

На правах рукописи

Сергеева

Сергеева Елена Сергеевна

**СИСТЕМА ГЛУТАТИОНА И ЕЕ КОРРЕКЦИЯ
У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ**

14.00.03 – эндокринология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук



003481132

Москва – 2009

Работа выполнена в ГОУ ДПО «Иркутский государственный институт усовершенствования врачей Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» и ГОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Бардымова Татьяна Прокопьевна

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор
Колесниченко Лариса Станиславовна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Смирнова Ольга Михайловна

доктор медицинских наук, профессор
Анциферов Михаил Борисович

Ведущая организация: ГОУ ВПО «Московская медицинская академия
им. И.М. Сеченова»

Защита диссертации состоится «18» мая 2009 года в 14⁰⁰ часов
на заседании диссертационного совета Д 208.126.01 при ФГУ
Эндокринологический научный центр Росмедтехнологий, по адресу: 117036,
г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, дом 11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
ФГУ Эндокринологический научный центр Росмедтехнологий

Автореферат разослан «17» октября 2009 года

Ученый секретарь
Диссертационного Совета
доктор медицинских наук, профессор

М.А. Трошина

Е.А. Трошина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В настоящее время сахарный диабет (СД) представляет актуальную медико-социальную проблему здравоохранения во многих странах вследствие значительного роста заболеваемости, высокой смертности, ранней инвалидизации лиц трудоспособного возраста, снижения качества жизни больных (Дедов И.И., 2005; Кононенко И.В., Смирнова О.М., 2005; Анциферов М.Б., Дорофеева Л.Г., 2007; Шестакова М.В., Чугунова Л.А., Шамхалова М.Ш., 2007; Сунцов Ю.И., Дедов И.И., Шестакова М.В., 2008; Bloomgarden Z.T., 2004; Chan J.C., Malik V., Jia W. et al., 2009).

Заболеваемость СД приобрела черты нарастающей пандемии и регистрируется во всех странах, имея тенденцию к росту в возрастных группах старше 35 лет. По прогнозам экспертов ВОЗ к 2025 году количество больных СД во всем мире превысит 333 миллионов человек (Deray G., Heurtier A., Grimaldi A. et al., 2004; Diabetes Atlas IDF, 2006). В структуре заболеваемости диабетом на долю СД 2 типа приходится около 90%. Согласно данным Государственного регистра СД в России зарегистрировано 2,5 млн. больных СД, однако их истинная численность в 3-4 раза превышает официально зарегистрированную и составляет почти 8 млн. человек (5,5% всего населения России) (Шестакова М.В., Дедов И.И., 2009). Результаты многих исследований показывают, что гипергликемия является таким же фактором риска для развития сердечно-сосудистых заболеваний, как и уровень общего холестерина и артериального давления (Сунцов Ю.И., Дедов И.И., Шестакова М.В., 2008; Coutinho M., Gerstein H.C., Wang Y. et al., 1999; Chan J.C., Malik V., Jia W. et al., 2009).

В изучении механизмов развития СД и его осложнений достигнуты определенные успехи. Установлены основные провоцирующие факторы и патогенетические механизмы, разработаны клинические критерии, методы диагностики и лечения. Все большее внимание привлекают клеточные и субклеточные механизмы развития диабета. Доказана роль хронической гипергликемии, продолжает изучаться роль и значение окислительного стресса в механизмах индуцированного гипергликемией тканевого поражения при диабете. Окисление глюкозы при гипергликемии провоцирует генерацию свободных радикалов, которым отводится важная роль в развитии дисфункции эндотелия (Смирнова О.М., Горелышева В.А., Никонова Т.В. и соавт., 2001; Дедов И.И., 2004; Косолапов В.А., Самохина М.П., Спасов А.А., 2007). Ликвидацию последствий окислительного стресса осуществляет система антиоксидантной защиты. Нарушение функционирования антиоксидантной системы играет важную роль в развитии СД. Глутатион относится к основным звеньям антиоксидантной защиты, участвует в детоксикации ксенобиотиков и продуктов метаболизма, оказывает влияние на активность ферментов, регулирует обмен эйкозаноидов и простагландинов, влияет на биосинтез нуклеиновых кислот, выполняет другие не менее важные функции (Kulinsky V.I., Kolesnichenko L.S., 2009; Ballatori N., Krance S.M., Notenboom S., 2009).

В этой связи, исследование состояния системы глутатиона при СД имеет важное прогностическое значение, будет способствовать познанию механизмов развития заболевания и обоснованности применения фармакологической коррекции.

Цель исследования

Изучить состояние системы глутатиона в плазме и эритроцитах крови у больных сахарным диабетом и влияние на неё альфа-липоевой кислоты.

Задачи исследования:

1. Исследовать состояние системы глутатиона в плазме и эритроцитах крови у больных сахарным диабетом в зависимости от типа заболевания.
2. Определить характер и выраженность изменений в системе глутатиона в плазме и эритроцитах крови у больных сахарным диабетом 2 типа в зависимости от длительности течения заболевания и пола больных.
3. Выявить наиболее информативные изменения в глутатионовом антиоксидантном статусе у больных сахарным диабетом и ишемической болезнью сердца.
4. Оценить динамику концентрации глутатиона и показателей активности ферментов его метаболизма в плазме и эритроцитах при фармакологической коррекции альфа-липоевой кислотой у больных сахарным диабетом 2 типа.

Научная новизна работы

Впервые проведено исследование системы глутатиона в целом у больных СД 1 и 2 типа. Приоритетными являются данные о том, что снижение восстановленного глутатиона и активация глутатионредуктазы в эритроцитах являются универсальными механизмами статуса глутатиона при СД. Впервые установлены особенности механизмов антиоксидантной защиты при СД 1 и 2 типа, которые заключаются в функционировании глутатионтрансферазы плазмы у больных СД 1 типа и глутатионпероксидазы эритроцитов у больных СД 2 типа. Впервые показаны особенности механизмов глутатионовой антиоксидантной системы у больных СД 1 типа, которые заключаются в снижении концентрации GSH и активности ГПО в плазме и эритроцитах на фоне активации ГР в эритроцитах относительно контрольной группы. Установлены изменения в системе глутатиона у больных СД 2 типа, обусловленные сроком заболевания и полом больных. Для впервые выявленного СД 2 типа характерно снижение концентрации восстановленного глутатиона на фоне повышения активности глутатионредуктазы в эритроцитах. При СД 2 типа с течением заболевания до 5 лет дополнительно отмечено повышение активности глутатионтрансферазы в эритроцитах. При СД 2 типа со сроком более 5 лет установлено снижение концентрации восстановленного глутатиона в плазме и эритроцитах и активация глутатионредуктазы в эритроцитах на фоне снижения активности глутатионтрансферазы и повышения активности глутатионпероксидазы в плазме. Новыми являются

данные о состоянии внутриклеточного звена глутатионовой антиоксидантной защиты у больных СД 2 типа с ишемической болезнью сердца (ИБС), заключающиеся в снижении восстановленного глутатиона и активации глутатионредуктазы как в плазме, так и в эритроцитах, повышении глутатионтрансферазы в эритроцитах на фоне активации глутатионпероксидазы в плазме. Впервые установлен предикторный фермент при СД 2 типа со сроком течения более 10 лет и риском ИБС – глутатионтрансфераза в эритроцитах, активность которой повышается относительно группы контроля. Впервые изучена динамика показателей системы глутатиона как в эритроцитах, так и в плазме на фоне проведения фармакотерапии альфа-липоевой кислотой при СД. Впервые показана эффективность фармакологической коррекции препаратом альфа-липоевой кислоты на систему глутатиона у больных СД 2 типа с нормализацией концентрации восстановленного глутатиона в эритроцитах и активности глутатионтрансферазы в плазме.

Практическая значимость работы

Полученные в ходе диссертационного исследования результаты позволяют расширить представления о состоянии глутатионовой антиоксидантной защиты при СД. Данные позволяют уточнить и расширить представления о состоянии системы глутатиона и метаболизме глутатионзависимых ферментов (глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатионтрансферазы) у больных СД 1 и 2 типа. Представленные результаты дают возможность уточнить состояние антиокислительных процессов и дифференцированно подойти к назначению антиоксидантной терапии. Применение альфа-липоевой кислоты в терапии СД 2 типа положительно влияет на систему глутатиона и течение заболевания, приближая показатели к параметрам нормы. Результаты по исследованию глутатинового статуса могут применяться в качестве диагностических критериев ответа на проведение фармакотерапии препаратом альфа-липоевой кислоты.

Внедрение результатов исследования в практику

Основные положения работы используются в учебном процессе и научной работе на кафедрах эндокринологии, неврологии и клинической фармакологии Иркутского государственного института усовершенствования врачей; на кафедрах биоорганической и бионеорганической химии, биологической химии Иркутского государственного медицинского университета, а также в лечебно-диагностическом процессе эндокринологического отделения Городской клинической больницы №8, госпиталя ветеранов войн г. Иркутска, республиканской клинической больницы им. Н.А. Семашко г. Улан-Удэ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Состояние системы глутатиона у больных СД 1 типа отличается от больных СД 2 типа. При СД 1 типа функционирует глутатионтрансфераза

плазмы, при СД 2 типа – глутатионпероксидаза эритроцитов при взаимном сравнении.

2. Выраженность и направленность изменений метаболизма глутатиона и его ферментов зависят от сроков заболевания и пола больных.
3. СД 2 типа с ишемической болезнью сердца характеризуется снижением GSH и активацией ГР в плазме и эритроцитах, повышением глутатионтрансферзной активности в эритроцитах и глутатионпероксидазной активности в плазме по сравнению с контролем.
4. Применение альфа-липоевой кислоты является значимым фактором улучшения антиоксидантной защиты при СД 2 типа вследствие способности нормализовывать содержание GSH в эритроцитах и активность ГТ в плазме.

Апробация работы

Апробация материалов диссертации проведена на межкафедральном заседании кафедр эндокринологии, клинической фармакологии Иркутского государственного института усовершенствования врачей и биоорганической и бионеорганической химии, биохимии Иркутского государственного медицинского университета. Материалы работы представлены и обсуждены на межрегиональной научной конференции «Медицинские и социальные проблемы геронтологии» (г. Иркутск, 2006), на заседаниях ассоциаций врачей-эндокринологов, неврологов и клинических фармакологов (г. Иркутск, 2007, 2008, 2009), XIII научно-практической конференции «Актуальные проблемы клинической медицины» (г. Иркутск, 2008), III Сибирском съезде эндокринологов «Эндокринология Сибири» (г. Красноярск, 2009).

Публикации

Материалы диссертации опубликованы в 10 печатных работах, изданных в отечественной и зарубежной печати.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 135 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, характеристики материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, их обсуждения, выводов и практических рекомендаций. Список литературы включает 255 источников. Работа иллюстрирована 32 рисунками и 11 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на базе кафедры эндокринологии ГОУ ДПО «Иркутский государственный институт усовершенствования врачей» (ректор – профессор, д.м.н. В.В. Шпрах) и на базе кафедры биоорганической и бионеорганической химии ГОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» (ректор – профессор, д.м.н. И.В. Малов).

В работе представлены результаты обследования 92 больных сахарным диабетом (СД). С учетом поставленных задач все больные СД были распределены на группы в зависимости от типа заболевания. В группу больных СД 1 типа вошли 15 пациентов (6 мужчин и 9 женщин), средний возраст – $37,40 \pm 2,95$ лет, длительность заболевания – $12,53 \pm 1,99$ лет. В группу больных СД 2 типа вошли 77 пациентов (32 мужчин и 45 женщин), средний возраст – $56,96 \pm 0,65$ лет, длительность диабета – $6,27 \pm 0,65$ лет.

Среди больных СД 2 типа были выделены группы в зависимости от длительности течения диабета и пола больных. Отдельные группы составили больные СД 2 типа с ишемической болезнью сердца (ИБС) и больные после фармакологической коррекции с использованием альфа-липоевой кислоты (АЛК). Первую группу составили 19 больных с впервые выявленным СД 2 типа (мужчин – 9, женщин – 10), средний возраст – $56,58 \pm 1,39$ лет, длительность заболевания до 1 года. Во вторую группу вошли 30 больных СД 2 типа с длительностью диабета более 1 года (мужчин – 11, женщин – 19), средний возраст – $55,77 \pm 0,89$ лет, длительность заболевания – $7,00 \pm 0,93$ лет. Третью группу составили 16 пациентов с СД 2 типа и ишемической болезнью сердца (мужчин – 7, женщин – 9), средний возраст – $59,50 \pm 1,58$ лет, длительность заболевания – $11,09 \pm 1,30$ лет.

Кроме того, больные СД 2 типа со стажем заболевания более 1 года были разделены на две подгруппы в зависимости от длительности течения диабета: стаж диабета до 5 лет и более 5 лет. В первой подгруппе было 13 пациентов (мужчин – 5, женщин – 8), средний возраст – $54,38 \pm 0,80$ лет, длительность заболевания – $2,77 \pm 0,29$ лет. Во второй подгруппе – 17 больных (мужчин – 6, женщин – 11), средний возраст – $56,82 \pm 1,42$ лет, длительность заболевания – $10,24 \pm 1,09$ лет.

В группе больных СД 2 типа с фармакологической коррекцией АЛК состояние системы глутатиона оценивалось дважды: до начала лечения АЛК и в конце терапии АЛК. Фармакологическая коррекция АЛК проводилась больным СД 2 типа путем внутривенного введения АЛК 600 мг в сутки. В эту группу вошли 12 пациентов (мужчин – 5, женщин – 7), средний возраст – $57,17 \pm 1,74$ лет, длительность заболевания – $7,17 \pm 1,49$ лет. Группу клинического сравнения (не получавших АЛК) составили 12 больных СД 2 типа (мужчин – 4, женщин – 8), средний возраст – $56,50 \pm 1,13$ лет, длительность заболевания – $8,67 \pm 1,58$ лет.

Контрольные группы для больных СД 1 типа и больных СД 2 типа были сформированы из лиц сопоставимого возраста и пола, без диагностированного СД и ИБС. Контрольная группа для больных СД 1 типа (контроль 1) состояла из 20 человек (мужчин – 8, женщин – 12), средний возраст – $36,05 \pm 2,20$ лет. Контрольная группа для больных СД 2 типа (контроль 2) – из 29 человек (мужчин – 12, женщин – 17), средний возраст – $53,14 \pm 1,65$ лет.

Все больные СД 1 типа получали заместительную инсулинотерапию. Больным СД 2 типа коррекция гликемии проводилась сахароснижающими препаратами. У всех больных состояние диабета было, в основном, в стадии декомпенсации. В работе использована классификация СД (ВОЗ, 1999г.),

диагностические критерии СД (ВОЗ, 1999г.), диагностические критерии СД и других нарушений углеводного обмена (Дедов И.И., Шестакова М.В., 2006, 2009).

Диагноз СД устанавливался на основании комплексного клинического обследования больных. Тщательно изучались жалобы, анамнез заболевания и жизни больного, данные объективного статуса. Больным проводились клинко-лабораторное и функциональное обследования, включающие осмотр с определением индекса массы тела, общеклинические анализы крови и мочи, кетоновые тела, билирубин, функциональные печеночные пробы, мочевины, креатинин, холестерин, триглицериды или липидограмму, пробу Зимницкого, пробу Реберга-Тареева, пробу мочи по Нечипоренко, тест на микроальбуминурию, гликированный гемоглобин, а также по показаниям – С-реактивный белок, щелочную фосфатазу, диастазу, иммунограмму. Кроме этого, выполнялись электрокардиография, ультразвуковое исследование щитовидной железы, сердца и органов брюшной полости. Все больные консультировались кардиологом, неврологом, окулистом, по показаниям - другими специалистами. Гликемический профиль определялся больным регулярно. Исследовался гликированный гемоглобин. Критериями нормализации углеводного обмена считались: отсутствие клинических симптомов заболевания, нормогликемия натощак и постпрандиальная гликемия не более 8 ммоль/л (ВОЗ, 1999г.).

Таким образом, состав больных исследуемых групп и клинко-лабораторная характеристика позволяли выполнить поставленную цель и задачи нашей работы.

Состояние системы глутатиона оценивали по определению концентрации восстановленного глутатиона (GSH) и активности ферментов его метаболизма глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР), глутатионтрансферазы (ГТ) отдельно в эритроцитах и плазме крови (табл.1).

Таблица 1

Количество проведенных исследований

Методы исследования	Количество исследований						
	Контр. группа для б-ных СД 1 типа	Контр. группа для б-ных СД 2 типа	Б-ные СД 1 типа	Б-ные с впервые выявленным СД 2 типа	Б-ные СД 2 типа	Б-ные СД 2 типа и ИБС	Б-ные СД 2 типа после лечения
Концентрация GSH	39	58	29	36	56	30	48
Активность ГТ	38	56	29	36	57	30	48
Активность ГТ	40	56	29	36	57	31	48
Активность ГТ	40	57	29	37	56	31	48
ВСЕГО:	158	227	116	145	226	122	192

Для определения активности ферментов метаболизма глутатиона забор венозной крови проводился строго утром натощак.

Концентрацию восстановленного глутатиона определяли в плазме и эритроцитах по методу Anderson M.E. (1989). Расчет концентрации GSH производился по формуле:

$$C = \frac{\Delta\varepsilon \cdot V \cdot R}{\sqrt{\varepsilon_M} \cdot N} = \text{ммоль/л, где}$$

$\Delta\varepsilon$ – экстинкция пробы,

ε_M – коэффициент молярной экстинкции (для ДТНБ - 13,6),

V – объем кюветы,

R – разведение,

N – количество пробы в опыте.

Активность ферментов (ГПО, ГТ, ГР) также определяли в плазме и эритроцитах. Активность ГПО определяли по методу Flohe L. (1989), активность ГР – по методу Mannervik B. (1989), активность ГТ – по методу Habig N.H. (1974). Активность всех ферментов пересчитывали на концентрацию белка в пробе.

Расчет активности ферментов проводился по формуле:

$$\frac{\Delta E \cdot V \cdot 10^9}{B \cdot M} = \text{нмоль/мин на 1 мг белка (Б), где}$$

ΔE – изменение экстинкции за 1 минуту,

V – объем кюветы,

B – концентрация белка в пробе,

M – коэффициент молярной экстинкции: $M=6,22 \cdot 10^6$ для ГПО, ГР
 $M=9,6 \cdot 10^6$ для ГТ

Статистическая обработка материала предусматривала систематизацию полученных данных групп больных СД и контрольных групп, построение таблиц и графических изображений. Достоверная значимость различий количественных признаков рассчитывалась по t-критерию Стьюдента, использовались методы параметрической статистики (при соответствии значений исследуемых переменных закону нормального распределения) и непараметрической статистики (при распределении, не соответствующему нормальному закону). По U-критерию Манна-Уитни проводилось сравнение двух независимых групп. Применялся метод кластерного анализа и дискриминантный анализ для показателей антиоксидантной активности системы глутатиона с расчетом расстояний между группами больных с помощью D^2 -Махаланобиса. Полученные данные представлены в виде средних арифметических значений показателей (M), стандартного отклонения (δ), стандартной ошибки (m) и процентов. Различия считались статистически значимыми при $P < 0,05$. Для статистической обработки данных использовались современные пакеты прикладных математических программ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного нами исследования был установлен дисбаланс в системе глутатиона как у больных СД 1, так и у больных СД 2 типа. Показано, что функционирование системы глутатиона при СД изменялось в зависимости от типа диабета и сроков заболевания.

Так, у больных СД 1 типа выявлено синхронное снижение концентрации GSH в плазме на 26% ($p<0,05$) и в эритроцитах на 28% ($p<0,01$) на фоне повышения активности ГР в эритроцитах на 59% ($p<0,05$) и снижения активности ГПО как в плазме на 23% ($p<0,05$), так и в эритроцитах на 30% ($p<0,01$) по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы (табл. 2).

Таблица 2

Сравнительная характеристика показателей системы глутатиона
у больных сахарным диабетом

Показатель	Субстрат	Единицы измерения	Контроль для СД 1 типа (n=20)	Больные СД 1 типа (n=15)	Контроль для СД 2 типа (n=29)	Больные СД 2 типа (n=30)
GSH	плазма	мкмоль/л	19,09±1,15	14,14±1,80 ↓ *	15,75±1,47	12,66±1,88
	эр-ры	ммоль/л	1,75±0,14	1,26±0,10 ↓ **	1,78±0,15	1,09±0,07 ↓ **
ГТ	плазма	нмоль/мин на 1 мг белка	2,18±0,29	1,91±0,36	2,10±0,30	1,17±0,17 ↓ **
	эр-ры		3,25±0,36	5,33±1,09	3,36±0,37	4,20±0,49
ГР	плазма	нмоль/мин на 1 мг белка	0,39±0,02	0,47±0,07	0,41±0,02	0,43±0,05
	эр-ры		4,01±0,62	6,39±0,82 ↑ *	3,34±0,34	6,45±0,82 ↑ **
ГПО	плазма	нмоль/мин на 1 мг белка	3,60±0,23	2,76±0,29 ↓ *	2,48±0,20	3,20±0,22 ↑ *
	эр-ры		30,49±2,44	21,35±2,29 ↓ **	25,37±2,22	26,88±1,58

Примечание: значимость различий: * – $p<0,05$, ** – $p<0,01$;
↓ – снижение показателя, ↑ – увеличение показателя

Как известно, окислительный стресс является одной из ведущих причин развития сосудистых осложнений при диабете. Уменьшение содержания GSH у больных СД 1 типа можно связать как со снижением синтеза глутатиона, так и повышением его потребления, а также замедлением восстановления из окисленной формы (Субботина Т.Н., Отто В.С., Титова Н.М. и соавт., 2009). Показано, что у больных СД 1 типа дефицит восстановленного глутатиона

сопровождался активацией ГР в эритроцитах. Следует отметить, что сопряженное увеличение активности ГР с одновременным снижением GSH может указывать на значительный расход глутатиона и отражать процессы адаптации, так как все свои защитные функции глутатион выполняет только в восстановленной форме. Абсолютная инсулиновая недостаточность при СД 1 типа сопровождается нарушением процессов активации пентозофосфатного цикла с образованием NADPH и наблюдаемый дефицит GSH на фоне глутатионредуктазной активации зависит от дисрегуляции на уровне пентозофосфатного цикла. В то же время, активация ГР должна способствовать образованию активной формы глутатиона, однако возможное быстрое включение GSH в процессы антиоксидантного окисления снижает его концентрацию в эритроцитах и плазме, а не приводит к накоплению.

Снижение глутатионпероксидазной активности у больных СД 1 типа также может приводить к накоплению свободных радикалов и усугублять развитие окислительного стресса с негативным влиянием на клетки и ткани. Известно, что в патогенезе макро- и микрососудистых осложнений перекисный дисбаланс занимает одно из основных мест. Стабильность ГТ как в плазме, так и в эритроцитах у больных СД 1 типа может быть результатом ингибирования фермента в результате аутоиммунного воспаления и способствовать прогрессированию болезни. По мнению Зенкова Н.К., Ланкина В.З. и Меньшиковой Е.Б. (2001) в первую очередь окислительный стресс проявляется в области поджелудочной железы и вызывает повреждение β -клеток, а затем трансформируется на остальные системы организма.

Таким образом, у больных СД 1 типа наблюдается выраженное напряжение системы глутатиона, проявляющееся снижением содержания GSH и активности ГПО как в плазме, так и в эритроцитах на фоне повышения глутатионредуктазной активности в эритроцитах.

При СД 2 типа метаболизм системы глутатиона имеет зависимость от длительности течения заболевания. Так, у больных с впервые выявленным СД 2 типа наблюдалось снижение концентрации GSH в эритроцитах на 52% ($p < 0,01$) и повышение активности ГР в эритроцитах на 74% относительно контрольной группы ($p < 0,01$) (табл. 3).

Установленный нами дефицит GSH в эритроцитах у больных СД 2 типа может свидетельствовать об ослаблении антиоксидантной системы в целом и выступать в качестве наиболее раннего показателя усиления окислительных процессов в клетках. Единство и тесное взаимодействие метаболических процессов определяют резервные возможности и механизмы адаптации. Развитие сахарного диабета осуществляется при дисрегуляторных нарушениях адаптационных механизмов патохимических и молекулярных изменений, которые получают клиническое выражение через вызываемые ими патофизиологические механизмы нарушений функций органов и систем. Полученные нами результаты указывают, что на момент диагностики заболевания имеются признаки активного окислительного стресса, выражающиеся снижением содержания GSH, что косвенно может свидетельствовать о нарушении процессов быстросрочной адаптации при

впервые выявленном диабете. В физиологических условиях активация ГР способствует накоплению активной формы глутатиона с мобилизацией цитопroteкции, установленное нами усиление активности ГР у больных с впервые выявленным СД 2 типа не приводило к повышению концентрации GSH. При СД 2 типа также наблюдается дефицит кофактора NADPH, который зависит от угнетения пентозофосфатного цикла на фоне уже относительной инсулиновой недостаточности и инсулинорезистентности, что, скорее всего, и приводит к дефициту GSH.

Таким образом, при впервые выявленном СД 2 типа наблюдаются изменения двух изучаемых параметров системы глутатиона (GSH и ГР в эритроцитах).

Таблица 3

Сравнительная характеристика показателей системы глутатиона у больных сахарным диабетом 2 типа в зависимости от длительности заболевания

Показатель	Субстрат	Единицы измерения	Контроль (n=29)	Больные с впервые выявленным СД 2 типа (n=19)	Больные СД 2 типа (стаж до 5 лет) (n=13)	Больные СД 2 типа, (стаж более 5 лет) (n=17)
GSH	плазма	мкмоль/л	15,75±1,47	14,59±2,52	15,85±3,37	10,22±1,99 ↓ *
	эр-ры	ммоль/л	1,78±0,15	0,86±0,09 ↓ **	1,09±0,09 ↓ **	1,10±0,12 ↓ **
ГТ	плазма	нмоль/мин на 1 мг белка	2,10±0,30	1,75±0,24	1,46±0,29	0,95±0,18 ↓ **
	эр-ры		3,36±0,37	3,76±0,66	5,03±0,73 ↑ *	3,53±0,62
ГР	плазма	нмоль/мин на 1 мг белка	0,41±0,02	0,37±0,05	0,36±0,05	0,49±0,08
	эр-ры		3,34±0,34	5,82±0,89 ↑ **	6,53±0,86 ↑ **	6,39±1,34 ↑ **
ГПО	плазма	нмоль/мин на 1 мг белка	2,48±0,20	2,86±0,43	3,12±0,24	3,27±0,30 ↑ *
	эр-ры		25,37±2,22	23,71±2,04	30,85±1,78	23,70±2,17

Примечание: значимость различий: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$;
↓ – снижение показателя, ↑ – увеличение показателя

У больных СД 2 типа с длительностью заболевания до 5 лет была снижена концентрация GSH на 39% ($p < 0,01$), а также повышена активность как ГТ, так и ГР в эритроцитах на 50% и 96% соответственно относительно контрольной группы (табл. 3).

В свою очередь у больных СД 2 типа с длительностью заболевания более 5 лет были зарегистрировано одновременное снижение концентрации GSH в плазме на 35% и в эритроцитах на 38%, повышение глутатионредуктазной активности в эритроцитах на 91%, разнонаправленные сдвиги активности ГТ и ГПО в плазме (снижение на 55% и повышение на 32% соответственно) относительно группы контроля (табл. 3).

Вполне вероятно, что длительность течения СД приводит к формированию адаптивных реакций в клетках и способствует их устойчивости («привыканию») к болезни. Так, СД характеризуется механизмами дизадаптации и полиферментным дисбалансом в эритроцитах, который в свою очередь может отражать метаболические процессы в других клетках. Это подтверждается характером течения болезни с формированием и прогрессированием макро- и микрососудистых осложнений, выраженность и частота которых зависят от повреждающих факторов и самой длительности патологического процесса. Если пользоваться спортивной терминологией, то можно провести сравнение с бегом стайеров и спринтеров, у которых резервные возможности включаются на разных этапах: у спринтеров (или больных с длительностью СД до 5 лет) – быстро, а у стайеров (или больных с длительностью диабета более 5 лет) – отсрочено. Разная выраженность активации основных глутатионзависимых ферментов при СД 2 типа может раскрывать особенности некоторых метаболических закономерностей течения заболевания с формированием осложнений, а также отдельные механизмы цито- и ангиопротекции.

Таким образом, обнаружены метаболические закономерности, зависящие от длительности течения СД 2 типа. У больных СД 2 типа с длительностью заболевания до 5 лет реагировали только эритроцитарные компоненты системы глутатиона (три изучаемых параметра), а при длительности заболевания более 5 лет – дополнительно к эритроцитарным присоединялись изменения компонентов системы глутатиона в плазме (уже пять параметров). Общеизвестно, что ферменты характеризуются внутриклеточной деятельностью, однако в плазме ферменты могут косвенно отражать тканевые и клеточные процессы и структурные повреждения. Установленная ферментативная активность в плазме у больных СД 2 типа со сроком болезни более 5 лет может указывать на наличие и выраженность дополнительных факторов альтерации, в том числе оксидативного стресса.

В общей группе больных с СД 2 типа дестабилизация системы глутатиона характеризовалась снижением концентрации GSH на 39% и повышением активности ГР на 93% в эритроцитах на фоне разнонаправленных изменений активности ГТ и ГПО в плазме относительно контрольной группы ($p < 0,05$) (табл. 2). Дисбаланс глутатиона ослабляет устойчивость клеток к развитию оксидативного стресса, не исключается также возможность влияния на снижение секреторной активности β -клеток с быстрым развитием инсулиновой недостаточности. Известно, что избыточная генерация свободных радикалов способствует дисфункции эндотелия, окислению липопротеидов,

гиперкоагуляции, следовательно, развитию и прогрессированию сосудистых осложнений (Смирнова О.М., Горелышева В.А., Никонова Т.В. и соавт., 2001).

Проведенный сравнительный анализ показал разный уровень участия системы глутатиона при СД 1 типа и СД 2 типа, что в свою очередь может способствовать разной степени выраженности окислительного стресса с прогрессированием болезни и сосудистых осложнений. При взаимном сравнении групп больных СД 1 типа и СД 2 типа механизмы защиты от активных форм кислорода отличались: при СД 2 типа функционировала ГПО в эритроцитах, а при СД 1 типа - ГТ в плазме ($p < 0,05$). Вполне закономерно, что при СД 1 типа и при СД 2 типа в механизмах антиоксидантной защиты кроме глутатионовой системы принимают участие другие как ферментативные (каталаза, супероксиддисмутаза), так и неферментативные (антиокислительная активность) компоненты.

Таким образом, у больных СД 1 и 2 типа универсальными показателями системы глутатиона являются снижение концентрации GSH и активация ГР в эритроцитах, скорее всего, из-за дефицита NADPH в результате ингибирования пентозофосфатного пути, на фоне дефицита инсулина разного характера и степени выраженности. Полученные результаты могут оказывать влияние на течение заболевания и прогрессирование сосудистых осложнений в результате оксидативного стресса.

При СД 2 типа в метаболизме глутатиона установлена зависимость от пола больных. Проведенный сравнительный анализ показателей активности глутатионзависимых ферментов и концентрации GSH у мужчин с СД 2 типа показал снижение содержания GSH в эритроцитах на 45% (больные $0,97 \pm 0,13$ ммоль/л, контроль $1,77 \pm 0,22$ ммоль/л), на фоне повышения активности ГР в эритроцитах на 156% (больные $8,29 \pm 1,59$ нмоль/мин на 1 мг белка, контроль $3,24 \pm 0,58$ нмоль/мин на 1 мг белка), разнонаправленных сдвигов активности ГТ в плазме (больные $1,06 \pm 0,25$ нмоль/мин на 1 мг белка, контроль $2,41 \pm 0,58$ нмоль/мин на 1 мг белка) и эритроцитах (больные $5,96 \pm 0,92$ нмоль/мин на 1 мг белка, контроль $3,12 \pm 0,74$ нмоль/мин на 1 мг белка) ($p < 0,05$).

У женщин с СД 2 типа наблюдались разнонаправленные сдвиги только в эритроцитах: снижение концентрации GSH (больные $1,17 \pm 0,09$ нмоль/мин на 1 мг белка, контроль $1,79 \pm 0,21$ нмоль/мин на 1 мг белка) ($p < 0,01$) и повышение активности ГР (больные $5,37 \pm 0,84$ нмоль/мин на 1 мг белка, контроль $3,40 \pm 0,42$ нмоль/мин на 1 мг белка) ($p < 0,05$). Кроме этого, у мужчин с СД 2 типа активность ГТ в эритроцитах была статистически значимо выше аналогичного показателя женщин с СД 2 типа на 89% ($p < 0,01$).

Таким образом, у мужчин, больных СД 2 типа, наблюдалось более выраженное усиление механизмов глутатионовой антиоксидантной защиты по сравнению с женщинами, больными СД 2 типа. Такому метаболическому статусу могут способствовать эстрогены, обладающие антиоксидантным эффектом (Гуревич М.А., Мравян С.Р., Григорьева Н.М., 2006; Bello N., Mosca L., 2004). Наряду с установленными данными показано, что у мужчин повышение глутатионредуктазной активности в эритроцитах происходит более интенсивно, по сравнению с женщинами (повышение активности на 156% и

58% соответственно). Установленные закономерности функционирования системы глутатиона у мужчин и женщин с СД могут проявляться в формировании адаптационных механизмов, а также способствовать формированию защитно-приспособительных реакций и функциональных резервов, способствовать менее выраженному клиническому течению заболевания.

У больных СД 2 типа и ИБС выявлено снижение концентрации GSH в эритроцитах на 40% с синхронным падением GSH в плазме на 46% относительно контроля ($p < 0,01$). Ферментативное звено антиоксидантной глутатионовой системы при СД 2 типа и ИБС характеризуется широким спектром изменений: активацией ГР в плазме на 41 % и эритроцитах на 61%, повышением активности ГТ в эритроцитах на 78% на фоне повышения активности ГПО в плазме на 29% относительно контрольной группы ($p < 0,05$). Следует отметить, что содержание GSH как в плазме, так и в эритроцитах в группах больных СД 2 типа с ИБС и без ИБС при сопоставимой длительности диабета не отличались. Повышенная активность ГР при СД 2 типа с ИБС должна способствовать восстановлению глутатиона с цитопротекцией. Однако у больных СД 2 типа с ИБС активация ГР в эритроцитах была сопряжена с уменьшением концентрации GSH, скорее всего из-за необходимости повышенного потребления GSH для выполнения защитных функций в процессе адаптации.

Полученные нами изменения активности ферментов указывают на то, что при длительном стаже диабета (более 10 лет) с наличием ИБС в механизмы антиоксидантной защиты активно включаются практически все звенья антипероксидной глутатионовой системы без перераспределения между ними приоритетности. Связанный с СД и ИБС окислительный стресс, вероятно, является следствием одновременного увеличения генерации свободнорадикальных форм кислорода и снижением емкости антиоксидантной защиты. При СД 2 типа со стажем более 5 лет (длительность в группе более 10 лет) активность ГТ в эритроцитах была на уровне контрольной группы ($p > 0,05$). Установленная активация ГТ в эритроцитах у больных СД 2 типа и ИБС (длительность в группе более 10 лет) относительно контрольной группы может рассматриваться как прогностический признак риска формирования макроангиопатий.

Положительное воздействие препаратов альфа-липовоей кислоты (АЛК) при СД известно, однако влияние фармакотерапии на систему глутатиона в комплексе не изучалось. Нами показано, что у больных СД 2 типа после лечения без использования АЛК сохранялось сниженное содержание GSH и повышенная активность ГР в эритроцитах по отношению к контрольной группе ($p < 0,01$). Фармакологическая коррекция с присоединением больным СД 2 типа АЛК приводила к повышению активности ГТ в плазме и концентрации GSH в эритроцитах относительно соответствующих показателей больных СД 2 типа до лечения, то есть к их «нормализации» (табл. 4).

Таким образом, анализ эффективности терапии АЛК показал, что проведение лечения больных СД 2 типа с использованием АЛК оказывает

положительное влияние на состояние системы глутатиона и способствует нормализации двух из трех ранее нарушенных показателей метаболизма глутатиона. Следовательно, АЛК обладает позитивным влиянием на систему глутатиона и выраженной антиоксидантной эффективностью. В связи с этим, обоснованность назначения при СД препаратов АЛК очевидна также и с целью фармакологической коррекции состояния глутатионовой антиоксидантной системы.

Таблица 4

Сравнительная характеристика системы глутатиона у больных СД 2 типа до лечения, после стандартного лечения и лечения с присоединением АЛК относительно контрольной группы

Показатель	Субстрат	Единицы измерения	До лечения	После лечения без АЛК	После лечения с АЛК
GSH	плазма	мкмоль/л	N	N	N
	эр-ты	ммоль/л	↓*	↓*	N
ГТ	плазма	нмоль/мин на 1 мг белка	↓*	N	N
	эр-ты		N	N	N
ГР	плазма	нмоль/мин на 1 мг белка	N	N	N
	эр-ты		↑*	↑*	↑*
ГПО	плазма	нмоль/мин на 1 мг белка	N	N	N
	эр-ты		N	N	N

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$;

↓ – снижение показателя, ↑ – увеличение показателя;

N – значения показателя соответствует показателю контрольной группы.

С использованием соответствующих статистических критериев выявлены наиболее информативные признаки в контрольных группах и в группах больных СД 1 и 2 типа. Наиболее информативными прогностическими признаками для всех исследуемых групп являются концентрация GSH и активность ГР в эритроцитах. Установленный дефицит GSH способствует активации ГР, однако у больных СД 1 и 2 типа наблюдается дефицит NADPH из-за угнетения пентозофосфатного цикла и как следствие не происходит накопление GSH. Новые сведения могут быть использованы в разработке

препаратов и технологий, направленных на резервные возможности по повышению функциональных и адаптационных резервов и механизмов в условиях болезни.

Методом дискриминантного анализа по информативным признакам показаны различия между группами больных СД 1 и 2 типа и соответствующими контрольными группами с точностью различия групп 84,18%. Для выявления соотношения связей показателей состояния антиоксидантной активности системы глутатиона в группах больных СД 1 и 2 типа и в соответствующих контрольных группах проведен дополнительный многомерный анализ с использованием непараметрических критериев наиболее информативных признаков (Юнкеров В.И. и соавт., 2002) (рис. 1).

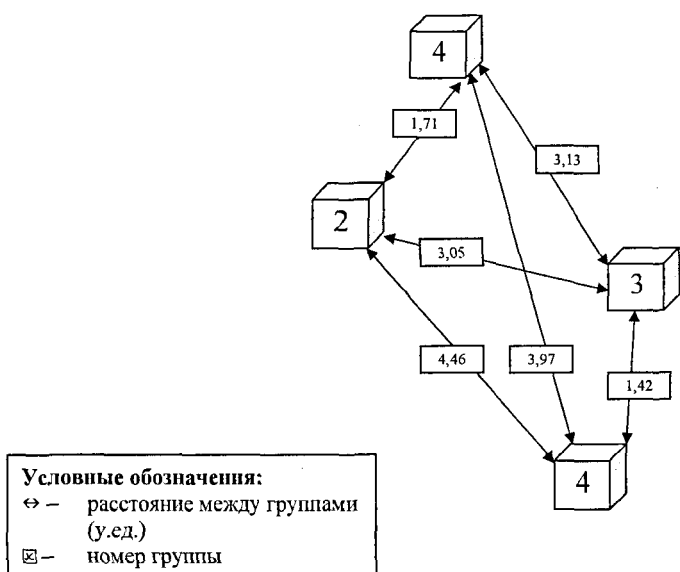


Рис. 1. Граф взаимной близости (удаленности) по квадрату расстояний Махаланобиса в восьмимерном пространстве ($m=8$)

- 1 группа – контрольная группа (средний возраст – $36,05 \pm 2,20$ лет)
- 2 группа – контрольная группа (средний возраст – $53,14 \pm 1,65$ лет)
- 3 группа – больные СД 1 типа (средний возраст – $37,40 \pm 2,95$ лет)
- 4 группа – больные СД 2 типа (средний возраст – $55,77 \pm 0,89$ лет)

Полученные данные позволяют уточнить механизмы развития СД, раскрыть некоторые особенности функционирования внутриклеточного звена антиоксидантной защиты, использовать установленные закономерности в разработке препаратов и технологий, направленных на резервные возможности по повышению функциональных и адаптационных механизмов в условиях болезни, а также будут полезны в разработках прогностических методик инновационного характера.

ВЫВОДЫ:

1. У больных СД состояние системы глутатиона имеет зависимость от типа диабета. СД 1 типа характеризуется снижением концентрации GSH и активности ГПО в плазме и эритроцитах на фоне активации ГР в эритроцитах относительно контрольной группы. Для СД 2 типа характерно снижение содержания GSH в эритроцитах, активация ГР в эритроцитах и ГПО в плазме на фоне снижения активности ГТ в плазме по сравнению с контролем.
2. При СД 2 типа содержание глутатиона и активность ферментов его метаболизма зависят от сроков заболевания. Впервые выявленный СД 2 типа характеризуется снижением концентрации GSH и повышением активности ГР в эритроцитах; СД 2 типа с длительностью до 5 лет – снижением содержания GSH, повышением активности ГТ и ГР в эритроцитах; СД 2 типа с длительностью более 5 лет – снижением содержания GSH одновременно в плазме и эритроцитах, активацией ГР в эритроцитах и ГПО в плазме на фоне снижения активности ГТ в плазме относительно контрольной группы.
3. Для мужчин с СД 2 типа характерна выраженная активация метаболизма глутатиона: снижение содержания GSH, повышение активности ГР в эритроцитах на фоне разнонаправленных сдвигов активности ГТ в плазме и эритроцитах относительно контрольной группы мужчин; для женщин – только уменьшение концентрации GSH и повышение активности ГР в эритроцитах сравнительно с женской контрольной группой.
4. СД 2 типа с ишемической болезнью сердца характеризуется дисбалансом системы глутатиона: снижением концентрации GSH и активацией ГР в плазме и эритроцитах; повышением активности ГТ в эритроцитах и активности ГПО в плазме относительно контрольной группы.
5. Прогностически значимым показателем для больных СД 2 типа со сроком заболевания более 10 лет и риском ишемической болезни сердца служит активация ГТ в эритроцитах относительно контрольной группы.
6. Предикторами фармакологической коррекции альфа-липоевой кислотой при СД 2 типа служит нормализация содержания GSH в эритроцитах и активности ГТ в плазме.
7. Модели кластерного анализа позволяют выделить наиболее значимые метаболические показатели у больных СД. Универсальными реагентами системы глутатиона при СД являются активация ГР и снижение уровня GSH в эритроцитах.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для оценки состояния больных сахарным диабетом необходимо исследовать показатели системы глутатиона с целью определения состояния антиоксидантной защиты.
2. При лечении больных сахарным диабетом 2 типа и ишемической болезнью сердца целесообразно исследовать систему глутатиона с определением прогностически значимого показателя – активности глутатион-трансферазы, для прогнозирования течения заболевания.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Состояние системы глутатиона у больных сахарным диабетом 2 типа / Т.П. Бардымова, Л.С. Колесниченко, Е.С. Сергеева, И.В. Белоусова // Тез. докл. IV всеросс. диабетол. Конгресса. – Москва, 2008. – С. 339.
2. Сергеева Е.С., Бардымова Т.П., Колесниченко Л.С. Глутатионовая антипероксидная защита у больных сахарным диабетом 2 типа // Тез. докл. XIII итоговой науч.-практ. конф. Иркутского ГИУВа. – Иркутск, 2008. – С. 41.
3. Бардымова Т.П., Сергеева Е.С. Сахарный диабет: распространенность, патогенез, клиническая картина и диагностика. – Иркутск: РИО ИГИУВа, 2008. – 44 с.
4. Glutathione antioxidant system in patients with Diabetes Mellitus / L. Kolesnichenko, T. Bardimova, E. Sergeeva, M. Sergeeva, N. Verlan, I. Belousova // J. Clin. Lipidol. – 2008. – Vol.2, 5S. – P. 124-125.
5. Глутатионовая антиоксидантная система у больных сахарным диабетом / Л.С. Колесниченко, Т.П. Бардымова, Н.В. Верлан, Е.С. Сергеева, М.П. Сергеева // Сибирск. мед. журн. – 2009. – №1. – С. 31-33.
6. Оценка системы глутатиона у больных сахарным диабетом 2 типа / Е.С. Сергеева, Т.П. Бардымова, Л.С. Колесниченко, М.П. Сергеева // Тез. докл. III Сибирского Съезда эндокринологов с международным участием. – Красноярск, 2009. – С. 55-56.
7. Глутатион и ферменты его метаболизма у больных сахарным диабетом 2 типа / Л.С. Колесниченко, Т.П. Бардымова, Е.С. Сергеева, М.П. Сергеева // Сибирск. мед. журн. – 2009. – №2. – С. 56-58.
8. Состояние системы глутатиона и ее коррекция у больных сахарным диабетом/ Т.П. Бардымова, Е.С. Сергеева. – Иркутск: РИО ИГИУВа, 2009. – 25 с.
9. Glutathione antioxidant protection in patients with Diabetes Mellitus / T. Bardimova, L. Kolesnichenko, E. Sergeeva, N.V. Verlan, M.P. Sergeeva // Atherosclerosis. – 2009. – Vol.10, N2. – P. 265.
10. Состояние системы глутатиона при сахарном диабете / Т.П. Бардымова, Л.С. Колесниченко, Е.С. Сергеева, Н.В. Тарабан, И.М. Михалевич, М.П. Сергеева// Сибирск. мед. журн. – 2009. – №7. – С.81-83.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛК – альфа-липоевая кислота

ГПО – глутатионпероксидаза

ГР – глутатионредуктаза

ГТ – глутатионтрансфераза

ИБС – ишемическая болезнь сердца

СД – сахарный диабет

GSH – восстановленный глутатион

GSSG – окисленный глутатион

NADP – никотинамид-адениндинуклеотид фосфат

NADPH – никотинамид-адениндинуклеотид фосфат восстановленный

Подписано в тираж 15.10.09

Печать Riso
Усл.п.л. -1.0
Заказ № 854
Тираж: 50 экз.

Оперативная типография «Грань»
ИНН 3812088580
664007, Иркутск, ул. Декабрьских Событий, д. 85
Тел: (3952) 294-594