

УДК 616.316-008.8-074:616.379-008.64

ПЕРСПЕКТИВЫ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ НАРУШЕНИЙ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА

Быков И.М., Мелконян К.И., Алексеенко Е.А., Попов К.А.

ГБОУ ВПО "Кубанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Краснодар, e-mail: ilya.bh@mail.ru

В статье приведены данные об изменении активности ферментов антирадикальной защиты (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы), накоплении продуктов окислительной модификации и антиокислительной активности плазмы в ротовой жидкости у 25 человек с сахарным диабетом 2 типа и 25 человек при сочетанном течении сахарного диабета 2 типа и ишемической болезни сердца. Установлено, что наиболее выраженные нарушения в прооксидантно-антиоксидантной системе отмечены у пациентов с сахарным диабетом 2 типа, при котором отмечено снижение активности всех ферментов на местном уровне, а также антиокислительной емкости ротовой жидкости (на 29,9%) и наиболее существенное увеличение продуктов окислительной модификации в ротовой жидкости (на 192,3%). Результаты исследования показывают, что в ротовой полости имеются автономные механизмы, регулирующие активность ферментного звена антиоксидантной системы, что сопровождается изменением активности отдельных ферментов в ротовой жидкости при соматических заболеваниях.

Ключевые слова: ротовая жидкость, супероксиддисмутаза, каталаза, антирадикальная защита

PROSPECTS NONINVASIVE DIAGNOSIS OF FREE RADICAL OXIDATION DEFECTS AND ANTIOXIDANT PROTECTION IN TYPE 2 DIABETES

Bykov I.M., Melkonyan K.I., Alekseenko E.A., Popov K.A.

Kuban state medical university, Krasnodar, e-mail: ilya.bh@mail.ru

The article presents data on changes in the activity of enzymes of antiradical defense (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase), the accumulation of oxidative modification and antioxidant activity of plasma in the oral fluid of 25 people with type 2 diabetes and 25 people in the combined current of type 2 diabetes and coronary heart disease. It was found that the most pronounced disturbances in prooxidant-antioxidant system were observed in patients with type 2 diabetes, in which the decreased activity of the enzymes at the local level, as well as antioxidant capacity of oral fluid (29.9%) and the most significant increase of oxidative modifications in the oral fluid (by 192.3%). The results show that in the oral cavity are autonomous mechanisms that regulate the activity of the enzyme level of the antioxidant system, which is accompanied by changes in the activity of certain enzymes in saliva in somatic diseases.

Keywords: oral fluid, superoxide dismutase, catalase, antiradical protection

В последние годы все большее внимание уделяется разработке новых неинвазивных алгоритмов с использованием ротовой жидкости (РЖ) для оценки состояния антиоксидантной защиты (АОЗ) и свободнорадикального окисления при патологии внутренних органов, в том числе

для проведения мониторинга терапии, направленной на уменьшение процессов перекисного окисления [12]. Учитывая все это, для определения ведущих лабораторных критериев следует изучить особенности изменения показателей активности ферментов антирадикальной защиты в РЖ,

которая позволит повысить эффективность использования неинвазивной диагностики у пациентов с сахарным диабетом (СД) 2 типа и его сочетании с ишемической болезнью сердца [11]. Медико-социальная значимость СД 2 типа обусловлена не только широкой распространенностью данной патологии среди населения [15], но и высокой частотой развития различных осложнений, сопровождающихся повреждением многих органов и систем, нередко приводящих к неблагоприятным исходам, при этом в последние годы отмечено увеличения частоты встречаемости СД 2 типа, в связи с чем проблема своевременного выявления и коррекции нарушений системы АОЗ становится все более актуальной и требует разработки новых лабораторных подходов в диагностике и мониторинге эффективности проводимой терапии [14]. Благодаря последним достижениям в биохимии и стоматологии продолжают совершенствоваться и внедряться в клиническую практику лабораторные методы, позволяющие осуществлять неинвазивную диагностику соматических заболеваний с помощью исследования показателей в РЖ, что существенно расширяет диагностические возможности и позволяет более эффективно контролировать состояние пациентов.

Процессы свободнорадикального окисления (СРО), которые являются универсальными и необходимы для нормальной жизнедеятельности, должны поддерживаться на физиологическом уровне, что обеспечивается АОЗ. Нарушение регуляции окислительного метаболизма приводит к усилению СРО, что сопровождается развитием различных патологических состояний при СД 2 типа [16], в том числе возрастанием осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы.

В этой связи представляется актуальным исследование выраженности пероксидации и нарушений ферментного звена антиоксидантной защиты в ротовой жидкости при СД 2 типа и его сочетании с ишемической болезнью сердца.

Материалы и методы исследования

Обследование пациентов и забор материала проводили на клинических базах: МБУЗ "Городская поликлиника №7 города Краснодара" (г. Краснодар), отделения кардиологии № 3 ГБУЗ "Клинический госпиталь для ветеранов войн" (г. Краснодар), отделения эндокринологии ГБУЗ "Краевая клиническая больница №1 имени профессора С.В.Очаповского" министерства здравоохранения Краснодарского края (г. Краснодар), ГБУЗ "Краевая консультативная поликлиника" (г. Краснодар). Материалом для исследования была РЖ больных с СД 2 типа (9 мужчин и 16 женщин, в возрасте – $64,9 \pm 2,2$ года, $n=25$, группа 1), РЖ больных с СД 2 типа и ишемической болезнью сердца ($n=25$, 10 мужчин и 15 женщин в возрасте ($M \pm m$) – $61,5 \pm 2,6$ года, группа 2). Контрольную группу 3 составили 25 человек (мужчин 12 и женщин 13, в возрасте – $56,3 \pm 8,7$ года) без патологии пародонта, не имеющих клинических и лабораторных признаков СД 2 типа и ишемической болезни, соизмеримых по полу и возрасту с другими обследованными группами.

Определение антиоксидантной активности проводили амперометрически на анализаторе антиоксидантной активности "Яуза-01-ААА" по способу [4], по которому сначала при определенном потенциале (1,3 В) измеряли электрический ток, возникающий при окислении на поверхности рабочего электрода стандарта (аскорбиновой кислоты в концентрации от 0,1 до 8,0 мг/л), на основании полученных данных выполняли построение калибровочного графика. Для оценки выраженности СРО в биожидкостях определяли реагирующие с тиобарбитуровой кислотой продукты пероксидации (ТБК-РП). Определение продуктов окислительной модификации биомолекул проводили на основании количественной оценки окрашенного комплекса, образующегося при взаимодействии вторичных продуктов окислительной модификации, содержащихся в РЖ, с тиобарбитуровой кислотой. Полученные результаты выражали в микромолях ТБК-РП на 1 л РЖ [7].

Среди показателей ферментного звена антирадикальной защиты изучали активность глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР), супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ). Активность ГПО определяли по уровню израсходованного в результате реакции окисления восстановленного глутатиона. Оставшийся после реакции восстановленный глутатион определяли с помощью 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной) кислоты (реактив Элмана). Активность ГПО выражали в мкмоль / (мин • г белка) [2]. Активность фермента ГР измеряли по степени окисления (НАДФН+Н⁺) в ходе реакции восстановления окисленного глутатиона при длине волны 340 нм. Активность ГР выражали в мкмоль / (мин • г белка) [2]. Активность СОД в РЖ определяли по методу [9] и выражали в условных единицах, отнесенных к 1г белка РЖ. Определение

активности КАТ в РЖ проводили колориметрическим методом [9], и выражали в мкмоль/ (мин • г белка) в РЖ.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли методами вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента. Достоверным считали различие при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Выраженные изменения в прооксидантно-антиоксидантной системе на местном уровне наблюдались во всех группах пациентов. При изучении активности ферментов, регулирующих обмен тиоловых субстратов, было установлено, что в РЖ больных с СД 2 типа и его сочетании с ишемической болезнью сердца определяется дисбаланс в работе ГПО и ГР: активность ГПО была снижена на 45,7% и в группах 1 и 2 соответственно ($p < 0,05$), активность ГР – на 49,1% ($p < 0,05$), что указывает на существенное падение восстановительного потенциала ферментного звена АОС и говорит о невозможности рециркуляции у таких больных тиоловых низкомолекулярных антиоксидантов и, безусловно, является неблагоприятным предиктором развития осложнений стоматологического и соматического характера [3, 16]. Оценивая количественно с помощью ТБК-РП состояние пероксидации в ротовой полости, было выявлено, что наиболее значительные нарушения встречались в группе 2, которые в 2,92 раза превышали показатели контрольной группы ($p < 0,05$), а также были выше значений в группе 2 (на 32,8%), что указывает на ведущую роль эндокринной патологии в развитии нарушений окислительного гомеостаза в ротовой полости и может быть связано как с рекреторной функцией слюнных желез и накоплением в РЖ глюкозы при декомпенсации СД, так и с выраженными нарушениями функционирования гематосаливарного барьера при диабете в условиях формирования макро- и микрососудистых осложнений. Интенсификация процессов свободнорадикального окисления, вызывает повреждение биополимеров, биологически

активных молекул и структурных компонентов клеточных мембран, поэтому своевременное использование в комплексной терапии препаратов с антиоксидантной направленностью представляется целесообразным у этих категорий больных [1, 5, 8, 13].

При анализе активности основных ферментов АОС на локальном уровне были выявлены патологические изменения для КАТ и СОД в РЖ обследованных больных: в группе 1 активность КАТ снижалась на 41,5% ($p < 0,05$), активность СОД уменьшалась на 44,9% ($p < 0,05$), в группе 2 было понижение активности КАТ на 49,6% ($p < 0,05$) и активности СОД на 51,7% ($p < 0,05$), что позволяет говорить о наличии в ротовой полости собственной локальной АОС, позволяющей автономно регулировать с помощью ферментов АОЗ интенсивность процессов свободнорадикального окисления. Такая организация ферментного звена АОС в РЖ обеспечивает дополнительную антиоксидантную протекцию слизистой ротовой полости в случае снижения антиоксидантной емкости крови при соматических заболеваниях [6]. Так, в группе 1 и 2 было установлено уменьшение антиоксидантной активности РЖ на 30,0% и 43,9% соответственно ($p < 0,05$). Следует отметить несколько большие резервы антиоксидантной защиты у пациентов с повышением у них активности СОД, что позволяет на определенном этапе нивелировать повреждающее воздействие супероксидного анион-радикала на слизистую ротовой полости.

На основании проведенных экспериментов необходимо отметить, что большое диагностическое значение для оценки уровня окислительного стресса в организме имеет определение в РЖ низкомолекулярных и ферментных компонентов прооксидантно-антиоксидантной системы, в наибольшей степени отражающих тяжесть патологического процесса у пациентов при сочетанном течении СД 2 типа и ишемической болезнью сердца.

Заключение

Необходимо отметить, что устойчивость организма к окислительному повреждению определяется организованной, взаимодополняющей работой всех механизмов защиты от свободных радикалов. Можно сказать, что, судя по полученным результатам, у больных СД 2 типа и ишемической болезнью сердца имеется выраженная разобщенность функционирования ферментов антирадикальной защиты, приводящая в свою очередь к снижению антиоксидантного потенциала низкомолекулярного звена АОЗ в РЖ. На основании полученных результатов, можно сказать, что изучение ведущих показателей ферментного и неферментного звеньев АОЗ в РЖ позволяет достаточно точно оценивать потенциал неспецифической защиты организма, что может быть использовано в диагностическом алгоритме для неинвазивной диагностики окислительного стресса и иммунологической дисфункции при СД 2 типа и при его сочетанном течении с ишемической болезнью сердца. Использование подобного подхода позволит более рационально проводить мониторинг их состояния в амбулаторных условиях.

Список литературы

1. Абидов М.Т., Павлюченко И.И., Басов А.А., Моргоев А.Э., Павленко С.Г., Абидов А.Б. Актуальность изучения и сравнительной оценки антиоксидантной активности Тамерита *in vitro* // Доклады Адыгской (Черкесской) Международной академии наук. – 2010. – Т. 12, № 2. – С. 135-141.
2. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: метод. Рекомендации. – СПб.: Фолиант, 2000. – 104 с.
3. Басов А.А., Аكوпова В.А., Гизей Е.В., Быков И.М. Биохимические особенности процессов свободно-радикального окисления и локальной продукции гуморальных факторов защиты в ротовой полости при ИБС с нормальным и нарушенным углеводным обменом // Кубанский научный медицинский вестник. – 2013. – Т. 141, № 6. – С. 34-38.
4. Басов А.А., Федосов С.Р., Канус И.С., Еремина Т.В., Пшидаток Д.В., Малышко В.В. Современные способы стандартизации антиоксидантных лекарственных средств и биологически активных добавок // Современные проблемы науки и образования. – 2006. – № 4. – С. 149.
5. Быков И.М., Павлюченко И.И., Луговая И.А., Басов А.А., Федосов С.Р. Сравнительная антиоксидантная емкость некоторых отечественных и импортных чайных напитков // Успехи современного естествознания. – 2005. – № 10. – С. 40.
6. Губарева Е.А., Каде А.Х., Павлюченко И.И., Быков И.М., Зингилевский К.Б., Басов А.А., Макарова М.О., Старицкий А.Г., Борисенко В.Г. Прогностическая значимость определения активности ферментов антирадикальной защиты у больных с острым инфарктом миокарда // Кубанский научный медицинский вестник. – 2008. – № 3-4. – С. 104-106.
7. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – 920 с.
8. Коваленко А.Л., Биличенко С.В., Саватеев А.В., Саватеева-Любимова Т.Н. Эффективность цитофлавина в терапии экспериментального диабета различного генеза // Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии. – 2006. – № 1. – С.137-139.
9. Королюк М.А., Иванов Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.П. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1988. – №1. – С.16-19.
10. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.И. Простой и чувствительный метод определения супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопросы медицинской химии. – 1990. – № 2. – С.88-91.
11. Литвинова М.Г., Басов А.А., Быков И.М. Показатели свободнорадикального окисления в крови и ротовой жидкости у больных при ишемической болезни сердца и сахарном диабете 2-го типа // Кубанский научный медицинский вестник. – 2012. – № 3. – С. 94-98.
12. Basov A.A., Akopova V.A., Bykov I.M. Changing the parameters of prooxidant-antioxidant system in blood and oral fluid of patients with ischemic heart disease and type 2 diabetes mellitus // International Journal on Immunorehabilitation. – 2013. – Vol. 15, № 2. – P. 84-86.
13. Faure P. Protective effects of antioxidant micronutrients (vitamin E, selenium) in type 2 diabetes mellitus. //Clin Chem Lab Med. – 2003. – V. 41, № 8. – P. 995-998.
14. Garcia-Caballero M, Tinahones FJ, Cohen RV, editors. Diabetes surgery.fst ed. Madrid: McGraw Hill. – 2010. – P.140-141.
15. Mayer-Davis E.J. Type 2 diabetes in youth: epidemiology and current research toward prevention and treatment //J. Am. Diet. Assoc. – 2008. – Vol.108, № 4 (Suppl 1). – P.S45-S51.
16. Retsky K.L., Freeman M.W., Frei B. Ascorbic acid oxidation product(s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 268. – P.1304-1309.