

Окислительная модификация белков при диабетических микроангиопатиях

И.А. Бондарь, В.В. Климонтов, И.А. Поршенников

*Кафедра внутренних болезней
(зав. - акад. РАМН проф. Л.Д. Сидорова) лечебного факультета
Новосибирской государственной медицинской академии*

Проведенные в различных странах проспективные исследования (DCCT, UKDPS и др.) доказали ведущую роль гипергликемии в формировании сосудистых осложнений сахарного диабета (СД). Однако молекулярные механизмы, определяющие взаимосвязь между нарушенным гомеостазом глюкозы и развитием диабетических ангиопатий (ДА), окончательно не ясны. Накапливается все больше данных о том, что повреждающее действие гипергликемии на сосудистую стенку опосредуется свободными радикалами. Известно, что СД сопровождается активацией процессов свободнорадикального окисления (СРО) на фоне дисбаланса в системе антиокислительной защиты («окислительный стресс»). Избыточная генерация свободных радикалов ответственна за развитие дисфункции эндотелия, модификации липопротеинов, гипервязкости и гиперкоагуляции [8,10].

На уровне клетки повреждающее действие свободных радикалов направлено на три типа мишеней: липиды, нуклеиновые кислоты и белки [2,3]. Неоднозначные данные о степени окислительной модификации белков получены при СД: согласно одним авторам, содержание окисленных белков при СД повышается [7, 9, 18], по данным других - не изменяется [11, 15].

Одним из методов оценки степени окислительной модификации белковых молекул является исследование количества входящих в их состав карбонильных групп. Содержание данных групп в циркулирующих и тканевых белках считается ранним, чувствительным и достаточно стабильным маркером свободнорадикального повреждения [17].

Целью работы явилось изучение степени карбонильной модификации белков сыворотки крови у больных СД 1 типа в зависимости от качества гликемического контроля, интенсивности процессов липопероксидации и наличия микроангиопатий.

Объем и методы исследования

Обследовано 48 больных СД 1 типа, 23 мужчины и 25 женщин, в возрасте от 16 до 52 лет (средний возраст 30,9±1,4 г.). Длительность заболевания варьировала от 1 мес. до 20 лет, (в среднем 8,0±0,8 г.) При комплексном обследовании у 17 па-

циентов не выявлено признаков микроангиопатий, у 25 больных диагностирована ретинопатия (непролиферативная у 14, препролиферативная - у 3, пролиферативная - у 8 больных). Микроальбуминурия выявлена у 12 больных, явная нефропатия - у 11. В состоянии декомпенсации углеводного обмена находились 42 больных; средний уровень HbA1c составил 9,1±0,4%. В контрольную группу вошли 15 здоровых лиц.

Исследование HbA1c осуществлялось иммунотурбидиметрическим методом (анализатор «COBAS MIRA», Roche Diagnostica), альбуминурии - иммунохимическим полу-количественным методом («Micral-Test II», Boehringer Mannheim).

Степень окислительной модификации белков сыворотки крови оценивали по содержанию в них карбонильных групп, количество которых определяли по С. D. Smith и соавт. (1991). На первом этапе образцы подвергали часовой обработке раствором 2,4-динитрофенилгидразина, гидразоновые производные белков экстрагировали 20% трихлоруксусной кислотой с последующей трехкратной отмывкой - этилацетат-этанолом (1:1) и удалением супернатанта. В качестве солибилизирующего агента использовали 6 М гуанидин-гидрохлорид. Оптическую плотность полученного раствора определяли спектрофотометрически при $\lambda=385$ нм.

Для оценки интенсивности процессов свободнорадикального окисления липидов в гемолизатах эритроцитов определяли содержание диеновых конъюгатов (ДК), уровень карбонильных продуктов ПОЛ, активных по отношению к 2-тиобарбитуровой кислоте (ТБК).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью стандартных методов вариационной статистики, включая корреляционный анализ. Достоверность различий оценивали по t критерию Стьюдента. Данные представлены как M+m.

Результаты и обсуждение

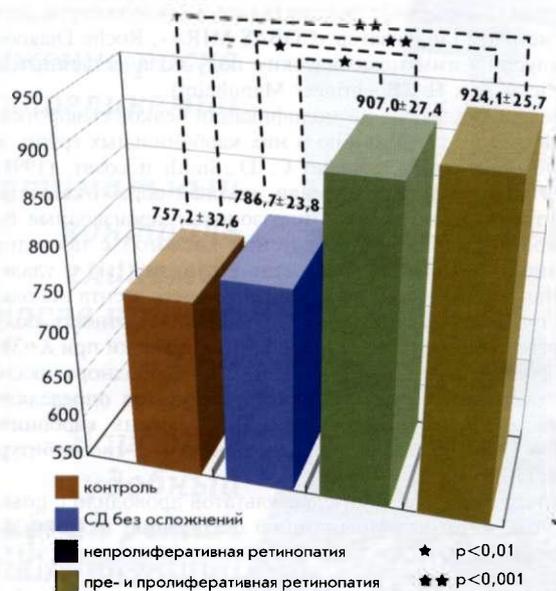
Проведенные исследования показали повышение содержания карбонильных групп в белках сыворотки крови у больных СД 1 типа в сравнении с контролем (884,9±18,6 и 757,2±32,6 нмоль/г белка соответственно, $p<0,01$). Это подтверждает наличие системного окислительного стресса при СД и согласуется с данными авторов [7], отметивших увеличение уровня карбонильных групп в белках плазмы крови у детей, подростков и молодых лиц, больных СД.

В нашем наблюдении степень карбонильной модификации сывороточных белков не зависела от пола и возраста обследованных, но была наибольшей у пациентов с длительностью заболевания свыше 5 лет, имевших те или иные сосудистые осложнения. Зависимость между содержанием карбонильных групп и стадиями диабетической ретино- и нефропатии демонстрирует рис. 1. Если при неосложненном СД на-

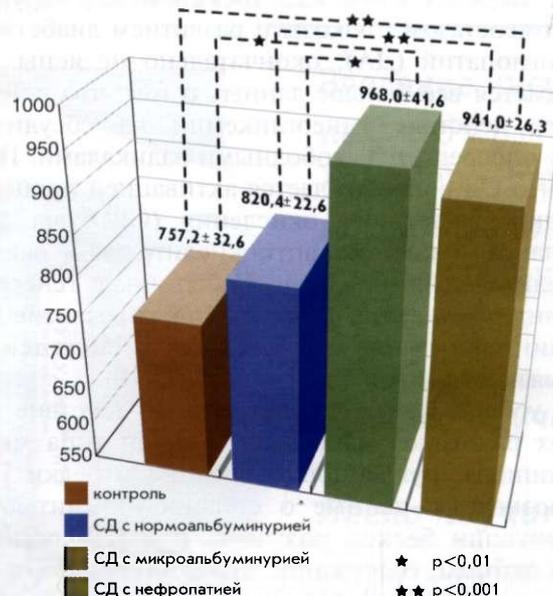
блюдалась лишь тенденция к повышению уровня карбонильных групп, то начальные стадии микроангиопатий характеризовались значимым ($p < 0,01$) повышением показателя. У пациентов с пре- и пролиферативной ретинопатией и у больных с нефропатией на стадии протеинурии повышение уровня карбонильных групп в молекулах белков было высокодостоверным ($p < 0,001$). Следовательно, степень окислительного повреждения белков при СД взаимосвязана с выраженностью сосудистых осложнений.

Карбонильной модификации белков у обследованных больных сопутствовала значительная активация СРО липидов, о чем свидетельствовало избыточное накопление первичных (ДК) и вторичных продуктов липопероксидации в мембранах эритроцитов (табл. 1). Средний уровень ДК был повышен по сравнению с контролем в 1,9 раза ($p < 0,001$). Содержание

Обнаружена положительная корреляция между уровнем карбонильных групп и содержанием ТБК-активных продуктов, что свидетельствует о взаимосвязи между процессом окислительной модификации белков и интенсивностью свободно-радикального окисления (СРО) липидов при СД. Образующиеся при СРО липидов продукты действуют на белки как сильные окислители, повреждающее влияние которых реализуется взаимодействием с SH-, NH₂- и CH₃-группами аминокислотных остатков. Данный механизм лежит в основе инактивирующего влияния липопероксидации на многие ферменты. Продукты окисления липидов, в том числе МДА, могут образовывать стабильные комплексы с белками и инициировать полимеризацию белковых молекул, что в еще большей степени способствует разрушению клеточных структур [1].



А



Б

Рис. 1. Содержание карбонильных групп в белках сыворотки крови у больных СД 1 типа с различной выраженностью ретинопатии (А) и нефропатии (Б).

МДА превышало контрольные показатели в 2,3 раза ($p < 0,001$). Выявленные изменения в системе пероксидации липидов выявлены у больных с длительностью СД более 10 лет. Отмечена тенденция к возрастанию интенсивности ПОЛ с увеличением тяжести микроангиопатий (см. табл. 1), наиболее высокие показатели зафиксированы у больных с выраженной нефропатией и пролиферативной ретинопатией.

Корреляционный анализ (табл. 2) выявил слабую положительную взаимосвязь между содержанием карбонильных групп и длительностью СД, что, очевидно, объясняется большей интенсивностью окислительной модификации белков у больных с микроангиопатиями.

Как известно, гипергликемия сопровождается усилением генерации свободных радикалов вследствие аутоокисления глюкозы и неферментативного гликирования [8, 13] ингибцией системы антиоксидантной защиты, включая такие ее компоненты, как супероксиддисмутаза [5], глутатион, витамины Е и С [14]. Вероятно, именно эти механизмы определяют зависимость степени карбонильной модификации белков от качества компенсации СД.

Окисленные белки часто функционально неактивны, они легче подвергаются протеолизу [6]; часть модифицированных в ходе СРО белков может накапливаться в различных тканях. При этом окисленные белки способны выступать в качестве источника свободных радикалов истощать запасы клеточных антиоксидантов, таких как аскорбиновая кислота и глутатион [16]. In vitro показано, что продукты СРО белков опосредуют окислительное повреждение ДНК [12]. Таким образом, окисленные белки являются не только «свидетелями», но и активными участниками процесса свободно-радикального повреждения.

Таблица 1

Содержание продуктов ПОЛ в мембранах эритроцитов (мкмоль/мл) у больных СД I типа с различной выраженностью ДА

Группы обследованных	Показатель	
	ДК	МДА
Контрольная (n=15)	43,2±1,6	6,3±0,2
СД без микроангиопатий (n=17)	73,2±7,4*	12,1±1,3*
Непролиферативная ретинопатия и/или микроальбуминурия (n=19)	84,0±10,8*	14,2±1,8*
Пре- или пролиферативная ретинопатия и/или нефропатия (n=12)	87,0±10,8*	18,2±2,2*, **

Примечание. Достоверность различий ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (*) и с группой больных без микроангиопатий (**).

Таблица 2

Коэффициент корреляции между содержанием карбонильных групп в белках и клиничко-лабораторными параметрами у больных СД I типа

Показатель	r	P
Возраст, годы	-0,06	>0,05
Длительность СД, годы	0,3	<0,05
Показатели ПОЛ		
ДК	0,19	>0,05
МДА	0,34	<0,02
Показатели углеводного обмена		
НbA1c	0,29	<0,05
Гликемия утренняя	0,28	>0,05
Гликемия среднесуточная	0,35	<0,02

Данные последних лет указывают на возможную роль локального окислительного стресса и карбонильной модификации белков в развитии поздних осложнений СД. Высокий уровень МДА и карбонильных групп в белках обнаружен [9] в сетчатой оболочке глаз у больных СД с пролиферативной ретинопатией и отслойкой сетчатки, ранее выявлено повышенное содержание карбонильных групп в белках хрусталика и стекловидного тела у больных СД, особенно при наличии ретинопатии [4]. При диабетической нефропатии обнаружено накопление карбонилмодифицированных белков в расширенном мезангиальном матриксе и в зонах узелковых

поражений почечных клубочков [18]. Эти наблюдения согласуются с нашими данными о повышении уровня карбонильных групп в циркулирующих белках у пациентов с диабетической ретино- и нефропатией.

Выводы

1. У больных СД I типа, осложненном ретино- и/или нефропатией, наблюдается накопление в сыворотке крови модифицированных белков с повышенным количеством карбонильных групп.
2. Гипергликемия и интенсификация СРО липидов способствуют окислительному повреждению сывороточных белков при СД.

Литература

1. Абрамова Ж. И., Оксенгендлер Г. И. Человек и противокислительные вещества. - Л., 1985. - 230 с.
2. Бобырева Л. Е. // Пробл. эндокринол. - 1996. - Т. 42, № 6. - С. 14-20
3. Нелаева А. А., Трошина И. А. // Сахарный диабет. - 1999. - № 3. - С. 25-29.
4. Altomare E., Grattagliano I., Vendemiale G. et al. // Eur. J. Clin. Invest. - 1997. - Vol. 27, N 2. - P. 141-147.
5. Arai K., Iizuka S., Tada Y. et al. // Biochem. Biophys. Acta. - 1987. - Vol. 924, № 2. - P. 292-296.
6. Dean R. T., Fu S., Stocker R., Davies M. J. // Biochem. J. - 1997. - Vol. 324, Pt 1. - P. 1-18.
7. Dominguez C., Ruiz E., Gussinye M., Carrascosa A. // Diabetes Care. - 1998. - Vol. 21, N 10. - P. 1736-1742.
8. Giugliano D., Ceriello A., Paolisso G. // Metabolism. - 1995. - Vol. 44, N 3. - P. 363-368.
9. Grattagliano I., Vendemiale G., Boscia F. et al. // Free Radic. Biol. Med. - 1998. - Vol. 25, N 3. - P. 369-372.
10. Jones R. H., Hotherhall J. S. // Biochem. Med. Metab. Biol. - 1993. - Vol. 50, N 2. - P. 197-209.
11. Krapfenbauer K., Birnbacher R., Vierhapper H. // Clin. Sci. (Colch.) - 1998. - Vol. 95, N 3. - P. 331-337.
12. Morin B., Davies M. J., Dean R. T. // Biochem. J. - 1998. - Vol. 330, Pt 3. - P. 1059-1067.
13. Mullarkey C. J., Edelstein D., Brownlee M. // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1990. - Vol. 173, N 3. - P. 932-939.
14. O'Brien R. C., Luo M. // Metabolism. - 1997. - Vol. 46, N 12, Suppl. 1. - P. 22-25.
15. Portero-Otin M., Pamplona R., Ruiz M. C. et al. // Diabetes. - 1999. - Vol. 48, N 11. - P. 2215-2220.
16. Simpson J. A., Narita S., Gieseg S. et al. // Biochem. J. - 1992. - Vol. 282, Pt 3. - P. 621-624.
17. Stadtman E. R., Berlett B. S. // Drug. Metab. Rev. - 1998. - Vol. 30, N 2. - P. 225-243.
18. Suzuki D, Miyata T, Saotome N. et al. // J. Am. Soc. Nephrol. - 1999. - Vol. 10, N 4. - P. 822-832.