

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.379-008.64
©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОЗЫ НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ *IN VITRO* И *IN VIVO*

В.З. Ланкин*, Г.Г. Коновалова, А.К. Тихазе, Л.В. Недосугова

ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс
Росмедтехнологий», Москва 121552, 3-я Черепковская ул., 15а;
эл. почта: lankin@cardio.ru

Глюкоза в диапазоне концентраций 12,5-100 мМ стимулирует Cu-иницированное свободнорадикальное окисление липопротеинов низкой плотности (ЛНП) плазмы крови человека. На основании исследования кинетических параметров окисления ЛНП установлено, что интенсификация процесса вызвана образованием радикальных интермедиатов автоокисления глюкозы при генерировании активных форм кислорода в присутствии ионов металлов переменной валентности. Обнаружено, что нормализация уровня глюкозы в крови больных сахарным диабетом типа 2 в процессе сахароснижающей терапии сопровождается существенным снижением окисленности ЛНП. При терапии метформином, способным утилизировать метилглиоксаль, окисление ЛНП больных сахарным диабетом *in vivo* ингибируется в еще большей степени, вероятно, вследствие снижения метилглиоксаль-зависимого генерирования супероксидных анион-радикалов, обнаруженного нами ранее [Биохимия (2009) **74**: 568-574].

Ключевые слова: окислительный стресс, карбонильный стресс, модифицированные липопротеины низкой плотности, глюкоза, липогидропероксиды, малоновый диальдегид, метилглиоксаль, метформин.

ВВЕДЕНИЕ. Окислительно модифицированные липопротеины низкой плотности (ЛНП) обладают большей атерогенностью (способностью накапливаться в клетках стенки сосуда), чем интактные частицы ЛНП [1-6]. Известно, что вызывать модификацию белкового компонента (апопротеина В-100) частиц ЛНП могут природные дикарбонилы, накапливающиеся в процессе окислительного стресса при атеросклерозе (малонилдиальдегид, МДА) [1-3, 5] и карбонильного стресса при сахарном диабете (глиоксаль, метилглиоксаль) [5, 7, 8]. В процессе реакции альдегидов с аминогруппами происходит образование меж- и внутримолекулярных сшивок (шиффовы основания) в молекулах протеинов [5, 9, 10]. Белок-модифицирующее действие глюкозы при диабетической гипергликемии может осуществляться двумя альтернативными способами. Во-первых, путем гликирования – прямого присоединения молекулы глюкозы при взаимодействии альдегидной группы альдозной формы углевода с аминогруппами протеина [8, 11]. Во-вторых, путем реакции аминогрупп белков с дикарбонилами, образующимися вследствие глиоксилирования – автоокисления глюкозы или фрагментации триозофосфатов [8, 12, 13].

Принятые сокращения: ЛНП – липопротеины низкой плотности; МДА – малоновый диальдегид; HbA_{1c} – гликированный гемоглобин; ИБС – ишемическая болезнь сердца, СОД – супероксиддисмутаза, ВНТ – бутилированный гидрокситолуол.

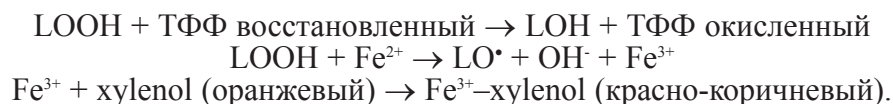
* - адресат для переписки

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОЗЫ НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛНП

Резкое накопление дикарбониллов, в частности метилглиоксалия, в крови больных при диабете [8] способствует развитию карбонильного стресса, причём, как установлено нами, при реакции метилглиоксалия с аминокеттогруппами концевых аминокислот белков подобных апоВ-100 может происходить генерирование супероксидных анион-радикалов [14], что должно приводить к интенсификации свободнорадикальных реакций, включая автоокисление глюкозы. Исходя из вышесказанного, логично предположить, что увеличение содержания глюкозы в крови при диабетической гипергликемии может способствовать интенсификации свободнорадикального окисления ЛНП с их последующей атерогенной модификацией. Тем не менее, сведения по влиянию глюкозы на свободнорадикальное окисление ЛНП в доступной литературе крайне немногочисленны и неоднозначны [13].

В связи с этим, в настоящей работе исследовали влияние различных концентраций глюкозы на Cu-инициированное свободнорадикальное окисление ЛНП плазмы крови человека, а также изменение окисленности ЛНП, изолированных из плазмы крови больных сахарным диабетом типа 2 в процессе сахароснижающей терапии.

МЕТОДИКА. Для выделения ЛНП использовали плазму венозной крови здоровых доноров (в случае модельных экспериментов) или пациентов с сахарным диабетом типа 2, взятой натощак в присутствии 1 мг/мл ЭДТА в качестве антикоагулянта и антиоксиданта. Плазму подвергали двукратному центрифугированию в градиенте плотности NaBr в течение 2 ч при 41000 об/мин в угловом роторе 50Ti при 4°C в рефрижераторной ультрацентрифуге Beckman L-8 (США) [15], а затем подвергали диализу при 4°C в течение 16 час против 50 мМ фосфатного буфера pH 7,4. Содержание белка в ЛНП определяли по методу Лоури и ЛНП разбавляли до 50 мкг белка/мл раствором, содержащим 0,154 М NaCl в 50 мМ фосфатном буфере pH 7,4, после чего в пробы вносили различные количества (от 12,5 до 100 мМ) глюкозы. Окисление ЛНП инициировали при 37°C внесением 30 мкМ CuSO₄, после чего через фиксированные интервалы времени измеряли накопление липогидропероксидов (конъюгированных диенов) при 233 нм (ΔD_{233}) на спектрофотометре Hitachi 220A (Япония) [16, 17]. По результатам исследований строили кинетические кривые окисления ЛНП, из которых определяли продолжительность лаг-фазы окисления (период индукции, τ) и величину максимальной скорости окисления (V_{\max}) [17]. В отдельном опыте в инкубационную среду вносили 30 мкг/мл лиофилизированной супероксиддисмутазы (СОД), 50 мкг/мл лиофилизированной каталазы или 50 мМ бутилированного гидрокситолуола (ВНТ). Содержание липидных гидропероксидов в ЛНП определяли специфичным колориметрическим методом, используя реакцию окисления ионов Fe²⁺ в Fe³⁺ в присутствии органических гидропероксидов и анализируя содержание образованного стехиометрически Fe³⁺ при помощи цветной реакции с ксиленолоранжем при 560 нм на спектрофотометре Hitachi 557 (Япония) до и после специфичного восстановления органических (липидных) гидропероксидов (LOOH) трифенилфосфином (ТФФ) [18, 19] в соответствии с уравнениями реакции:



Содержание вторичных продуктов свободнорадикального окисления (преимущественно МДА) в плазме крови определяли по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой в кислой среде, как описано ранее [17, 20], анализируя количество образовавшегося триметинового комплекса на спектрофотометре Hitachi 220A при 532 нм [17]. Содержание общего холестерина в плазме крови определяли при помощи ферментативного метода на химическом анализаторе FP-900 Labsystems Oy с использованием тест-наборов

фирмы “Boehringer” (Германия). Уровень гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) определяли на анализаторе Bayer DCA-2000 методом латексного ингибирования иммуноагглютинации с помощью Hemoglobin A_{1c} Reagent Kit фирмы “Bayer” (Германия).

В первое клиническое исследование были включены 30 больных сахарным диабетом типа 2 с длительностью заболевания около 5 лет (15 мужчин / 15 женщин, 57 ± 10 лет) в период декомпенсации углеводного обмена. Больные в течение 2-х месяцев получали стандартную сахароснижающую терапию, включающую препараты сульфаниламидов (глибенкламид – “Манинил” фирмы “Berlin-Chemie” (Германия) в суточной дозе 3,5-10,5 мг или гликлазид – “Диабетон” фирмы “Servier” (Франция) в суточной дозе 80-240 мг). Контрольную группу составили 7 мужчин (45 ± 5 лет) без признаков ишемической болезни сердца (ИБС) и гиперхолестеринемии, а также без каких-либо клинических проявлений сахарного диабета.

Во второе клиническое исследование было включено 70 пациентов, страдающих сахарным диабетом типа 2 (31 мужчина / 39 женщин, 57 ± 9 лет), из которых 40 человек с впервые выявленным сахарным диабетом не получали на момент включения в исследование сахароснижающей терапии, остальные 30 пациентов с длительностью диабета более 5 лет получали до исследования препараты сульфаниламидов (манинил или диабетон). Все включённые в исследование пациенты до его начала находились в состоянии декомпенсации углеводного обмена. Нормализации углеводного обмена у пациентов с впервые выявленным сахарным диабетом достигали с помощью метформина (“Глюкофаж” производства “Nucomed” (Швейцария) в суточной дозе 1500-2500 мг). У пациентов с длительностью диабета более 5 лет, компенсации углеводного обмена добивались путем коррекции дозы препаратов сульфаниламидов. Определение указанных выше биохимических параметров проводили до начала исследования и через 2 месяца после достижения удовлетворительной компенсации углеводного обмена в соответствии с критериями European Diabetes Polic Group (достижение уровня $\text{HbA}_{1c} < 7\%$).

В отдельном клиническом исследовании 29 больных (мужчины, 48 ± 6 лет) ИБС с гиперлипотеинемией IIa (уровень общего холестерина $> 6,5$ ммоль/л) в течение 14 недель на фоне стандартной антиатерогенной терапии ежедневно получали 400 мг/сут витамина Е (1 капсула/сут α -токоферолаацетата фирмы “Slovakofarma” (Словакия)).

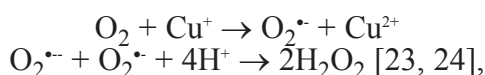
Кроме того, было проведено клиническое исследование, в которое было включено 30 пациентов (15 мужчин / 15 женщин, 56 ± 10 лет), в течение 5-6 лет страдающих сахарным диабетом типа 2 и до начала исследования находящихся в состоянии декомпенсации углеводного обмена. Больные были рандомизированы на две группы, из которых первая (20 человек) получала в течение 2-х месяцев стандартную сахароснижающую терапию (препараты сульфаниламидов в виде монотерапии или в комбинации с метформином), а вторая (10 человек) – дополнительно к сахароснижающей терапии получала синтетический антиоксидант пробукол (0,5 г “Alcolex” фирмы “ISN” (Венгрия) два раза в сутки).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ STATISTICA 6.0. Все использованные в работе химреактивы и ферментные препараты были получены от “Sigma” (США).

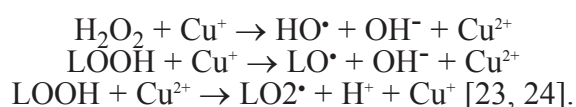
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Как видно из рисунка 1 кривые Си-инициированного окисления ЛНП плазмы крови здоровых доноров имеют характерную для свободнорадикального процесса кинетику с выраженным индукционным периодом (τ) как в отсутствии экзогенной глюкозы, так и в её присутствии. Суммированные данные, отражающие изменение параметров кинетики Си-инициированного свободнорадикального окисления ЛНП плазмы крови здоровых доноров (τ , V_{\max}) в присутствии различных концентраций (12,5-100 мМ) глюкозы, представлены на рисунке 2. Видно, что при увеличении

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОЗЫ НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛНП

содержания глюкозы в инкубационной среде происходит прогрессивное уменьшение продолжительности периода индукции с одновременным увеличением максимальной скорости окисления (рис. 1 и 2). Так, при концентрации глюкозы в среде инкубации 25 мМ и 100 мМ продолжительность периода индукции окисления ЛНП уменьшалась с $12,0 \pm 0,14$ мин в контроле (окисление ЛНП без добавки глюкозы) до $10,0 \pm 1,13$ и $7,0 \pm 0,03$ мин соответственно ($p < 0,05$), а величина максимальной скорости окисления ЛНП возрастала с $126 \pm 3,0$ нмоль LOOH/мин в контроле до $168 \pm 3,9$ и $254 \pm 2,6$ нмоль LOOH/мин соответственно ($p < 0,05$). Следует отметить, что стимулирующее действие глюкозы выявлено и при её содержании, соответствующем патофизиологическим уровням (12,5–50 мМ), характерным для диабетической гипергликемии (см. рис. 1 и 2, а также [21]). Кроме того, в наших исследованиях было выявлено более глубокое окисление ненасыщенных липидов ЛНП в присутствии глюкозы, поскольку уровни липогидропероксидов при достижении плато на кинетических кривых Cu-инициированного свободнорадикального окисления ЛНП в присутствии различных концентраций глюкозы всегда были достоверно выше соответствующих уровней при достижении плато на кинетических кривых окисления ЛНП без дотации глюкозы ($272 \pm 0,8$ против $307 \pm 5,5$ нмоль LOOH/мг белка ЛНП; $p < 0,001$). Таким образом, на основании исследованных кинетических параметров можно утверждать, что в присутствии экзогенной глюкозы наблюдается отчетливая интенсификация Cu-инициированного свободнорадикального окисления ЛНП (рис. 1 и 2). Можно полагать, что присутствие в среде инкубации низкой концентрации ионов меди в качестве индуктора окисления не является нефизиологичным, поскольку установлено, что эндогенные ионы металлов переменной валентности активно связываются с апопротеином В-100 ЛНП в кровотоке [22], что доказывает эффективное подавление спонтанного свободнорадикального окисления ЛНП при хелатировании этих ионов [22]. Исходя из этого, неудивительно, что глюкоза способна стимулировать окисление ЛНП *in vitro* даже в отсутствии экзогенных ионов металлов переменной валентности [21], поскольку эндогенные ЛНП-ассоциированные ионы металлов могут участвовать в активации кислорода и инициировании окисления. В ранее выполненном исследовании [21] было показано подавление глюкозо-зависимого Cu-инициированного окисления ЛНП скэвенджерами активных форм кислорода, такими как антиоксидантные ферменты супероксиддисмутаза и каталаза, равно как ингибитором свободнорадикальных реакций бутилированным гидрокситолуолом. По мнению авторов, это однозначно подтверждает образование свободнорадикальных интермедиатов глюкозы в процессе окисления [21]. Тем не менее, с нашей точки зрения этот вывод не является обоснованным. Дело в том, что активация кислорода в присутствии ионов меди должна сопровождаться образованием как супероксидных радикалов $O_2^{\bullet-}$, так и пероксида водорода:



вследствие чего подавление окисления ЛНП при внесении в среду инкубации СОД и каталазы, утилизирующих $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 , обнаруженное в работе [21] не является неожиданным. В качестве основных индукторов окисления полиеновых липидов ЛНП в изучаемой системе выступают гидроксил-радикал и липидные радикалы, образующиеся при металл-зависимом разложении пероксида водорода и липидных гидропероксидов соответственно:



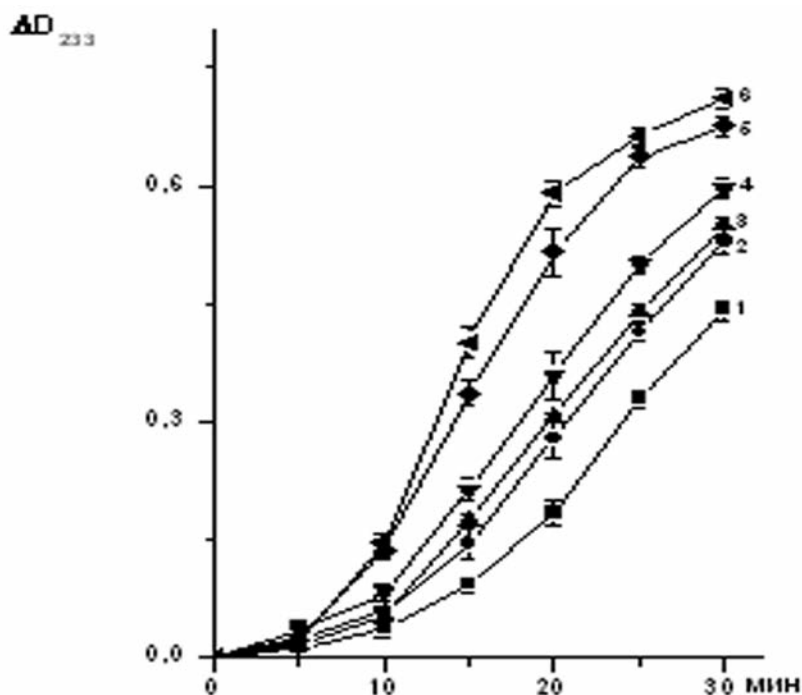


Рисунок 1.

Кинетика Si-инициированного свободнорадикального окисления ЛНП плазмы крови человека (практически здоровые доноры) в отсутствии (1) и в присутствии различных концентраций глюкозы: 12,5 мМ (2), 25 мМ (3), 50 мМ (4), 75 мМ (5), 100 мМ (6).

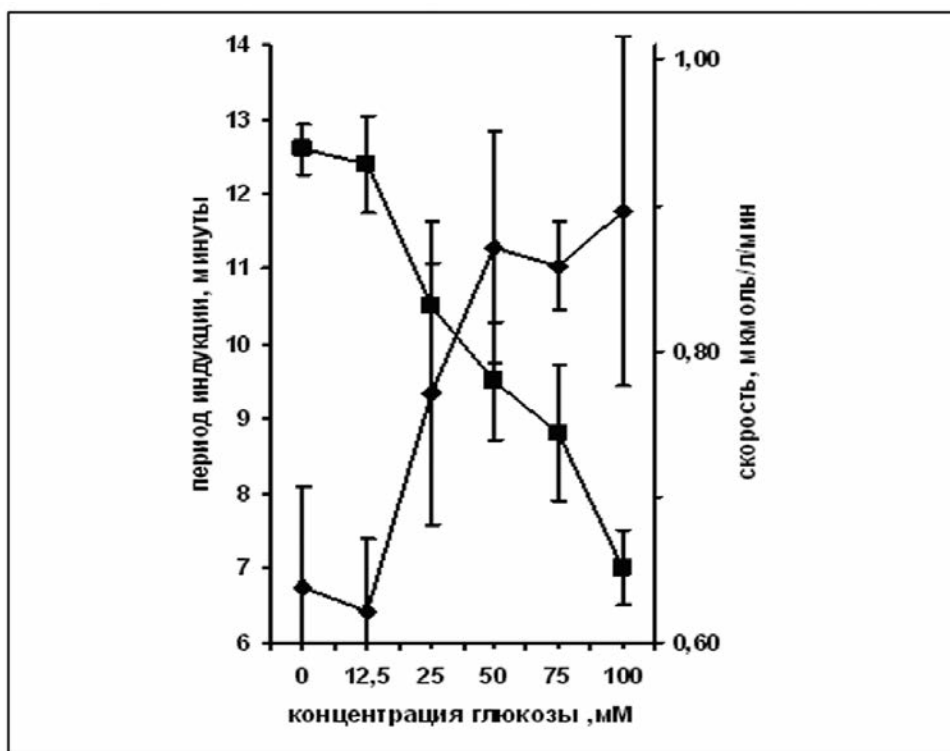


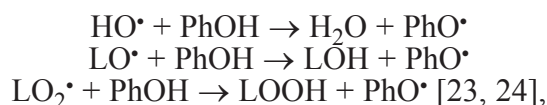
Рисунок 2.

Влияние экзогенной глюкозы на изменение кинетических параметров Si-инициированного свободнорадикального окисления ЛНП плазмы крови человека:

- (1) продолжительность периода индукции - τ ;
- (2) максимальная скорость окисления - V_{\max} .

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОЗЫ НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛНП

Очевидно, что в присутствии фенольного антиоксиданта ВНТ (Ph-OH) эти реакции должны ингибироваться вследствие образования малоактивных феноксильных радикалов (PhO \cdot):



что соответствует результатам, полученным авторами работы [21].

Исходя из вышесказанного неудивительно, что в наших экспериментах, результаты которых приведены на рисунке 3, Cu-зависимое окисление ЛНП и в отсутствие глюкозы существенно подавлялось внесением в инкубационную среду и антиоксидантных ферментов (СОД и каталазы), и ингибитора свободнорадикальных реакций ВНТ. Таким образом, полученные данные доказывают присутствие в используемой нами и авторами работы [21] Cu-инициированной системе окисления ЛНП таких активных форм кислорода как O $_2\cdot^-$ и H $_2$ O $_2$, а также свободных радикалов, образование которых не связано с автоокислением глюкозы. Таким образом, вопреки выводам авторов работы [21], полученные нами результаты (рис. 3) свидетельствуют о невозможности идентификации радикальных интермедиатов автоокисления глюкозы в используемой системе окисления ЛНП при помощи экзогенных скэвенджеров активных форм кислорода и ингибиторов свободнорадикальных реакций.

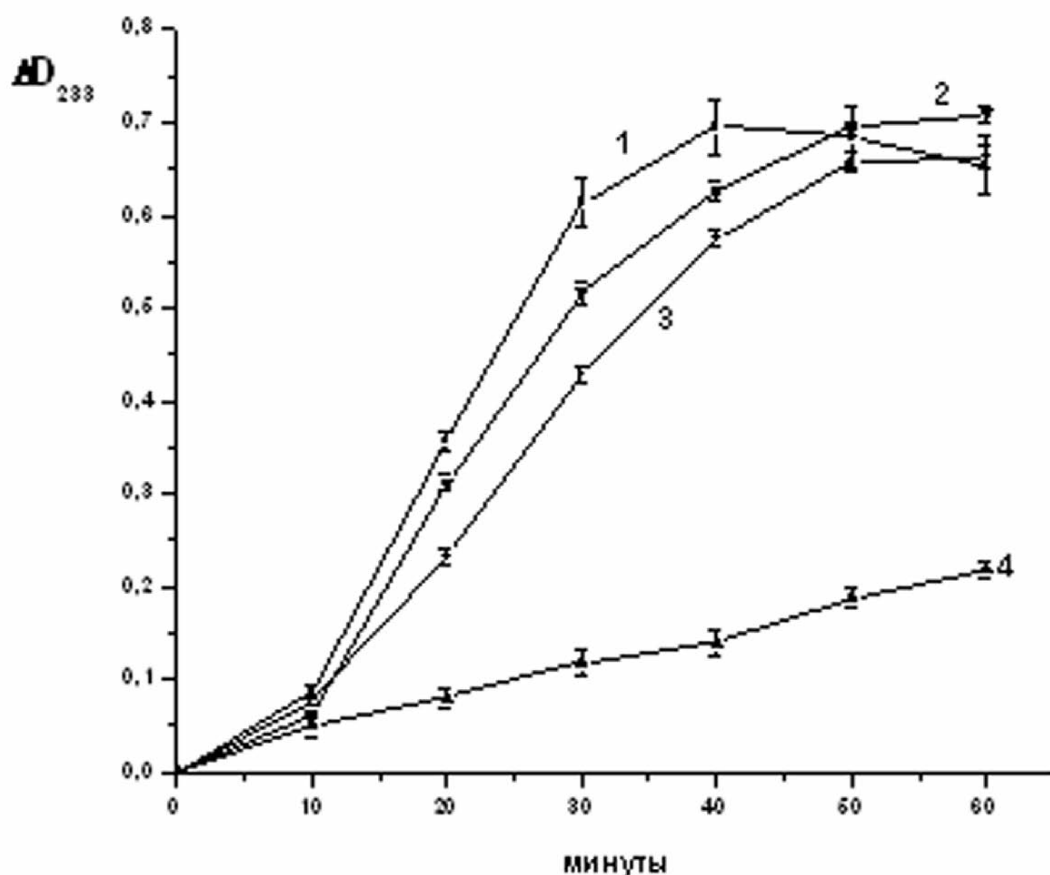


Рисунок 3.

Влияние антиоксидантных ферментов и ингибитора свободнорадикальных процессов ВНТ на кинетику Cu-инициированного свободнорадикального окисления ЛНП плазмы крови человека.

1 - контроль (без добавок), 2 - + 30 мкг/мл СОД, 3 - + 50 мкг/мл каталазы, 4 - + 50 мМ ВНТ.

Приведены средние данные 3-х экспериментов.

Тем не менее, в присутствии возрастающих концентраций экзогенной глюкозы при неизменном содержании других компонентов системы нами выявлено значительное снижение продолжительности периодов индукции Cu-инициированного свободнорадикального окисления ЛНП и одновременное увеличение максимальной скорости окисления. Как известно, период индукции $\tau = [\text{InH}]/w$, где $[\text{InH}]$ – концентрация ингибиторов свободнорадикальных процессов в системе, а w – скорость инициирования окисления [25]. В наших исследованиях все серии экспериментов проводили с использованием одних и тех же образцов свежeweделенных ЛНП в стандартных условиях. Очевидно, что концентрация эндогенных ингибиторов свободнорадикальных процессов ($[\text{InH}]$) во всех образцах ЛНП была идентичной. Идентичной должна была бы быть также и скорость инициирования окисления (w) изолированных из плазмы крови ЛНП, если бы она зависела только от содержания в них преобразованных *in vivo* липогидропероксидов $[\text{LOOH}]$, которые в условиях наших опытов в присутствии ионов меди подвергаются распаду с образованием липидных радикалов (см. выше), способных инициировать дальнейшее окисление ненасыщенного субстрата – полиеновых липидов ЛНП. Обнаруженное нами уменьшение продолжительности периодов индукции Cu-инициированного свободнорадикального окисления ЛНП в присутствии экзогенной глюкозы (рис. 1 и 2), следовательно, может быть логично объяснено исключительно образованием свободнорадикальных интермедиатов в процессе автоокисления глюкозы (увеличение w при $[\text{InH}]=\text{const}$), которые и вызывают наблюдаемую нами (рис. 1 и 2) вторичную индукцию окисления полиненасыщенных липидов в частицах ЛНП. Свободнорадикальные интермедиаты окисления ЛНП, в свою очередь, могут вновь провоцировать автоокисление глюкозы с образованием соответствующих свободных радикалов, инициирующих окислительные процессы в липидах ЛНП. Следовательно, на основании анализа кинетических параметров Cu-инициированного свободнорадикального окисления ЛНП в присутствии экзогенной глюкозы можно полагать, что в процессе автоокисления глюкозы образуются свободнорадикальные интермедиаты. Установление природы этих свободнорадикальных интермедиатов, учитывая сложность и многокомпонентность исследуемой системы окисления, в настоящее время не представляется возможным, однако можно предположить, что в процессе автоокисления глюкозы происходит образование супероксидного анион-радикала, а следовательно H_2O_2 и HO^\bullet (см. вышеприведенные схемы реакций).

Увеличение окисленности ЛНП (увеличение уровня LOOH в ЛНП) было выявлено нами в крови больных сахарным диабетом типа 2 в период декомпенсации углеводного обмена ($\text{HbA}_{1c}=8,1\pm0,03\%$). Уровень липогидропероксидов в ЛНП, выделенных из плазмы крови этих больных почти в 25 раз (!) превышал таковой у практически здоровых людей без признаков ИБС и сахарного диабета (рис. 4). Обращает на себя внимание тот факт, что окисленность ЛНП плазмы крови больных сахарным диабетом типа 2 при декомпенсации углеводного обмена была значительно выше, чем в ЛНП плазмы крови больных ИБС с гиперхолестеринемией, высокий уровень окисленности ЛНП у которых был отмечен нами ранее [26]. Стандартная сахароснижающая терапия препаратами сульфонилмочевины в течение 2-х месяцев приводила к существенному улучшению показателей углеводного обмена ($\text{HbA}_{1c}=7,1\pm0,18\%$) и сопровождалась, как видно из рисунка 4, существенным снижением (почти в 1,5 раза) уровня липогидропероксидов в ЛНП плазмы крови больных сахарным диабетом типа 2. Содержание вторичного продукта свободнорадикального окисления ненасыщенных липидов ЛНП – МДА было увеличено в крови больных сахарным диабетом типа 2 в период декомпенсации углеводного обмена по сравнению с контролем в 3 раза, а после достижения компенсации углеводного обмена – уменьшалось в 1,8 раза (рис. 4). Следует отметить, что снижение уровня

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОЗЫ НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛНП

липогидропероксидов в ЛНП больных сахарным диабетом типа 2 в процессе терапии не было связано с влиянием сахароснижающих препаратов на уровень холестеринемии, поскольку у исследованных больных сахарным диабетом содержание общего холестерина в плазме крови до и после терапии достоверно не изменялось и составляло $6,5 \pm 0,42$ и $6,1 \pm 0,36$ ммоль/л соответственно. Таким образом, только снижение уровня глюкозы в крови больных сахарным диабетом, без какого-либо антиоксидантного воздействия, приводит к весьма значительному уменьшению окисленности ЛНП плазмы крови (рис. 4). Следовательно, эти данные, полученные *in vivo*, хорошо согласуются с приведенными выше результатами модельных исследований (рис. 1 и 2) и убедительно свидетельствуют о важном вкладе радикальных продуктов автоокисления глюкозы в инициирование окисления полиеновых липидов частиц ЛНП, в том числе, в условиях целостного организма.

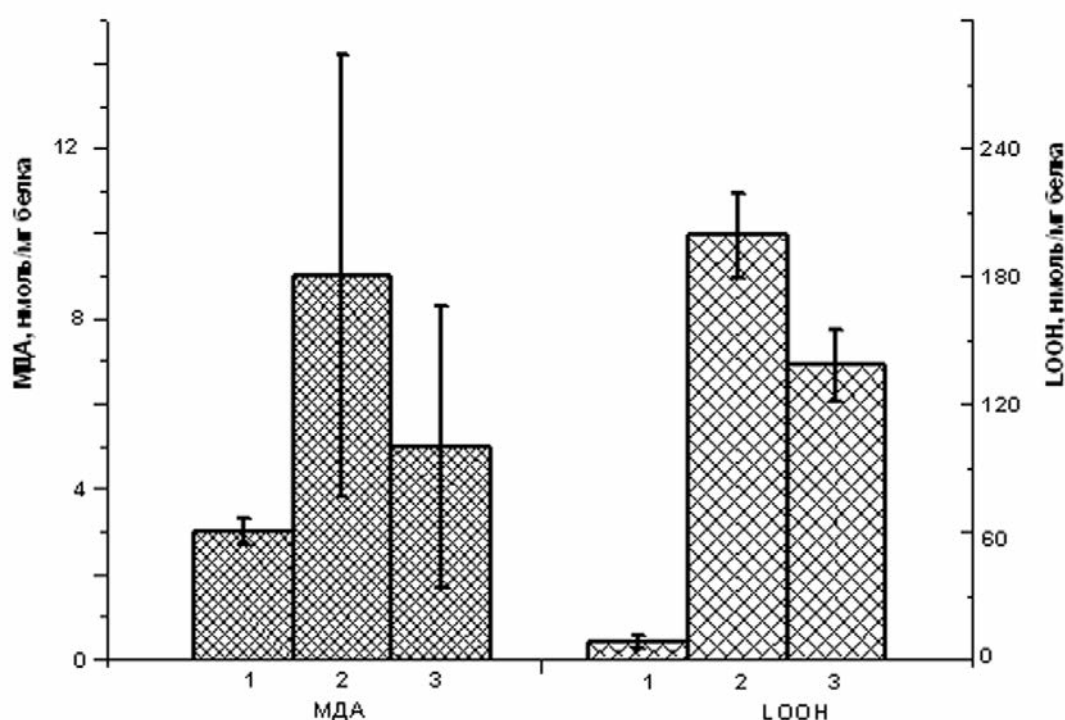


Рисунок 4.

Содержание продуктов свободнорадикального окисления полиеновых липидов в ЛНП плазмы крови практически здоровых людей без признаков ИБС и сахарного диабета (1), а также больных сахарным диабетом типа 2 до терапии (2) и после проведения 2-х месячного курса сахароснижающей терапии препаратами сульфонилмочевины (3).

[MDA] - $p_{1-2} < 0,05$; $p_{1-3} < 0,05$; $p_{2-3} > 0,05$. [LOOH] - $p_{1-2} < 0,001$; $p_{1-3} < 0,001$; $p_{2-3} < 0,05$.

Подтверждение высказанных положений было получено также при исследовании изменения содержания продуктов свободнорадикального окисления полиеновых липидов в ЛНП плазмы крови больных с декомпенсированным ($HbA_{1c} = 8,24 \pm 0,19\%$) сахарным диабетом типа 2 во втором клиническом исследовании в процессе отдельной сахароснижающей монотерапии либо производными сульфонилмочевины, либо метформином в течение 2-х месяцев.

Известно, что метформин помимо сахароснижающего действия способен вступать в реакцию с метилглиоксалью с образованием циклического производного – триазепинона, экскретируемого с мочой [27-29], причем показано, что терапия метформином действительно приводит к существенному снижению уровня метилглиоксала в крови больных сахарным диабетом [27]. Таким образом, метформин, вероятно, подавляет радикалообразование в крови больных при сахарном диабете за счет снижения уровня активных форм кислорода, которые могут образоваться при взаимодействии метилглиоксала с аминокислотными группами белков [14]. Как было установлено в нашем исследовании, метформин был не менее эффективен в качестве сахароснижающего агента, чем производные сульфонилмочевины (снижение уровня HbA_{1c} за 2 месяца терапии до $6,69 \pm 0,15\%$ и $7,10 \pm 0,18\%$ соответственно; $p < 0,1$). Также как и в предыдущем исследовании (рис. 4), в процессе терапии производными сульфонилмочевины и метформином в крови больных сахарным диабетом отмечено снижение уровня МДА (рис. 5), причем уменьшение содержания этого дикарбонила было более выражено (почти в 2,5 раза) при терапии метформином по сравнению с терапией производными сульфонилмочевины (снижение уровня МДА на 59% и 36% соответственно, $p < 0,01$). В то же время, уровень липогидропероксидов в ЛНП плазмы крови больных сахарным диабетом при терапии метформином снижался в 5 раз больше, чем при терапии производными сульфонилмочевины (рис. 5), уменьшаясь на 87% и 29% соответственно ($p < 0,001$). С нашей точки зрения, столь резкое снижение уровня окисленных ЛНП в крови больных сахарным диабетом в процессе терапии метформином вполне объяснимо повышенной утилизацией потенциального радикалообразователя – метилглиоксала [14].

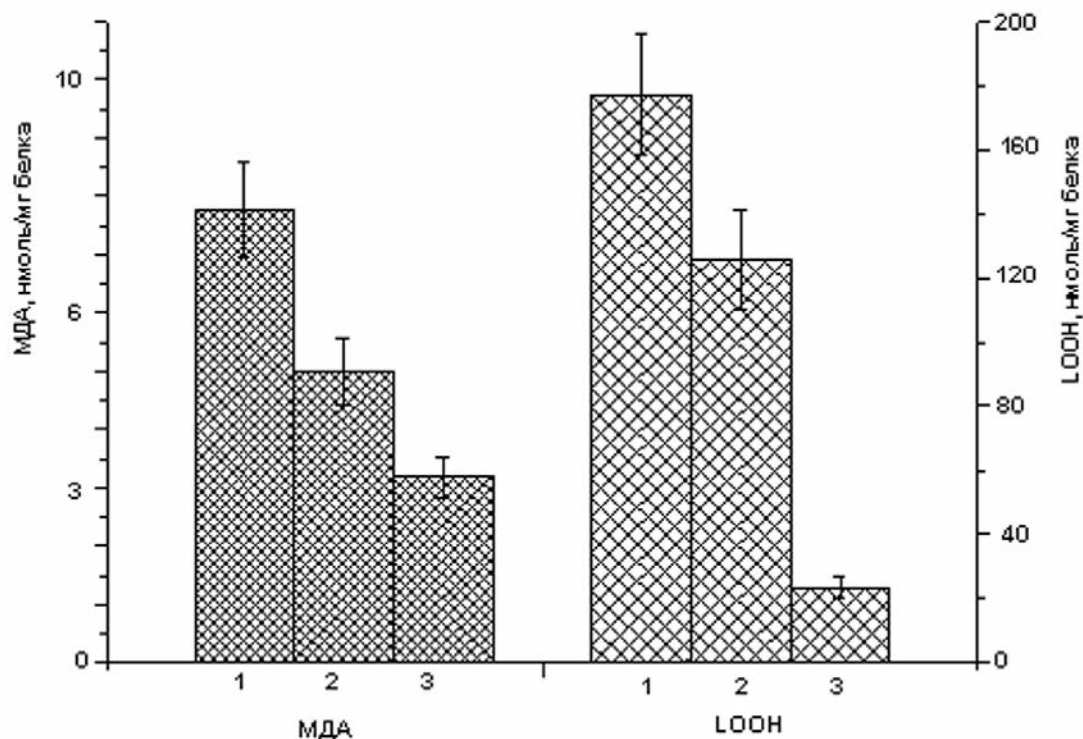


Рисунок 5.

Содержание продуктов свободнорадикального окисления полиеновых липидов в ЛНП плазмы крови больных сахарным диабетом типа 2 в период декомпенсации углеводного обмена (1) и после проведения 2-х месячного курса сахароснижающей терапии препаратами сульфонилмочевины (2) или метформином (3).

Окислительный стресс при диабете [8] сопровождается увеличением уровня дикарбониллов в крови больных, преимущественно МДА [8, 30, 31] (см. рис. 4 и 5), образующегося в процессе свободнорадикального окисления липидов при гиперлипидемии [4, 5, 8], а также глиоксаля и метилглиоксаля [27, 32], образующихся в процессе автоокисления глюкозы и фрагментации триозофосфатов [5, 8, 33] при гипергликемии. Таким образом, в процессе диабета окислительный стресс переходит в карбонильный стресс, что сопровождается накоплением более токсичных продуктов, способных вызывать значительное повреждение или модификацию молекул биополимеров. В соответствии с высказанной нами гипотезой [5], молекулярный механизм первичных повреждений стенки сосудов при атеросклерозе и сахарном диабете идентичен и состоит в повышенном образовании альдегид-модифицированных ЛНП, причём модифицированные ЛНП, накапливающиеся при диабете, как показано нами ранее, могут быть более атерогенны [5]. С нашей точки зрения, эти представления удовлетворительно объясняют известный факт усиленного прогрессирования атеросклеротических повреждений стенки сосудов при наличии сахарного диабета, а также то, что смертность при сахарном диабете типа 2 более чем в 70% случаев обусловлена сердечно-сосудистыми осложнениями [34]. Полученные в настоящей работе данные указывают на то, что сама диабетическая гипергликемия может быть фактором, усиливающим проявления окислительного и карбонильного стрессов, способствуя накоплению химически агрессивных дикарбониллов, включая МДА и метилглиоксаль. При этом накопление метилглиоксаля может провоцировать протекание автокаталитических реакций, сопровождающихся генерированием активных форм кислорода, что должно способствовать дальнейшей интенсификации свободнорадикальных процессов [14]. В соответствии с этим, результаты нашего исследования указывают на возможность определенного ограничения окислительного стресса у больных сахарным диабетом типа 2 исключительно путём нормализации углеводного обмена, даже без назначения антиоксидантной терапии (рис. 4 и 5). Более того, сахароснижающие препараты, способствующие усилению клиренса дикарбониллов, вероятно, имеют преимущества перед сахароснижающими средствами с иным механизмом действия. Действительно, не исключено, что используемые в клинике антигипертензивное средство гидралазин, антидепрессанты фенелзин и ипрониазид, а также другие нетоксичные производные гидразинов, способные эффективно связывать диабетогенные токсичные дикарбонилы [35, 36], могут найти применение в комплексной терапии сахарного диабета. Как бы то ни было, представленные в настоящей работе данные убедительно свидетельствуют о непосредственном вовлечении глюкозы в процесс развития окислительного стресса при сахарном диабете и ставят вопрос о необходимости учитывать эти результаты при разработке терапевтических мероприятий, направленных на эффективное предотвращение сосудистых поражений при этом заболевании.

В то же время, из результатов нашего исследования следует, что дополнительное использование антиоксидантов в комплексной терапии сахарного диабета вполне оправдано, поскольку подавление свободнорадикального окисления ЛНП *in vivo* должно способствовать уменьшению их атерогенности (способности к повреждению стенки сосуда). Очевидно, что оптимальным было бы использование природных фенольных антиоксидантов, в частности, α -токоферола (витамина Е). Тем не менее, результаты многочисленных клинических исследований свидетельствуют о том, что α -токоферол, даже при применении в весьма высоких дозах, не предотвращает существенным образом прогрессирование повреждения стенки сосудов у больных атеросклерозом [37-40]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что пероральное введение высоких доз витамина Е больным ИБС в течение 2,5 месяцев не приводит к достоверному изменению окисляемости ЛНП из плазмы крови этих пациентов

(рис. 6). Это объясняется тем, что транспортируемый частицами ЛНП α -токоферол не является эффективным антиоксидантом для этих липопротеинов, поскольку антиоксидантную функцию в ЛНП, очевидно, выполняет восстановленная форма коэнзима Q_{10} [41]. При использовании модели Cu-инициированного свободнорадикального окисления ЛНП мы продемонстрировали весьма существенное снижение (увеличение продолжительности лаг-фазы окисления почти в 4,5 раза, $p < 0,05$) окисляемости частиц ЛНП, изолированных из плазмы крови больных сахарным диабетом типа 2 после введения синтетического фенольного антиоксиданта пробукола в течение 2-х месяцев (рис. 7). Одновременно в ЛНП больных, получавших пробукол, наблюдали почти двукратное снижение содержания липогидропероксидов ($135 \pm 21,8$ и $75 \pm 21,4$ мкмоль/мг апоВ в контрольной группе и группе с введением пробукола соответственно, $p < 0,05$) и более чем трёхкратное снижение содержания МДА ($7,9 \pm 2,4$ и $2,5 \pm 0,4$ нмоль/мг апоВ в контрольной группе и группе с введением пробукола соответственно, $p < 0,05$). Следовательно, нетоксичные фенольные антиоксиданты могут быть весьма эффективны для подавления свободнорадикального окисления ЛНП при сахарном диабете и, наряду с производными гидразинов, способными связывать активные дикарбонилы, весьма перспективны для использования в комплексной терапии этого заболевания для снижения негативных последствий окислительного и карбонильного стрессов. Очевидно, что накопление токсичных липогидропероксидов и дикарбониллов различного строения при диабетогенной гипергликемии, провоцируя атерогенную модификацию ЛНП, является одним из основных факторов повреждения стенки сосудов при сахарном диабете.

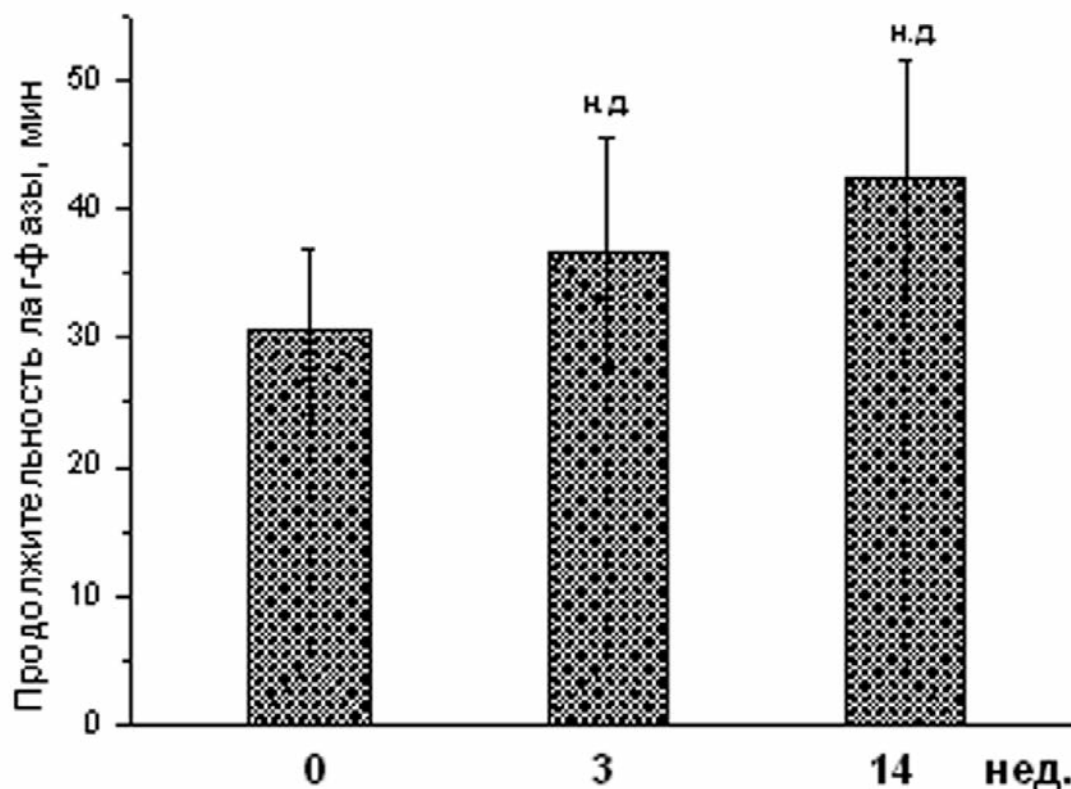


Рисунок 6.

Влияние перорального приема витамина Е (400 мг/сут α -токоферолаацетата) на окисляемость ЛНП плазмы крови больных ИБС *in vitro* (нд - отличия от контроля статистически недостоверны).

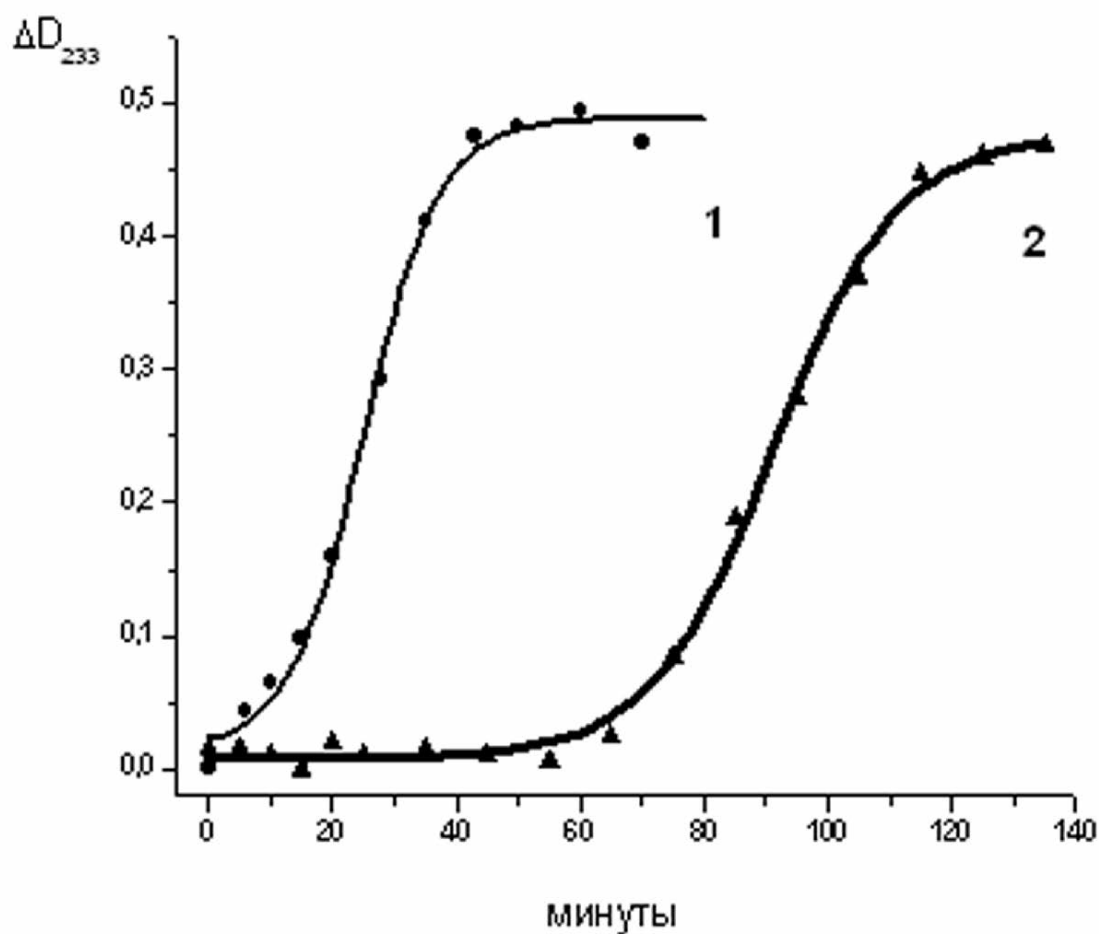


Рисунок 7.

Характерные кинетические кривые Si-инициированного свободнорадикального окисления ЛНП плазмы крови больных сахарным диабетом типа 2 после 2-х месячной стандартной сахароснижающей терапии (1) и после 2-х месячной терапии, дополнительно включающей приём антиоксиданта пробукола (1000 мг/сут).

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ №07-04-00558а и №10-04-00294а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Witztum J.L., Steinberg D. (1991) J. Clin. Invest., **88**, 1785-1792.
2. Schwartz C.J., Valente A.J., Sprague E.A., Kelley J.L., Nerem R.M. (1991) Clin. Cardiol., **14**, 11-16.
3. Yla-Herttuala S. (1994) Drugs Today, **30**, 507-514.
4. Lankin V.Z., Tikhaze A.K. (2003) in: Free Radicals, Nitric Oxide, and Inflammation: Molecular, Biochemical, and Clinical Aspects, NATO Science Series vol. 344 (Tomasi A. et al., eds.) IOS Press, Amsterdam etc., pp. 218-231.
5. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Капелько В.И., Шепелькова Г.С., Шумаев К.Б., Панасенко О.М., Коновалова Г.Г., Беленков Ю.Н. (2007) Биохимия, **72**, 1330–1341.
6. Willcox B.J., Curb J.D., Rodriguez B.L. (2008) Am. J. Cardiol., **101**, 75D-86D.
7. Oberley L.W. (1988) Free Radic. Biol. Med., **5**, 113-124.

8. *Niedowicz D.M., Daleke D.L.* (2005) *Cell Biochem. Biophys.*, **43**, 289-330.
9. *Witz G.* (1989) *Free Radic. Biol. Med.*, **7**, 333-349.
10. *Donato H.* (1981) in: *Age pigments* (Sohal R.S., ed.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam etc., pp. 63-81.
11. *Furth A.J.* (1997) *Br. J. Biomed. Sci.*, **54**, 192-200.
12. *Monnier V.M., Mustata G.T., Biemel K.L., Reihl O., Lederer M.O., Zhenyu D., Sell D.R.* (2005) *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, **1043**, 533-544.
13. *Esper R.J., Vilarino J.O., Machado R.A., Paragano A.* (2008) *Adv. Cardiol.*, **45**, 17-43.
14. *Шумаев К.Б., Губкина С.А., Кумскова Е.М., Шепелькова Г.С., Рууге Э.К., Ланкин В.З.* (2009) *Биохимия*, **74**, 568-574.
15. *Tertov V.V., Kaplun V.V., Dvoryantsev S.N., Orekhov A.N.* (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 608-613.
16. *Esterbauer H., Striegl G., Puhl H., Rotheneder M.* (1989) *Free Radic. Res. Commun.*, **6**, 67-75.
17. *Ланкин В.З., Лусина М.О., Арзамасцева Н.Е., Коновалова Г.Г., Недосугова Л.В., Каминный А.И., Тихазе А.К., Агеев Ф.Т., Кухарчук В.В., Беленков Ю.Н.* (2005) *Бюлл. экспер. биол. мед.*, **140**, 41-43.
18. *Nourooz-Zadeh J., Tajaddini-Sarmadi J., Wolff S.P.* (1994) *Analyt. Biochem.*, **220**, 403-409.
19. *Hermes-Lima M., Willmore W.G., Storey K.B.* (1995) *Free Radic. Biol. Med.*, **19**, 271-280.
20. *Slater T.F., Sawyer B.C.* (1971) *Biochem. J.*, **123**, 805-814.
21. *Kawamura M., Heinecke J.W., Chait A.* (1994) *J. Clin. Invest.*, **94**, 771-778.
22. *Kuzuya M., Yamada K., Hayashi T., Funaki C., Naito M., Asai K., Kuzuya F.* (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1123**, 334-341.
23. *Lankin V.Z.* (2003) in: *Free Radicals, Nitric Oxide, and Inflammation: Molecular, Biochemical, and Clinical Aspects*, NATO Science Series vol. 344 (Tomasi A. et al., eds.) IOS Press, Amsterdam etc., pp. 8-23.
24. *Lankin V.Z., Antonovsky V.L., Tikhaze A.K.* (2004) in: *Peroxides at the Beginning of the Third Millennium* (Antonovsky V.L. et al., eds.) Nova Science Publishers Inc., New York, pp. 85-111.
25. *Эмануэль Н.М., Лясковская Ю.Н.* (1961) *Торможение процессов окисления жиров*, Пищепромиздат, М., стр. 10-19.
26. *Ланкин В.З., Коновалова Г.Г., Тихазе А.К., Нежданова И.Б., Олферьев А.Н., Кухарчук В.В.* (2003) *Бюлл. экспер. биол. мед.*, **136**, 49-52.
27. *Beisswenger P., Howell S., Touchette A., Lai S., Szwergold B.* (1999) *Diabetes*, **48**, 198-202.
28. *Ruggiero-Lopez D., Lecomte M., Moinet G., Patereau G., Lagarde M., Wiernsperger N.* (1999) *Biochem. Pharmacol.*, **58**, 1765-1773.
29. *Beisswenger P., Ruggiero-Lopez D.* (2003) *Diabetes Metab.*, **29**, 6S95-6S103.
30. *Jain S.K., McVie R., Jackson R., Levine S.N., Lim G.* (1999) *Diabetes Care*, **22**, 1171-1175.
31. *Slatter D.A., Bolton C.H., Bailey A.G.* (2000) *Diabetologia*, **43**, 550-557.
32. *Negre-Salvayre A., Salvayre R., Auge N., Pamplona R., Portero-Otin M.* (2009) *Antioxid. Redox Signal.*, **11**, 3071-3109.
33. *Negre-Salvayre A., Coatrieux C., Ingueneau C., Salvayre R.* (2008) *Brit. J. Pharmacol.*, **153**, 6-20.
34. *Laakso M.* (2010) *Diabetes Care*, **33**, 442-449.
35. *Galvani S., Coatrieux C., Elbaz M., Grazide M.H., Thiers J.C., Parini A., Uchida K., Kamar N., Rostaing L., Baltas M., Salvayre R., Negre-Salvayre A.* (2008) *Free Radic. Biol. Med.*, **45**, 1457-1467.
36. *Belkheiri N., Bouguerne B., Bedos-Belval F., Duran N., Bernis C., Salvayre R., Negre-Salvayre A., Baltas M.* (2010) *Eur. J. Med. Chem.*, in press.
37. *Steinberg D.* (2000) *Curr. Opin. Lipidol.*, **11**, 603-607.

38. Jialal I., Traber M., Devaraj S. (2001) Curr. Opin. Lipidol., **12**, 49-53.
39. Steinberg D., Witztum J.L. (2002) Circulation, **105**, 2107-2111.
40. Ланкин В.З., Тухазе А.К., Беленков Ю.Н. (2004) Кардиология, **44**, 72-81.
41. Lankin V.Z., Tikhaze A.K., Kukharchuk V.V., Konovalova G.G., Pisarenko O.I., Kaminniy A.I., Shumaev K.B., Belenkov Yu.N. (2003) Mol. Cell. Biochem., **249**, 129-140.

Поступила: 06. 07. 2010.

THE INFLUENCE OF GLUCOSE ON THE FREE RADICAL PEROXIDATION
OF LOW DENSITY LIPOPROTEINS *IN VITRO* AND *IN VIVO*

V.Z. Lankin, G.G. Konovalova, A.K. Tikhaze, L.V. Nedosugova

Russian Cardiology Research Complex, ul. 3-ya Cherepkovskaya 15a, Moscow, 121552 Russia;
e-mail: lankin@cardio.ru

It was shown that glucose in concentration 12.5-100 mM stimulated of Cu²⁺-mediated free radical peroxidation of low density lipoproteins (LDL) from human blood plasma. On the base investigation of kinetic parameters of LDL peroxidation it was stated that intensification of this process in the conditions of our experiments is caused by formation of free radical intermediates of glucose autooxidation during active oxygen species generation in the presence of metal ions with variable valence. It was found that glucose level normalization in the blood of patients with type 2 diabetes during therapy accompanied by significant decreasing of LDL oxidizing. During therapy with sugar-lowering drug metformin which utilize methylglyoxal the LDL peroxidation from blood diabetes mellitus *in vivo* inhibited in more higher degree probably in consequence of decreasing of methylglyoxal-dependent generation of superoxide anion radicals as was shown by us early [*Biochemistry (Moscow)*, 2007, **72**: 1081-1090; *Biochemistry (Moscow)*, 2009, **74**: 461-466].

Key words: oxidative stress, carbonyl stress, modified low density lipoproteins, glucose, lipohydroperoxides, malondialdehyde, methylglyoxal, metformin.