

## **ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ТИПА 2 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ КОМПЕНСАЦИИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА И ДЛИТЕЛЬНОСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

*О. В. Занозина, Т. Г. Щербатюк, Н. Н. Боровков*

ГОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия Росздрава»

**Окислительный стресс при сахарном диабете типа 2 характеризуется генерацией свободных радикалов, приводящих, в частности, к окислительной модификации белков (ОМБ). Показано, что модификация белков происходит и при субкомпенсации углеводного обмена, однако максимальные изменения имеют место при декомпенсированном СД типа 2 большой длительности. Для оценки этапности, направленности, выраженности окислительного стресса у больных СД типа 2 предложено использовать различные составляющие ОМБ и их соотношения. Компенсации углеводного обмена недостаточно для прерывания порочного круга (генерация свободных радикалов – окислительная модификация белков – перекисное окисление липидов – генерация свободных радикалов).**

**Ключевые слова:** окислительная модификация белков, сахарный диабет, компенсация углеводного обмена.

Гипергликемия вызывает усиление окислительного стресса и неферментативного гликозилирования белков у больных сахарным диабетом типа 2 (СД 2). Эти механизмы взаимосвязаны [1,2]. Окислительный стресс сопровождается повышенным образованием свободных радикалов, которые взаимодействуют с липидами, углеводами, аминокислотами, модифицируют белки, образуя продукты первичного окисления и реактивные карбонильные интермедиаты (карбонильный стресс) [2]. Последние могут как подвергнуться детоксикации, взаимодействуя с глутатионом, так и образовать вторичные продукты окисления и неокисляемые конечные продукты гликозилирования [2], которые сами являются одним из источников активных форм кислорода, вызывающих окисление белков и липидов мембран, что ведёт к неспецифическим изменениям структуры и функции клеточных мембран [3]. ОМБ сопровождается либо образованием белковых агрегатов за счёт межмолекулярных связей (дисульфидных), либо фрагментацией белков с распадом на низкомолекулярные компоненты, в связи с чем более подвержены протеолизу и конформационным изменениям. Было показано, что ОМБ ведёт к ускорению атеросклероза [4]. Однако в настоящее время не выделено различие ОМБ в зависимости от длительности СД типа 2 и его компенсации.

ОМБ может осуществляться за счёт ферментативных и неферментативных систем. Интенсивность ОМБ можно оценивать с использованием различных методов, отражающих изменение гидрофобности белковых молекул, потерю гистидиновых остатков, изменение ультрафиолетового спектра белков. Наиболее информативным является определение карбонильных группировок аминокислотных остатков белков, которые образуются в результате окислительной модификации исследуемых белков в реакции с 2,4- ДНФН (2,4-динитрофенилгидразином) [5]. Реакция этих группировок со специфическими реагентами на карбонильные группы позволяет оценить степень окислительной деструкции белков.

**Цель исследования:** уточнить различие ОМБ в зависимости от компенсации углеводного обмена у больных СД типа 2 и от длительности заболевания.

### **Материалы и методы**

Нами обследовано 32 пациента, страдающих сахарным диабетом типа 2. По степени компенсации они были разделены на 2 группы: В I группу вошли 16 человек. Длительность заболевания в среднем составляла 8 лет, возраст пациентов - 65 лет. Уровень гликозилированного гемоглобина свидетельствовал о компенсации сахарного диабета- 6,8% [6] . Во II группу вошли также 16 человек. Длительность заболевания в среднем составляла 9 лет, возраст пациентов – 62 года, гликированный гемоглобин подтверждал декомпенсацию сахарного диабета -8,2%. Все пациенты имели поздние осложнения сахарного диабета.

Состояние прооксидантной системы оценивали по уровню: хемилюминесцентной активности (Imax) (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. Состояние антиоксидантной системы оценивали по общей антиоксидантной активности (АОА=1/S), где S - светосумма) (Кузьмина Е. И., 1983). Состояние ферментативной антиоксидантной системы оценивали по активности: супероксиддисмутазы (СОД) (Nishirimi, 1972), в адаптации Дубининой и др. (1988); каталазы (КАТ) (Aebi, 1970), в адаптации Королук и др. (1988), Чевари и др. (1991).

Окислительную модификацию белков оценивали по Levine [7] в модификации Е.Е. Дубининой [8]. Для расчёта использовался коэффициент молярной экстинкции  $22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Использовали методы оценки спонтанного окисления белка, характеризующего окислительный потенциал организма, и стимулированного, которое характеризует степень резервно-адаптационных возможностей организма [9].

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 ( $n > 30$ ). Центральные тенденции и рассеяния количественных признаков, имеющих приближённо нормальное распределение описывали средним значением (М) и средним квадратическим отклонением (s) в формате М(s). Если количественные признаки не имели приближённо нормального распределения, их описывали медианой и интерквартильным размахом [25-й и 75-й процентиль]. При нормальном распределении переменных для определения различий между двумя независимыми группами использовался непарный t-критерий Стьюдента, а при непараметрическом - критерий Вилкоксона-Манна-Уитни. Достоверными считались различия при уровне  $p < 0,05$  [10].

### Результаты и обсуждение

При длительном декомпенсированном СД типа 2 по сравнению с компенсированным диабетом статистически значимо повышена интенсивность свободно-радикального окисления ( $p = 0,001$ ), снижена общая антиоксидантная активность ( $p = 0,004$ ), увеличено содержания общих липидов ( $p = 0,026$ ). Однако достоверных различий по уровню свободнорадикального окисления липидов и белков, а также по активности антиоксидантных ферментов нами не найдено (табл. 1).

Таблица 1

**Показатели свободно-радикального окисления в плазме больных СД типа 2 в зависимости от компенсации сахарного диабета (Ме [25;75 процентиль], М(s))**

Показатель	Компенсированный СД тип2 (n=16)	Декомпенсированный СД тип2 (n=16)	p
HbA1c, %	6,8[6,25;7]	8,2[7,55;8,7]	<b>0,0004</b>
Длительность СД, лет	8[6;10]	9[5;12]	0,20
Возраст, годы	65[57,5;69]	62[55;66]	0,53
СОД, ед. акт-ти /мг Hb мин	47,26[38,17;53,32]	46,25[38,75;52,63]	0,72
КАТ ед. акт-ти /мг Hb мин	0,11[0,08;0,16]	0,10[0,08;0,14]	0,92
ОБ, г / л	72,53[60,65;87,24]	74,06[61,89;83,20]	0,82
АДФГ с, ед. оптич. плотности	0,00039(0,00003)	0,00045(0,00009)	0,46
КДФГс, ед. оптич. плотности	0,003[0,001;0,004]	0,004[0,003;0,004]	0,10
АДФГ инд, ед. оптич. плотности	0,0005[0,0016;0,007]	0,0006[0,0005;0,0007]	0,31
КДФГ инд , единицы оптич.	0,0044[0,0015;0,0067]	0,0044[0,003;0,005]	0,49

плотности			
МДА, ед. оптич. плотности	4,19[3,35;5,085]	5,64[4,75;6,74]	0,068
ДК, ед. оптич. плотности	0,0469(0,009)	0,053(0,001)	0,70
ТК, ед. оптич. плотности	0,0056(0,023)	0,051(0,004)	0,083
ОЛ, г/ л	<b>0,099(0,035)</b>	<b>0,134(0,010)</b>	<b>0,026</b>
Интенсивность, mV	<b>1,94[1,70;2,04]</b>	<b>2,16[2,06;2,23]</b>	<b>0,001</b>
Общая антиоксидантная активность, относ.ед.	<b>0,046[0,041;0,051]</b>	<b>0,039[0,037;0,041]</b>	<b>0,004</b>

*АДФГ с - альдегиддинитрофенилгидразоны спонтанные*

*АДФГ инд – альдегиддинитрофенилгидразоны индуцированные*

*КДФГс - кетодинитрофенилгидразоны спонтанные*

*КДФГ инд – кетодинитрофенилгидразоны индуцированные*

Однако, при сравнении составляющих ОМБ (спонтанные и индуцированные) в одной и той группе модифицированных белков при длительно текущем компенсированном и декомпенсированном СД 2, нами обнаружено, что АДФГ при декомпенсации меняются незначительно (отмечается снижение на 4 %), в то время как уровень КДФГ возрастает на 34%, свидетельствуя об истощении резервных, в том числе, и антиоксидантных ресурсов организма, что и согласуется с приведёнными выше данными, характеризующими активизацию свободно-радикального окисления (усиление интенсивности свободнорадикального окисления,  $p=0,001$ ; снижение общей антиоксидантной активности,  $p=0,004$ )

Ранее было показано, что образование в молекулах белков N(e)-(карбоксиметил) лизиновых сайтов при их гликировании может приводить к прочному связыванию металлов переменной валентности, прежде всего меди, причём эти комплексы меди способны сами генерировать радикалы в присутствии  $H_2O_2$ , что, в частности, вызывает окисление аскорбата и деполимеризацию белков [3], чем можно объяснить отсутствие различий активности антиоксидантных ферментов при достижении компенсации при длительно текущем сахарном диабете. Следовательно, при длительно текущем, как компенсированном, так и декомпенсированном СД типа 2 не происходит достоверного различия активности антиоксидантных ферментов, как защитников первой линии, вероятно, вследствие окислительной модификации белков и гликозилирования.

В связи с этим возникает необходимость усиливать антиоксидантную ферментативную защиту для прерывания порочного круга взаимосвязи свободнорадикального стресса, карбонильного стресса, гликозилирования и при хороших гликемических показателях у больных сахарным диабетом типа 2.

Для решения вопроса о зависимости показателей перекисного окисления липидов и ОМБ от длительности сахарного диабета типа 2 при субкомпенсации мы сформировали 2 группы пациентов, не различающиеся по возрасту, полу, уровню гликированного гемоглобина, однако различающиеся по длительности заболевания (табл.2)

Таблица 2

**Показатели окислительного стресса, окислительной модификации белков в плазме больных СД типа 2 в зависимости от длительности сахарного диабета (Ме [25;75 процентиль], M(s))**

Показатель	СД менее 5 лет (n=8)	СД более 5 лет (n=16)	p
Возраст, лет	63[63;64]	66[65,5;67,5]	0,438
Длительность сахарного диабета,	<b>3[2;4]</b>	<b>9[8;9]</b>	<b>0,01</b>

<b>лет</b>			
HbA1c, %	7,25[6,3:8,2]	7,3[6,8:7,9]	0,96
СОД, ед. акт-ти /мг Нб мин	56,25 [45,50:67,00]	50,80 [42,50:65,85]	0,629
КАТ ед. акт-ти /мг Нб мин	0,11 [0,09:0,13]	0,10 [0,08:0,13]	0,97
Общий белок, г/л	65,94[60,87: 71,01]	67,97[59,00:86,23]	0,84
АДФГ с, ед. оптич. плотности	0,00045 [0,00040:0,00050]	0,00040 [0,00020:0,00050]	0,31
КДФГс, ед. оптич. плотности	0,003[0,003:0,004]	0,0022[0,0012:0,0039]	0,72
АДФГ инд, ед. оптич. плотности	0,00065[0,0006:0,0007]	0,00060[0,0003:0,0007]	0,63
<b>КДФГ инд , единицы оптич. плотности</b>	<b>0,0029[0,0005:0,0034]</b>	<b>0,0044[0,0038:0,0050]</b>	<b>0,0016</b>
<b>МДА, ед. оптич. плотности</b>	<b>3,68[2,5:4,86]</b>	<b>5,0[4,70:7,0]</b>	<b>0,055</b>
<b>Диеновые конъюгаты ( ДК), ед. оптич. плотности</b>	<b>0,033(0,009)</b>	<b>0,089(0,0053)</b>	<b>0,029</b>
Триеновые конъюгаты (ТК), ед. оптич. плотности	0,0042(0,0047)	0,0079(0,0445)	0,52
<b>Общие липиды, г/л</b>	<b>0,004[0,003:0,005]</b>	<b>0,006[0,002:0,007]</b>	<b>0,012</b>

*АДФГ с - альдегиддинитрофенилгидразоны спонтанные*

*АДФГ инд – альдегиддинитрофенилгидразоны индуцированные*

*КДФГс - кетодинитрофенилгидразоны спонтанные*

*КДФГ инд – кетодинитрофенилгидразоны индуцированные*

При увеличении длительности диабета достоверно увеличивается количество общих липидов ( $p=0,012$ ), промежуточных (ДК,  $p=0,029$ ), конечных молекулярных продуктов перекисного окисления липидов ( МДА,  $p= 0,055$ ) и одновременно увеличивается количество модифицированных белков (индуцированных) ( $p= 0,0016$ ), что указывает на то, что именно индуцированные КДФГ указывают на истощении резервных сил организма при длительно текущем сахарном диабете.

Следовательно, с увеличением длительности сахарного диабета достоверно увеличивается количество субстрата для перекисного окисления липидов ( $p=0,012$ ) и генерации свободных радикалов, последние, в свою очередь, через повышенное образование реактивных интермедиатов глюкозы увеличивают количество модифицированных окисленных белков ( $p=0,0016$ ), причём последние сами являются источником свободных радикалов и активизирует как свободно-радикальное окисление, так и гликирование.

#### **Выводы**

- Окислительная модификация белков является репрезентативным маркёром свободно-радикального окисления у больных сахарным диабетом типа 2.
- Наличием ОМБ, вероятно, можно объяснить отсутствие различий активности антиоксидантных ферментов при длительно текущем сахарном диабете типа 2.
- Модификация белков происходит и при субкомпенсации углеводного обмена, однако максимальные изменения имеют место при декомпенсированном СД типа 2 большой длительности, вероятно, вследствие потенцирования токсических эффектов свободных радикалов.

- Для оценки этапности, направленности, выраженности окислительного стресса у больных СД типа 2 предложено использовать различные составляющие ОМБ и их соотношения.
- Достижение компенсации не разрывает порочный круг (генерация свободных радикалов – окислительная модификация белков – перекисное окисление липидов - генерация свободных радикалов)
- Это даёт основание предположить, что введение антиоксидантов в комплексную терапию больных СД типа 2 может ограничить патогенетические механизмы развития осложнений у больных СД типа 2.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин М.И. Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений диабета / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова // Пробл. эндокринологии.-2000.-Т.46,№ 6.-С.29-34.
2. Балаболкин М.И. Лечение сахарного диабета и его осложнений: руководство для врачей / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова, В.М. Кремская - М.: Медицина,2005. – 512 с.
3. Ланкин В.З. Особенности модификации липопротеинов низкой плотности в развитии атеросклероза и сахарного диабета типа 2 / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Е.М. Кумскова // Кардиологический вестн . - 2008. -Т.3,№ 1.- С. 60 - 68
4. Саенко Ю.В. Роль оксидативного стресса в патологии сердечно-сосудистой системы у больных с заболеваниями почек / Ю.В. Саенко, А.М. Шутов // Нефрология и диализ.- 2004.- Т.6,№ 1.-С. 47-53.
5. Арутюнян А.В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма / А.В. Арутюнян, Е.Е. Дубинина, Н.Н. Зыбина.- М., 2000.-103с.
6. Дедов И.И. Федеральная целевая программа « Сахарный диабет»: методические рекомендации / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, М.А. Максимова.- М.: Медиа Сфера,2002.- 88 с.
7. Levine R.L. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins / R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver // Methods Enzymology.-1990.-Vol.186.-P.464-478.
8. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека. Методы её определения / Е.Е. Дубинина [и др.] // Вопр. мед. химии.- 1995.- Т.41,№1.- С. 24-26
9. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях / Ю.И. Губький [и др.] 2008.- Вип. 7.- № 814.
10. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: Медиа Сфера,2006.-305 с.

## OXIDIZING MODIFICATION OF ALBUMENS IN PLASMA OF BLOOD OF PATIENTS BY DIABETES MELLITUS OF TYPE 2 IN DEPENDENCE ON DEGREE OF INDEMNIFICATION OF CARBOHYDRATE EXCHANGE AND DURATION OF DIABETES MELLITUS OF TYPE2

*O. V. Zanozina, T. G. Scherbatus, N. N. Borovkov*

**Oxidizing stress at diabetes mellitus (DM) of type 2 characterized by the generation of free radicals, leading, in particular, to oxidizing modification of albumens. It is rotined that modification of albumens takes place and at subcompensation of carbohydrate exchange, however much maximal changes take place at decompensation of DM of type 2 large durations. For the estimation of stage, orientation, expressed of oxidizing stress for the patients of DM of type 2 it is suggested to use different parts of OMB and their correlations. Not enough for indemnification of carbohydrate exchange breaking of vicious circle ( a generation of free radicals is oxidizing modification of albumens is oxidation of lipids - generation of free radicals).**

**Keywords:** oxidizing modification of albumens, diabetes mellitus, indemnification of carbohydrate exchange.

Занозина Ольга Владимировна – к.м.н., ассистент кафедры госпитальной терапии НижГМА.

тел: +7- 960-172-77-85, факс: 8-831-438-93-83, e-mail: [zwx2@mail.ru](mailto:zwx2@mail.ru)

Щербатюк Татьяна Григорьевна - д.м.н., профессор, зав. кафедрой биологии НижГМА

Боровков Николай Николаевич – д.м.н., профессор, зав. кафедрой госпитальной терапии НижГМА