

УДК 616.876.572  
©Коллектив авторов

## ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЯВЛЕНИЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ТИПА 2, ЗЛОУПОТРЕБЛЯЮЩИХ АЛКОГОЛЕМ

*А. В. Индутный, В. Е. Высокогорский, Л. Н. Индутная*

Кафедра биохимии с курсом клинической биохимии и лабораторной диагностики  
Омской государственной медицинской академии

В сыворотке крови больных сахарным диабетом типа 2 (СД2), злоупотребляющих алкоголем, оценивали  $H_2O_2$ -индуцированную хемилюминесценцию, антиокислительную активность и уровень соединений, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Показано, что при сочетании СД2 со злоупотреблением алкоголем происходят существенные нарушения метаболизма, выражающиеся в интенсификации свободнорадикальных процессов. У данных пациентов зафиксировано значительное, статистически достоверное повышение содержания ТБК-реактивных продуктов свободнорадикального окисления и светосуммы  $H_2O_2$ -индуцированной хемилюминесценции. Полученные данные свидетельствуют о необходимости изучения у пациентов СД2, злоупотребляющих алкоголем, состояния процессов СРО в сыворотке крови, что позволит выработать показания для включения патогенетически обоснованной антиоксидантной терапии в комплекс терапевтических мероприятий.

**Ключевые слова:** свободнорадикальное окисление, хемилюминесценция, антиокислительная активность, злоупотребление алкоголем, сахарный диабет тип 2.

**ВВЕДЕНИЕ.** Интенсификация процессов свободнорадикального окисления (СРО) при сахарном диабете типа 2 (СД2) является следствием патогенетически детерминированных поломок в системе антиокислительной защиты, избыточной генерации свободных радикалов в митохондриях и эндоплазматической сети, а также связана с аутоокислением глюкозы [1,2]. К наиболее значимым субстратам СРО относят фосфолипиды, углеводы, белки и нуклеопротеины, что определяет характер и многообразие функциональных и структурных последствий окислительного стресса у больных СД2 [3,4]. Свободнорадикальный механизм повреждения является важным звеном патогенеза осложнений СД2, подлежащих коррекции с целью обеспечения качества и продолжительности жизни пациентов [1].

Одна из характерных особенностей СД2 состоит в том, что болезнь развивается преимущественно в зрелом возрасте, что предопределяет высокую частоту сочетания этого заболевания с различной сопутствующей патологией. Очевидно, что развитие оксидативного стресса в значительной степени универсально для широкого круга нозологических форм, включая распространенные бытовые интоксикации, в том числе и злоупотребление алкоголем [5]. С целью выяснения характера влияния злоупотребления алкоголем при СД2 на процессы свободнорадикального окисления и антиокислительной

защиты нами проведено изучение  $H_2O_2$ -индуцированной хемилюминесценции, антиокислительной активности и уровня соединений, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), в сыворотке крови.

**МЕТОДИКА.** В контингент обследуемых вошли 40 мужчин: 1) больные СД2, злоупотребляющие алкоголем (группа СД2+А); 2) пациенты СД2, не злоупотребляющие спиртными напитками (группа СД2); 3) злоупотребляющие алкоголем лица, у которых исключен сахарный диабет (группа А). Средний возраст пациентов на момент обследования составил 52 года ( $\pm 10,5$  лет). Контрольная группа была представлена здоровыми донорами. В группы обследуемых не входили лица, употреблявшие спиртные напитки в течение 14 дней перед забором крови. Формулировки диагноза у больных сахарным диабетом типа 2 соответствовали шифру E11.0-E11.9 по МКБ-10. Злоупотребление алкоголем (F10.1-F10.2; МКБ-10) выявляли по методике, предложенной Огурцовым и соавторами [6], которая интегрирует методы анкетирования (CAGE, ПАС) с оценкой физических признаков хронической интоксикации алкоголем по протоколу LeGo.

Материалом для исследования служила сыворотка крови. Антиокислительную активность (АОА) определяли на хемилюминометре ХЛМЦ-01 по способности сыворотки крови угнетать хемилюминесценцию, индуцированную  $Fe^{2+}$  в суспензии желточных липопротеинов [7]. Инкубационная среда содержала: 5,0 мл 50 мМ К-фосфатного буфера pH 7,7 и 0,5 мл суспензии желтка в 0,86% растворе NaCl (разведение 1:50). К полученной смеси добавляли 0,5 мл дистиллированной воды (контрольная проба) или 0,5 мл водного раствора сыворотки крови 1:5 (опытная проба). Реакцию индуцировали введением  $Fe^{2+}$  ( $FeSO_4$  в конечной концентрации 1,0 мМ) и проводили в условиях термостатирования ( $t=37\pm 0,5^\circ C$ ) с непрерывным перемешиванием смеси. Отношение амплитуды медленной вспышки хемилюминесценции в контрольной пробе к аналогичному показателю опытной пробы рассчитывали в Ед/мл исследуемой сыворотки и использовали как показатель АОА.  $H_2O_2$ -индуцированную хемилюминесценцию сыворотки крови регистрировали на хемилюминометре БХЛ-06 по предложенной методике [8]. В кювету хемилюминометра, содержащую 300 мкл 50 мМ К-фосфатного буфера (pH 7,4), вносили 150 мкл исследуемой сыворотки крови. Хемилюминесценцию инициировали добавлением к смеси 450 мкл 0,88 М  $H_2O_2$  и оценивали по величине светосуммы за 1 мин в расчете на 1 мл сыворотки (имп·мин<sup>-1</sup>·мл<sup>-1</sup>). Реакцию проводили при температуре 25°C, в условиях непрерывного перемешивания смеси. Содержание ТБК-реактивных веществ оценивали колориметрическим методом на спектрофотометре СФ-46 при  $\lambda=535$  нм и выражали через эквивалентное количество малонового диальдегида [9]. Полученные данные подвергнуты статистической обработке с помощью пакета компьютерных программ CSS, Microsoft Excel и представлены в таблице. Оценку достоверности различий между средними значениями показателей проводили с использованием критерия Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что в группе обследуемых, злоупотребляющих алкоголем (А) отсутствуют статистически значимые различия в светосумме  $H_2O_2$ -индуцированной хемилюминесценции и содержании ТБК-реактивных соединений по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы. У пациентов, злоупотребляющих алкоголем, зафиксировано повышение АОА крови на 25% ( $p<0,01$ ; по сравнению с контролем). Данный факт свидетельствует об увеличении способности сыворотки крови блокировать свободнорадикальное окисление липидов. Однако его невозможно объяснить прямым антиоксидантным эффектом этанола, поскольку обследуемые лица не употребляли спиртных напитков в течение двух и более недель перед забором крови. Известно, что злоупотребление алкоголем сопровождается усиленным образованием свободных

Таблица. Антиокислительная активность (АОА), светосумма  $H_2O_2$ -индуцированной хемилюминесценции (S) и содержание ТБК-реактивных веществ (ТБК-тест) в сыворотке крови обследуемых.

ГРУППЫ ОБСЛЕДУЕМЫХ	АОА (Ед/мл)	S (имп·10 <sup>3</sup> ·мин <sup>-1</sup> ·мл <sup>-1</sup> )	ТБК-тест (нмоль/мл)
КОНТРОЛЬНАЯ	17,06±0,77 (9)	3,71±0,95 (7)	2,71±0,44 (8)
А	21,39±0,88 *** (8)	4,65±1,00 (8)	2,49±0,51 (7)
СД2	18,98±1,13 (8)	6,77±0,87 ** (8)	5,58±1,40 * (6)
СД2+А	21,31±2,22 (15)	8,19±0,75 *** (15)	9,59±1,56 *** (8)

Примечание. Достоверность различий по отношению к контрольной группе обозначена \* при  $p<0,05$ ; \*\* -  $p<0,02$ ; \*\*\* -  $p<0,01$ . В скобках - количество опытов

радикалов в процессе биотрансформации этанола с участием микросомальной этанол-окисляющей системы, альдегидоксидазы и ксантинооксидазы тканей [5]. Это позволяет предположить, что умеренное повышение АОА сыворотки у лиц, злоупотребляющих алкоголем, может быть проявлением адаптивной активации системы антиокислительной защиты крови вследствие предшествующей хронической алкоголизации.

Анализ полученных данных выявил резко увеличенные значения светосуммы  $H_2O_2$ -индуцированной хемилюминесценции у пациентов группы СД2 (в 1,8 раза;  $p<0,02$  - по сравнению с контрольной группой) и значительное увеличение содержания ТБК-реактивных продуктов (в 2,1 раза;  $p<0,05$  - по отношению к контролю), а изменений со стороны АОА сыворотки крови обнаружено не было. Следовательно, у пациентов данной группы активированы процессы СРО, приводящие к усиленному образованию и поступлению из тканей в кровь соединений, вступающих в реакцию с тиобарбитуровой кислотой. Поскольку способность сыворотки крови блокировать свободнорадикальное окисление липидов (АОА) не изменена, можно предположить, что повышение уровня ТБК-реактивных продуктов связано с уменьшением способности крови обезвреживать активные формы кислорода - инициаторы СРО. На это указывает повышение величины светосуммы  $H_2O_2$ -индуцированной хемилюминесценции, которое отражает смещение баланса между уровнем катализаторов, разлагающих перекись водорода по радикальному и нерадикальному путям, в сторону преобладания радикал-генерирующих процессов [8].

В группе СД2+А зафиксированы ещё более значительные сдвиги со стороны изучаемых параметров. Отмечена тенденция к повышенному содержанию в крови ТБК-реактивных веществ по сравнению с группой СД2 ( $0,05<p<0,1$ ), которое уже в 3,6 раза превышает соответствующее значение в контрольной группе ( $p<0,01$ ). Светосумма  $H_2O_2$ -индуцированной хемилюминесценции сыворотки крови больных группы СД2+А увеличена в 2,2 раза ( $p<0,01$ ) по сравнению с группой здоровых доноров и в 1,8 раза по сравнению с обследуемыми из группы А ( $p<0,05$ ). Характерно, что, как и в группе СД2, интенсивность  $H_2O_2$ -индуцированной хемилюминесценции и уровень ТБК-реактивных продуктов в сыворотке крови пациентов группы СД2+А изменялись однонаправленно и практически параллельно, но сдвиги были выражены в большей степени. Обнаруженное углубление окислительного стресса у больных СД2, злоупотребляющих алкоголем, может оказать отрицательное влияние на течение заболевания и качество жизни пациентов, способствуя прогрессированию ультраструктурных и тканевых повреждений.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что при сочетании сахарного диабета типа 2 со злоупотреблением алкоголем наблюдается

## ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС ПРИ ДИАБЕТЕ, ОСЛОЖНЕННОМ АЛКОГОЛИЗМОМ

более выраженная активация процессов свободнорадикального окисления на фоне ограничения активности пероксид-элиминирующего компонента антиокислительной защиты крови. Одним из механизмов нарушения обезвреживания и усиленной генерации активных форм кислорода при сахарном диабете является гликирование белковых компонентов системы антиокислительной защиты крови [10]. Установлено, что хроническая алкоголизация у больных СД2 усугубляет инсулинорезистентность тканей, потенцирует гипергликемию и повышает скорость неферментативных реакций гликирования белков крови [11]. Следовательно, усиление гипергликемии при сочетании СД2 с алкоголизацией может быть одним из фактором, ослабляющих мощност системы защиты от повреждающего действия активных форм кислорода. К числу других возможных причин наблюдаемой активации СРО можно отнести генерацию свободных радикалов при активном потреблении кислорода цитохром-Р450-зависимой системой окисления, индуцированной вследствие хронической алкоголизации [11].

## ЛИТЕРАТУРА.

1. Соколов Е. И. (2002) Диабетическое сердце, М.: Медицина, 416 с.
2. Bellomo G., Maggi E., Poli M. et al. (1995) *Diabetes*, **44**, 60-66.
3. Балаболкин М. И., Креминская В. М. (1999) *Тер. архив*, **71**, №10, 5-12.
4. Kaul N., Sivalski-Iliskovic N., Thomas T. P. et al. (1995) *Nutrition*, **11**, № 5, Suppl., 551-554.
5. McDonough K. H. (2003) *Toxicology*, **189**(1-2), 89-97.
6. Огурцов П. П., Покровский А. Б., Нужный В. П. (1997) *Вопр. наркологии*, №1, 52-58.
7. Шерстнев М. П., Клебанов Г. И., Владимиров Ю. А. (1985) *Ж. физ. химии*, **59**, 2283-2286.
8. Журавлев А. К., Шерстнев М. П. (1985) *Лабор. дело*, № 10, 586-587
9. Стальная Н. О. Гарнишвили Т. Г. (1977) В кн.: *Современные методы в биохимии*. (ред. В. Н. Орехович), М., с. 66-68.
10. Ben G., Gnudi L., Maran A. et al. (1991) *Am. J. Med.*, **90**, 70-76.
11. Fujimoto S., Kawakami N., Ohara A. (1995) *Biol. Pharm. Bull.*, **18**(3), 396-400.

Поступила 10.12.2002

## CHARACTERISTIC MANIFESTATIONS OF OXIDATIVE STRESS IN ALCOHOL ABUSERS WITH DIABETES MELLITUS TYPE 2

A.V. Indutnyi, V.E. Vysokogorsky, L.N. Indutnaya

Omsk Medical Academy, Russia

Hydrogen peroxide induced chemiluminescence, thiobarbituric acid (TBA) reactive products and antioxidant activity were analyzed in blood serum of alcohol abusers with diabetes mellitus type 2. The chemiluminescence and TBA-tests were significantly higher in these patients whereas antioxidant activity remained unchanged compared with healthy volunteers and diabetic patients without alcohol background.

**Key words:** free radical reactions, chemiluminescence, antioxidant activity, alcohol abuse, diabetes mellitus type 2