Окислительный стресс у больных сахарным диабетом типа 2 с различной длительностью заболевания и разной степенью компенсации углеводного обмена

М.А. Панкратова, С.В. Пирожков, М.И. Балаболкин, П.Ф. Литвицкий

Кафедра патофизиологии, кафедра эндокринологии ФППО Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова (ректор – акад. РАН и РАМН М.А. Пальцев)

В последние годы накапливается все больше данных в пользу представления о существенной роли активных форм кислорода (АФК) и активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) в патогенезе осложнений сахарного диабета типа 2 (СД 2) [17,18]. Предполагается, что активация ПОЛ при СД в существенной мере связана с гипергликемией и опосредована избыточным гликированием белковых и небелковых молекул клеток и межклеточного вещества органов и тканей [19]. Окислительный стресс (ОС) лежит в основе развития многих поздних осложнений СД 2, в частности, микро- и макроангиопатий, нейропатий и нефропатий [9, 10]. При этом значимость гипергликемии в инициации и потенцировании генерации АФК показана как на экспериментальных моделях [14], так и в клинических исследованиях [1, 12].

Остается неясным, насколько эффективно можно снизить выраженность ОС при СД 2 путем уменьшения гипергликемии до оптимального уровня и достаточна ли сахароснижающая терапия для восстановления нормального баланса про- и антиоксидантных факторов. Кроме того, остается открытым вопрос о влиянии длительности заболевания и поздних осложнений на выраженность ОС при СД, а также имеется ли зависимость ОС от степени компенсации обменных нарушений.

В настоящей работе поставлена цель выяснить связь между проявлениями ОС у больных с СД 2 и следующими факторами: 1) уровнем глюкозы в плазме крови; 2) наличием поздних осложнений СД 2; 3) длительностью заболевания.

Материалы и методы

В исследование включено 65 пациентов с СД 2 в возрасте от 28 до 76 лет (M±m = 62,7±1,3), из них 51 пациент (группа Д) имели поздние осложнения СД (нейропатия у 90% пациентов, ретинопатия – у 57% , нефропатия – у 16 %); у 14 (группа Г) они не были выявлены. Также учитывалась длительность заболевания: 26 пациентов страдали СД более 10 лет (группа Е), у 39 больных заболевание было менее 10 лет. Все пациенты получали сахароснижающую терапию (препараты сульфонилмочевины, метформин, инсулинотерапия), на фоне которой в момент начала обследования у 19 пациентов (группа Б) отмечалась компенсация углеводного обмена и у 46 (группа В) – декомпенсация его (уровни глюкозы натощак соответственно $\leqslant$ или $>$ 7,8 ммоль/л). В группу контроля (группа А) входили 20 здоровых доноров в возрасте от 22 до 45 лет (M±m = 32,5±6,8).

У всех больных СД 2 и лиц контрольной группы при оценке выраженности окислительного стресса определяли величину генерации АФК фагоцитами крови (по показателям интенсивности базальной и стимулированной хемилюминесценции (ПИХЛбаз и ПИХЛстим) в 0,2 мл объема лейкомассы с концентрацией лейкоцитов 2500/мкл). При определении ПИХЛстим в качестве активатора добавляли 0,02 мл раствора люминола и 0,2 мл суспензии зимозана (20 мг зимозана в 1 мл) соответственно. Базальный и стимулированный ПИХЛ измеряли методом люминолзависимой люминесценции на хемилюминометре LKB WALLAC (Финляндия). После определения ПИХЛбаз и ПИХЛстим дополнительно рассчитывали их соотношение – коэффициент активации ($К_{акт}$), характеризующий резервный потенциал для усиления генерации СР при дополнительной стимуляции лейкоцитов.

Состояние антиоксидантной системы организма оценивалось по показателю антиперекисной активности (АПА) плазмы крови, представляющему собой отношение показателя хемилюминесценции, индуцированной перекисью водорода, к ее спонтанной хемилюминесценции [3–5]. Показатель АПА являлся величиной обратно пропорциональной антиперекисной активности плазмы (чем меньше значение АПА, тем выше антиоксидантный потенциал).

Активность перекисного окисления липидов в плазме крови при ОС определяли по уровню малонового диальдегида (МДА) в реакции с тиобарбитуровой кислотой [3].

Полученные данные обрабатывались статистически. В табл. 1–3 указаны средние значения определявшихся параметров и ошибки средних (M±m). При сравне-

Таблица 1

Показатели оксидативного стресса у больных СД 2 в зависимости от степени компенсации гликемии

Показатель	Группы					
	А (контроль – здоровые доноры) n = 20	Б (пациенты с хорошей и удовлетворительной компенсацией СД 2 по уровню гликемии натощак: глюкоза ≤ 7,8 ммоль/л) n = 19	В (пациенты с неудовлетворительной компенсацией СД 2 по уровню гликемии натощак: глюкоза > 7,8 ммоль/л) n = 46	p		
				между А и Б	между А и В	между Б и В
Уровень глюкозы плазмы крови натощак, ммоль/л	5,3±0,12	6,33±0,23	10,84±0,35	< 0,001	< 0,001	< 0,01
ПИХЛбаз, мВ/с • 10^6 лейк	66,7±9,1	82,0±14,2	149,2±13,8	< 0,05	< 0,05	< 0,05
ПИХЛстим, мВ/с • 10^6 лейк	278,4±59,5	404,5±30,3	546,6±40,4	< 0,05	< 0,05	< 0,05
$K_{акт}$	4,2±0,5	4,9±0,7	3,7±0,6	> 0,05	> 0,05	> 0,05
МДА, мкмоль/л	2,53±0,3	3,14±0,22	3,28±0,16	< 0,05	< 0,05	> 0,05
АПА	2,63±0,34	3,54±0,36	3,88±0,42	< 0,05	< 0,05	> 0,05

Таблица 2

Показатели оксидативного стресса у больных СД 2 в зависимости от наличия/отсутствия поздних осложнений СД 2

Показатель	Группы					
	А (контроль – здоровые доноры) n = 20	Г (пациенты с отсутствием поздних осложнений СД 2) n = 14	Д (пациенты с наличием поздних осложнений СД 2) n = 51	p		
				между А и Г	между А и Д	между Г и Д
Уровень глюкозы плазмы крови натощак, ммоль/л	5,3±0,12	7,92±0,85	9,94±1,1	< 0,01	< 0,01	> 0,05
ПИХЛбаз, мВ/с • 10^6 лейк	66,7±9,1	106,8±12,7	126,8±12,5	< 0,05	< 0,05	> 0,05
ПИХЛстим, мВ/с • 10^6 лейк	278,4±59,5	453,7±42,3	518,4±44,6	< 0,05	< 0,05	> 0,05
$K_{акт}$	4,2±0,5	4,2±0,7	4,1±0,9	> 0,05	> 0,05	> 0,05
МДА, мкмоль/л	2,53±0,3	3,16±0,23	3,26±0,19	< 0,05	< 0,05	> 0,05
АПА	2,63±0,34	3,62±0,41	3,84±0,38	< 0,05	< 0,05	> 0,05

нии средних 2 групп количественных показателей использовался парный критерий Стьюдента (t-тест). Различия считались достоверными при критических значениях t, соответствовавших 95% доверительному интервалу ($p<0,05$). При вычислениях использовалась программная система SAS (Statistical Analysis System).

Результаты

Влияние выраженности гликемии на показатели окислительного стресса

Как следует из данных табл. 1, у больных групп Б и В по сравнению со здоровыми (группа А) величина базальной и стимулированной хемилюминесценции фагоцитов крови (ПИХЛбаз и ПИХЛстим), а также уровни МДА и АПА в плазме крови были существенно выше ($p<0,05$). Средние значения Какт в группах Б и В также превышают контрольные величины, хотя и не достигали статистически достоверного диапазона ($p>0,05$).

При сопоставлении данных групп Б и В выявлено, что у больных с хорошей и удовлетворительной компенсацией СД 2 имеются статистически достоверные более низкие значения ПИХЛбаз (82,0±14,2 против 149,2±13,8 мВ/с · 10^6лейк, $p<0,05$) и ПИХЛстим (404,5±30,3 против 546,6±40,4 мВ/с · 10^6лейк, $p<0,05$). Это свидетельствует о том, что коррекция гликемии до значений менее 7,8 ммоль/л способствует переходу фагоцитов из чрезмерно активированного состояния в

Таблица 3

Показатели оксидативного стресса у больных СД 2 в зависимости от наличия/отсутствия поздних осложнений СД 2

Показатель	Группы					
	А (контроль – здоровые доноры) n = 20	Е (пациенты с длительностью СД < 10 лет) n = 39	Ж (пациенты с длительностью СД ≥10 лет) n = 26	p		
				между А и Е	между А и Ж	между Е и Ж
Уровень глюкозы плазмы крови натощак, ммоль/л	5,3±0,12	8,72±0,83	10,01±0,9	< 0,01	< 0,01	> 0,05
ПИХЛбаз, мВ/с • 10^6 лейк	66,7±9,1	106,1±14,5	144,5±24,6	< 0,05	< 0,05	> 0,05
ПИХЛстим, мВ/с • 10^6 лейк	278,4±59,5	481,4±72,3	542,9±56,4	< 0,05	< 0,05	> 0,05
$K_{акт}$	4,2±0,5	4,5±0,8	3,8±0,7	> 0,05	> 0,05	> 0,05
МДА, мкмоль/л	2,53±0,3	3,1±0,24	3,56±0,22	< 0,05	< 0,05	> 0,05
АПА	2,63±0,34	3,71±0,45	3,92±0,37	< 0,05	< 0,05	> 0,05

оптимальный режим, для которого характерны низкий уровень базальной генерации АФК и слабый ответ на стимуляцию фагоцитарной реакции.

Тем не менее, хорошая и удовлетворительная компенсации СД 2 по уровню гликемии натощак не обеспечивает полной нормализации функции фагоцитов, т.к. сохраняется статистически достоверное различие между группами А и Б по средним значениям ПИХЛбаз (66,7±9,1 против 82,0±14,2 мВ/с · 10^6 лейк, p<0,05) и ПИХЛстим (278,4±59,5 против 404,5±30,3 мВ/с · 10^6 лейк, p<0,05).

Аналогично в группах Б и В содержание МДА в крови и АПА достоверно увеличены по сравнению с контрольными значениями. Это дополнительно указывает на развитие ОС у больных СД 2 и подтверждает вывод о том, что достижение удовлетворительной и хорошей компенсации гликемии не приводит к полному устранению ОС.

Величина $K_{акт}$ примерно одинакова у здоровых доноров и больных СД 2 с разным уровнем гликемии (группы Б и В), составляя в группах А, Б и В соответственно 4,2±0,5, 4,9±0,7 и 3,7±0,6. Из этого следует, что резервный потенциал генерации АФК, включающийся при стимуляции лейкоцитов зимозаном, в среднем в 3–5 раз превышает фоновый уровень как при нормальных, так и повышенных значениях глюкозы в крови.

Различия между группами Б и В по показателям МДА и АПА статистически не достоверны. Это говорит о том, что ПИХЛбаз и ПИХЛстим как маркеры окислительного стресса более чувствительны к уровню гликемии, чем МДА и АПА.

Маркеры оксидативного стресса у пациентов с наличием и отсутствием осложнений СД 2 типа

В табл. 2 представлены данные пациентов с СД 2, с наличием или отсутствием поздних осложнений (ретинопатии, макроангиопатии, нейропатии, нефропатии). В группу Г включены 14 больных СД 2 без осложнений; в группу Д - 51 пациент с тем или иным вариантом специфической органной патологии, вызванной основным заболеванием.

Сопоставление групп Г и Д со здоровыми лицами группы А показывает, что у больных СД 2 имеются статистически достоверно более высокие уровни ПИХЛбаз, ПИХЛстим, МДА и АПА. Это свидетельствует о развитии ОС у всех пациентов с СД, причем независимо от того, имеются или нет у них специфические осложнения, обусловленные СД.

Группы Г и Д не различаются между собой ни по одному из изученных показателей. Эти результаты свидетельствуют о том, что при СД 2 признаки ОС (возрастание ПИХЛ, МДА и АПА) выявляются еще до возникновения специфических осложнений этого заболевания. Развитие осложнений СД сопровождается тенденцией к еще большему усилению генерации АФК и активации ПОЛ. Тем не менее, отсутствие достоверной разницы между группами Г и Д по измеряемым параметрам позволяет констатировать, что ОС у больных СД 2 провоцируется расстройствами, связанными с самим диабетом (гипергликемией), и в меньшей степени – с его специфическими осложнениями.

Влияние длительности заболевания сахарным диабетом на показатели окислительного стресса

По длительности основного заболевания все пациенты с СД 2 были разделены на 2 группы: группа Е – 39 больных с длительностью СД 2 < 10 лет; группа Ж – 26 больных с длительностью СД 2 ⩾ 10 лет.

Показатели ОС у пациентов указанных групп приведены в табл. 3. Видно, что по сравнению со здоровыми лицами у больных СД 2, независимо от длительности заболевания значения параметров ОС (ПИХЛбаз, ПИХЛстим, МДА и АПА) статистически

достоверно выше. По-видимому, это связано с выраженной гликемией в группах Е и Ж.

Показатели ОС в группах Е и Ж достоверно не различаются, хотя можно отметить тенденцию к нарастанию выраженности признаков ОС у лиц с более продолжительным течением заболевания.

Отсутствие статистически достоверных различий между группами Е и Ж по показателям ОС совпадает с отсутствием значимого различия ($p > 0,05$) между группами по уровню гликемии: 8,72±0,83 и 10,01±0,9 ммоль/л. Таким образом, для индукции ОС уровень гликемии имеет бо̀льшее значение, чем длительность СД 2.

Обсуждение

Полученные результаты (см. табл.1) свидетельствуют о наличии значимой связи между гипергликемией и выраженностью ОС (по значению параметров ПИХЛбаз, ПИХЛстим, МДА и АПА) у больных СД 2. Эти данные согласуются с результатами других исследователей, обнаруживших усиление проявлений ОС в условиях декомпенсации диабета по сравнению с состоянием компенсации (на фоне приема сахароснижающих препаратов) [1, 2, 9]. Кроме того, устранение гипергликемии при приеме диабетона и манинила сопровождается статистически достоверным снижением содержания МДА в крови больных сахарным диабетом [1].

Как следует из полученных нами данных, компенсация СД по уровню глюкозы натощак (7,8 ммоль/л) приводит лишь к ослаблению, но не к полному устранению признаков ОС. Отсюда следует, что при СД 2 гипергликемия является важным, однако не единственным фактором ОС, а снижение уровня глюкозы плазмы крови с аномально высокого до оптимального уровня не обеспечивает полной нормализации свободно-радикального окисления. Таким образом, пациенты с СД 2 нуждаются в проведении антиоксидантной терапии независимо от уровня гликемии. При этом доза антиоксидантов при содержании глюкозы > 7,8 ммоль/л должна быть выше в соответствии с более интенсивным характером ОС.

Следует отметить также тенденцию к более выраженному ОС у пациентов с осложнениями СД 2 (микро- и макрососудистыми), и по мере нарастания длительности заболевания (более 10 лет) можно предположить, что у таких пациентов, помимо гипергликемии, избыточному образованию свободных радикалов способствуют метаболические изменения в ишемизированных зонах тканей и органов [6, 15]. Тенденция к нарастанию признаков ОС при длительности заболевания более 10 лет может быть связана с пожилым возрастом пациентов [7, 11, 16] и увеличением среди них доли лиц со специфическими осложнениями СД 2, которые встречаются тем чаще, чем больше стаж заболевания [2, 9].

Можно заключить, что для выраженности ОС при СД 2 степень гипергликемии имеет существенно бо̀льшее значение, чем длительность заболевания или наличие специфических для диабета поздних осложнений. Это требует обязательного проведения у пациентов с СД 2 наряду со специфической и антиоксиданотной терапии [8, 18].

Литература

1. Антонова К.В., Недосугова Л.В., Балаболкин М.И. и др. Влияние компенсации углеводного обмена на свободнорадикальное окисление липопротеинов низкой плотности и активность ферментативной антиоксидантной системы при сахарном диабете типа 2. //Проблемы эндокринологии. –2003. –т.49. - №2. –с.51-53.
2. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Креминская В.М. Лечение сахарного диабета и его осложнений: руководство для врачей. //М.: ООО «Издательство «Медицина», 2005. –с.288-305.
3. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.П. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуратовой кислотой. //Вопросы мед химии. – 1987. –т.33. Вып.1. –с.118-122.
4. Корочкин И.М., Клебанов Г.И. и др. Хемилюминесценция лейкоцмтарной массы в диагностике острого ифаркта миокарда. //Тер.арх. – 1984. - №8. – с.29-31.
5. Любицкий О.Б. Определение антиокислительной активности биологических жидкостей хемолюминисцентным методом. //Дисс. канд. мед. наук. –М.: 1999. –135 с.
6. Медведев Ю.В., Толстой А.Д. Гипоксия и свободные радикалы в развитии патогенетических состояний организма. //М.: Триада-Х, 2000. –227 с.
7. Хавинсон В.Х., Баринов В.А., Арутюнян А.В. и др. Свободнорадикальное окисление и старение. //С-Пб.: Наука, 2003. –327с.
8. Шанин Ю.Н., Шанин В.Ю., Зиновьев Е.В. Антиоксидантная терапия в клинической практике (теоретическое обоснование и стратегия проведения). //С-Пб.: ЭЛБИ-СПб, 2003. –128 с.
9. Baynes J.W. Reactive oxygen in the aetiology and complications of diabetes. //In: Drugs, Diet and Disease: mechanistic approaches to diabetes/ Ed by C. Ioannides. –London: Pergamon Press, 1995. –vol.2. –pp.203-240.
10. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. //Nature. –2001. –v.414. –pp.813-820.
11. Cadenas E., Kelvin J.A.D. Mitochondrial free radical generation, oxydative stress, and aging. //Free Radical Biology and Medicine. –2000. –v.29. -№3-4. pp.222-230.
12. Esposito K., Guigliano D. Hyperglycemia and vascular damage: role of oxydative stress. //Recenti Prog Med (Ital). –2002. –v.93. №3. –pp.172-174.
13. Faure P. Protective effects of antioxidant micronutrients (vitamin E, selenium) in type 2 diabetes mellitus. //Clin Chem Lab Med. –2003. –v.41. -№8. -pp.995-998.
14. Low P.A., Nickander K.K. et al. The role of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy. //Diabetes. –1997. –v.46. –Suppl.2. –pp.38-42.
15. Niki E. Free radicals in the 1990's: from in vitro to in vivo.//Free Radic Res. –2000. –v.33. -№6. –pp.693-704.
16. Simonoff M., Sergeant G., Grarnier N et al. Antioxidant status (selenium, vitamin A and vitamin E) and aging. //In: Free Radicals and aging. –Basel: Birkhauser Verlag. –1992. –pp.368-397.
17. Cameron N.E., Tuck Z., Maccabe L. et al. Effect of the hydroxyl radical scavenger, dimethylthiourea, on peripheral nerve tissue perfusion, conduction velocity and nociception in experimental diabetes // Diabetologia. – 2001. – V. 44. – P. 1161-1169.
18. Obrasova I.G., Minchenko A.G., Marinescu V. et al. Antioxidants pools and lipid peroxidation in insulin-dependent diabetes mellitus // Europ. J. Clin. Invest. – 2001. – V. 28. – P. 659-663.
19. Rincon-Choles H., Kasinath B.S., Gorin Y. Et al. Angiotensin II and growth factors in the pathogenesis of diabetic nephropathy // Kidney International. – 2002. – V. 62. – Suppl. 82. – P. S8-S11.