

На правах рукописи

Харченкова Наталия Викторовна

**СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ «ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ
ЛИПИДОВ – АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА» У БОЛЬНЫХ
С СОСУДИСТЫМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ САХАРНОГО
ДИАБЕТА I ТИПА.**

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва 2006

Работа выполнена в Челябинской государственной медицинской академии и Челябинской городской клинической больнице №1.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор

Илья Анатольевич Волчегорский

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Татьяна Геннадьевна Сазонтова

доктор биологических наук,
профессор

Наталья Николаевна Глушенко

Ведущая организация:

Московский государственный университет им.М.В.Ломоносова,
биологический факультет

Защита состоится «14» мая 2006 г. в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 212.203.13 при Российском университете дружбы народов по адресу: 117198, г.Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.8, медицинский факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Российского университета дружбы народов по адресу: 117198, г.Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Автореферат разослан «15» апреля 2006 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
доктор фарм. наук, доцент

 Т.П.Лагуткина

2006 А
8307

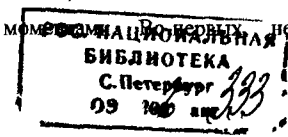
АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ. Проблема сахарного диабета относится к числу наиболее важных медико-социальных проблем современного общества. В первую очередь это касается сахарного диабета первого типа (СД 1). СД 1 чаще всего дебютирует в детском возрасте, протекает хронически и к моменту достижения зрелого трудоспособного возраста становится причиной многочисленных поздних осложнений (Балаболкин М.И., 1994; Robben H., 1979)

Несмотря на очевидные успехи в развитии заместительной инсулинотерапии при СД 1, данная нозологическая форма продолжает оставаться источником клинически значимых поздних осложнений (Балаболкин М.И., 1997; Дедов И.И., Фадеев В.В., 1998; Bergams J., 1983). Поздние осложнения СД 1 носят системный характер, т.е. одновременно поражают различные органы и ткани. Это касается диабетических поражений глаз, периферической и центральной нервной системы, желудочно-кишечного тракта, мочеполовой системы, опорно-двигательного аппарата, кожных покровов и т.д.

Системный характер органной патологии у больных СД 1 во многом связан с таким стереотипным процессом, как диабетические ангиопатии, которые затрагивают как магистральные резистивные сосуды (диабетические макроангиопатии), так и микрососуды обменного сектора (диабетические микроангиопатии) (Долгов В.В., 1983; Климов А.Н., Никульчева Н.Г., 1995; Чазова Т.Е., 1998; Andrew R. et al., 2001; Ksziaek K., 2001). В настоящее время сложилось устойчивое мнение, что для больных СД 1 наиболее типичным является развитие микроангиопатий, в то время как макроангиопатии наиболее характерны для больных сахарным диабетом второго типа (СД 2) (Ефимов А.С., 1988; Эрдманис Д.С., 1986; Lundbaek K., und and., 1971a).

При СД 1 также достаточно часто отмечается развитие макроангиопатий, приводящих к развитию ишемического инсульта и острого инфаркта миокарда у больных относительно молодого возраста (Долгов В.В., 1983; Балаболкин М.И., Чернышова Т.Е., 1989, Денисенко Т.В., 1990; Mezetti et al., 2000). В связи с этим особого внимания заслуживает концепция единого механизма развития диабетических ангиопатий, который касается патогенеза как микро- так и макроангиопатий (Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П., 2000).

Представления о стереотипном механизме развития ангиопатических поражений связаны с универсальным патохимическим механизмом поражения сосудистой стенки (интимы и меди) и ковалентной модификацией циркулирующих липопротеинов (Спесивцева В.Г. и соавт., 1982; Lundbaek K., 1971) Установлено, что этот стереотипный механизм обусловлен двумя главными моментами: окислительным и неферментативным



гликозилированием белков и во-вторых, активацией свободнорадикального (перекисного) окисления липидов (ПОЛ) (Балаболкин М.И., Креминская В.М., 1999; Вербовая Н.И., Лебедева Е.А., 1997; Davison G.W. et al., 2002).

Опираясь на универсальное значение ПОЛ в развитии диабетических ангиопатий и современные клинико-биохимические возможности оценки различных категорий липопероксидов в одной пробе (Волчегорский И.А. и соавт., 1989, 2000), представляется актуальным разработать лабораторный алгоритм верификации характера ангиопатических поражений у больных СД 1. Создание такого алгоритма может способствовать раннему, доклиническому выявлению диабетических микро- и макроангиопатий с опережающим назначением соответствующей терапии.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ: Исходя из вышеизложенного, в работе была поставлена цель: изучить показатели системы «перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита» в сопоставлении с выраженностью дислипидемических расстройств и клиническими проявлениями ангиопатических осложнений у больных сахарным диабетом 1 типа.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:

1. Оценить сдвиги содержания продуктов ПОЛ в крови больных СД 1 по мере развития диабетических ангиопатий.
2. Оценить динамику ПОЛ-зависимой модификации липопротеиновых фракций плазмы крови в сопоставлении с развитием дислипидемических расстройств у больных с сосудистыми осложнениями СД 1.
3. Выявить категории продуктов ПОЛ, являющихся наиболее информативными маркерами перекисной модификации различных фракций липопротеинов.
4. Провести сопоставительный анализ уровня продуктов ПОЛ и ПОЛ-зависимой модификации липопротеинов плазмы крови в зависимости от наличия и характера ангиопатий у больных СД 1.
5. Провести сопоставительный анализ концентрации α -токоферола и церулоплазмينا в зависимости от наличия ангиопатического процесса у больных СД 1.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ состоит в том, что впервые проведен сопоставительный анализ показателей системы «ПОЛ-АОЗ» у больных с диабетическими микро- и макроангиопатиями при СД 1. Установлен факт существенной активации ПОЛ у больных СД 1 без сосудистых осложнений. Впервые продемонстрировано относительное снижение интенсивности ПОЛ по мере развития диабетических микроангиопатий. Показано,

что наиболее существенное накопление продуктов ПОЛ в крови отмечается у больных с диабетическими макроангиопатиями.

Установлено, что активация ПОЛ у больных с сосудистыми осложнениями СД 1 сопровождается угнетением системы АОЗ. Впервые показано, что наиболее существенное угнетение АОЗ отмечается у больных СД 1 с диабетическими макроангиопатиями.

Продemonстрировано, что активация ПОЛ у больных с сосудистыми осложнениями СД 1 сопровождается ПОЛ-зависимой модификацией как ЛПВП, так и суммарной фракции атерогенных липопротеинов (ЛПНП+ЛПОНП). Продemonстрирована связь между ПОЛ-зависимой модификацией циркулирующих липопротеинов и развитием вторичных дислипидемических расстройств у больных с сосудистыми осложнениями СД 1.

Установлено, что диабетические макроангиопатии у больных СД 1 сопровождаются более выраженным дисбалансом в системе «ПОЛ-АОЗ» в сочетании с более выраженными атерогенными сдвигами липидограмм по сравнению с больными, страдающими микроангиопатиями.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

В процессе выполнения диссертационного исследования был разработан лабораторный метод дифференциальной оценки содержания продуктов ПОЛ в ЛПВП и в суммарной фракции атерогенных липопротеинов (ЛПНП+ЛПОНП).

Полученные результаты могут быть использованы для лабораторного выявления латентно протекающих ангиопатических процессов у больных СД и выделения групп риска по преимущественному развитию микро- и макроангиопатий среди больных СД 1.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы, содержащей результаты собственных исследований, обсуждения полученных результатов и выводов. Диссертация изложена на 123 страницах, содержит 11 таблиц и 4 рисунка. Список литературы включает 239 цитируемых источников, из них 136 на русском языке, 103 - иностранных источника.

РЕЗУЛЬТАТЫ ВНЕДРЕНИЯ В ПРАКТИКУ. Результаты исследования внедрены в практику отделений клинической лабораторной диагностики МУЗ ГKB №1 г. Челябинска и Областной клинической больницы №1.

АПРОБАЦИЯ МАТЕРИАЛОВ ДИССЕРТАЦИИ И ПУБЛИКАЦИИ. Материалы исследования доложены и обсуждены на Всероссийской конференции «Проблемы

медицинской энзимологии. Современные технологии лабораторной диагностики нового столетия» (Москва, 2002г.), на IV Международной конференции «Биоантиоксидант» (Москва, 2002г.) и на совместном заседании кафедр биоорганической химии и фармакологии Челябинской государственной медицинской академии (2004 г.)

Материалы диссертационного исследования опубликованы в пяти печатных работах, представленных на страницах центральных изданий.

НА ЗАЩИТУ ВЫНОСЯТСЯ СЛЕДУЮЩИЕ ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ:

1. Развитие сосудистых осложнений СД 1 типа сопровождается признаками дисбаланса в системе «ПОЛ-АОЗ».
2. Активация ПОЛ и угнетение АОЗ у больных СД 1 сопровождается развитием вторичных дислипидемических расстройств и наиболее ярко проявляется на фоне развития диабетических макроангиопатий.
3. Развитие диабетических микроангиопатий сопровождается относительным снижением содержания продуктов ПОЛ в плазме крови и менее выраженным угнетением АОЗ по сравнению с диабетическими макроангиопатиями.
4. Гептан-экстрагируемые продукты ПОЛ являются информативными маркерами ПОЛ-зависимой модификации ЛПВП при СД 1. Изопропанол-растворимые продукты ПОЛ являются наиболее информативными маркерами ПОЛ-зависимой модификации атерогенных липопротеинов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Было обследовано 80 больных СД 1, из которых 52 находились на стационарном лечении в эндокринологическом отделении ГКБ № 1 г. Челябинска, 28 больных получали амбулаторное лечение. В качестве контрольной группы обследован 41 человек (18 мужчин и 23 женщины) в возрасте от 18 до 50 лет без сосудистой патологии и нарушений углеводного обмена. Контрольная группа была сформирована из медицинского персонала (18 человек), а также 23 человек, проходивших профосмотр в ГКБ № 1. Средний возраст лиц контрольной группы составил 36.5 ± 1.4 года. Характеристика обследованных больных представлена в таблицах 1 и 2.

Как видно, ишемическая болезнь сердца, клинические проявления облитерирующего атеросклероза сосудов нижних конечностей, артериальная гипертензия, нарушения мозгового кровообращения и синдром диабетической стопы достоверно чаще встречались у больных с СД 1 с макроангиопатиями в сравнении с остальными группами больных. Этот факт свидетельствует об адекватности проведенного распределения больных на группы, страдающих микро- и макроангиопатиями.

Таблица № 1. Гендерная и клинико-анамнестическая характеристика больных СД 1, включенных в исследование.

Показатели	СД 1 без сосудистых осложнений (n=14)	СД 1 с микроангиопатиями (n=49)	СД 1 с макроангиопатиями (n=17)
Половой состав (м/ж)	8/6	27/22	8/9
Средний возраст (годы)	31,2 ± 2,9	38,2 ± 1,8 **	49,9 ± 1,4 * ** **
Средняя длительность течения СД (годы)	6,57 ± 0,42	13,18 ± 1,04 **	12,0 ± 1,91 **
Средний возраст дебюта СД 1 (годы)	24,6 ± 2,6	24,8 ± 1,7	37,9 ± 1,9 ** **
Гликемия натощак (ммоль/л)	6,44 ± 0,50	9,92 ± 0,66 **	8,89 ± 0,22 ** **

Примечания: 1) * – различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с группой контроля;
 ** – различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с группой СД 1 без сосудистых осложнений
 *** – различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с группой СД 1 с микроангиопатиями.
 2) Статистическое сопоставление не выявило межгрупповых различий по половому составу.

Проведение такого подразделения представляет известную сложность, так как в настоящее время на патоморфологическом и клиническом уровне рассматривается концепция о единой комбинированной ангиопатии, т.е. о параллельном и взаимно потенцирующем течении процессов гликозилирования белков базальных мембран и атерогенеза (Зайчик А.П., Чурилов Л.П., 2000). Учитывая это обстоятельство, мы провели подразделение больных на группы в соответствии с характером клинической картины, указывающей на преимущественно микро- или макроангиопатическое поражение

Выделенные группы больных не различались между собой по характеру течения СД 1 и частоте применения препаратов инсулина короткого и среднего действия. Совокупность использованных биохимических методов исследования включала унифицированное изучение липидограмм, анализ содержания продуктов ПОЛ в плазме крови и ее липопротеидных фракциях, а также оценку системы антиоксидантной защиты (АОЗ).

Дополнительно проводилось изучение содержания гликозилированного альбумина (Викторова Л.Н., Городецкий Д.Г., 1990) и ЛПВП-ассоциированного фруктозамина (Волчегорский И.А., Харченкова Н.В., 2003).

Фракционирование липопротеидов плазмы крови, стабилизированной ЭДТА (1 мг/мл) проводили с использованием стандартной смеси фосфорновольфрамовой кислоты и хлорида магния из наборов "LACHEMA" (Чехия). Полученную суспензию использовали для определения холестерина ЛПВП. Общее содержание холестерина (ХС общ.) в плазме крови и ХС-ЛПВП определяли унифицированным колориметрическим методом Ильяка (Камышников В.С., 2000; Меньшиков В.В. и соавт., 1987). На основании полученных данных рассчитывали коэффициент атерогенности (КА) по формуле: $КА = (ХС\text{ общ.} - ХС\text{-ЛПВП}) / ХС\text{-ЛПВП}$. Концентрацию циркулирующих триглицеридов (ТГ) регистрировали с помощью стандартных наборов реактивов для энзиматического определения ТГ ("Olvex diagnosticum", Санкт-Петербург). Содержание ХС-ЛПНП рассчитывали по формуле: $ХС\text{-ЛПНП} = ХС\text{ общ.} - (ХС\text{-ЛПВП} + ТГ / 2,2)$ (Камышников В.С., 2000). Дополнительно в плазме крови определяли концентрацию незатерифицированных (свободных) жирных кислот (СЖК) (Duncombe W.G., 1964). Липопротеидное распределение продуктов ПОЛ оценивали по содержанию липопероксидов в ЛПВП и суммарной фракции атерогенных липопротеидов с помощью разработанной в процессе исследования аналитической технологии (Волчегорский И.А., Харченкова Н.В., 2003).

Степень гликозилирования ЛПВП, выделенных с помощью преципитационной технологии Бурштейна-Самая, оценивали по содержанию фруктозамина в расчете на 1г белка (Волчегорский И.А., Харченкова Н.В., 2003), содержание которого определяли с помощью бромкрезолового зеленого (Меньшиков В.В. и соавт., 1987). Аналогичный подход применялся для оценки гликозилирования альбумина плазмы крови.

Определение продуктов ПОЛ в плазме крови и липопротеидных фракциях проводилось с помощью экстракционно-спектрофотометрического метода Волчегорского И.А. и соавт. (1989, 2000).

Результаты выражали в единицах индексов окисления (е.и.о.) — E_{232} / E_{220} [относительное содержание диеновых конъюгатов (ДК)] и E_{278} / E_{220} [уровень кетодиенов (КД) и сопряженных триенов (СТ)].

Концентрацию ферментно-активного церулоплазмينا определяли колориметрически с помощью модифицированного метода Ревина, основанного на окислении параоксидифенила (Колб В.Г., Камышников В.С., 1976). Концентрацию α -ТК определяли с использованием

Таблица № 2. Распределение поздних осложнений СД 1 у больных, включенных в исследование.

Группы (кол-во пациентов) Показатели	СД 1 без сосудистых осложнений (n =14)	СД 1 с микроангиопатиями (n =49)	СД 1 с макроангиопатиями (n =17)
Диабетическая ретинопатия	0	38 (77,6%) **	2 (11,8 %)**
Диабетическая нефропатия	0	8 (16,3%)	0
Диабетическая нейропатия	0	40 (81,6 %) **	11 (64,7 %)**
Синдром диабетической стопы	0	5 (10,2 %)	6 (35,3 %)** ***
Ишемическая болезнь сердца	0	2 (4,08%)	11 (64,7 %)** ***
Макроангиопатия сосудов нижних конечностей	0	0	7 (41,2 %)** ***
Артериальная гипертензия	0	4 (8,2%)	6 (35,3 %)** ***
Нарушения мозгового кровообращения	0	0	3 (17,6 %)**
Диабетическая энцефалопатия	0	1 (2,04%)	1 (5,9 %)
Катаракта	0	6 (12,2%)	6 (35,3 %)** ***
Хронический пиелонефрит	0	7 (14,3%)	1 (5,9 %)
Диабетическая гепатопатия и гепатомегалия	0	1 (2,04%)	3 (17,6 %)**

Примечания: 1) ** – различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с группой СД 1 без сосудистых осложнений;

*** – различия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с группой СД 1 с микроангиопатиями.

2) Статистическое сопоставление групп проведено с использованием точного критерия Фишера.

реактива Эммери-Энгель и поправкой на оптическое поглощение каротинов (Спиричев В.Б. и соавт., 1979).

Результаты обработаны методами дескриптивной статистики и представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$). О достоверности различий судили по t-критерию Стьюдента и некоторым критериям непараметрической статистики (Вилкоксона-Манна-Уитни, Колмогорова-Смирнова и точному критерию Фишера). Для изучения статистических взаимосвязей рассчитывали коэффициенты корреляции рангов по Кенделу (τ_k).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе разработки оптимальной технологии оценки липопротеидного распределения продуктов ПОЛ была установлена сопоставимость показателей продуктов ПОЛ в ЛПВП и суммарной фракции атерогенных липопротеидов (ЛПНП+ЛПОНП), выделенных с помощью двух различных систем осаждения апо-В-содержащих липопротеидов: фосфорновольфрамовая кислота – Mg^{2+} и гепарин – Ca^{2+} . Использование гепарин- Mn^{2+} системы осаждения приводило к завышению показателей ПОЛ в обеих фракциях липопероксидов. Исходя из полученных результатов, мы избрали гепарин – Ca^{2+} систему преципитации для оценки липопротеидного распределения продуктов ПОЛ у больных СД 1.

В результате проведенного исследования было установлено накопление продуктов ПОЛ в нефракционированной плазме крови как у больных СД 1 без сосудистых осложнений, так и при диабетических ангиопатиях (табл. 3).

Наиболее выраженный прирост был отмечен для гептан-растворимых КД и СТ, уровень которых превышал значения контроля на 79-183 %. У больных, страдающих микроангиопатиями, содержание этих продуктов ПОЛ оказалось достоверно ниже соответствующего показателя в группе больных СД 1 без ангиопатий. Прирост содержания изопропанол-растворимых продуктов ПОЛ был равно выражен во всех группах больных СД 1 и не зависел от сосудистых осложнений.

Помимо активации ПОЛ у больных СД 1 отмечалось существенное угнетение АОЗ. Это проявилось существенным снижением концентрации α -ТК в сыворотке крови. Как видно (табл. 3), больные СД 1 без сосудистых осложнений характеризовались наименее выраженным уменьшением концентрации циркулирующего α -ТК, средний уровень которого был достоверно ниже значений контроля, но не выходил за пределы нижней границы нормы

(11,6 мкмоль/л или 0,5 мг/дл) (Иванов И.И. и соавт., 1975; Надилов Н.К., 1991; Спиричев В.Б. и соавт., 1979).

Таблица № 3. Содержание продуктов ПОЛ (е.и.о.), α -токоферола (Мкмоль/л) и церулоплазмينا (мг/дл) в сыворотке крови больных СД 1 типа без сосудистых осложнений и с диабетическими ангиопатиями ($M \pm m$)

Показатели	Контроль (n=41)	СД 1 без сосудистых осложнений (n=15)	СД 1 с микро- ангиопатиями (n=47)	СД 1 с макро- ангиопатиями (n=17)
ДК _(г)	0,801 $\pm$ 0,024	0,817 $\pm$ 0,046	0,815 $\pm$ 0,047	0,870 $\pm$ 0,054
КД и СТ _(г)	0,047 $\pm$ 0,0055	0,133 $\pm$ 0,015*	0,084 $\pm$ 0,0095***	0,110 $\pm$ 0,013*
ДК _(и)	0,381 $\pm$ 0,0086	0,523 $\pm$ 0,025*	0,490 $\pm$ 0,021*	0,499 $\pm$ 0,024*
КД и СТ _(и)	0,186 $\pm$ 0,0086	0,275 $\pm$ 0,026*	0,266 $\pm$ 0,016*	0,253 $\pm$ 0,019*
α -ТК	16,55 $\pm$ 0,82	13,52 $\pm$ 1,23*	11,70 $\pm$ 0,698*	9,82 $\pm$ 0,72***
ЦП	27,55 $\pm$ 1,15	28,35 $\pm$ 3,64	24,74 $\pm$ 1,796	20,18 $\pm$ 1,81***

Примечания: 1) ДК–диеновые конъюгаты, КД и СТ – кетодиены и сопряженные триены; буквенные подиндексы (г) и (и) обозначают соответственно гептановую и изопропанольную фазы липидного экстракта.

2) α -ТК– α -токоферол; ЦП– церулоплазмин.

3) *– показатель достоверности отличий ($p < 0,05$) от группы контроля;

***–показатель достоверности отличий ($p < 0,05$) от СД 1 типа без сосудистых осложнений.

У больных с диабетическими микроангиопатиями концентрация α -ТК падала до нижней границы нормы. Самые низкие показатели содержания циркулирующего α -ТК были зарегистрированы при макроангиопатиях. В данной группе больных средняя концентрация α -ТК оказалась ниже границы нормального диапазона, а также достоверно меньше соответствующих показателей группы контроля и больных СД 1 без ангиопатий. На фоне макроангиопатий было зарегистрировано достоверное снижение концентрации циркулирующего ЦП по сравнению с группой контроля и больными без сосудистых осложнений.

В целом результаты проведенного исследования свидетельствуют о развитии дисбаланса в системе «ПОЛ АОЗ» при СД 1. Это проявляется накоплением в крови

перекисленных липидов на фоне снижения уровня α -ТК. Развитие диабетических микроангиопатий сопровождается относительным ограничением ПОЛ, интенсивность которого при этом остается выше нормы. Присоединение макроангиопатий усугубляет дефицит АОЗ за счет дополнительного уменьшения концентрации циркулирующего α -ТК и параллельного снижения уровня ЦП, который считается центральным ангиооксидантом плазмы крови (Санина О.Л., Бердинских Н.К., 1986; Ruis C. et al., 1999). Таким образом, прогрессирование сосудистой патологии при СД 1 сопряжено с нарастающей недостаточностью АОЗ.

Опираясь на это положение, мы посчитали целесообразным изучить липопротеидное распределение продуктов ПОЛ у больных с сосудистыми осложнениями СД 1 типа. В результате раздельного определения липопероксидов в ЛПВП, содержащихся в супернатанте плазмы крови, фракционированной по Бурнштейну-Самой, были установлены особенности перекисной модификации ЛПВП в зависимости от наличия сосудистых осложнений СД 1 (табл.4).

Как видно, уровень гептан-экстрагируемых продуктов ПОЛ у больных СД 1 без сосудистых осложнений достоверно превышал значения контроля, но был существенно ниже соответствующих показателей группы больных с микроангиопатиями. Наибольшее содержание ЛПВП-связанных гептанотфильных липопероксидов было отмечено у больных с макроангиопатиями. В этой группе средний уровень ЛПВП-связанных гептан-растворимых продуктов ПОЛ достоверно превышал не только значения нормы, но и соответствующие показатели больных с микроангиопатиями. У больных с микроангиопатиями и без сосудистых осложнений одновременно с повышением уровня ЛПВП-связанных гептанотфильных продуктов ПОЛ наблюдалось уменьшение содержания изопропанол-растворимых липопероксидов во фракции ЛПВП (табл.4). Вполне возможно, что перекисленные полиеновые ацилы глицерофосфолипидов, экстрагируемых изопропанолом (Волчегорский И.А. и соавт., 2000; Плацер З. и соавт., 1970), перераспределяются лецитин-холестерол-ацетилтрансферазой (ЛХАТ) в состав эфиров ХС, экстрагируемых гептаном (Косухин А.Б., Ахметова Б.С., 1987).

У больных с диабетическими микроангиопатиями содержание ЛПВП-ассоциированных изопропанол-растворимых продуктов ПОЛ оказалось достоверно выше соответствующих значений в группе без сосудистых осложнений, но ниже, чем при макроангиопатиях. По-видимому, усиление ПОЛ фосфолипидной части ЛПВП в связи

Таблица № 4. Содержание продуктов ПОЛ (е.и.о.) в ЛПВП и суммарной фракции атерогенных липопротеидов (ЛПНП+ЛПОНП) у больных СД 1 без сосудистых осложнений и с диабетическими ангиопатиями (М±m).

Показатели	Контроль (n=46)	СД без сосудистых осложнений (n=14)	СД с микроангиопатиями (n=48)	СД с макроангиопатиями (n=17)
ЛПВП				
ДК(г)	0,210±0,037	0,227±0,060*	0,269±0,042* **	0,273±0,080* ***
КД и СТ(г)	0,063±0,012	0,086±0,029*	0,115±0,020* **	0,139±0,047* ***
ДК(и)	0,292±0,037	0,099±0,042*	0,251±0,045* **	0,303±0,080* ***
КД и СТ(и)	0,147±0,019	0,054±0,024*	0,130±0,027* **	0,164±0,045* ***
ЛПНП + ЛПОНП				
ДК(г)	0,685±0,014	0,522±0,023 *	0,675±0,016 **	0,592±0,037* ***
КД и СТ(г)	0,091±0,005	0,042±0,010 *	0,106±0,005 * **	0,170±0,025* ** ***
ДК(и)	0,390±0,007	0,387±0,014	0,366±0,011 *	0,661±0,018* ** ***
КД и СТ(и)	0,052±0,006	0,071±0,020 *	0,108±0,005 * **	0,187±0,018* ** ***

Примечания: 1) * – показатель достоверности различий ($p<0,05$) с группой контроля;

** – показатель достоверности отличий ($p<0,05$) от СД 1 без сосудистых осложнений ;

*** – показатель достоверности отличий ($p<0,05$) от СД 1 с микроангиопатиями

2) в остальном примечания соответствуют 1 пункту примечания к табл.3

с нарастающей циркуляторной гипоксией (Биленко М.В., 1989) может компенсировать ЛХАТ-зависимую убыль изопропанол-растворимых продуктов ПОЛ. В целом полученные данные свидетельствуют о нарастании уровня ПОЛ-модифицированных ЛПВП по мере развития сосудистых осложнений СД 1. эта связь прослеживается для ЛПВП, модифицированных гептаногликовыми продуктами ПОЛ.

В отличие от ЛПВП, в суммарной фракции атерогенных липопротеидов было отмечено достоверное уменьшение гептан-растворимых продуктов липопероксидации. Прежде всего это касалось гептан-растворимых продуктов ПОЛ у больных СД 1 без сосудистых осложнений. Уровень гептан-экстрагируемых ДК оказался ниже контрольных значений также у больных СД с макроангиопатиями. Содержание гептан-экстрагируемых ДК во фракции ЛПНП+ЛПОНП у больных с микроангиопатиями не отличалось от соответствующих показателей контроля, но было достоверно выше соответствующих величин у больных СД без сосудистых осложнений и с макроангиопатиями.

Независимо на первоначально сниженное содержание гептаногликовых КД и СТ во фракции атерогенных липопротеидов у больных без сосудистых осложнений, по мере прогрессирования ангиопатий отмечалось нарастание вторичных гептан-экстрагируемых продуктов ПОЛ. Содержание гептаногликовых КД и СТ в ЛПНП+ЛПОНП у больных с микроангиопатиями было достоверно выше контрольных значений и соответствующих величин у больных без сосудистых осложнений. Развитие макроангиопатий обусловило дальнейший рост уровня этих продуктов ПОЛ. У больных с макроангиопатиями содержание гептан-растворимых КД и СТ во фракции ЛПНП+ЛПОНП достигало максимума и было достоверно выше аналогичных показателей во всех остальных группах. Полученные результаты позволяют считать, что развитие сосудистых осложнений СД 1 приводит к усиленной окислительной деструкции первичных гептан-растворимых продуктов ПОЛ (ДК) с их последующей трансформацией во вторичные продукты липопероксидации (КД и СТ).

Совершенно по-иному выглядели изменения уровня изопропанол-растворимых липероксидов фракции ЛПНП+ЛПОНП в изученных группах больных. Больные без сосудистых осложнений характеризовались статистически неизменным содержанием изопропанол-растворимых ДК во фракции атерогенных липопротеидов при одновременном нарастании КД и СТ в сравнении с контролем. По-видимому, в этой группе больных отмечается усиленное свободнорадикальное окисление эфирносвязанных, входящих в структуру глицерофосфолипидов полиеновых жирнокислотных остатков с усиленным образованием вторичных продуктов ПОЛ. Вероятно, этот процесс усиливается по мере развития микроангиопатий. Правомерность данного предположения иллюстрируется

дальнейшим нарастанием содержания изопропанол-растворимых КД и СТ при одновременном снижении содержания изопропанол-экстрагируемых ДК. Как видно (табл.4), вторичные изопропанол-экстрагируемые продукты ПОЛ у больных с микроангиопатиями достоверно превышали аналогичные величины контроля и больных без сосудистых осложнений, а содержание ДК изопропанольной фазы оказалось достоверно ниже контрольных значений. Скорее всего, отмеченные различия связаны с интенсификацией свободнорадикального окисления фосфолипидной части атерогенных липопротеидов и усилением окислительной конверсии первичных липопероксидов во вторичные продукты ПОЛ.

Развитие макроангиопатий обуславливает еще более выраженную интенсификацию данного процесса. Это выражается в достоверном увеличении как первичных, так и вторичных ЛПНП+ЛПОНП-ассоциированных продуктов липопероксидации в изопропанольной фазе по сравнению со всеми остальными группами больных.

В целом полученные результаты подтверждают факт переокисления липидных компонентов во фракции атерогенных липопротеидов по мере развития и прогрессирования сосудистых осложнений СД I (Климов А.Н., Никульчева Н.Г., 1995).

Известно, что неферментное гликозилирование липопротеидов является важным фактором, увеличивающим чувствительность липопротеидов к оксидативному стрессу (Климов А.Н., Никульчева Н.Г., 1995; Matteucci E., Giampietro O., 2000). При этом вопрос о взаимосвязи между гликозилированием и липопероксидацией в ЛПВП остается практически неизученным. Поэтому на следующем этапе работы мы провели целенаправленное изучение выраженности гликозилирования ЛПВП и степени дислипидемических расстройств во взаимосвязи с перекисной модификацией ЛПВП.

В результате проведенного исследования было установлено, что СД I сопровождается увеличением содержания фруктозамина на 1 грамм альбумина плазмы крови в 3,3 – 3,5 раза по сравнению с группой контроля (табл.5). Степень прироста этого показателя не зависела от наличия сосудистых осложнений, что проявилось отсутствием достоверных различий между обследованными группами больных. Это свидетельствует о сопоставимой выраженности гипергликемии в изученных группах больных на протяжении предшествующих 3 недель (Камышников В.С., 2000). Уровень ЛПВП-ассоциированного фруктозамина не отличался от контрольных значений у больных с диабетическими ангиопатиями. При СД I без сосудистых осложнений этот показатель оказался более чем в 2 раза сниженным по сравнению с нормой. Последнее, по-видимому, отражает ускоренный катаболизм гликозилированных ЛПВП (Климов А.Н., Никульчева Н.Г., 1995; Federle P. et al., 1982).

Таблица № 5. Содержание фруктозамина (ФА) в плазме крови (в мкМоль на 1 г альбумина), ЛПВП-связанного ФА (в мкМоль на 1 г белка) и показатели липидного обмена у больных СД 1 без сосудистых осложнений и с диабетическими ангиопатиями (M+m)

Показатели	Контроль (n=46)	СД без сосудистых осложнений (n=14)	СД с микроангиопат иями (n=48)	СД с макроангиопатиями (n=17)
ФА плазмы крови	18,76±1,34	61,00±8,71*	63,00±3,94*	66,23±7,06*
ФА – ЛПВП	16,90±2,71	7,86±1,34*	15,17±3,18	13,72±4,
ТГ, мМоль/л	0,91±0,06	1,57±0,22*	1,38±0,09*	1,70±0,38*
ХС общ, мМоль/л	4,40±0,08	5,42±0,32*	4,74±0,17* **	5,71±0,41* ***
ХС-ЛПВП, мМоль/л	1,41±0,04	1,19±0,08*	1,27±0,05*	1,26±0,08*
ХС-ЛПНП, мМоль/л	2,58±0,10	3,51±0,33*	2,84±0,17	3,67±0,41* ***
КА, отн.ед.	2,33±0,17	3,90±0,47*	3,16±0,34*	4,13±0,68* ***
СЖК, мЭКВ/л	0,77±0,03	1,54±0,15*	1,45±0,10*	1,22±0,12* **

Примечания: * – показатель достоверности различий ($p<0,05$) с группой контроля,

** – показатель достоверности отличий ($p<0,05$) от СД 1 без сосудистых осложнений ;

*** – показатель достоверности отличий ($p<0,05$) от СД 1 с микроангиопатиями.

Не исключено, что по мере развития ангиопатий ускоренная элиминация ЛПВП-связанного фруктозамина компенсируется его усиленным новообразованием (Berger G.M.B., 1984). Важно добавить, что во фракции ЛПВП у больных с макроангиопатиями были выявлены прямые корреляции между гептанофильными продуктами ПОЛ и фруктозамином. Для гептан-растворимых ДК эта связь ($r_k=0,429$; $p<0,01$) проявилась более отчетливо, чем для КД и СТ ($r_k=0,357$, $p<0,05$). Отмеченные связи соответствуют представлениям о потенцирующем эффекте неферментного гликозилирования в отношении перекисной модификации липопротеидов (Климов А Н, Никульчева Н.Г., 1995; Masana L.I., 1986).

По-видимому, наиболее ПОЛ-чувствительной частью ЛПВП являются глицерофосфолипиды. Скорее всего, ранее отмеченный прирост гептан-растворимых продуктов ПОЛ в ЛПВП больных с сосудистыми осложнениями СД I обусловлен ЛХАТ-зависимым перераспределением перекисленных ацилов из структуры глицерофосфолипидов в состав эфиров ХС. Справедливость этого соображения иллюстрируется прямой корреляцией между изопропанол-экстрагируемыми ДК-ЛПВП и содержанием ХС-ЛПВП ($r=0,393$; $p<0,05$) у больных с макроангиопатиями. Аналогичная корреляция связывала уровень изопропанол-растворимых КД и СТ во фракции ЛПВП с концентрацией ХС- ЛПВП ($r=0,308$; $p<0,05$).

Для оценки соотношения между содержанием продуктов ПОЛ в крови больных с сосудистыми осложнениями СД I и выраженностью дислипидемических расстройств были изучены унифицированные показатели липидограммы

Во всех группах больных СД I величины КА достоверно превышали значения контроля и достигали максимума на фоне клинически выраженного атеросклероза (макроангиопатий) (табл.5). Кроме того, у больных СД I было установлено достоверное снижение уровня ХС-ЛПВП по отношению к контролю. Тем не менее, ни в одной группе не наблюдалось падение средних величин данного показателя ниже границы нормы (0,9 Ммоль/л). Наименьшие значения концентрации ХС - ЛПВП, наряду с минимальным уровнем ЛПВП-ассоциированных фруктозамина и изопропанол-растворимых продуктов ПОЛ, были зарегистрированы у больных без сосудистых осложнений СД I. Данное совпадение хорошо соответствует представлениям об ускоренном катаболизме модифицированных ЛПВП (Климов А.Н., Никульчева Н.Г., 1995; Parthasarathy S. et al., 1990).

Концентрации ХС_{общ.} и ХС – ЛПНП значимо превышали показатели контроля у больных без сосудистых осложнений и с макроангиопатиями. В этих группах средние показатели ХС_{общ.} выходили за границу нормального диапазона (5,2 Ммоль/л), а средний уровень ХС – ЛПНП соответствовал норме (<4,9 Ммоль/л). У больных с микроангиопатиями концентрация ХС – ЛПНП не отличалась от контроля и была достоверно ниже соответствующего показателя группы с макроангиопатиями. Содержание ХС_{общ.} при микроангиопатиях не превышало границу нормы, было ниже, чем у больных СД I без сосудистых осложнений и с макроангиопатиями, но выше контрольных значений. Относительно благоприятный характер показателей обмена ХЛ при микроангиопатиях может быть связан с «псевдоремиссией» («феноменом Зуброды-Дана»), которая развивается из-за дефицита инсулиновой активности почек при диабетической нефропатии и нарушения

продукции контринсулярных гормонов при патологии микрососудов гипоталамуса (Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П., 2000; Miyata T. et al., 1999).

Средний уровень циркулирующих ТГ достоверно превышал значения контроля во всех группах больных СД 1, но оставался в пределах нормы ($<2,3$ ммоль/л). Концентрация СЖК в плазме крови, наоборот, была существенно выше верхней границы нормы (0,8 мэкв/л) и показателей контроля. При этом уровень СЖК в группе больных с макроангиопатиями оказался достоверно ниже, чем при СД 1 без сосудистых осложнений. По-видимому, последний факт отражает усиленный расход циркулирующих СЖК на биосинтез ХС и ТГ в печени больных с клинически выраженным атеросклерозом. Правомерность данного предположения иллюстрируется прямыми корреляциями СЖК с ХСобщ ($r_k = 0,437$; $p < 0,01$) и ТГ ($r_k = 0,473$; $p < 0,05$) в группе страдающих макроангиопатиями.

В целом результаты проведенного исследования продемонстрировали высокое соответствие между уровнем циркулирующих продуктов ПОЛ и выраженностью дислипидемических расстройств у больных с сосудистыми осложнениями СД 1.

Наиболее выраженные атерогенные сдвиги липидного спектра были выявлены у больных с клиническими проявлениями атеросклероза (макроангиопатиями). Эта же группа характеризовалась самыми высокими показателями содержания продуктов ПОЛ как во фракции атерогенных липопротеидов (ЛПНП+ЛПОНП), так и в антиатерогенной фракции ЛПВП. Кроме того, у больных с макроангиопатиями отмечалось самое выраженное снижение изученных показателей АОЗ (α -токоферола, церулоплазмина).

Полученные данные в целом свидетельствуют о том, что изучение липопротеидного распределения продуктов ПОЛ может рассматриваться как эффективное дополнение к общепринятым липидологическим исследованиям. В диабетологической клинике такой подход может оказаться полезным для объективизации клинических данных о динамике развития сосудистых осложнений при СД 1.

ВЫВОДЫ

1. Сахарный диабет 1 типа сопровождается активацией ПОЛ, выраженность которого увеличивается по мере развития диабетических ангиопатий.

2. Активация ПОЛ у больных с сосудистыми осложнениями СД 1 типа сопровождается ПОЛ-зависимой модификацией ЛПВП и суммарной фракции атерогенных липопротеидов (ЛПНП + ЛПОНП) и сопутствующим развитием вторичных дислипидемических расстройств.

3. Наиболее информативными маркерами ПОЛ-зависимой модификации ЛПВП при СД 1 типа является уровень гептан-экстрагируемых ЛПВП-ассоциированных липопероксидов.

4. Наиболее информативными маркерами ПОЛ-зависимой модификации суммарной фракции атерогенных липопротеидов (ЛПНП+ЛПОНП) является уровень изопропанол-растворимых кетодиенов и сопряженных триенов в этой липопротеидной фракции.

5. Развитие макроангиопатий у больных СД 1 типа сопровождается более выраженной активацией процессов ПОЛ и более глубокой ПОЛ-зависимой модификацией липопротеидов в сравнении с микроангиопатиями.

6. Развитие сосудистых осложнений СД 1 типа сопровождается лабораторными признаками угнетения системы АОЗ. Это проявляется уменьшением концентрации α -ТК в плазме крови с развитием наиболее выраженной гипотокоферолемии у больных с диабетическими макроангиопатиями, которые также сопровождаются снижением концентрации циркулирующего ЦП.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Харченкова Н.В. Дислипидемические расстройства у больных с сосудистыми осложнениями СД 1 типа / Н.В. Харченкова // Труды Всероссийской конференции «Проблемы медицинской энзимологии», «Современные технологии лабораторной диагностики нового столетия». Москва, 2002. – С.221
2. Харченкова Н.В. Содержание продуктов липопероксидации и антиоксидантов в крови больных диабетическими ангиопатиями / Н.В. Харченкова // Тезисы докладов IV Международной конференции БИОАНТИОКСИДАНТ. – Москва, 2002. – С.593.
3. Волчегорский И.А. Фруктозамин, липопротеиды высокой плотности и степень дислипидемии у больных с сосудистыми осложнениями СД 1 типа / И.А. Волчегорский, Н.В. Харченкова // Клин. лаб. диагностика – 2003. №1. – С.14–17.
4. Волчегорский И.А. Содержание продуктов перекисного окисления липидов, α -токоферола и церулоплазмينا в крови больных с сосудистыми осложнениями инсулинзависимого сахарного диабета / И.А. Волчегорский, Н.В. Харченкова // Клин. лаб. диагностика – 2003. – №4. – С.13 –15.
5. Волчегорский И.А. Определение содержания продуктов ПОЛ в липопротеидах с помощью систем преципитации / И.А. Волчегорский, Н.В. Харченкова // Клин. лаб. диагностика – 2004. – №2. – С.37–39.

2006A
P307

W-8307