Влияние биофлаваноидов на интенсивность свободнорадикального окисления и активность Na^+-H^+-обменника у больных сахарным диабетом типа 2

М.И. Балаболкин, М.Ф. Белоярцева, Л.В. Недосугова, В.С. Орлов, М.С. Никишова

Кафедра эндокринологии и диабетологии (зав. – проф. М.И. Балаболкин) ФППО ММА им. И.М. Сеченова, кафедра общей патологии и патофизиологии (зав. – проф. А.А. Кубатиев) РМАПО, Москва

Основу диабетических осложнений составляют поражения сосудов, сопровождающиеся гипертрофией и пролиферацией гладкомышечных клеток, а также гиперпродукцией и модификацией внеклеточного матрикса. Рядом исследователей продемонстрировано, что Na^+/H^+-обменник участвует в регуляции роста многих типов клеток, включая гладкомышечные, и что изменение активности Na^+/H^+-обменника является тем звеном, посредством которого биохимические нарушения, возникающие при сахарном диабете (СД), оказывают свое влияние на развитие и поддержание ангиопатий [2, 3, 5].

Известно, что активность Na^+-H^+-противотранспорта генетически детерминирована [7, 9, 10]. При исследовании катионного противотранспорта у больных СД обнаружена более высокая активность Na^+-H^+ обмена в эритроцитах при развившейся нефропатии по сравнению с неосложненным течением заболевания [4, 8]. Достоверное увеличение Na^+-H^+ обмена выявляется не только у больных с клинически выраженным диабетическим поражением почек, но и на допротеинурической стадии диабетической нефропатии (ДН). Эти данные позволяют предположить, что больные с высоким риском развития ДН могут быть идентифицированы на основании ускоренного Na^+-H^+ обмена.

Гипергликемия и свободные кислородные радикалы посредством стимуляции митогенактивированной протеинкиназы способны повышать активность Na^+/H^+-обменника [2, 5]. Существуют данные, что небольшие различия в составе молекулярных подклассов фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтаноламина (ФЭА) – фосфолипидов, содержащих основное количество ненасыщенных мембранных жирных кислот (ЖК), могут существенно изменять активность Na-транспортных систем в мембране эритроцита [1].

Учитывая, что основой повреждающих эффектов ПОЛ в мембране является реакция ненасыщенных жирнокислотных остатков фосфолипидов мембранного бислоя с активными формами кислорода, нам показалось интересным исследовать активность данного ионотранспортирующего процесса у больных СД типа 2 и изучить возможности терапевтического влияния на функционирование Na^+-H^+-обменника.

Целью работы явилась оценка влияния антиоксидантов биофлавоноидного ряда на скорость функционирования Na^+-H^+-обменника в мембранах эритроцитов у больных СД типа 2.

Объем и методы исследования

Обследовано 20 больных СД типа 2, получающих пероральную сахароснижающую терапию (8), инсулинотерапию (10) и комбинированную терапию (2), из них 5 мужчин и 15 женщин в возрасте от 41 года до 76 лет. Больные находились в состоянии компенсации углеводного обмена – по критериям European Diabetes Policy Group, 1999 (HbA1c=7,12±0,29%) и имели начальные признаки диабетических микрососудистых осложнений – ДР I-II ст. и ДН I (микроальбуминурическая стадия). Больные рандомизированы методом случайной выборки: пациентам 1-й группы назначали диквертин в дозе 120 мг/сут, а 2-й – танакан 120 мг/сут. Общая продолжительность лечения составила 12 нед (условия включения в исследования, длительность курса терапии и техника забора крови одинаковы в обеих группах). При наборе группы контроля принимался во внимание нормальный тест толерантности к глюкозе и отсутствие отягощенной наследственности по СД.

Уровень HbA1c определяли на приборе DCA 2000 Analyzer (Bayer) методом латексного ингибирования иммуноагглютинации с помощью «Hemoglobin A1c Reagent Kit» (норма HbA1c – до 6,5%). Количественная оценка суточной экскреции альбумина с мочой проводилась с помощью DCA 2000 Microalbumin/Creatinine Reagent Cartridge на приборе DCA 2000 Analyzer (Bayer, Германия). Микроальбуминурия диагностировалась при суточной экскреции альбумина с мочой от 30 до 300 мг.

Скорость Na^+-H^+ обмена определяли по методу N. Escobales в модификации С.Н. Орлова как амилорид-ингибирующую компоненту выхода протонов из эритроцитов с подкисленной до pH 6,5 цитоплазмой в защелачиваемую среду (pH 8,0±0,1) в условиях ингибирования фонового анионного транспорта посредством введения SITS (4-ацетамидо-4-изотиоцианостильбен-2,2-дисульфоновая кислота).

Таблица 1

Показатели функционирования Na^+-H^+-обменника у больных (n=20) и здоровых (n=10)		
Исходная скорость Na^+-H^+ обмена, мкмольH^+/мл$^{-1}$/время инкуб.$^{-1}$	Больные СД	Контроль
	M±m	M±m
	89,28±14	71,9±11,15

Количественное содержание метиловых эфиров жирных кислот в образцах теней эритроцитов анализировали методом газовой хроматографии на хроматографе Mega-5300 «Carlo Erba» (Италия) с использованием плазменно-ионизационного детектора.

Уровень МДА в эритроцитарных мембранах определяли спектрофлуориметрическим методом на приборе «Hitachi-1000».

Статистическая обработка производилась на компьютере с использованием специального статистического пакета SPSS версии 9.0 (SPSS inc., США). Для определения достоверности различий между сравниваемыми группами использовался t-критерий Стьюдента. Достоверность динамических изменений исследуемых параметров до и после лечения определяли с помощью непараметрических методов вариационного анализа (критерий Вилкоксона). Различия считались достоверными при $p<0,05$. Все средние значения в таблицах представлены в виде M±m.

Результаты и их обсуждение

Не получено статистически значимых различий исходного уровня Na^+-H^+ обмена между больными диабетом и здоровыми людьми (группа контроля) (табл. 1). Однако у 8 пациентов отмечалась значительно (в 2-3 раза) повышенная скорость Na^+-H^+ обмена (по сравнению с контролем и с остальными 12 больными). Мы не выявили достоверных различий у 8 пациентов с исходной гиперактивностью обменника от 12 больных из этой группы ни по возрасту, ни по продолжительности заболевания, ни по состоянию компенсации СД, ни по показателям липидного обмена, ни по выраженности сосудистых диабетических осложнений, ни по уровню АД (табл. 2).

Таблица 2

Сравнительная характеристика средних исходных антропометрических, анамнестических и клинико-биохимических показателей в подгруппах больных, соответствующих высокому и низкому уровню Na^+-H^+ обмена (M±m), p<0,01		
Показатель	Больные СД (ДН I) с исходно повышенной скоростью Na^+-H^+ обмена	Больные СД (ДН I) с нормальной скоростью Na^+-H^+ обмена (n=12)
Na^+-H^+-обмен	136±13,9	52,86±7,6
Возраст, лет	59,5±4,87	63,8±2,76
Длительность заболевания, лет	16,5±2,3	13,55±2,66
HbA1c, ммоль/л	7,46±0,3	7,05±0,27
САД, мм рт. ст.	145,7±7,8	151,82±3,77
ДАД, мм рт. ст.	87,14±2,0	83,18±1,39
ХС, ммоль/л	5,7±0,34	5,35±0,14
ТГ, ммоль/л	1,08±0,07	1,49±0,06
ЛВП, ммоль/л	1,17±0,1	1,28±0,05
ЛНП, ммоль/л	4,04±0,23	3,39±0,19
Протеинурия	Отсутствует	Отсутствует
Микроальбуминурия	154,6±19,3	182,8±22,6
Наследственный анамнез по гипертензии	Отсутствует	Отсутствует

Ответ на антиоксидантную терапию отмечался только у 8 пациентов, которые имели высокую скорость Na^+-H^+ обмена, что выражалось в достоверном снижении данного параметра на 55,3% до величин, сопоставимых с контрольными значениями (табл. 3). Не представляется возможным сопоставить эффекты двух препаратов, т.к. 7 пациентов из 8 принимали диквертин и только 1 больной принимал танакан, что связано со случайным распределением больных при рандомизации.

Мы проанализировали взаимосвязь скорости Na^+-H^+ обмена у больных с содержанием линолевой (18:2) и арахидоновой кислот (20:4) в индивидуальных фосфолипидах эритроцитарных мембран и с интенсивностью ПОЛ.

Уменьшение скорости Na^+-H^+ обмена на фоне антиоксидантной терапии в подгруппе больных с исходной гиперактивностью обменника было сопряжено с достоверным снижением процессов ПОЛ, что проявлялось статистически значимым снижением МДА и увеличением относительного содержания линолевой кислоты. В подгруппе с исходно нормальным уровнем Na^+-H^+ обмена проведение курса антитоксидантной терапии не привело ни к достоверному изменению скорости функционирова-

Таблица 3

Влияние терапии на интенсивность ПОЛ, скорость Na^+-H^+ обмена и жирнокислотный состав мембран эритроцитов				
Показатель	Больные СД с исходно повышенной скоростью Na^+-H^+ обмена (n=8)		Больные СД с нормальной скоростью Na^+-H^+ обмена (n=12)	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
МДА в мембранах эритроцитов, нг/мг белка	3,34±0,19	2,39±0,05**	3,01±0,34	3,26±0,75
18:2 (%)	9,51±0,75	11,78±0,83*	9,48±0,69	10,43±0,95
20:4 (%)	9,03±0,95	9,32±1,02	7,69±1,52	7,95±1,20
Скорость Na^+-H^+-обмена, мкмольH^+/мл$^{-1}$/время инкуб.$^{-1}$	136,57±13,9	61,14±12,88**	52,86±7,6	80,79±27,05

Достоверность различий по Вилкоксону обозначена:
* $p < 0.05$,
** $p < 0.01$ по сравнению с исходными данными до лечения.

ния обменника, ни к изменению уровней МДА и 18:2 в мембранах эритроцитов.

При оценке влияния биофлавоноидов на скорость функционирования Na^+-H^+ обменника эффект был выявлен только у пациентов с исходной гиперактивностью данного транспортера, что выражалось в достоверном снижении скорости Na^+-H^+-обмена до величин, сопоставимых с контрольными значениями. Не представляется возможным сравнить степень эффективности исследуемых антиоксидантов, т.к. 7 из 8 больных с повышенной скоростью Na^+-H^+ обмена принимали диквертин (1 больной получал танакан). Речь не может идти об ошибке в модели, так как все больные были рандомизированы методом случайной выборки до начала исследования.

В попытке приблизиться к пониманию причин, приводящих к чрезмерной активации Na^+-H^+ обменника у подгруппы (см. табл. 2) больных и причин, вызывающих снижение этого показателя после проведения курса антиоксидантной терапии, мы проанализировали взаимосвязь скорости Na^+-H^+ обмена у больных с содержанием линолевой и арахидоновой кислот в индивидуальных фосфолипидах эритроцитарных мембран и с интенсивностью ПОЛ. Проведенный анализ показал, что уменьшение скорости Na^+-H^+ обмена на фоне антиоксидантной терапии у больных с исходной гиперактивностью обменника было сопряжено с достоверным снижением ПОЛ, что проявлялось значимым снижением уровня МДА и увеличением относительного содержания линолевой кислоты. В подгруппе больных с нормальным исходным уровнем Na^+-H^+ обмена (см. табл. 2) проведение курса антитоксидантной терапии не привело ни к достоверному изменению скорости функционирования обменника, ни к изменению уровней МДА и 18:2 в мембранах эритроцитов.

Выявленная нами закономерность связана не столько с прямым влиянием МДА на скорость Na^+-H^+ обмена, сколько со способностью бифункциональной по своей природе молекулы диальдегида взаимодействовать одновременно с аминогруппами двух молекул белков, образуя межмолекулярные сшивки и ограничивая конформационную подвижность полипептидной цепи, необходимой для нормального функционирования каналов ионной проводимости и систем, ответственных за трансмембранную передачу сигнала. Таким образом, повреждающий эффект МДА на клеточную мембрану может опосредованно изменять скорость функционирования Na^+-H^+-обменника.

Что касается взаимосвязи скорости Na^+-H^+ обмена с жирнокислотным составом мембранных фосфолипидов, то полученные нами данные согласуются с результатами B. Engelmann и соавт. [1], продемонстрировавшими прямую корреляцию между повышением Na^+/Li^+-противотранспорта и процентным содержанием ФЭА с арахидоновой кислотой во втором положении и обратную корреляцию между Na^+/Li^+-противотранспортом и процентным содержанием ФЭА с линолевой кислотой во втором положении (активность экспериментально созданного Na^+/Li^+-противотранспорта отражает функциональное состояние физиологически существующей Na^+/H^+-противотранспортной системы). Эти авторы показали, что замещение менее чем 10% мембранного ФХ на 16:0/20:4 – ФХ (фосфолипид с пальмитиновой кислотой в первом положении и арахидоновой кислотой во втором положении) стимулирует данный транспортер, тогда как замещение на 16:0/18:2 – ФХ – ингибирует его. Следовательно, небольшие изменения в соотношени 18:2 и 20:4 во втором положении индивидуальных фосфолипидов способны приводить к изменению скорости функционирования Na^+/H^+-обменника. Данные соображения подтверждаются результатами исследования S. Persson и соавт., продемонстрировавшими повышение содержания арахидоновой кислоты во фракциях ФХ и ФЭА у больных СД типа 2 [6].

Таким образом, принимая во внимание, что в группе больных с гиперактивностью обменника исходно отмечались более высокие уровни арахидоновой кислоты, чем в группе с нормальной скоростью Na^+-H^+ обмена (эта разница не была достоверной), а также, что снижение скорости Na^+-H^+ обмена в группе с исходным повышением данного показателя сопровождалось достоверным увеличением удельного веса линолевой кислоты и достоверным снижением содержания МДА, можно утверждать, что возникающий на фоне интенсификации процессов свободнорадикального окисления дисбаланс в содержании полиненасыщенных эссенциальных жирных кислот может приводить к повышению активности Na^+-H^+-обменника.

Тот факт, что повышение активности Na^+/H^+- антипортера предшествует росту гладкомышечных клеток и может являться одной из первых реакций на диабет, приводящей в дальнейшем к ремоделированию сосуда [3], указывает на то, что устранение гиперактивности обменника является потенциальной целью для терапевтического вмешательства при развитии сосудистых диабетических осложнений.

Способность биофлавоноида диквертина наряду с уменьшением содержания продуктов свободнорадикального окисления в мембранах эритроцитов и улучшением жирнокислотного состава мембранных фосфолипидов снижать до нормальных величин повышенную активность Na^+/H^+-обменника, делает его препаратом выбора в лечении пациентов с начальными признаками микроангиопатий у больных СД типа 2. Можно говорить о высокой эффективности и целесообрасности широкого внедрения антиоксидантной терапии в комплексе лечебных мero-

приятий, направленных на нормализацию обменных процессов у больных СД типа 2.

Выводы

1. Повышение скорости Na^+/H^+ обмена может рассматриваться как маркер оксидативного стресса у больных СД типа 2.

2. Установлена взаимосвязь между интенсивностью свободно радикального окисления, жирнокислотным спектром и скоростью функционирования Na^+-H^+-обменника в мембранах эритроцитов.

3. Прием диквертина и танакана в дозе 120 мг/сут в течение 3 мес. приводит к значимому снижению концентрации продуктов перекисного окисления липидов в эритроцитарных мембранах у больных СД типа 2.

4. На фоне лечения диквертином происходит достоверная нормализация скорости функционирования Na^+/H^+-обменника.

Литература

1. Engelman B., Schonthier U., Richter W., Dulm J. // Biochim. Biophys. Acta-1992-V.1165-P.38-44
2. Hannan K.M.; Little P.J. // Biochem. Cell Biol.-1998-V.76-N5-P.751-759.
3. Jandeleit-Dahm K., Hannan K., Farrelly C. et al. // Circ. Res.-2000-V.87-P.1133-1140.
4. Koren W.; Koldanov R.; Pronin V.S. et al. // Diabetologia-1997-V.40-N3-P.302-306.
5. Lucchesi P.A.; Berk B.C. // Cardiovasc. Res.-1995-V.29-N2-P.172-177.
6. Persson S.U.; Wohlfart G.; Larsson H.; Gustafson A. // Scand. J. Clin. Lab. Invest.-1996-V.56-P.183-190.
7. Pouyssegur J. et al. In: Haussinger D., ed. pH homeostasis. London, Academic press 1988; P. 61
8. Ritz E., Nowicki M., Fliser D., Homer D., Klimm H.P. // Kidney Int.-1994-V.46-Suppl. 47-P.S76-S80.
9. Rosskopf D., Fromter E., Siffert W. // J. Clin. Invest.-1993-V.92-P.2553-2559.
10. Siffert W.; Dusing R. // Basic Res. Cardiol.-1996- V.91- P.179-190.