

ОКИСЛЕННЫЕ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ БЕЛКИ В ГЕНЕЗЕ АТЕРОСКЛЕРОЗА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2-го ТИПА

УДК 616.379—008.64+616.13—004.6:575

Поступила 7.10.2009 г.



О.В. Занозина, к.м.н., ассистент кафедры госпитальной терапии, главный эндокринолог Н. Новгорода;
Н.Н. Боровков, д.м.н., профессор, зав. кафедрой госпитальной терапии им. В.Г. Вогралика;
Т.Г. Щербатюк, д.м.н., профессор, зав. кафедрой биологии

Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород

Рассмотрена роль свободно-радикального окисления в атерогенезе у больных сахарным диабетом 2-го типа при ишемической болезни сердца. Установлено, что окисленные модифицированные белки находятся в тесной взаимосвязи с перекисным окислением липидов и поддерживают свободно-радикальное окисление у данной категории больных. Показано, что определение окисленных модифицированных белков может быть как ранним, так и интегральным тестом метаболических нарушений и, в перспективе, гемостазиологических нарушений при сахарном диабете 2-го типа.

Ключевые слова: свободно-радикальное окисление, окислительная модификация белков, сахарный диабет 2-го типа.

English

Oxidized modified proteins in the atherosclerosis genesis at a diabetes mellitus of the 2nd type

O.V. Zanozina, c.m.s., assistant of a hospital therapy chair, head endocrinologist of N. Novgorod;
N.N. Borovkov, MD, professor, head of the V.G. Vogralick hospital therapy chair;
T.G. Sherbatyuk, MD, professor, head of a biology chair

Nizhny Novgorod state medical academy, N. Novgorod

A role of free-radical oxidation in atherogenesis in patients with a diabetes mellitus of the 2nd type at an ischemic heart disease is regarded. It is established, that the oxidized modified proteins are in tight contact with the lipid peroxidation and support a free-radical oxidation in the given category of patients. It is demonstrated, that the oxidized modified protein detection can be both early and integral test of metabolic disturbances and, in perspective, hemostasiologic disturbances at a diabetes mellitus of the 2nd type.

Key words: free-radical oxidation, oxidative modification of proteins, diabetes mellitus of the 2nd type.

Атеросклероз — многофакторный и динамичный процесс. Существуют разные теории атерогенеза: гипотеза липидной инфильтрации (Н.Н. Аничков и С.С. Халатов), гипотеза «ответа на повреждение» (R. Ross), гипотеза моноклонального неопролиферативного процесса (Beneditt and Beneditt) [1]. В 1992 г. В.З. Ланкиным сформулирована свободно-радикальная теория атерогенеза, суть которой заключается в том, что липопротеины низкой плотности, модифицированные вследствие свободно-радикального окисления (СРО), интенсивно захватываются стенкой сосуда, что приводит к накоплению их в стенке, способствуя прогрессированию атеросклероза [2].

При наличии сахарного диабета атеросклероз прогрессирует значительно быстрее, что подтверждает наличие порочного круга метаболических и гемостазиологических нарушений и указывает на единые патогенетические корни [3]. Однако все внимание уделяется окисленным липидам, а данные о возможной роли окисленных модифицированных белков (ОМБ) в генезе атеросклероза немногочисленны [4, 5], в том числе у больных сахарным диабетом 2-го типа (СД 2) [3, 5].

Цель исследования — оценить выраженность окисленной модификации белков у больных сахарным диабетом 2-го типа при наличии ишемической болезни

Для информации: Занозина Ольга Владимировна, тел. моб. +7 960-172-77-85; e-mail: zwx2@mail.ru

сердца и уточнить ее взаимосвязь с выраженностью пероксидации липидов и эндотелиальной дисфункции и активностью антиоксидантной защиты.

Материалы и методы. Обследованы 2 группы пациентов: 1-я группа (n=16) — пациенты, страдающие СД 2 и ИБС (стенокардией напряжения II КФК); 2-я группа (n=18) — пациенты, страдающие СД 2. По возрасту, длительности заболевания, степени компенсации, полу группы не различались. Средний возраст больных — 61 год, длительность СД 2 — 8 лет, гликозилированный гемоглобин — 7,0% (табл. 1).

Состояние прооксидантной системы оценивали по следующим показателям:

уровню интенсивности СРО, определяемой методом хемилюминесценции;

содержанию молекулярных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ): диеновых конъюгатов (ДК) и триеновых конъюгатов (ТК) с использованием системы Helios (Thermo Spectronic, USA).

Малоновый диальдегид (МДА) определяли по общепринятой методике с тиобарбитуровой кислотой, общие липиды — с помощью стандартного набора реактивов Lachema [6].

Состояние ферментативной антиоксидантной системы оценивали по активности:

супероксиддисмутазы (СОД) по Nishirimi (1972) в адаптации Е.Е. Дубининой и др. (1988);

каталазы по Aebi (1970) в адаптации Королук и др. (1988), Чевари и др. (1991) [6].

Кроме того, проводили оценку общей антиоксидантной активности (АОА=1/S), где S — светосумма (Кузьмина Е.И., 1983).

Окислительную модификацию белков оценивали по Levine (1990) в модификации Е.Е. Дубининой (1995) [7]. Карбонильные группировки аминокислотных остатков, образующиеся в результате окислительной модификации исследуемых белков, характеризовали степень их окислительной деструкции: альдегиддинитрофенилгидразон спонтанный и индуцированный (АДФГс и АДФГи соответственно) и кетондинитрофенилгидразон спонтанный и индуцированный (КДФГс и КДФГи).

Оценивали все составляющие липидограммы: общий холестерин (ОХ), липопротеины низкой плотности (ЛПНП), липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП), триглицериды (ТГ), липопротеины высокой плотности (ЛПВП). Липидный профиль определялся с помощью диагностических систем ООО «Ольвекс Диагностикум», Санкт-Петербург (Россия).

Для оценки выраженности эндотелиальной дисфункции использована методика определения NO по восстановлению нитрата до нитрита по реакции Грисса (Green L.S. et al., 1982) [7].

Полученные результаты обрабатывались при помощи пакета прикладных программ для обработки медицинской и биологической информации Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США) [8].

Характер распределения определялся при помощи критериев Вилка—Шапиро (n<30) и Колмогорова—Смирнова (n>30). Центральные тенденции и рассеяние количественных признаков, имеющих приближенно

Т а б л и ц а 1

Общая характеристика больных, вошедших в исследование, Me [25; 75 процентиль]

Показатель	СД 2 с ИБС (n=16)	СД 2 без ИБС (n=18)	p
HbA1c, %	7,18 [7; 8,1]	7 [6,3; 7,8]	0,6
Длительность СД 2, лет	10 [8; 11,5]	8 [5; 11,5]	0,28
Возраст больных, лет	62 [53; 66,5]	61 [54; 65]	0,74

нормальное распределение, описывали средним значением (M) и средним квадратическим отклонением (s) в формате M(s). Если количественные признаки не имели приближенно нормального распределения, их описывали медианой и интерквартильным размахом [Me (25-й и 75-й процентиль)]. При нормальном распределении переменных для определения различий между двумя зависимыми и независимыми группами использовался парный и непарный t-критерий Стьюдента, а при непараметрическом — критерий Вилкоксона и Вилкоксона—Манна—Уитни. Достоверными считались различия при $p < 0,05$. Для анализа взаимосвязи двух признаков использовали корреляционный анализ по Спирмену (для непараметрических критериев) и Пирсону (для параметрических критериев). О характере связи судили по знаку и абсолютной величине коэффициента корреляции. При величине $r \leq 0,25$ связь считалась слабой, при $0,25 < r < 0,75$ — умеренной, а при $r \leq 0,75$ — значительной [8].

Результаты исследования.

1. В 1-й группе больных (СД 2 и ИБС) по сравнению со 2-й группой (СД 2) достоверно отмечалось увеличение общих липидов, свидетельствующее о потенциальной готовности к СРО всех составляющих (холестерин, жирные кислоты, фосфолипиды и др.) (табл. 2).

2. Уровень ДК у больных, страдающих СД 2 и ИБС, значительно превышал таковой у пациентов без ИБС, что подтверждало не только потенциальную, но и фактическую активизацию СРО у больных 1-й группы. Аналогичными были результаты и по конечному продукту ПОЛ — МДА.

3. Изменения в содержании модифицированных белков в указанных группах были разнонаправленными: с одной стороны, отмечалось значительное повышение АДФГс у больных СД 2 и ИБС, что подтверждало активизацию у них общего окислительного потенциала, с другой стороны, отмеченная тенденция к снижению КДФГи у больных этой группы свидетельствовала об истощении адаптивных возможностей организма.

4. У пациентов сравниваемых групп не установлено различий в активности антиоксидантных ферментов, что, вероятно, можно объяснить разнонаправленным действием металлкалализирующего окисления на различные белки.

5. Выявлена значительная корреляция ОМБ и промежуточных продуктов ПОЛ (ДК, ТК, МДА), что подтверждает значимую взаимосвязь составляющих ме-

Таблица 2

Содержание молекулярных продуктов СРО, ОМБ и антиоксидантных ферментов у пациентов, страдающих СД 2 и ИБС, Me [25; 75 процентиль]

Показатель	СД 2 с ИБС (n=16)	СД 2 без ИБС (n=18)	p
СОД, ед. акт./мг Нв-мин	49,5 [38,75; 60,66]	41,06 [37,5; 50,46]	0,13
Каталаза, ед. акт./мг Нв-мин	0,095 [0,07; 0,143]	0,126 [0,09; 0,15]	0,26
ОБ, г/л	72,02 [60,87; 84,7]	76,1 [67,97; 81,16]	0,09
АДФГс, отн. ед.	0,00072 (0,00039)	0,00043 (0,000078)	0,000002
КДФГс, отн. ед.	0,0032 [0,0025; 0,0045]	0,0037 [0,0022; 0,0043]	0,08
АДФГи, отн. ед.	0,0007 [0,00050; 0,00080]	0,0006 [0,0005; 0,0007]	0,37
КДФГи, отн. ед.	0,0039 [0,0029; 0,0046]	0,0044 [0,0034; 0,0050]	0,06
МДА, ед. опт. пл.	4,14 [1,27; 4,94]	2,54 [0,05; 3,12]	0,04
ДК, ед. опт. пл.	0,090940 (0,0548)	0,051 (0,010)	0,000001
ТК, ед. опт. пл.	0,06311 (0,0226)	0,05 [0,03; 0,063]	0,29
Общие липиды, г/л	0,47 (0,26)	0,006 [0,005; 0,406]	0,002

Таблица 3

Корреляция ОМБ и молекулярных продуктов СРО

Показатели	АДФГс	АДФГи	КДФГс	КДФГи
ДК	Нд*	r=-0,41 p=0,01	r=0,51 p=0,006	Нд
ТК	Нд	r=-0,42 p=0,02	r=0,57 p=0,001	Нд
МДА	r=-0,40 p=0,01	r=-0,32 p=0,01	r=0,52 p=0,031	Нд
lmax	r=0,55 p=0,0002	r=-0,46 p=0,01	r=0,54 p=0,003	r=0,51 p=0,002

* Нд — недостоверно.

Таблица 4

Корреляция антиоксидантных ферментов и молекулярных продуктов СРО

Показатели	АДФГс	АДФГи	КДФГс	КДФГи
СОД	r=0,52 p=0,004	r=0,65 p=0,0001	Нд*	r=-0,48 p=0,009
Каталаза	Нд	Нд	Нд	r=-0,48 p=0,009
Общая антиоксидантная активность	Нд	Нд	r=-0,71 p=0,00001	r=-0,515 p=0,0015

* Нд — недостоверно.

ханизма СРО. Следует отметить, что эта взаимосвязь носит разнонаправленный характер и, вероятно, отражает этапность СРО с последовательным вовлечением сначала АДФГ, затем КДФГ (табл. 3).

6. Неоднозначными оказались и корреляционные связи между антиоксидантными ферментами и окисленными белками. Если между АДФГ и СОД отмечалась заметная достоверная положительная связь, то

КДФГ отрицательно коррелировали с общей и ферментативной антиоксидантной защитой, подтверждая как этапность СРО, так и глубину повреждений с вовлечением всех уровней защиты при окислительной модификации КДФГ (табл. 4).

7. Получена значимая отрицательная корреляционная зависимость между ОМБ (АДФГс и АДФГи) и содержанием NO (r=-0,47; p=0,007), что указывает на взаимосвязь окислительной модификации белков с дисфункцией эндотелия — ключевым звеном в патогенезе атерогенеза.

Заключение. У больных сахарным диабетом 2-го типа и ИБС отмечается 8-кратное повышение уровня общих липидов, потенциально являющихся субстратом для свободно-радикального окисления. У них достоверно увеличено по сравнению с пациентами, страдающими только сахарным диабетом, содержание как промежуточных, так и конечных продуктов перекисидации липидов.

Процессы перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков тесно взаимосвязаны. Различные составляющие ОМБ характеризуют не только наличие СРО, но и его этапность и свидетельствуют о резервных способностях организма (оцениваем по АДФГ и КДФГ). ОМБ — обобщающий термин: различные его составляющие по-разному реагируют на стресс, проявляя в зависимости от вида белков либо антиоксидантные, либо прооксидантные свойства, в связи с чем необходимо исследовать конкретные группы и/или отдельные белки, подвергшиеся окислительной модификации.

ОМБ значимо отрицательно коррелируют с оксидом азота, и, возможно, снижение содержания NO у больных СД 2 происходит за счет окислительной модификации эндотелиальной синтазы, что и определяет готовность к атерогенным повреждениям сосудистой стенки.

Определение окисленных модифицированных белков может быть как ранним, так и интегральным тестом метаболических нарушений и, в перспективе, гемостазиологических нарушений при СД 2. Кроме того, не исключена возможность использования содержания различных фракций модифицированных белков в качестве прогностического теста у больных СД 2 и ИБС.

Окислительная модификация белков у больных СД 2 подтверждает свободно-радикальную теорию атерогенеза, а также уточняет стадийность процесса.

Литература

1. *Kukharchuk V.V.* Липидно-инfiltrационная теория. Действительно ли меняется сценарий? Кардиологический вестник 2009; IV(XVI) (1): 60—61.
2. *Ланкин В.З.* О роли свободных радикалов в атерогенезе. Кардиологический вестник 2009; IV(XVI) (1): 62—63.
3. *Ланкин, В.З.* Особенности модификации липопротеинов низкой плотности в развитии атеросклероза и сахарного диабета типа 2. Кардиологический вестник 2008; 3(1): 60—68.
4. *Рагино Ю.И., Баум В.А., Полонская Я.В., Воевода М.И., Никитин Ю.П.* Атеросклероз и окислительные процессы. Новые способы оценки окислительной модификации белков. Бюллетень СО РАМН 2006; 4(122): 67—73.
5. *Ланкин В.З. и др.* Механизм окислительной модификации липопротеинов низкой плотности при окислительном и карбонильном стрессах. Биохимия 2007; 72(10): 1330—1341.
6. *Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н.* Методы оценки свободно-радикального окисления и антиоксидантной системы организма. СПб: Фолиант; 2000; 104 с.
7. *Дубинина Е.Е. и др.* Окислительная модификация белков сыворотки крови человека. Методы ее определения. Вопр мед химии 1995; 41(1): 24—26.
8. *Реброва О.Ю.* Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М: МедиаСфера; 2006; 312 с.