

ВОЗМОЖНОСТЬ ОЦЕНКИ НАЛИЧИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ТИПА 2 С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА КЛИНОВИДНОЙ ДЕГИДРАТАЦИИ

Т. Г. Щербатюк, О. В. Занозина, Н. Н. Боровков Е. С. Клинцева

Нижегородская государственная медицинская академия

Статья посвящена уточнению возможности метода клиновидной дегидратации в комплексной оценке выраженности окислительного стресса у больных сахарным диабетом типа 2. Проведено комплексная оценка свободно-радикального окисления у 37 больных сахарным диабетом 2 типа, включая и метод клиновидной дегидратации. Проведенный корреляционный анализ свидетельствовал о значимой взаимосвязи между некоторыми показателями морфологической картины высушенной капли сыворотки крови и показателями, характеризующими окислительный стресс у больных сахарным диабетом типа 2. Сделан вывод о том, что используя метод клиновидной дегидратации, можно комплексно оценить выраженность окислительного стресса и его этапность у конкретного пациента.

Ключевые слова: сахарный диабет, окислительный стресс, карбониловый стресс, клиновидная дегидратация.

В настоящее время доказано, что в основе осложнений сахарного диабета типа 2 (СД 2) лежит гипергликемия, индуцированные ею неферментное гликозилирование белков и окислительный стресс (ОС). В свою очередь, известно, что ОС индуцирует карбониловый стресс (КС) [2]. В результате потенцируются все патогенетические звенья развития осложнений. Для оценки выраженности ОС существует достаточное количество методов [1,2,7]. Трудности количественной оценки выраженности окислительного стресса обусловлены высокой реактивностью свободных радикалов. В клинической практике о состоянии окислительного баланса судят по содержанию первичных и вторичных продуктов перекисного окисления в эритроцитах и плазме крови: диеновых и триеновых конъюгатов, оснований Шиффа, малонового альдегида, а также по активности антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатион-S- трансферазы и глутатионредуктазы, содержанию витаминов С, Е и тиоловой кислоты [7]. Для оценки состояния окислительного статуса может быть использован метод количественной оценки изопростагландина F2 типа III и IV (Liu T. et al, 1999), определение концентрации антител к белкам с изменённой свободными радикалами структурой (Toyokuni S., 1999), наличия нитротирозина в плазме (Myatt L. et al., 2000), определение общей способности плазмы связывать свободные радикалы (Mercuri F., 2001) [7]. Хотя эти исследования и информативны, но очень трудоёмки, дорогостоящи и дают представление о выраженности только какого либо компонента, т.е. односторонни. Нами

предпринята попытка оценить значимость метода клиновидной дегидратации в комплексной оценке выраженности окислительного и карбонильного стресса у больных сахарным диабетом.

Клиновидная дегидратация – метод, разработанный в лаборатории кристаллографии ФГУ « НИИ геронтологии Росздрава» академиком В. Н. Шабалиным и профессором С. Н. Шатохиной (1996, 1999), позволяющий оценить структурные изменения сыворотки крови [8] и тем самым сделать выводы о характеристике окислительных процессов, протекающих во всём организме [3,5].

Перспективность использования указанного метода показана для различных заболеваний - атеросклероза, онкопатологии, хронических дерматозов, неврологических заболеваний, лепры, заболеваний глаз, хронического алкоголизма, почечной недостаточности, гестоза у беременных и других патологических состояний (Инюткина Н. В. с соавт. 1997; Шабалин В. Н. с соавт., 1992,2004; Аюпова А. К. 2001; Кузнецова Т. В. с соавт., 2001; Шатохина С. Н. с соавт., 2001, 2004; Архангельский О.К. с соавт., 2004; Бережной Д. И., 2004., Девяткин А. А., 2004, Душкова В. А. с соавт.2004) [6]. Показана также значимость метода в постановке диагноза туберкулёза лёгких и оценке эффективности проведённой терапии [6]. Доказана эффективность метода клиновидной дегидратации для дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы [3]. Показана эффективность метода при скрининговых обследованиях для выявления гиперлипидемии и парапротеинемии [5]. Кроме того, имеются данные, что данный метод может быть успешно использован для выявления, диагностики уровня и установления этиологии эндогенной интоксикации [4]. Между тем, о возможности использовании клиновидной дегидратации у больных сахарным диабетом типа 2 имеются лишь единичные упоминания [4].

Цель исследования: оценить значимость метода клиновидной дегидратации в комплексной оценке выраженности окислительного стресса у больных сахарным диабетом типа 2 .

Материалы и методы

Нами обследовано 37 больных сахарным диабетом типа 2. Гликозилированный гемоглобин в среднем составил 7,3 %, возраст - 59 лет, длительность сахарного диабета - около 8 лет. Все пациенты имели поздние осложнения сахарного диабета.

Состояние прооксидантной системы оценивали по уровню: хемилюминесцентной активности (I_{max}) (Кузьмина Е. И., 1983), содержанию молекулярных продуктов ПОЛ: диеновых конъюгатов (ДК), триеновых конъюгатов (ТК) на спектрофотометре СФ-26 фирмы « ЛОМО» (Ленинград), малонового диальдегида (МДА), оснований Шиффа (ОШ)(Fletcher,1973) на флюориметре АСО-1. Общие липиды определялись с помощью стандартного набора реактивов Lachema. Окислительную модификацию белков (ОМБ) оценивали по Levine (1990) в модификации Е.Е. Дубининой (1995). Состояние антиоксидантной системы определяли по общей антиоксидантной активности(S)(АОА=1/S) (Кузьмина Е. И., 1983). Состояние ферментативной антиоксидантной системы оценивали по активности: супероксиддисмутазы (СОД)(Nishirimi,1972), в адаптации Дубининой и др. (1988); каталазы(Aebi,1970), в адаптации Королюк и др. (1988), Чевари и др.

(1991). [1]. У всех больных проводилось исследование морфологической картины высушенной капли сыворотки крови с помощью метода клиновидной дегидратации.

Метод клиновидной дегидратации заключался в следующем: с помощью пипеточного микродозатора каплю сыворотки объемом 0,01 мл наносили на чистое предметное стекло. Эту каплю высушивали при комнатной температуре в закрытом шкафу. Через 18-24 полученную каплю рассматривали под микроскопом в проходящем свете [8]. Проводилось фотографирование фаций с помощью микроскопа Leica DMLS и CCD- камеры Digital KOCOM , соединённой с компьютером Pentium III .Использовали увеличения в 25 раз.

Отмечали наличие следующих патологических структур [4 - 6,8]:

маркёры острых и хронических воспалительных процессов (языковые микроструктуры), маркёры процессов склерозирования (листовидные структуры), маркёры напряжённости адаптационных механизмов гомеостаза (трещины «закрутки»), а также оценивали наличие морщин.

Кроме того, учитывали сам факт наличия микроструктур и их размер. Для характеристики структурных маркёров патологических процессов использовали следующая система оценки :

- слабая степень выраженности – 1 балл,
- умеренная степень выраженности – 2 балла,
- высокая степень выраженности – 3 балла.

Полученные в ходе исследования результаты обрабатывались статистически общепринятыми методами статистики на компьютере IBM PC при помощи пакета прикладных программ для обработки медицинской и биологической информации « STATISTICA 6.0» (StatSoft,Inc.,США). Характер распределения определялся при помощи критериев Вилка-Шапиро ($n < 30$) и Колмогорова – Смирнова ($n > 30$). Для анализа взаимосвязи двух признаков использовали корреляционный анализ по Спирмену (для непараметрических критериев). Об её характере судили по знаку и абсолютной величине коэффициента корреляции. При величине $r < 0,25$ связь считалась слабой, при $0,25 < r < 0,75$ - умеренной, а при $r > 0,75$ - значительной.

Результаты и обсуждение

Нами отмечена тесная взаимосвязь между интенсивностью окислительного стресса у больных СД типа 2 и гликозилированным гемоглобином, являющимся интегральным показателем нарушения углеводного обмена ($r=0,576$; $p=0,000196$), подтверждая также патогенетическую общность свободно-радикального окисления и гликозилирования, а также обратная взаимосвязь между антиоксидантной активностью и гликозилированным гемоглобином ($r= -0,532$; $p=0,0007$), акцентируя внимание на необходимость коррекции антиоксидантного статуса с целью прерывания порочного круга «окислительный стресс-карбонильный стресс – окислительная модификация белков-гликозилирование – окислительный стресс».

Отмечена умеренная взаимосвязь с содержанием гликозилированного гемоглобина и молекулярных продуктов окислительного стресса, в том числе ДК ($r=0,476$; $p=0,0003$), ТК ($r=0,457$; $p=0,0004$), МДА($r=0,411$; $p=0,006$), а также корреляция окисленных модифицированных белков с уровнем гликированного гемоглобина($r=0,471$; $p= 0,002$).

Нами найдены также следующие корреляции отдельных показателей морфологической картины высушенной капли сыворотки крови (фации) у больных СД типа 2 с уровнем гликированного гемоглобина (табл.1)

Таблица 1.

Корреляции фации с уровнем гликированного гемоглобина.

Качественные показатели фации (n=37)	Коэффициент корреляции и достоверность
«Языковые микроструктуры 1»	$r= 0,326; p=0,0048$
«Трещины 1»	$r= 0,446; p=0,0055$

Наличие «языковых микроструктур» положительно коррелировало с уровнем гликозилированного гемоглобина ($r= 0,326; p=0,0048$). Аналогичная ситуация складывалась и относительно взаимосвязи наличия «трещин» и интегрального показателя нарушения углеводного обмена - гликозилированного гемоглобина ($r= 0,446; p=0,0055$), свидетельствуя о напряжённости адаптационных механизмах гомеостаза при декомпенсации сахарного диабета типа 2.

Следовательно, установлена тесная связь как показателей окислительного стресса, так и отдельных показателей, характеризующих фации больного СД, с нарушением углеводного обмена у больных СД типа 2.

При оценке взаимосвязи между отдельными молекулярными продуктами ПОЛ и некоторыми качественными показателями фации больных СД, в баллах, полученными с помощью метода клиновидной дегидратации, также обнаружена значимая взаимосвязь (табл.2)

Таблица 2.

Корреляции отдельных микроструктур фации в баллах с показателями окислительного стресса

Показатели(n=37)	Коэффициент корреляции и достоверность
«Языковые микроструктуры 1» и МДА	$r= 0,337; p=0,041$
«Языковые микроструктуры 4» и МДА	$r= 0,344; p=0,037$
«Языковые микроструктуры 1» и ДК	$r= 0,4184; p=0,009$
«Языковые микроструктуры 4» и ДК	$r= 0,5626; p=0,00029$
«Трещины 4» и ДК	$r= 0,355; p=0,00308$
«Трещины 1» и ТК	$r= 0,366; p=0,0025$

1- наличие микроструктур,

4- выраженность микроструктур

Наличие «языковых микроструктур» значимо ассоциировалось как с наличием ДК($r=0,418; p=0,009$), так и с их размером ($r=0,5626; p=0,00029$). Данный показатель также коррелировал с уровнем малонового диальдегида ($r= 0,337; p=0,041$ и $r= 0,344; p=0,037$, соответственно для наличия и размера «языков»), следовательно, данный параметр («языковые микроструктуры»), характеризующий выраженность хронического

воспаления, репрезентативен относительно выраженности свободно-радикального окисления у больных сахарным диабетом типа 2. Показатель «Языковые микроструктуры 1» отрицательно коррелировал с активностью СОД ($r = - 0,35$; $p=0,033$), а показатель «Листовидные микроструктуры» - с активностью КАТ ($r = - 0,382$; $p= 0,02$ для «Листовидные микроструктуры 1» и $r = - 0,328$; $p = 0,047$ для «Листовидные микроструктуры 4».) Следовательно, наличие «языковых микроструктур», характеризующих хроническое воспаление, и наличие и размер «листовидных микроструктур», характеризующих процессы склерозирования, возможно, как исход воспаления, связаны не только с активностью ферментативной антиоксидантной системы, но и с этапностью включения в процесс СРО антиоксидантных ферментов: само наличие «языковых микроструктур» отрицательно коррелирует с выраженностью самого первого фермента, выступающего в борьбу со свободными радикалами – СОД, тогда как показатель «листовидные микроструктуры», коррелируя с активностью КАТ, свидетельствует о вовлечении в процесс последующих ферментов.

Выводы

С помощью метода клиновидной дегидратации можно объективно оценить наличие и выраженность окислительного стресса у конкретного пациента с ДД типа 2 и его этапность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян, А.В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма/ А. В. Арутюнян, Е. Е. Дубинина – Москва, 2000 - 103с.
2. Балаболкин, М. И. Лечение сахарного диабета и его осложнений :руководство для врачей/ М. И. Балаболкин М. И., Е. М. Клебанова, В. М. - М.: «Медицина», 2005- 512с.
3. Исследование морфологической картины и свободно-радикальной активности жидкой части пунктатов узловых образований щитовидной железы./ Ю. П. Потехина [и др.] // Нижегородский медицинский журнал – 2004. - № 3. - С. 11-15.
4. Морфологический анализ плазмы крови при эндогенной интоксикации /Л. М. Обухова [и др.] // Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского.- Н.Новгород.- 2007.- №6.- С.- 104-107.
5. Отражение биохимических параметров сыворотки крови в её морфологической картине (сообщение III) /Ю.П.Потехина [и др.]// Нижегородский медицинский журнал.- 2004.- № 3.- С. 93-97.
6. Рыжкова, О. А. Клинико-диагностическое значение морфологической картины сыворотки крови у больных туберкулёзом лёгких: автореф. дис... канд. мед.наук.- Москва, 2008. - 30с.
- 7.Смирнова, О. М.. Свободно – радикальное окисление и антиоксидантная защита при сахарном диабете: пособие для врачей / сост. О. М. Смирнова, Т. В. Никонова /под редакцией И. И. Дедова. – Москва, 2003- 40с.
8. Шабалин, В.Н. Морфология биологических жидкостей человека / В. Н. Шабалин, С. Н. Шатохина.- М.: Христо,2001.- 304с

**POSSIBILITY OF ESTIMATION
OF OXIDIZING STRESS FOR PATIENTS BY
DIABETES MELLITUS OF TYPE 2 BY METHOD
OF WEDGE-SHAPED DEHYDRATION**

T.G. Scherbatuk, O.V. Zanozina, N.N. Borovkov., E.S. Klincova

Public educational institution of higher professional education « Nizhegorodskaya state medical academy» federal agenstva on a health protection and social development, Nizhniy Novgorod

Resume:

The article is devoted to clarification of possibility of method of wedge-shaped dehydration in the complex estimation of expressed of oxidizing stress for patients by diabetes mellitus of type 2. It is conducted complex estimation of oxidizing stress at 37 patients diabetes 2 types, including the method of wedge-shaped dehydration. The conducted cross-correlation analysis testified to meaningful intercommunication between some indexes of morphological picture of the dried up drop of whey of blood and to the indexes characterizing oxidizing stress for patients by diabetes mellitus of type 2. A conclusion is done that using the method of wedge-shaped dehydration, it is possible complex to estimate expressed of oxidizing stress and his stage for a concrete patient.

Keywords: diabetes mellitus, oxidizing stress, karbonilovy stress, wedge-shaped dehydration.

Щербатюк Татьяна Григорьевна, д.б.н., профессор, зав. кафедрой биологии Нижегородской государственной медицинской академии. Тел: +7-910-383-22-91.

Боровков Николай Николаевич, д.м.н., профессор, зав. кафедрой госпитальной терапии Нижегородской государственной медицинской академии. Тел: +7-910-382-20-72

Занозина Ольга Владимировна, к.м.н., ассистент кафедры госпитальной терапии Нижегородской государственной медицинской академии. Тел: +7-960-172-77-85, факс: 8-831-438-93-83, e-mail:zwx2@mail.ru

Клинцова Елена Сергеевна, к.б.н., ассистент кафедры биологии Нижегородской государственной медицинской академия.