ $*-p < 0,05$) и в меньшей степени с суммарной частотой макрососудистых осложнений (ИБС, стенокардия, постинфарктный кардиосклероз, нарушения мозгового кровообращения, дисциркуляторная энцефалопатия: $r_{(\text{КАТ}, \text{СОД})/\text{макроангиопатии}} = -0,55^*, -0,54^*$, $*-p < 0,05$).

Таблица 2 – Клиническая характеристика обследованных категорий пациентов

Показатель, в % для каждой подгруппы	Контроль	Группа 1	Группа 2	Группа 3
Ретинопатия, %	0,0	0,0	40,0	40,0
Ангиопатия нижних конечностей, %	0,0	6,7	100,0	80,0
Полинейропатия, %	0,0	3,3	100,0	83,3
Нефропатия, %	0,0	0,0	70,0	50,0
ИБС, %	0,0	100,0	0,0	100,0
Стенокардия, %	0,0	100,0	0,0	100,0
Постинфарктный кардиосклероз, %	0,0	20,0	0,0	20,0
Нарушение мозгового кровообращения, %	0,0	16,7	10,0	13,3
Дисциркуляторная энцефалопатия, %	0,0	100,0	30,0	73,3

При анализе данных, полученных при изучении РЖ ($r_{\text{КАТ, СОД/микроангиопатии}} = -0,85^*$, $-0,77^*$; $r_{\text{КАТ, СОД/макроангиопатии}} = -0,47$, $-0,55^*$, $^* - p < 0,05$), коэффициенты корреляции существенно не отличались от аналогичных показателей в крови, что можно применять в клинической практике для неинвазивного мониторинга состояния пациентов с ИБС и СД 2 типа, особенно при анализе риска развития микрососудистых осложнений на амбулаторном этапе.

Таким образом, на основании выполненных исследований был разработан следующий лабораторный алгоритм для мониторинга процессов СРО у пациентов при ИБС и СД 2 типа.

1. На первом этапе выполняется определение липидного спектра и гликозилированного гемоглобина в крови с одновременной оценкой содержания ТБК-РП и GSH в РЖ. При повышении уровня липидов и HbA_{1c} проводится коррекция метаболических нарушений с помощью гиполипидемических средств и сахароснижающей терапии, дополнительно при повышении уровня ТБК-РП целесообразна коррекция с помощью антиоксидантов прямого действия (липофильной и гидрофильной природы), при снижении уровня GSH обосновано назначение тиолсодержащих препаратов (липовая кислота, глутатион).

2. На втором этапе после достижения показателей адекватного контроля углеводного и липидного обменов продолжается мониторинг состояния СРО и АОС путем определения ТБК-РП и GSH в РЖ с целью своевременной коррекции процессов СРО, а также дополнительно оценивается в РЖ активность ферментного звена АОС (СОД и КАТ) с целью своевременного прогнозирования возможного развития микро- и макрососудистых осложнений, с дальнейшим назначением профилактических мероприятий и ангиопротекторов пациентам с пониженной активностью ферментов антирадикальной защиты.

Преимущества такого подхода заключаются в том, что исследование РЖ возможно проводить амбулаторно, так как ее получение можно осуществлять неинвазивно и это не требует профессиональной подготовки от пациентов и персонала.

Выводы

Изменения показателей СРО и состояния АОС достоверно коррелируют с нарушениями липидного (ЛПНП, ТрГ) и углеводного (HbA_{1c}) обменов при ИБС и СД 2 типа. Исследование РЖ позволяет достаточно точно контролировать состояние процессов СРО в организме уже на ранних стадиях развития ОС. Изучение содержания ТБК-РП и уровня глутатиона в РЖ при ИБС и СД 2 типа перспективно проводить для неинвазивного мониторинга уровня ОС и последующего назначения в комплексной терапии препаратов с антиоксидантной направленностью. Определение активности СОД и КАТ позволяет

прогнозировать развитие микрососудистых осложнений и своевременно назначать корригирующие мероприятия и ангиопротекторы пациентам с пониженной активностью ферментного звена АОС.

Список литературы

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма : методич. рекомендации. – СПб. : Фолиант, 2000. – 104 с.
2. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М. : МЕДпресс-информ, 2004. – 920 с.
3. Королук М.А., Иванов Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.П. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
4. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.И. Простой и чувствительный метод определения супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопросы медицинской химии. – 1990. – № 2. – С. 88-91.
5. Кудряшова М.В., Довгалюк Ю.В. и др. Возможности коррекции нарушений реологических свойств крови, свободнорадикальных процессов у больных острым инфарктом миокарда в сочетании с сахарным диабетом 2-го типа // Кардиология. – 2010. – Т. 50. – № 5. – С. 9-12.
6. Пустовалова Л.М., Борисенко О.В. Исследование биохимических параметров слюны у лиц, подвергающихся влиянию электромагнитного излучения сотовых телефонов // Фундаментальные исследования. – 2006. – № 9. – С. 105-106.
7. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups // Arch. Bioch. Biophys. – 1959. – V. 82. – P. 70-77.
8. Esper R.J., Vilarino J.O., Machado R.A. Endothelial dysfunction in normal and abnormal glucose metabolism // Adv. Cardiol. – 2008. – V. 45. – P. 17-43.
9. Garcia-Caballero M., Tinahones F.J., Cohen R.V. editors. Diabetes surgery. – 1st ed. – Madrid : McGraw Hill, 2010. – P. 140-141.
10. Sever P.S., Dahlof B., Poulter N.R. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial – Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomized controlled trial // Lancet. – 2003. – V. 361. – P. 1149-58.

Рецензенты

Каде Азамат Халидович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей и клинической патофизиологии, государственное бюджетное образовательное учреждение

высшего профессионального образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, г. Краснодар.

Быков Илья Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии, государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, г. Краснодар.