

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.379-008.64

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНЫХ ДИКАРБОНИЛОВ НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ *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

Природные дикарбонилы, способные накапливаться в процессе окислительного стресса при атеросклерозе (малонилдиальдегид) или карбонильного стресса при сахарном диабете (глиоксаль, метилглиоксаль), существенно ингибируют активность коммерческих препаратов антиоксидантных ферментов: каталазы, Cu,Zn-супероксиддисмутазы (Cu,Zn-СОД) и Se-содержащей глутатионпероксидазы из эритроцитов быка и человека, а также глутатион-S-трансферазы из печени крысы. После инкубации эритроцитов человека в присутствии 10 мМ исследуемых дикарбониллов также было выявлено снижение активности внутриклеточной Cu,Zn-СОД. Активность эритроцитарной Cu,Zn-СОД была существенно снижена у больных сахарным диабетом типа 2 в период декомпенсации углеводного обмена, тогда как эффективная сахароснижающая терапия сопровождалась увеличением активности этого фермента. При терапии больных сахарным диабетом типа 2 с использованием метформина, способного утилизировать метилглиоксаль, активность эритроцитарной Cu,Zn-СОД возрастала в значительно большей степени, чем при традиционной сахароснижающей терапии.

Ключевые слова: свободнорадикальное окисление, малоновый диальдегид, глиоксаль, метилглиоксаль, антиоксидантные ферменты, Cu,Zn-супероксиддисмутаза, метформин.

ВВЕДЕНИЕ. Сахарный диабет является фактором риска возникновения атеросклероза, причем при наличии диабета атеросклеротические повреждения стенки сосудов прогрессируют [1]. Нами сформулирована гипотеза о едином молекулярном механизме повреждения стенки сосудов при атеросклерозе и сахарном диабете типа 2 [2-4], исходящая из полученных ранее данных о путях модификации липопротеинов низкой плотности (ЛНП) при атеросклерозе и сахарном диабете [2-4]. Известно, что окислительно модифицированные ЛНП обладают большей атерогенностью (способностью накапливаться в клетках стенки сосудов), чем интактные частицы ЛНП [5-9]. При этом установлено, что модификацию белкового компонента (апопротеина В-100) частиц ЛНП могут вызывать вторичные продукты свободнорадикального окисления и, в первую очередь, природные дикарбонилы, накапливающиеся в процессе окислительного стресса при атеросклерозе (преимущественно малонилдиальдегид, МДА) [2-9] и карбонильного стресса при сахарном диабете (преимущественно глиоксаль и метилглиоксаль) [2-4, 10, 11]. При реакции этих альдегидов с концевыми аминокетогруппами в молекулах протеинов происходит образование поперечных меж- и внутримолекулярных сшивок типа шиффовых оснований [2-4, 10, 11]. Альдегидная группа глюкозы также способна оказывать белок-модифицирующее действие, причём модификация белков при диабетической гипергликемии может

Принятые сокращения: МДА – малоновый диальдегид; HbA_{1c} – гликированный гемоглобин; СОД – супероксиддисмутаза, GSH-Px – глутатионпероксидаза.

* - адресат для переписки

осуществляться двумя способами: путём гликирования – прямого присоединения молекулы глюкозы при взаимодействии свободных аминогрупп протеинов с альдегидной группой этого углевода, либо путём реакции аминогрупп белков с дикарбонилами, образующимися вследствие процесса глиоксилирования – автоокисления глюкозы или фрагментации триозофосфатов [10, 11]. Отмеченное многими авторами резкое накопление α -оксоальдегидов, в частности глиоксаля и метилглиоксаля, в крови больных при диабете [12-20] приводит к развитию карбонильного стресса [10, 11]. Нами установлено, что при реакции метилглиоксаля с аминогруппами концевых аминокислот белков, подобных апоВ-100 ЛНП, может происходить генерирование супероксидных анион-радикалов [21], что должно сопровождаться интенсификацией свободнорадикальных реакций, включая автоокисление глюкозы. Если низкомолекулярные альдегиды способны проникать через эритроцитарную мембрану, очевидно, что многократное увеличение уровня химически агрессивных дикарбонилов – глиоксаля и метилглиоксаля в плазме крови больных сахарным диабетом типа 2 [12-20] может способствовать модификации не только белковой части ЛНП, но и других протеинов кровотока, таких как эритроцитарные ферменты. На такую возможность указывает выявленное в нашем предварительном исследовании снижение активности антиоксидантных ферментов, в частности, супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (GSH-Px) у больных сахарным диабетом типа 2 в период декомпенсации углеводного обмена [22]. Тем не менее, механизм снижения активности эритроцитарных антиоксидантных ферментов при сахарном диабете окончательно не выяснен. Исходя из этого, настоящая статья посвящена исследованию влияния природных дикарбонилов на активность антиоксидантных ферментов *in vitro* и *in vivo*.

МЕТОДИКА. Для получения эритроцитов использовали венозную кровь здоровых доноров, взятую натощак в присутствии 1 мг/мл ЭДТА в качестве антикоагулянта и антиоксиданта.

После осаждения клеток крови центрифугированием, их трёхкратно отмывали изотоничным раствором NaCl. Эритроциты человека или гомогенные коммерческие препараты антиоксидантных ферментов (каталаза и Cu,Zn-СОД из эритроцитов человека, GSH-Px из бычьих эритроцитов, глутатион-S-трансфераза из печени крысы) инкубировали в течение 5-12 часов при 37°C в изотоничном K,Na-фосфатном буфере pH 7,4, содержащем 10 мМ малоновый диальдегид, метилглиоксаль или глиоксаль. В отдельном эксперименте эритроциты, полученные из цельной крови здоровых доноров, инкубировали в течение 6 ч при 37°C в изотоничном K,Na-фосфатном буфере pH 7,4, содержащем 10 мМ малоновый диальдегид, метилглиоксаль или глиоксаль. Затем эритроциты трижды отмывали изотоничным раствором NaCl, после чего лизировали в 5 мМ K,Na-фосфатном буфере pH 7,4. Определение активности Cu,Zn-СОД в полученных лизатах эритроцитов проводили после осаждения гемоглобина. Содержание гемоглобина (Hb) в эритроцитах определяли цианогемоглобиновым методом с использованием тест-наборов фирмы “Lachema” (Чехия).

В первое клиническое исследование было включено 30 больных сахарным диабетом типа 2 с длительностью заболевания до 5 лет (15 мужчин / 15 женщин, 57 \pm 10 лет) в период декомпенсации углеводного обмена. Больные с их информированного согласия в течение 2-х месяцев получали стандартную сахароснижающую терапию, включающую препараты сульфонилмочевины (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 \pm 5 лет) без признаков ишемической болезни сердца (ИБС) и гиперхолестеринемии, а также без признаков нарушений углеводного обмена и каких-либо клинических проявлений сахарного диабета.

Во второе клиническое исследование было включено 70 пациентов, страдающих сахарным диабетом типа 2 (31 мужчина / 39 женщин, 57 \pm 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 сульфонилмочевины (манинил или диабетон). Все включённые в исследование пациенты до его начала находились в состоянии декомпенсации углеводного обмена (уровень $HbA_{1c} > 7\%$). Компенсации углеводного обмена у пациентов с впервые выявленным сахарным диабетом достигали с помощью метформина (“глюкофаж” производства “Nyscomed” (Швейцария) в суточной дозе 1500-2500 мг) в течение 2-х месяцев; у пациентов с длительностью диабета более 5 лет - путем коррекции дозы препаратов сульфонилмочевины. Определение биохимических параметров проводили до начала исследования и после достижения удовлетворительной компенсации углеводного обмена в соответствии с критериями European Diabetes Police Group (достижение уровня $HbA_{1c} < 7\%$).

Активность каталазы определяли по скорости утилизации пероксида водорода на спектрофотометре Hitachi 220A (Япония) [23]. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для восстановления 1 мкмоль H_2O_2 в мин/мг белка (коэффициент молярной экстинкции $H_2O_2 = 43,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) или 1 мкмоль H_2O_2 /г Hb (при определении активности фермента в эритроцитах).

Активность Cu,Zn-СОД определяли согласно методу [24] по ингибированию восстановления синего нитротетразолия супероксидным радикалом, генерируемым в системе ксантин-ксантиноксидаза, определяя кинетику образования формазана на регистрирующем спектрофотометре Hitachi-557 (Япония) при 560 нм. За единицу активности СОД принимали количество фермента, необходимое для 50%-ного подавления восстановления синего нитротетразолия в условиях определения. Для определения активности Cu,Zn-СОД к образцам цельной крови больных сахарным диабетом приливали 5 мМ K,Na-фосфатный буфер pH 7,4 (1:9), после лизирования красных кровяных клеток в течение 15 минут при 0°C пробы центрифугировали при 800 g в течение 10 минут, а затем осаждали гемоглобин смесью этанол-хлороформ (3:5) [25].

Активность Se-содержащей GSH-Px определяли в сопряжённой глутатионредуктазной системе по скорости окисления NADPH при 340 нм с гидропероксидом *трет*-бутила в качестве субстрата по методу [26] в нашей модификации [27], используя регистрирующий спектрофотометр Hitachi-557 (Япония). Среда определения содержала 0,5 ед/мл активности глутатионредуктазы из дрожжей, 1 мМ GSH, 0,2 мМ гидропероксид *трет*-бутила, 0,15 мМ NADPH и 1 мМ ЭДТА в 50 мМ K,Na-фосфатном буфере pH 7,0. При расчете начальной скорости вводили поправку на неферментативное окисление глутатиона за время реакции. За единицу активности GSH-Px принимали количество фермента, необходимое для окисления 1 мкмоль GSH/мин в условиях эксперимента.

Пероксидазную активность глутатион-S-трансферазы определяли по методу [28] с некоторыми изменениями. Среда определения содержала 0,5 ед/мл активности глутатионредуктазы из дрожжей, 1 мМ GSH, 0,2 мМ гидропероксид *трет*-бутила и 1 мМ ЭДТА в 100 мМ K,Na-фосфатном буфере pH 7,0. За единицу активности GSH-Px принимали количество фермента, необходимое для окисления 1 мкмоль GSH/мин в условиях эксперимента.

Исследование активности всех ферментов проводили при 20°C.

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).

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), гидропероксид *трет*-бутила был получен от фирмы “Merck” (Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Результаты экспериментов по влиянию природных дикарбониллов на активность коммерческого препарата каталазы из эритроцитов человека приведены на рисунке 1. Как видно из представленных

ВЛИЯНИЕ ДИКАРБОНИЛОВ НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ

данных, инкубация фермента в присутствии 10 мМ МДА, глиоксаля или метилглиоксаля при 37°C в течение 6 часов не приводила к достоверному изменению активности фермента (рис. 1). Тем не менее, при аналогичных условиях эксперимента исследованные природные дикарбонилы существенно ингибировали активность коммерческого препарата Cu,Zn-СОД из эритроцитов человека уже через 3 часа после начала инкубации (рис. 2), причем ингибирующее действие увеличивалось в ряду МДА > метилглиоксаль > глиоксаль (рис. 2). За 12 ч инкубации активность СОД в присутствии МДА, глиоксаля и метилглиоксаля снизилась на 25%, 39% и 52% соответственно ($p < 0,05$). Активность коммерческого препарата Se-содержащей GSH-Px из эритроцитов быка при инкубации с исследованными карбонильными соединениями также существенно снижалась (рис. 3), однако в отличие от СОД снижение активности GSH-Px было более резким, причем в течение 3-5 ч инкубации в присутствии природных альдегидов торможение активности фермента было практически полным (рис. 3). Следует отметить, что за 5 ч инкубации при 37°C активность GSH-Px даже в отсутствии дикарбониллов в среде падала почти на 50%, при этом, в отличие от эксперимента с СОД, ингибирующее действие природных альдегидов увеличивалось в ряду глиоксаль > МДА > метилглиоксаль (рис. 3). За 2 ч инкубации активность GSH-Px в присутствии МДА, глиоксаля и метилглиоксаля снижалась на 89%, 65% и 94% соответственно ($p < 0,05$) по сравнению с активностью фермента, инкубированного в течение того же времени без добавления экзогенных дикарбониллов. Пероксидазная активность глутатион-S-трансферазы из печени крысы (субстрат – гидропероксид *трет*-бутила) при инкубации с МДА, глиоксалем и метилглиоксалем резко падала в течение первого часа инкубации на 70%, 67% и 54%, соответственно ($p < 0,05$), а затем достоверно ($p < 0,05$) возрастала и через 6 ч инкубации составляла 60%, 74% и 46% соответственно от исходной активности (рис. 4). Таким образом, все исследованные природные дикарбонилы весьма существенно ингибировали активность Cu,Zn-СОД, Se-содержащей GSH-Px и глутатион-S-трансферазы уже в первые часы после начала инкубации (рис. 2-4). Значительное ингибирование активности антиоксидантных ферментов при инкубации с исследованными дикарбонилами может быть обусловлено модификацией концевых аминокислотных групп белков при взаимодействии с альдегидными группами, причем частичное восстановление активности глутатион-S-трансферазы при продолжительной инкубации с дикарбонилами может быть связано, вероятно, с последующей перегруппировкой образовавшихся шиффовых оснований.

Для доказательства того, что низкомолекулярные природные дикарбонилы, накапливающиеся в плазме крови больных атеросклерозом и сахарным диабетом типа 2, способны легко проникать через клеточную мембрану, проводили инкубацию эритроцитов человека в течение 1-6 ч в присутствии МДА, глиоксаля и метилглиоксаля, после чего клетки трижды отмывали физиологическим раствором NaCl от внесенных в среду альдегидов, лизировали и после осаждения гемоглобина определяли активность эритроцитарной Cu,Zn-СОД. Результаты этих экспериментов приведены на рисунке 5. Видно, что все исследованные природные дикарбонилы существенно ингибировали внутриэритроцитарную Cu,Zn-СОД (рис. 5), причем ингибирующее фермент действие увеличивалось в ряду МДА > метилглиоксаль > глиоксаль (рис. 5). Полученные результаты свидетельствуют о том, что МДА, глиоксаль и метилглиоксаль могут проникать через эритроцитарную мембрану и способны ингибировать внутриклеточные антиоксидантные ферменты уже через 1-2 ч инкубации (рис. 5). Несмотря на то, что строгой зависимости степени ингибирования ферментов от структуры дикарбониллов установить не удалось, создается впечатление, что глиоксаль и метилглиоксаль подавляют активность эритроцитарной Cu,Zn-СОД в большей степени, чем МДА (рис. 2, 5), тогда как МДА и глиоксаль являются более эффективными ингибиторами пероксидазной активности GSH-Px и глутатион-S-трансферазы, чем метилглиоксаль (рис. 3, 4).

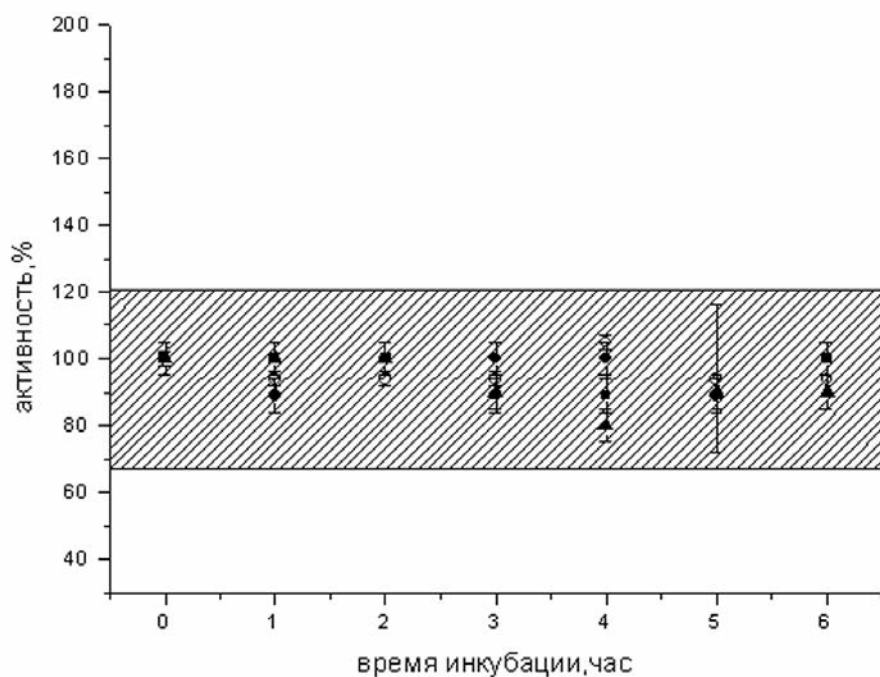


Рисунок 1.

Изменение активности каталазы (0,25 мг/мл) из эритроцитов человека в процессе инкубации ферментного препарата в изотоничном К,Na-фосфатном буфере pH 7,4 при 37°C без добавок (○) и в присутствии 10 мМ малонилдиальдегида (●), глиоксаля (▲) или метилглиоксаля (■).

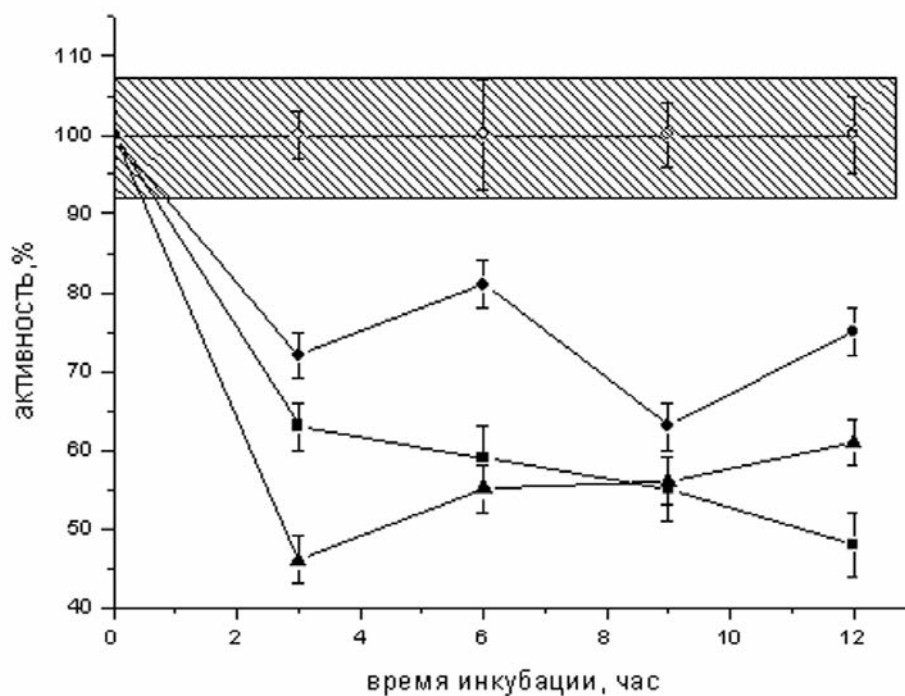


Рисунок 2.

Изменение активности Cu,Zn-супероксиддисмутазы (0,25 мг/мл) из эритроцитов человека в процессе инкубации ферментного препарата в изотоничном К,Na-фосфатном буфере pH 7,4 при 37°C без добавок (○) и в присутствии 10 мМ малонилдиальдегида (●), глиоксаля (▲) или метилглиоксаля (■).

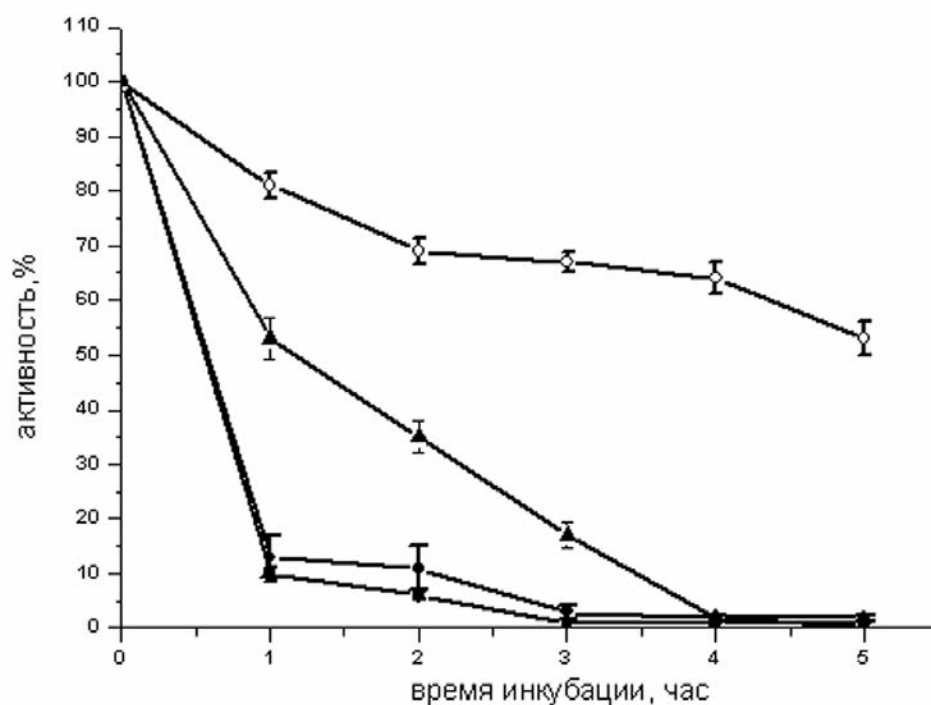


Рисунок 3.

Изменение активности Se-зависимой глутатионпероксидазы (0,25 мг/мл) из эритроцитов быка (субстрат - гидропероксид *трет*-бутила) в процессе инкубации ферментного препарата в изотоничном K,Na-фосфатном буфере pH 7,4 при 37°C без добавок (○) и в присутствии 10 мМ малонилдальдегида (●), глиоксаля (▲) или метилглиоксаля (■).

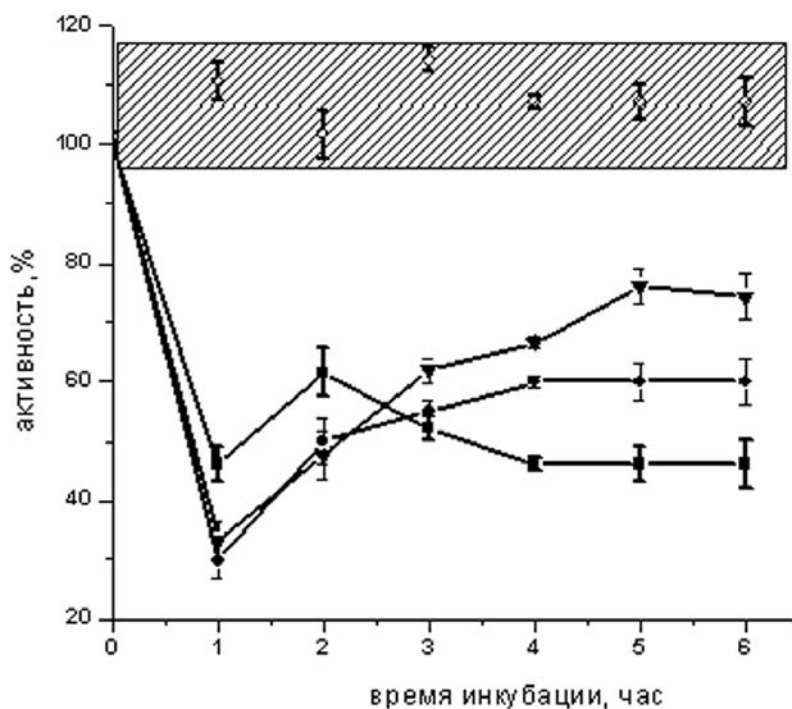


Рисунок 4.

Изменение активности глутатион-S-трансферазы (0,25 мг/мл) из печени крысы (субстрат - гидропероксид *трет*-бутила) в процессе инкубации ферментного препарата в изотоничном K,Na-фосфатном буфере pH 7,4 при 37°C без добавок (○) и в присутствии 10 мМ малонилдальдегида (●), глиоксаля (▲) или метилглиоксаля (■).

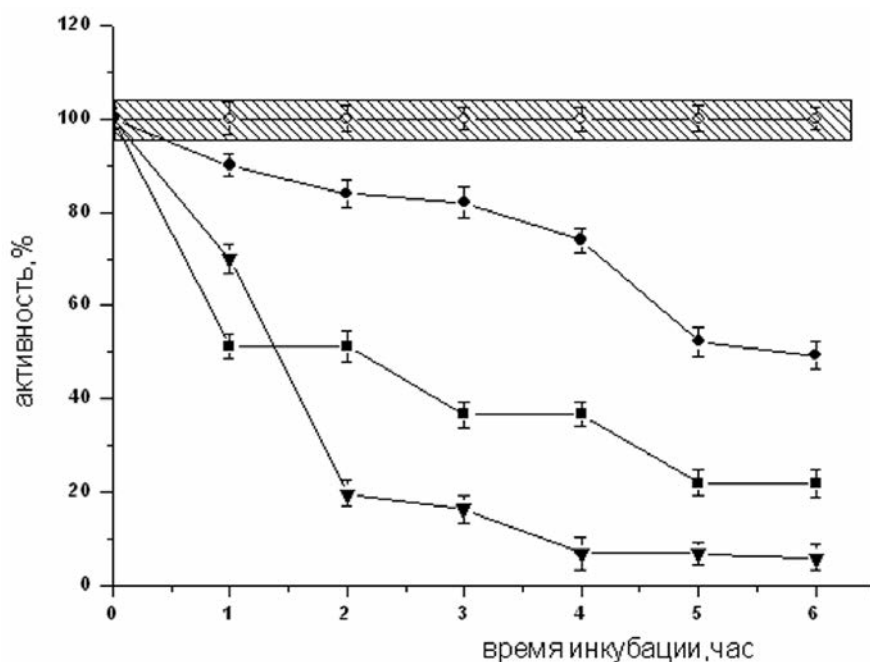


Рисунок 5.

Изменение активности Cu,Zn-супероксиддисмутазы в лизате эритроцитов человека, приготовленном после инкубации целых красных кровяных клеток в изотоничном K,Na-фосфатном буфере pH 7,4 при 37°C без добавок (○) и в присутствии 10 mM малонилдальдегида (●), глиоксала (▲) или метилглиоксала (■). До приготовления лизата эритроциты трижды отмывали от среды инкубации изотоничным K,Na-фосфатным буфером pH 7,4.

В связи с полученными экспериментальными данными (рис. 2, 5) представлялось важным исследовать активность эритроцитарной Cu,Zn-СОД в крови больных сахарным диабетом типа 2 с использованием идентичного аналитического метода. Результаты этого исследования приведены в таблице 1. Как видно из приведённых в таблице 1 данных, активность эритроцитарной Cu,Zn-СОД у больных сахарным диабетом типа 2 в период декомпенсации углеводного обмена снижена в 2,6 раза по сравнению с контрольной группой (пациенты такого же возраста без нарушений липидного и углеводного обмена). Учитывая обнаруженное в настоящей работе ингибирование активности эритроцитарной Cu,Zn-СОД в присутствии природных дикарбониллов (рис. 2, 5), падение активности СОД в эритроцитах больных сахарным диабетом типа 2 в период декомпенсации углеводного обмена можно объяснить отмеченным в литературе 5-6-кратным накоплением глиоксала и метилглиоксала в плазме крови этих пациентов [12, 17, 19, 20]. Поскольку успешная сахароснижающая терапия должна сопровождаться снижением уровня глиоксала и метилглиоксала в крови пациентов [29, 30], увеличение активности эритроцитарной Cu,Zn-СОД после достижения компенсации углеводного обмена не является неожиданным (табл. 2).

Таблица 1. Активность эритроцитарной Cu,Zn-супероксиддисмутазы у больных сахарным диабетом типа 2 в период декомпенсации углеводного обмена.

Группа	Активность эритроцитарной Cu,Zn-СОД, ед/г Hb	%
Контроль, пациенты без нарушений липидного и углеводного обмена (n=7)	11,2±1,3	100,0
Больные сахарным диабетом типа 2 в период декомпенсации углеводного обмена (HbA _{1c} = 8,1±0,03%) (n=30)	4,3±0,9 p<0,05	38,1
p	<0,05	

ВЛИЯНИЕ ДИКАРБОНИЛОВ НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Таблица 2. Влияние сахароснижающей терапии на активность эритроцитарной Cu,Zn-супероксиддисмутазы у больных сахарным диабетом типа 2.

N	Группа (n)	HbA _{1c} , %	Активность эритроцитарной Cu,Zn-СОД, ед/г Hb
1	Больные сахарным диабетом типа 2 в период декомпенсации углеводного обмена (n=70)	8,2±0,19	4,5±1,1 p₁₋₂<0,05
2	Больные сахарным диабетом типа 2 после терапии производными сульфанилмочевины (n=30)	7,1±0,18 p₁₋₂<0,001	9,7±0,5 p₁₋₂<0,001
3	Больные сахарным диабетом типа 2 после терапии метформином (n=40)	6,7±0,15 p₁₋₃<0,001 p₂₋₃>0,05	17,3±0,8 p₁₋₃<0,0001 p₂₋₃<0,0001

Обоснованность высказанных предположений подтверждают результаты второго клинического исследования (табл. 2) в котором 70 больных с декомпенсированным сахарным диабетом типа 2 получали различную сахароснижающую монотерапию производными сульфанилмочевины (30 человек), или метформином (40 человек) до достижения компенсации углеводного обмена. Метформин, как известно, помимо сахароснижающего действия способен вступать в реакцию с метилглиоксальем с образованием циклического производного – триазепинона, экскретируемого с мочой [29, 30], причём, как было показано, терапия метформином действительно приводит к существенному снижению уровня метилглиоксала в крови больных сахарным диабетом [29-31]. Результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что метформин был не более эффективен в качестве сахароснижающего агента, чем производные сульфанилмочевины (табл. 2). При этом в процессе терапии как производными сульфанилмочевины, так и метформином, было выявлено существенное увеличение активности эритроцитарной Cu,Zn-СОД у больных сахарным диабетом типа 2 (табл. 2), однако, при достижении практически идентичной степени компенсации углеводного обмена, увеличение активности фермента было значительно более выражено у пациентов, получавших метформин по сравнению с пациентами, получавшими производные сульфанилмочевины (увеличение активности эритроцитарной Cu,Zn-СОД за 2 месяца терапии более чем в 2 и почти в 4 раза соответственно, см. табл. 2). С нашей точки зрения, значительно большее увеличение активности эритроцитарной Cu,Zn-СОД в крови больных сахарным диабетом при терапии метформином вполне объяснимо повышенной утилизацией потенциального ингибитора СОД – метилглиоксала [31]. Действительно, в ряде работ экспериментально доказано, что вещества из класса гидразинов (к которым относится и метформин) способны защищать различные белки и ЛНП от модификации метилглиоксальем [32, 33].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что природные низкомолекулярные дикарбонилы способны быстро проникать через клеточную мембрану (рис. 5) и вызывать значительное ингибирование активности антиоксидантных ферментов (рис. 1-5), вероятно, вследствие модификации структуры молекулы белка. Глиоксаль и метилглиоксаль, накапливающиеся при диабетической гипергликемии [12, 17, 19, 20], как показано (рис. 1-5), являются более эффективными ингибиторами большинства антиоксидантных ферментов, чем МДА. Снижение активности эритроцитарной Cu,Zn-СОД в крови пациентов с сахарным диабетом типа 2 (табл. 1), исходя из полученных

данных (рис. 1-5), может быть объяснено повышенным уровнем глиоксаля и метилглиоксаля в плазме крови этих больных [12, 17, 19, 20]. В соответствии с этим, увеличение активности эритроцитарной Cu,Zn-СОД в крови больных диабетом в процессе эффективной сахароснижающей терапии (табл. 2), по-видимому, связано с уменьшением проявлений карбонильного стресса (на что указывает нормализация уровня HbA_{1c}), причем весьма показательно значительно большее увеличение активности фермента при терапии препаратом, способствующим утилизации метилглиоксаля (табл. 2). Имеющиеся данные о возможности утилизации высокотоксичных диабетогенных α -оксоальдегидов с помощью лекарственных средств из класса производных гидразинов [34, 35] открывают перспективы разработки новых эффективных препаратов для профилактики и терапии сахарного диабета. Можно также полагать, что по степени снижения активности эритроцитарной Cu,Zn-СОД можно косвенно судить об интенсивности накопления дикарбониллов в крови больных сахарным диабетом типа 2, вследствие чего этот простой биохимический тест, вероятно, может быть использован для дополнительного контроля эффективности сахароснижающей терапии.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ №10-04-00294а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Laakso M.* (2010) *Diabetes Care*, **33**, 442-448.
2. *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.
3. *Lankin V.Z., Tikhaze A.K., Konovalova G.G., Kumskova E.M., Shumaev K.B.* (2011) In: *Handbook of Lipoprotein Research*, Nova Sci.Publishers, New York.
4. *Lankin V.Z., Konovalova G.A., Tikhaze A.K., Nedosugova L.V.* (2011) *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, V. 5 no.3.
5. *Holvoet P.* (1999) *Therapeutic. Apheresis*, **3**, 287-293.
6. *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.
7. *Harrison D., Griendling K.K., Landmesser U., Hornig B., Drexler H.* (2003) *Am. J. Cardiol.*, **91**, 7A-11A.
8. *Steinberg D.* (2009) *J. Lipid. Res.*, **50**, S376-S381.
9. *Itabe H.* (2009) *Clinic. Rev. Allerg. Immunol.*, **37**, 4-11.
10. *Miyazawa T., Nakagawa K., Shimasaki S., Nagai R.* (2010) *Amino Acids* (epub. ahead of print).
11. *Desai K.M., Chang T., Wang H., Banigesh A., Dhar A., Liu J., Untereiner A., Wu L.* (2010) *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **88**, 273-284.
12. *McLellan A.C., Thornalley P.J., Benn J., Sonksen P.H.* (1994) *Clin. Sci.*, **87**, 21-29.
13. *Beisswenger P.J., Howell S.K., O'Dell R.M., Wood M.E., Touchette A.D., Szewgold B.S.* (2001) *Diabetes Care*, **24**, 726-732.
14. *Lapolla A., Flamini R., Dalla Vedova A., Senesi A., Reitano R., Fedele D., Basso E., Seraglia R., Traldi P.* (2003) *Clin. Chem. Lab. Med.*, **41**, 1166-1173.
15. *Nemet I., Duvnjak L., Car N., Varga-Defterdarovic L.* (2005) *Clin. Biochem.*, **38**, 379-383.
16. *Price C.L., Knight S.C.* (2007) *Curr. Pharm. Des.*, **13**, 3681-3687.
17. *Wang H., Meng Q.H., Gordon J.R., Khandwala H., Wu L.* (2007) *Clin. Biochem.*, **40**, 1232-1239.
18. *Vander Jagt D.L.* (2008) *Drug Metabol. Drug Interact.*, **23**, 93-124.

ВЛИЯНИЕ ДИКАРБОНИЛОВ НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ

19. *Kandhro A.J., Mirza M.A., Khuhawar M.Y.* (2008) *J. Chromatogr. Sci.*, **46**, 539-543.
20. *Khuhawar M.Y., Zardari L.A., Laghari A.J.* (2008) *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **873**, 15-19.
21. *Шумаев К.Б., Губкина С.А., Кумскова Е.М., Шепелькова Г.С., Рууге Э.К., Ланкин В.З.* (2009) *Биохимия*, **74**, 568-574.
22. *Недосугова Л.В., Ланкин В.З., Балаболкин М.И., Коновалова Г.Г., Лисина М.О., Антонова К.В., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н.* (2003) *Бюлл. exper. биол. мед.*, **136**, 132-133.
23. *Beers R.F., Sizer I.W.* (1952) *J. Biol. Chem.*, **195**, 133-140.
24. *Beauchamp C., Fridovich I.* (1971) *Analyt. Biochem.*, **44**, 276-287.
25. *Maral J., Puget K., Michelson A.M.* (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 1525-1535.
26. *Paglia D.E., Valentine W.N.* (1967) *J. Lab. Clin. Med.*, **70**, 158-169.
27. *Ланкин В.З., Гуревич С.М.* (1976) *Докл. АН СССР*, **226**, 705-708.
28. *Keen J.H., Habig W.H., Jakoby W.B.* (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 6183-6188.
29. *Ruggiero-Lopez D., Lecomte M., Moinet G., Patereau G., Lagarde M., Wiemsperger N.* (1999) *Biochem. Pharmacol.*, **58**, 1765-1773.
30. *Beisswenger P., Ruggiero-Lopez D.* (2003) *Diabetes Metab.*, **29**, 6S95-6S103.
31. *Beisswenger P., Howell S.K., Touchette A.D., Lal S., Szwergold B.S.* (1999) *Diabetes*, **48**, 198-202.
32. *Kiho T., Kato M., Usui S., Hirano K.* (2005) *Clin. Chim. Acta*, **358**, 139-145.
33. *Brown B.E., Mahroof F.M., Cook N.L., van Reyk D.M., Davies M.J.* (2006) *Diabetologia*, **49**, 775-783.
34. *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.
35. *Belkheiri N., Bouguerne B., Bedos-Belval F., Duran N., Bernis C., Salvayre R., Negre-Salvayre A., Baltas M.* (2010) *Eur. J. Med. Chem.*, **45**, 3019-3026.

Поступила: 25. 02. 2011.

THE INFLUENCE OF NATURAL DICARBONILS ON THE ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITY *IN VITRO* AND *IN VIVO*

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

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

Natural dicarbonyls, which may be accumulated during oxidative stress in atherosclerosis (e.g. malondialdehyde) or carbonyl stress in diabetes mellitus (glyoxal and methylglyoxal) effectively inhibited the activities of commercial preparations of antioxidant enzymes: catalase, Cu,Zn-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) and Se-contained glutathione peroxidase from human and bovine erythrocytes and also rat liver glutathione-S-transferase. After incubation of human erythrocytes with 10 mM of each investigated dicarbonyls the decrease of intracellular Cu,Zn-SOD was observed. The decreased activity of erythrocyte Cu,Zn-SOD was also detected in diabetic patients with carbohydrate metabolism disturbance but effective sugar-lowered therapy was accompanied by the increase of this enzyme activity. The increase of erythrocytes activity of Cu,Zn-SOD of diabetic patients treated with metformin (which may utilize methylglyoxal) was higher than in erythrocytes of diabetic patients subjected to traditional therapy.

Key words: free radical oxidation, malondialdehyde, glyoxal, methylglyoxal, antioxidant enzymes, Cu,Zn-superoxide dismutase, metformin.