

Л.Б. Ким, В.Ю. Куликов, С.А. Асламова, В.А. Галенок, О.Ю. Верб

АКТИВНОСТЬ РЕАКЦИЙ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И СОДЕРЖАНИЕ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ПЕРВОГО ТИПА С ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИЕЙ

ГУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, Новосибирская государственная медицинская академия МЗ РФ, Новосибирск

При обследовании 36 больных сахарным диабетом I типа, разделенных на 3 группы в зависимости от функционального состояния почек (без признаков нефропатии, нефропатия в стадии микроальбуминурии, нефропатия в стадии протеинурии), показано, что на всех стадиях развития и прогрессирования диабетической нефропатии имеет место окислительный стресс, сопровождающийся дисбалансом в системах его регуляции антиоксидантами водорастворимой природы. Выявлено увеличение содержания гликозаминогликанов в сыворотке крови на ранних (доклинических) этапах развития заболевания. Компенсаторное перераспределение антиоксидантов водорастворимой природы (активация церулоплазмينا на стадии микроальбуминурии, увеличение содержания мочевой кислоты и сульфгидрильных групп на стадии протеинурии) не приводит к нормализации уровня продуктов липидной перекисидации.

Ключевые слова: сахарный диабет, нефропатия, перекисное окисление липидов, антиоксиданты, гликозаминогликаны.

Диабетическая нефропатия (ДН) представляет наибольшую угрозу для жизни больных сахарным диабетом (СД) не только в России, но и в странах Европы, США и Японии. Фактическая распространенность ДН значительно превышает регистрируемую (при СД I типа — в 2 раза, при СД II — в 8 раз). Смерть от уремии наступает каждого третьего больного СД I типа и каждого пятого больного СД II типа [5, 6].

Патогенез ДН представляет собой каскад метаболических нарушений, пусковым фактором которого является гипергликемия [9], сопровождающаяся активацией реакций перекисного окисления липидов [2, 11, 12] и повреждением почечной паренхимы.

В литературе широко обсуждаются основные пути реализации неблагоприятного воздействия свободных радикалов и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) при гипергликемии [14, 16]. Наряду с этим наметились перспективы в изучении патогенеза ДН, в частности, оценке метаболизма белков и протеогликанов почечной ткани в условиях гипергликемии [5]. При СД нарушается соотношение между процессами анаболизма и катаболизма гликозаминогликанов (ГАГ) и их форм в базальных мембранах клубочков и сосудов. Обнаружены количественные и качественные изменения экскреции с мочой сульфатированных ГАГ при прогрессировании ДН, свидетельствующие о значительной перестройке метаболизма

ГАГ, протеогликанов вследствие их гликозилирования, что приводит к структурно-функциональным нарушениям между ними [3, 4, 10].

Морфологическим субстратом в прогрессировании ДН являются клеточные и внеклеточные компоненты соединительной ткани, которые высокочувствительны к накоплению свободных радикалов и продуктов липидной перекисидации. В связи с этим в регуляции активности соединительной ткани и нефросклерогенеза важное значение имеют свободнорадикальные процессы, особенно нарушение баланса между системами наработки и детоксикации активных кислородных метаболитов. Установлено, что активные кислородные метаболиты и перекиси липидов оказывают дезорганизующее воздействие на структурно-функциональные элементы соединительной ткани [1, 14, 15]. В связи со сказанным цель исследования заключается в изучении взаимосвязи между активностью процессов ПОЛ и содержанием гликозаминогликанов у больных с СД I типа по мере развития диабетической нефропатии.

Методика

При проведении научного исследования выполнялись требования комитета по биомедицинской этике, обеспечивающие соблюдение прав, безопасность и охрану здоровья испытуемых. Обследовано 36 больных СД I типа в возрасте от 19 до 37 лет (средний возраст $25,1 \pm 2,4$ лет), из них 15 мужчин и 21 женщина. Длительность заболе-

вания от 6 месяцев до 27 лет, в среднем составила $10,5 \pm 1,3$ лет. В зависимости от функционального состояния почек все пациенты разделены на три группы. У больных 1-й группы ($n=12$) отсутствовали клинические и лабораторные признаки нефропатии (ДН₀), пациенты 2-й группы ($n=12$) имели ДН в стадии микроальбуминурии (МАУ), 3-я группа ($n=12$) была представлена пациентами с ДН в стадии протеинурии (ПРУ), но без нарушения азотвыделительной функции почек. Контрольную группу представили практически здоровые лица ($n=20$), средний возраст которых был сопоставим с больными и составил $21,5 \pm 0,4$ год.

Уровень гликемии оценивали с использованием глюкозооксидазного метода, Hb A1c турбидиметрическим методом на приборах COBAS INTEGRA с помощью моноклональных антител, скорость клубочковой фильтрации и величину канальцевой реабсорбции измеряли по клиренсу эндогенного креатинина. Протеинурию оценивали по содержанию белка в суточной моче, у больных без протеинурии определяли микроальбуминурию иммунотурбидиметрическим методом со специфической антисывороткой. Содержание гликозаминогликанов сыворотки крови определяли орциноловым методом [8]. Скорость реакций ПОЛ оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови по реакции с тиобарбитуровой кислотой по U.P. Steinbrecher [17]. Систему водорастворимых антиоксидантов оценивали по активности церулоплазмينا (ЦП, КФ 1.16.3.1, методом Н.С. Ravin в собственной модификации [7]), содержанию сульфгидрильных групп белков (SH-группы) и мочевой кислоты. Определение SH-групп в сыворотке крови проводили колориметрическим методом при помощи 5,5-дитиобис (2-нитробензойной) кислоты. Для оценки концентрации мочевой кислоты использовался ферментативный колориметрический тест с уреазой и 4-аминоантипирином. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакетов прикладных программ «Statistica 6.0 for Win».

Результаты

Исследование показало, что у всех больных наблюдалась значительная интенсификация процессов ПОЛ с накоплением в сыворотке крови вторичных продуктов: во всех группах было зафиксировано достоверное повышение содержания МДА по сравнению с контролем. Активация процессов ПОЛ отмечена даже у больных с ДН₀, у которых отсутствовали клинические и биохимические признаки ДН, в том числе и у больных с впервые выявленным СД (Таблица 1).

Оценка состояния неферментативного звена системы антиоксидантной защиты (АОЗ) установила компенсаторное увеличение содержания сульфгидрильных групп в сыворотке крови у пациентов с выраженной ДН (стадия ПРУ). Выявлено достоверное снижение содержания мочевой кислоты у больных без нефропатии, а также у больных с ДН в стадии МАУ, по всей видимости связанное с депрессией этого звена неферментативной системы АОЗ. Однако прогрессирование нефропатии сопровождается увеличением мочевой кислоты: у больных с ДН в стадии ПРУ отмечено достоверно высокое относительно ранних стадий ДН (ДН₀ и ДН в стадии МАУ, но не отличающееся от уровня группы контроля. Оценка активности церулоплазмينا показала, что у больных с ДН в стадии МАУ она достоверно выше по сравнению с контролем и группой больных с ДН в стадии ПРУ. На стадии МАУ содержание МДА практически не отличалось от контрольных значений.

Динамика изменения содержания в крови водорастворимых антиоксидантов (SH-группы, мочевая кислота и церулоплазмин) отражает роль каждого антиоксиданта на определенной стадии развития ДН в регуляции свободнорадикальных и перекисных процессов. По-видимому, в стадии МАУ контроль осуществляется в большей степени ЦП, в стадии ПРУ — мочевой кислотой и SH-группами

Изменение содержания в сыворотке крови гликозаминогликанов представлено на рисунке 1.

Таблица 1

Содержание малонового диальдегида и основных водорастворимых антиоксидантов у практически здоровых лиц и больных сахарным диабетом с различными стадиями диабетической нефропатии ($M \pm m$)

Показатель	Группы обследованных больных с СД 1 типа			
	Группа 1 ДН ₀	Группа 2 МАУ	Группа 3 ПРУ	Группа контроля
Малоновый диальдегид (МДА) крови, нмоль/мл	$3,09 \pm 0,2$	$2,89 \pm 0,19$	$3,82 \pm 0,24^{***}$	$2,70 \pm 0,12$
Сульфгидрильные группы крови, мкмоль/л	$2,41 \pm 0,18$	$2,48 \pm 0,12$	$3,18 \pm 0,1^{***}$	$2,23 \pm 0,09$
Мочевая кислота крови, нмоль/л	$0,14 \pm 0,01^{***}$	$0,17 \pm 0,01^{**}$	$0,24 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,01$
Церулоплазмин крови, мг/л час	$3,12 \pm 0,21$	$4,36 \pm 0,27^{***}$	$2,48 \pm 0,25$	$3,07 \pm 0,25$

Примечание: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$ уровень достоверности относительно группы контроля, ДН₀ — клинические и лабораторные признаки нефропатии отсутствуют, МАУ — диабетическая нефропатия в стадии микроальбуминурии, ПРУ — диабетическая нефропатия в стадии протеинурии.

Во всех трех группах отмечено достоверное по сравнению с контролем повышенное содержание ГАГ в сыворотке крови. При этом у больных с ДНО и ДН в стадии МАУ содержание ГАГ в сыворотке крови достоверно не различалось ($2,03 \pm 0,4$ и $1,8 \pm 0,3$ соответственно), тогда как в группе больных с ДН в стадии ПРУ (группа 3) уровень ГАГ был в 4,5 раза выше ($3,6 \pm 0,3$), чем в контрольной группе ($0,81 \pm 0,09$) и в 2 раза превосходил аналогичный показатель в группах 1 и 2 (при $p < 0,05$).

Таким образом, установлено, что у пациентов с СД I типа имеет место синдром гиперпероксидации, который усугубляется по мере становления и прогрессирования ДН. Прогрессирование нефропатии происходит на фоне увеличения SH-групп и мочевой кислоты в сыворотке крови. Снижение активности церулоплазмينا на стадии ПРУ, по всей видимости, характеризует степень участия и истощения церулоплазмينا в регуляции перекисных процессов у больных на этой стадии.

Выявленное достоверное увеличение содержания сульфгидрильных групп у больных с ДН в стадии ПРУ по сравнению с контролем на фоне повышения уровня в сыворотке крови МДА, а также наличие слабой положительной корреляции ($+0,23$ в группе больных с ДНО и $+0,34$ в группе больных с ДН в стадии с МАУ), позволяют сделать вывод о важной компенсаторной роли тиоловых антиоксидантов в процессах регуляции свободнорадикального окисления у больных СД I типа.

По мере прогрессирования нефропатии отмечено изменение корреляционных отношений между МДА и мочевой кислотой: у больных без нефропатии имеется слабая ($-0,36$) отрицательная связь, у пациентов с ДН в стадии МАУ — слабая положительная связь ($+0,2$), у больных с ДН в стадии ПРУ степень корреляции достигает высокодостоверных значений ($+0,78$). По-видимому, указанные изменения свидетельствуют о формировании сложных патогенетических взаимоотношений между отдельными компонентами системы АОЗ по мере прогрессирования нефропатии, протекающей на фоне интенсификации ПОЛ.

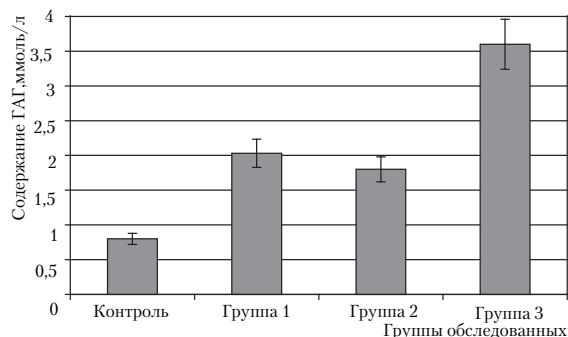


Рис. 1. Содержание гликозаминогликанов в сыворотке крови у больных сахарным диабетом I типа с различной степенью нефропатии

Динамичным оказалось также соотношение между содержанием МДА и активностью церулоплазмينا. Проведенный корреляционный анализ выявил слабую отрицательную связь ($-0,23$ в группе больных с ДН в стадии МАУ и $-0,39$ в группе больных с ДН в стадии ПРУ) между указанными параметрами. Этот факт позволяет предположить, что повышение активности ЦП при низком содержании мочевой кислоты по сравнению с контролем у больных с ДН в стадии МАУ и снижение ее у больных с ДН в стадии ПРУ на фоне увеличения мочевой кислоты и SH-групп указывает на разный вклад отдельных систем АОЗ в процессе прогрессирования нефропатии.

Корреляционные взаимосвязи между ГАГ и МДА представлены на рисунке 2. Установлено, что на стадии ДНО взаимосвязь между показателями отсутствует, но по мере прогрессирования заболевания она увеличивается. На стадии МАУ коэффициент корреляции равен $+0,52$, на стадии ПРУ увеличен до $+0,70$. Отмеченная высокая степень корреляции между ГАГ и МДА с тенденцией к росту этой связи по мере прогрессирования нефропатии свидетельствует о важной роли окислительного стресса в генезе деструкции соединительной ткани, индуцирующей нефросклеротические процессы.

Отмечена взаимосвязь между содержанием мочевой кислоты и ГАГ: слабая связь на ранних стадиях ДН (ДНО и МАУ) трансформировалась в высокодостоверную корреляцию, составившую $-0,70$.

Дисбаланс в системе АОЗ/ПОЛ приводит к глубоким структурно-функциональным изменениям органов и тканей. И одним из механизмов реализации повреждающего действия продуктов свободнорадикального окисления, помимо прямого цитотоксического, является дезорганизация

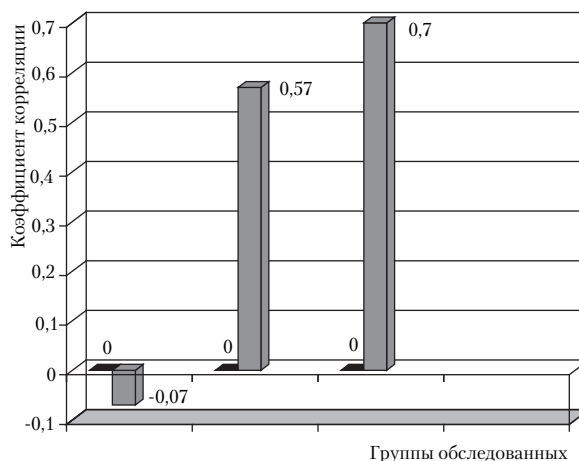


Рис. 2. Корреляция между содержанием гликозаминогликанов и продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови больных сахарным диабетом в зависимости от стадии прогрессирования нефропатии

соединительной ткани, и в частности ГАГ, что подтверждается высокостойкой корреляцией между МДА и ГАГ в сыворотке крови. Следует отметить, что несмотря на отсутствие корреляции между указанными соединениями в группе больных с ДН, достоверное повышение (в 2 раза) уровня ГАГ в сыворотке у больных на этой стадии уже отмечалось.

По мере становления и прогрессирования нефропатии отмечаются разнонаправленные изменения в содержании водорастворимых антиоксидантов, оказывающих регуляторное воздействие в гидрофильных областях биологических мембран и во внеклеточном матриксе.

Заключение. У больных сахарным диабетом I типа по мере развития и прогрессирования диабетической нефропатии усиливается выраженность окислительного стресса, обусловленная дисбалансом в регуляторной системе антиоксидантов водорастворимой природы. Компенсаторное перераспределение антиоксидантов (активация церулоплазмينا на стадии микроальбуминурии, увеличение содержания мочевой кислоты и сульфгидрильных групп на стадии протеинурии) не приводит к нормализации уровня продуктов липидной перекисной окисления. Достоверное увеличение содержания гликозаминогликанов в сыворотке крови определяется на ранних доклинических стадиях диабетической нефропатии.

Peculiarities of regulation of lipid peroxidation reactions in patients with insulin-dependent diabetes, having diabetic nephropathy

L.B. Kim, V.Yu. Kulikov, S.A. Aslamova, V.A. Galenok, O.Yu. Verba

While studying 36 patients with IDD, divided into 3 groups, depending on functional state of kidneys (without signs of nephropathy, nephropathy in the stage of microalbuminuria, nephropathy in the stage of proteinuria) it is shown that in all stages of development and progressing there was oxidative stress, accompanying by imbalance in its regulation systems by antioxidants, possessing water soluble nature. An increased content of blood serum glycosaminoglycans in the early (preclinical) stages of disease. Compensatory redistribution of antioxidants of water soluble nature (activation of ceruloplasmin in the stage of microalbuminuria, an increased content of uric acid and sulfhydryl groups in the stage of proteinuria) doesn't lead to normalization of the level of lipid peroxidation products.

Литература

1. Адаптогенные и лечебные свойства пелоидов / Под ред. В.Ю. Куликова. — Новосибирск, 2001. — 218 с.
2. Активность церулоплазмينا у больных ишемической болезнью сердца / Л.Б. Ким, Т.Г. Филатова, Е.Ю. Калмыкова, А.В. Яковлев // Бюл. СО РАМН. — 2001. — № 3. — С. 75-77.
3. Балаболкин М.И. Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений диабета / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова // Пробл. эндокринологии. — 2000. — № 6. — С. 29-34.
4. Воронцов А.В. Гликозаминогликаны в терапии диабетической нефропатии / А.В. Воронцов, И.И. Дедов, М.В. Шестакова и др. // Пробл. эндокринологии. — 1996. — № 5. — С. 14-18.
5. Дедов И.И. Диабетическая нефропатия (патогенез, лечение, профилактика) / И.И. Дедов, М.В. Шестакова // Врач. — 1996. — № 5. — С. 16-18.
6. Дедов И.И. Диабетическая нефропатия / И.И. Дедов, М.В. Шестакова. — М., 2000. — 239 с.
7. Кляцкин С.А. Определение гликозаминогликанов орциновым методом в крови больных / С.А. Кляцкин, Р.И. Лифшиц // Лаб. дело. — 1989. — № 10. — С. 51-53.
8. Обмен гликозаминогликанов и активность лизосомальных ферментов у больных с диабетической нефропатией / И.А. Бондарь, В.В. Климонтов, Г.А. Пауль и др. // Сахарный диабет. — 2002. — № 1. — С. 46-49.
9. Шестакова М.В. Диабетическая нефропатия: итоги XX века, перспективы XXI века / М.В. Шестакова // Сахарный диабет. — 2000. — № 1. — С. 15-18.
10. Юшков П.В. Морфогенез микроангиопатий при сахарном диабете / П.В. Юшков, К.В. Опаленков // Сахарный диабет. — 2001. — № 1. — С. 53-56.
11. Betteridge D.J. What Is Oxidative Stress? / D.J. Betteridge // Metabolism. 2000. Vol. 49. №2. P. 3-6.
12. Ceriello A. Патолофизиологические механизмы сосудистых осложнений при сахарном диабете: роль окислительного стресса / A. Ceriello // Медикография. — 1999. — Т. 21. — № 4. — С. 25-28.
13. Diabetic Complication / Edited by K.M. Shaw. — UK, 1996.
14. Eddy A. Interstitial fibrosis in hypercholesterolemic rats: role of oxidation, matrix synthesis and proteolytic cascades / A. Eddy // Kidney Int. — 1998. — Vol. 53. — P. 1182-1189.
15. Harman D. Free radicals theory of aging: inhibition of amyloidosis in mice by antioxidants; possible mechanism / D. Harman, D.E. Eddy, J. Noffsinger // J. Am. Geriatr. Soc. — 1996. — Vol. 24. — P. 203-210.
16. Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effect of melatonin / P.L. Montilla, J.F. Vargas, L.F. Tunc et al. // J. Pineal. Res. — 1998. — Vol. 25. — № 2. — P. 94-100.
17. Steinbrecher U.P. Free Radicals, lipoproteins and membrane lipids (Ed. L. Douste-Blary and Padeti) / U.P. Steinbrecher. — Plenum, New York, 1990. — 193 p.