

РАДАЕВА Марина Вячеславовна

**АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ
В НОРМЕ И ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ
НА ПРИМЕРЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА**

Специальность 03.00.04 – «Биохимия»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород 2008

Работа выполнена на кафедре клинической лабораторной диагностики в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «НИЖЕГОРОДСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ФЕДЕРАЛЬНОГО АГЕНТСТВА ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ И СОЦИАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ».

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор **Клавдия Николаевна Конторщикова**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук **Валентин Васильевич Анастасиев**

доктор медицинских наук, профессор **Геннадий Андреевич Бояринов**

Ведущая организация:

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального Образования «Самарский государственный медицинский университет Росздрава», г. Самара

Защита состоится «18» декабря 2008 г. в 15 часов на заседании диссертационного совета

Д 212.166.15 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, Н.Новгород, пр. Гагарина, д. 23, корп. 1, биологический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ННГУ им. Н.И. Лобачевского

Автореферат разослан «14» ноября 2008 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета, д.б.н., доцент

А.С. Корягин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

Метаболический синдром (МС) является одной из самых изучаемых патологий в мире в связи с тем, что сходные нарушения метаболизма связывают распространенные заболевания современного человека – атеросклероз, артериальная гипертензия, сахарный диабет 2 типа, ожирение. По современным представлениям МС характеризуется совокупностью нарушений системной, в том числе гормональной регуляции липидного, углеводного, белкового и других видов обмена веществ под действием внешних и внутренних факторов (Ройтберг Г.Е., 2007). Выделение МС имеет большое клиническое значение, поскольку, с одной стороны, это состояние является обратимым, с другой, важно решить вопрос о тактике ведения данного больного в связи с тем, что среди лиц с МС риск развития ишемической болезни сердца и/или инсульта в три раза выше, при этом значительно увеличивается смертность от сердечно-сосудистых заболеваний (13 против 2,2%).

Эффективность использования различных критериев для выявления МС неравнозначна, что делает необходимым обсуждение и проведение сравнительного анализа существующих критериев диагностики и требует дальнейшего, более глубокого изучения биохимических показателей при метаболическом синдроме.

Накопление продуктов липидного и углеводного обмена запускает реакции детоксикации, в том числе и свободно-радикальные процессы. Свободно-радикальные реакции направлены на поддержание гомеостаза, но при высокой интенсивности могут привести к развитию окислительного стресса.

Окислительный стресс является одним из тех стимуляторов, которые помогают включать клеточную адаптацию организма (Бурмистров и др., 1997; Дубинина, 1998; Del Maestro, 1980; Smith et al., 1991; Van der Vliet, Bast, 1992). Соотношение активности антиоксидантных систем и количества продуктов перекисидации может меняться в зависимости от состояния организма, влияния различных факторов сре-

ды. В здоровом организме поддерживается сбалансированное соотношение. Стрессорная реакция в норме может сопровождаться кратковременным подъемом АФК. Это обусловлено реакцией адаптации организма к экстремальным условиям, в которых АФК выполняют роль вторичных мессенджеров, участвуя в передаче сигнальной трансдукции, в экспрессии ряда генов. В результате обеспечивается своевременная мобилизация антиоксидантной защиты, которая обеспечивает снижение уровня реакционноспособных соединений, препятствуя тем самым проявлению их токсического действия.

Токсическое действие АФК проявляется при состояниях окислительного стресса, который сопровождается резкой интенсификацией свободно-радикальных процессов и снижением активности антиоксидантной защиты. Усиление свободно-радикальных процессов и развитие состояния окислительного стресса являются одним из патогенетических звеньев многих заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых, воспалительных, а также старения организма (Болдырев, 1995; Гусев, Скворцова, 2001; Дубинина, 2003; Дубинина и др., 1998; Зенков и др., 2001; Veal, 1997; Davies, 1995; Gibson, 2002).

Работ, посвященных исследованию свободно-радикального окисления при различных патологических состояниях, довольно много (Меньщикова и др., 2008). Однако данных о развитии окислительного стресса при метаболическом синдроме явно недостаточно, причем это касается, прежде всего, исследований активности антиоксидантных ферментов.

В последние годы для коррекции метаболических нарушений успешно применяются озоновые технологии (Бояринов Г.А. и др., 1999; Густов А.В. и др., 1999; Масленников О.В. и др., 2006, 2008; Bocci V., 1997; Viebahn-Hansler R., 1999). По данным Конторщиковой К.Н. и Перетягина С.П. (2006) основным действующим началом озона является нормализация про- и антиоксидантного баланса организма.

В то же время исследований, посвященных использованию озоновых технологий в коррекции нарушений метаболического синдрома, проведено недостаточно, в ос-

новном они касаются уже сформировавшихся осложнений – атеросклероза, сахарного диабета.

Цели и задачи исследования.

Целью данной диссертационной работы является изучение активности антиоксидантных ферментов при окислительном стрессе у больных с метаболическим синдромом до и после коррекции нарушений низкими терапевтическими дозами озона.

Соответственно поставленной цели решались следующие задачи.

1. Определить уровень основных биохимических показателей плазмы крови при метаболическом синдроме до и после коррекции нарушений.
2. Изучить активность антиоксидантных ферментов крови людей с метаболическим синдромом до и после лечения.
3. Исследовать интенсивность свободно-радикального окисления крови при метаболическом синдроме по данным биохемилюминесценции.
4. Проанализировать уровни продуктов перекисного окисления липидов и окисленно-модифицированных белков крови больных с метаболическим синдромом до и после коррекции
5. Исследовать активность фагоцитоза и измерить уровень оксида азота в крови больных с метаболическим синдромом до и после лечения.

Научная новизна.

Впервые при метаболическом синдроме изучено развитие окислительного стресса и охарактеризовано повышением уровней продуктов перекисного окисления липидов и окисленно-модифицированных белков.

Определен вклад в нарушение баланса про- и антиоксидантных систем оксида азота плазмы крови и состояния активности фагоцитоза.

Впервые у больных с метаболическим синдромом с помощью современных методов анализа выявлен дисбаланс в активности антиоксидантных ферментов – су-

пероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы до и после коррекции нарушений.

Практическая значимость работы:

Представлена эффективность использования унифицированных методов оценки активности антиоксидантных ферментов для контроля за коррекцией метаболических нарушений, как с помощью лекарственных препаратов, так и озонотехнологий с низкими дозами озона.

Полученные результаты дополняют имеющиеся данные по исследованию особенностей протекания метаболического синдрома в зависимости от проводимой коррекции.

Положения, выносимые на защиту.

1. Метаболический синдром характеризуется развитием окислительного стресса, проявляющегося разбалансировкой активности антиоксидантных ферментов и накоплением продуктов пероксидации белков (ОМБ) и липидов (ДК, ТК и ОШ).
2. Нарушение баланса про- и антиоксидантных систем при метаболическом синдроме обусловлено активацией фагоцитоза, выработкой оксида азота, повышенным уровнем липидов.
3. Нормализация ПОЛ в сыворотке крови под действием озона связана со снижением уровней основных биохимических показателей, коррекцией активности антиоксидантных ферментов, нормализацией фагоцитоза и уровня оксида азота.

Апробация работы.

Результаты работы представлены на 1 Азиатско-Европейской конференции (Казань, март 2007 г), на 2 Азиатско-Европейской конференции (Мисхор, Ялта, 2008),

7 Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Озон в биологии и медицине” (Нижний Новгород, 2007).

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 6 работ в ведущих отечественных журналах, рекомендованных ВАК и 1 тезисы доклада конференции.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа в объеме страниц состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы.

Диссертация иллюстрирована 7 рисунками и 21 таблицами. Библиографические указания включают 202 источника литературы (из них 116 отечественных и 86 иностранных).

Автор благодарит за совместную работу сотрудников кафедры клинической лабораторной диагностики Нижегородской государственной медицинской академии, а также врачей Медицинского центра ЗАО «Тополь», и прежде всего профессора, д.м.н. Масленникова Олега Викторовича и главного врача Грибкову Ирину Авенеровну; врачей Клинической городской больницы N5 и кандидата медицинских наук ассистента кафедры факультетской терапии НижГМА Григорьеву Наталью Юрьевну.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика обследуемых групп.

В основу работы положено исследование плазмы крови 75 человек, из них 60 пациентов относились по сочетанию критериев и поставленных диагнозов к симптомокомплексу «метаболический синдром». Для формирования данной группы были использованы критерии, разработанные в рамках проводимой экспертами Нацио-

нальной образовательной программы США Adult Treatment Panel 111 (АТР 111) и предложенные к использованию диабетической конференцией (International Diabetes Federation, 2005). Висцеральное ожирение, являющееся в данной программе главным критерием МС, отмечалось у всех 60 обследованных. У 42 человек имело место сочетание главного критерия и двух дополнительных, у 11 – кроме главного, еще трех дополнительных и у 7 – кроме главного, еще четырех критериев (табл. 1).

В первую (основную) группу вошли 25 человек с МС. В этой группе коррекция метаболических нарушений осуществлялась низкими дозами озона. Курс озонотерапии состоял из 6 процедур внутривенного введения озонированного физиологического раствора с концентрацией озона 300–400 мкг/л. (Руководство по озонотерапии, 2008).

Таблица 1

Диагностические критерии метаболического синдрома

Критерий	Висцеральное ожирение	Артер. гипертензия	Гипер-ТГ	Гипоаль ЛП	Глюкоза натощак выше 5,6 ммоль/л или СД
Количество больных	100%	65%	53%	57%	48%

Вторая группа (контроль) из 35 человек проходили лечение в Клинической городской больнице №5, где применялся комплекс препаратов, корригирующих уровень показателей липидного обмена, глюкозы и положительно воздействующих на вазодилатацию.

Нормой служила плазма крови 15 практически здоровых человек, сопоставимых по возрасту и полу группам больных.

Методы.

Всем обследованным в сыворотке крови измеряли уровень **глюкозы глюкозо-оксидазным методом, оценивали липидный профиль, включающий общий ХС,**

ТГ, ХС-ЛПНП, ХС-ЛПВП, стандартными тест-системами фирмы «Dyasys» (Германия) на биохимическом анализаторе «Ral Clima MC-15».

Количественное определение апо А₁, апо В и hs СРР осуществляли методом ИФА с использованием тест-систем фирмы «ROSHЕ» (Германия).

Оценку свободно-радикального окисления в плазме и эритроцитах крови проводили методом индуцированной хемилюминесценции (Кузьмина, 1983) на биохемилюминометре БХЛ-07, сопряженном с компьютером IBM. Из параметров хемилюминограммы учитывались I_{max}, S, tg (-2 α).

Определение продуктов пероксидации липидов в плазме и эритроцитах включало измерение уровней первичных продуктов – диеновых конъюгатов (ДК), вторичных – триеновых конъюгатов (ТК) и конечных продуктов оснований Шиффа (ОШ) по методу И.А. Волчегорского (1989).

Определение степени окислительной модификации белков по уровню карбонильных производных (Дубинина, 1995).

Определение фагоцитарной активности клеток крови осуществляли хемилюминесцентным методом (Владимиров Ю.А., Шерстнев М.П., 1989) с учетом суммарных показателей I_{max} (mv) и S (mv).

О концентрации оксида азота в крови судили по содержанию в плазме его конечных метаболитов – нитрита и нитрата как наиболее верифицированных маркеров оценки метаболизма оксида азота в организме человека. (П.П. Голиков и др., 2000)

Уровень антиоксидантной защиты оценивали по активности ферментов СОД, ГПО, ГЛР с помощью унифицированных тест-систем фирмы RANDOX (Англия) и каталазы по методу Дубининой Е.Е.

Парциальное давление кислорода (pO₂), углекислоты (PCO₂) и рН венозной крови определяли на радиометре ALB-555 (Дания).

Для статистической обработки полученных данных использовался лицензионный программный продукт Microsoft Excel Statistik 6.0. Результаты представлены в

виде $M \pm sd$, где M – средняя величина, σ – среднее квадратичное отклонение. Коэффициенты достоверности представлены по критерию Стьюдента (t).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение биохимических показателей, характеризующих метаболический синдром.

Поскольку в диагностике МС особое значение имеет оценка показателей углеводного и липидного обмена, в плазме крови измерялись уровни глюкозы, определялся липидный спектр, включающий уровни общего холестерина ХС, ХСЛПНП, ХСЛПВП, ТГ, КА, апо В, апо A_1 и апо A_1 /апо В. (табл. 2, 3).

Таблица 2

Уровни биохимических показателей плазмы крови при метаболическом синдроме и у практически здоровых ($M \pm \sigma$)

Группа обследованных	ХС общ	ТГ	ХСЛПНП	ХСЛПВП	КА	Глюкоза
Рекомен. уровни	<5,2	<1,7	<3,5	1,04–1,30	3	<5,6
Практ. здоровые, n=15	4,61±0,22	0,8±0,12	2,38±0,91	1,65±0,14	1,8	4,78±0,20
Метаболический синдром, n=60	6,57±0,20*	2,52±0,15*	4,3±1,1*	0,95±0,03*	5,7*	10,25±0,94*

*– достоверность различий по сравнению с рекомендуемым уровнем ($p \leq 0,05$)

Таблица 3

Уровни апопротеинов плазмы крови больных с метаболическим синдромом ($M \pm \sigma$)

Группы обследованных	апо В	апо A_1	апо A_1 / апо В
Больные МС, n=60	1,18±0,20*	1,29±0,30	1,093±0,09
Рекомен. уровень	< 0,5	1,1–1,9	>1,1

*– достоверность различий по сравнению с рекомендуемым уровнем ($p \leq 0,05$)

Исследование показателей липидного обмена продемонстрировало значительное увеличение уровня общего ХС у 77% больных более чем на 25% по сравнению с рекомендуемым уровнем. Повышение содержания ХСЛПНП отмечалось у 79% обследованных.

дованных с МС и достоверно отличалось от группы практически здоровых лиц. Напротив, содержание ХСЛПВП было снижено в 1,8 раз по сравнению со здоровыми людьми. Отсюда, коэффициент атерогенности (КА) у обследованных пациентов с МС равнялся 5,7 и тем самым превышал рекомендованный уровень почти в 2 раза.

Уровень ТГ оказался значительно повышен у 53% в среднем на 48% по сравнению с рекомендованным уровнем и более чем в 3 раза по сравнению с группой здоровых лиц. Тот факт, что гипертриглицеридемия выявлена только у половины обследованных с МС, можно предположить наличие других биохимических критериев данного состояния.

Содержание апоВ в среднем по всей группе обследованных с МС было повышено более чем в 2 раза, хотя отношение атерогенных и антиатерогенных апопротеинов не отличалось достоверно от рекомендуемого уровня.

По критериям АТР 111 уровни ТГ и ХСЛПВП, а именно отношение ТГ/ХСЛПВП можно использовать для косвенной оценки инсулинорезистентности, которая и лежит в основе развития МС. В работе Ройтберга Г.Е., 2007 приводится пороговое значение этого отношения, которое равняется 1,32. Нашими исследованиями было показано, что у практически здоровых лиц отношение ТГ/ХСЛПВП равнялось $0,48 \pm 0,12$, в то время как у больных с метаболическим синдромом было в 5 раз выше и в 2 раза превышало пороговую величину и составляло $2,65 \pm 0,98$. Полученные данные дают дополнительное подтверждение наличия метаболического синдрома у обследованных лиц.

Учитывая достоверное увеличение средних уровней ТГ, общего ХС, ХС ЛПНП и апо В при снижении ХС ЛПВП, можно с уверенностью говорить о наличии у обследованных больных атерогенных дислипидемий и связанном с этим высоким риском развития сердечно-сосудистых осложнений.

Известно, что при уровне hs СРБ, меньшем 1,0 мг/л, риск развития сердечно-сосудистых осложнений минимален, при 1,1–1,9 – низкий, при 2,0–2,9 – умеренный, а при более 3,0 мг/л – высокий. В нашей работе более, чем у половины обследованных с МС уровень этого показателя оказался достоверно повышенным и составлял в

среднем $3,6 \pm 0,8$ мг/л, что еще раз подтверждает наличие риска сердечно-сосудистых заболеваний.

Концентрация глюкозы плазмы крови натощак у обследованных с МС была повышена в среднем в 2 раза по сравнению с рекомендованным значением у 56% пациентов и по сравнению с группой практически здоровых лиц, что свидетельствует о выраженном нарушении углеводного обмена. Гипергликемия способствует гликированию различных белков, в том числе апопротеинов апо В и апо А₁. Гликирование апоА₁, основного апопротеина ЛПВП, нарушает функцию переноса ХС из тканей организма в печень и способствует прогрессированию атеросклероза. Накопление гликированных и насыщенных липидами ЛП приводит к тому, что они не могут поступать в ткани рецепторным путем, а начинают удаляться фагоцитирующими клетками. С функционированием фагоцитирующих клеток и высоким уровнем липидов связана интенсификация свободно-радикальных реакций и развитие окислительного стресса. Для подтверждения его наличия у больных с МС исследовали состояние про- и антиоксидантных систем.

Интегральная оценка СРО основывалась на анализе хемиллюминограммы плазмы крови и эритроцитов (табл. 4). У больных с МС величина I max была достоверно выше на 40% в плазме и на 31% в эритроцитах; S – повышена в плазме на 43%, а в эритроцитах на 21%; показатель tg(-2α) был выше нормы в плазме на 73% и в эритроцитах на 39%; отношение I max/S в плазме повышено на 10%.

Таблица 4

Параметры хемиллюминограммы плазмы крови и эритроцитов больных с метаболическим синдромом по сравнению с практически здоровыми ($M \pm \sigma$)

Объект анализа	Показатели			
	I max	S	tg(-2α)	I max/ S
Плазма крови n=60	17,57±4,8*	200,6±87,02*	4,86±2,70*	0,087±0,0091*
Норма, n=15	12,5±5,2	140,0±45,76	2,81±1,02	0,096±0,001
Эритроциты	15,85±6,61*	236,6±100,1*	3,51±2,07*	0,069±0,0087

n=60				
Норма, n=15	13,51± 3,4	215±95,72	2,53±1,98	0,0063±0,0059

* – достоверность различий по сравнению с нормой ($p \leq 0,05$).

Активация свободно-радикальных реакций в крови компенсировалась антиоксидантной защитой до тех пор, пока не происходила разбалансировка антиоксидантных ферментов (табл. 5): активность СОД в эритроцитах больных с МС снижалась по сравнению с практически здоровыми лицами на 77% , каталазы на 34% при увеличении активности ГПО в 3 раза и ГЛР в 2 раза. Достоверное снижение активности СОД и каталазы явилось одной из причин развития окислительного стресса, поскольку данные ферменты ответственны за удаление первичных АФК – супероксидного анион-радикала и перекиси водорода. Чрезмерно высокая активность ГПО и ГЛР объясняется большим количеством образовавшихся при окислительном стрессе продуктов липопероксидации.

Таблица 5

Активность антиоксидантных ферментов эритроцитов больных с метаболическим синдромом по сравнению с практически здоровыми ($M \pm \sigma$)

Группа обследованных лиц	СОД	КАТ	ГПО	ГЛР
МС, n=60	0,0042±0,000173*	67,33±10,76*	373,6±278,2*	104,2±44,9*
Практ. здоровые, n=15	0,018±0,0012	99,033±11,60	109±10,2	54,0±15,3

• *– достоверность различий по сравнению с нормой ($p \leq 0,05$).

Для уточнения причин активации свободно-радикальных реакций в крови анализировали состояние фагоцитоза. У обследованных с МС в среднем по группе активность фагоцитоза в цельной крови была достоверно повышенной по сравнению с практически здоровыми: показатель I_{max}- в 1,88 раза, показатель S – в 2,76 раза, что свидетельствовало об активации системы, направленной на детоксикацию накопившихся измененных соединений, в том числе гликированных, насыщенных липидами и подвергшихся окислительной модификации.

В активации свободно-радикального окисления плазмы крови принимают участие NO-радикалы. NO[•] синтезируется как эндотелиальными, так и фагоцитирующими клетками. Эндотелиальный NO – основной вазодилатор, препятствующий тоническому сокращению сосудов нейронального, эндокринного или локального происхождения. NO вызывает релаксацию гладкой мускулатуры сосуда, угнетает адгезию и агрегацию тромбоцитов, макрофагальную активность. Снижение его синтеза эндотелиальными клетками может быть связано с факторами риска атеросклероза, такими как СД, гипертония, гиперхолестеринемия.

Макрофагальный NO является провоспалительным фактором: при активации транскрипции фермента цитокинами синтез NO возрастает в десятки раз. В наших исследованиях уровень оксида азота определялся по содержанию конечных продуктов – нитратов. Поэтому полученные данные представляют суммарный ответ всех видов NO-синтаз.

В результате установлено, что у 80% обследованных с МС имело место достоверное увеличение количества нитратов в среднем до $30,95 \pm 10,5$ мк моль/л при норме 21–24 мк моль/л, что свидетельствовало об активации воспалительных процессов в кровеносных сосудах данной категории больных. У 20% обследованных с МС содержание нитратов было достоверно снижено до $14,05 \pm 11,8$ мк моль/л, что свидетельствовало об отсутствии выраженных воспалительных реакций и снижении функции эндотелиальной NO-синтазы. Значение коэффициента корреляции между показателями фагоцитоза S и средним уровнем оксида азота равняется +0,67 и указывает на их взаимосвязь через работу фагоцитирующих клеток.

Развитие окислительного стресса с нарушением общей антиоксидантной активности и разбалансировки активности антиоксидантных ферментов вызывает окисление субстратов крови и прежде всего белков и липидов.

Окислительная модификация белков признается в настоящее время не только одним из ранних, но и наиболее надежных индикаторов поражений тканей при свободно-радикальных реакциях.

При анализе крови больных с МС выявлено значительное повышение ОМБ при всех длинах волн, а именно, при 356 нм – в 6,7 раз; при 363 нм – в 6,8 раз; при 370 нм – в 6,7 раз. Наиболее выраженные изменения отмечались при 430 нм – в 13,2 раза и при 530 нм – в 58,8 раз (табл. 6).

Таблица 6

Уровень окисленно-модифицированных белков плазмы крови больных метаболическим синдромом по сравнению с практически здоровыми ($M \pm \sigma$)

Группы обследованных	356 нм	363 нм	370 нм	430 нм	530 нм
Метаболический синдром, n=50	99,85±21,57*	100,39±32,31*	99,78±34,75*	82,90±28,95*	67,10±18,96*
Практ. здоровые, n=15	14,07±0,08	14,66±0,08	14,81±0,06	6,28±0,01	1,14±0,04

* – достоверность различий по сравнению с нормой ($p \leq 0,05$).

Основными молекулярными продуктами свободно-радикального окисления липидов являются первичные – ДК, вторичные – ТК и конечные – ОШ. В плазме крови больных МС содержание всех продуктов было достоверно повышено по сравнению с группой практически здоровых лиц: ДК – на 21%, ТК – на 16% и ОШ – почти в 5 раз. В эритроцитах, соответственно, содержание ДК было повышено на 31%, ТК- на 34% и ОШ более, чем в 6 раз (табл. 7).

Таблица 7

Содержание продуктов перекисного окисления липидов плазмы крови и эритроцитов у больных метаболическим синдромом по сравнению с практически здоровыми ($M \pm sd$)

Показатели	ДК	ТК	ОШ	Ош/ДК+ТК
Плазма крови, n=50	0,195±0,061	0,11±0,051*	39,34±12,30*	128,9±45,1*
Норма, n=15	0,165±0,051	0,04±0,001	3,25±0,25	19,2±3,9
Эритроциты, n=50	0,210±0,175	0,210±0,193	62,29±40,41*	148,3±52,3*
Норма, n=15	0,152±0,091	0,149±0,082	10,11±4,61	40,3±10,9

* – достоверность различий по сравнению с нормой ($p \leq 0,05$).

Коэффициент ОШ/ДК+ТК, отражающий направленность процесса в сторону образования токсичных соединений Ош, в плазме был повышен более, чем в 6 раз, а в эритроцитах – в 3,2 раза.

При анализе корреляционных взаимоотношений между показателями антиоксидантных ферментов и продуктами пероксидации достоверно значимыми оказались корреляции между активностью фермента ГПО и уровнями молекулярных продуктов ПОЛ: ДК, ТК и ОШ. Отрицательный знак коэффициента корреляции свидетельствует о накоплении соответствующих продуктов ДК и ТК при снижении активности данных ферментов.

Наличие достоверно значимых коэффициентов корреляции между продуктами окисления липидов – ДК, ТК и ОШ и белков (ОМБ) свидетельствовало о том, что пероксидации были подвержены и липиды и белки.

Исследование влияния низких терапевтических доз озона на биохимические показатели крови больных с МС.

В основной группе больным с МС проводили монотерапию озоном без назначения других лекарственных средств. Поэтому в наших исследованиях озонотерапию можно рассматривать как альтернативный метод лечения и профилактики осложненный МС.

При коррекции метаболических нарушений как озоном, так и лекарственными препаратами, отмечались достоверные изменения исходных величин. Наиболее выраженные различия в изменении показателей больных двух сравниваемых групп наблюдались только для показателей уровня глюкозы. У больных обеих групп отмечалось снижение: при назначении стандартной терапии, включающей специальные сахароснижающие препараты – на 21%, в основной группе – только на 5%.

Через три недели после начала лечения показатели, характеризующие липидный профиль, в плазме крови больных основной контрольной групп достоверно снижались. При этом отмечалось снижение на 5 % уровня общего холестерина при повы-

шении содержания ХС ЛПВП также на 5%, что сказывалось на достоверном снижении значения КА с 6, 4 до 5,4. Достоверное снижение ТГ наблюдалось у 62% больных МС в 1 группе (на 49%) и у 67% – во 2 группе (на 51%). Изменение уровней ТГ у больных обеих групп, имеющих изначально нормальные показатели, проходило в референсных пределах.

После проведенного курса монотерапии озоном в среднем по всей группе больных с метаболическим синдромом имело место достоверное снижение в плазме крови содержания белка, основного для ЛПНП – апоВ – на 8% и, соответственно, величины отношения апоА₁/апоВ также на 8% (таб. 8). Сходные изменения отмечались и в плазме крови больных контрольной группы, в лечении которых применялась стандартная терапия.

Таблица 8

Уровни апопротеинов больных метаболическим синдромом до и после лечения

Группы обследованных		Показатели		
		апоА ₁	апоВ	апоА ₁ /апоВ
Лечение озоном, n=25	До лечения	1,29±0,91	1,18±0,81	1,093±0,85
	После лечения	1,29±0,98	1,09±0,74*	1,183±0,77*
Стандартное лечение, n=35	До лечения	1,28±0,87	1,19±0,89	1,091±0,67
	После лечения	1,27±0,83	1,08±0,77*	1,182±0,71*

* – достоверность различий по сравнению с уровнями до лечения.

При анализе уровней высокочувствительного С-реактивного белка в среднем у больных обеих сравниваемых групп после проведенного лечения имело место снижение с 3,3 мг/л до 2, 7 мг/л. (см. рисунок). Полученные данные указывали на противовоспалительные эффекты озона, сравнимые с таковыми при стандартной терапии.

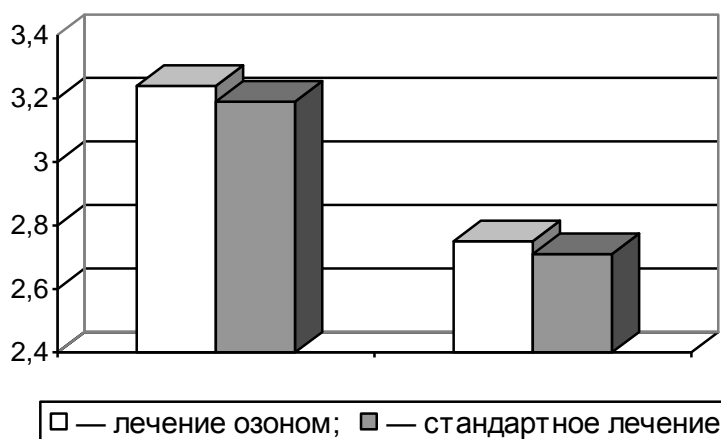


Рис.1. Уровень hs-CRP в плазме крови больных МС до и после лечения

При оценке влияния двух видов лечения на показатели окислительного стресса продемонстрировано следующее. Показатели свободно-радикального окисления – Im-ax и S имели тенденцию к снижению и в плазме и в эритроцитах, тогда как достоверное повышение показателя tg-2 до нормы свидетельствовало об увеличении активности неферментативного звена антиоксидантной защиты в обеих группах больных.

Снижение уровней ДК и ТК и в плазме и в эритроцитах больных МС обеих групп также имело характер тенденции. В то же время и в плазме и в эритроцитах количества ОШ-токсичного продукта у больных из основной группы достоверно снижалось, тогда как в контрольной группе, достоверно повышалось (табл. 9 и 10).

Таблица 9.

Уровни молекулярных продуктов в плазме крови больных метаболическим синдромом до и после лечения ($M \pm \sigma$)

Группы обследованных		ДК	ТК	ОШ
Лечение озоном, n=25	До лечения	0,17±0,059	0,09±0,034	25,4±11,55
	После лечения	0,15±0,047	0,10±0,032	21,9±10,81*
Стандартное лечение, n=35	До лечения	0,22±0,066	0,13±0,067	48,62±25,207
	После лечения	0,20±0,067	0,10±0,054	53,76±52,152*

*– достоверность различий по сравнению с уровнями до лечения ($p \leq 0,05$).

Уровни молекулярных продуктов в эритроцитах больных
метаболическим синдромом до и после лечения ($M \pm \sigma$)

Группы обследованных		ДК	ТК	ОШ
Лечение озоном, n=25	До лечения	0,19±0,148	0,25±0,245	97,51±40,81
	После лечения	0,19±0,086	0,20±0,022*	81,91±39,18*
Стандартное лечение, n=35	До лечения	0,23±0,21*	0,17±0,14*	27,08±19,006
	После лечения	0,24±0,15	0,14±0,11	54,22±30,68*

* – достоверность различий по сравнению с уровнями до лечения ($p \leq 0,05$).

Что касается показателей ОМБ в среднем крови у больных с МС из контрольной группы после лечения стандартной терапией изменений не обнаружено. У больных с МС из основной группы под действием озонотерапии происходило достоверное снижение уровней карбонильных производных на всех длинах волн (табл. 11).

Таблица 11

Уровень ОМБ плазмы крови больных МС до и после лечения ($M \pm \sigma$)

Группа обследо- ванных		Длина волн				
		356 nm	363 nm	370 nm	430 nm	530 nm
Лечение озоном, n=25	До лечения	15,58±1,05	15,85±1,12	15,86±1,18	7,25±0,52	1,82±0,15
	После ле- чения	12,34±0,84*	12,53±0,89*	12,48±0,93*	5,95±0,46*	1,36±0,12*
Стандарт- ное лече- ние, n=35	До лечения	12,30±0,53	12,65±0,54	12,61±0,57	5,96±0,38	1,34±0,22
	После ле- чения	12,12±0,81	12,31±0,74	12,36±0,73	5,95±0,46	1,28±0,24

* – достоверность различий по сравнению с уровнями до лечения ($p \leq 0,05$).

У больных с МС и в контрольной, и в основной группе в среднем отмечалось достоверное повышение активности СОД на 251 % и на 12%, соответственно. Сходная направленность отмечается и при исследовании активности каталазы: в контрольной группе повышение составляет 200% и в группе с монотерапией озоном – 14,5%. Активность ферментов ГПО и ГЛР в обеих группах снижалась достоверно,

что можно объяснить снижением количества гидроперекисей ДК + ТК в крови больных из обеих групп (табл. 12).

Таблица 12

Активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах обследованных с МС до и после лечения ($M \pm \sigma$)

Группы обследованных		КА	СОД	ГПО	ГЛР
Лечение озоном, n=25	До лечения	67,33±23,1	0,0042±0,00173	373,6±278,20	104,2±44,9
	После лечения	95,93±30,4*	0,054±0,00182*	328±178,31*	81±27,35*
Стандартное лечение, n=35	До лечения	68,09±27,5	0,0060±0,00163	243,7±99,86	105,1±31,88
	После лечения	123,4±42,6*	0,0154±0,0249*	188,8±104,50*	91,47±31,00*

* – достоверность различий по сравнению с уровнями до лечения ($p \leq 0,05$).

После проведенного курса монотерапии озоном с низкими терапевтическими дозами отмечалась коррекция уровней оксида азота. У больных с МС с высокими уровнями NO имело место снижение с 35, 52±6,98 до 24,83±4,32 мкмоль/л, у 20% больных исходные уровни 12,85±5,21 мкмоль/л, напротив, повысились до 25, 14±6,12 мкмоль/л.

Показатели активности фагоцитоза цельной крови снижались после проведенного курса озонотерапии: I max – в 1, 5 раза и S – в 7 раз, что было даже ниже, чем у практически здоровых людей и соответствовало снижению уровней токсичных продуктов липопероксидации – ОШ и измененных белков (табл. 13). У больных контрольной группы достоверных изменений в показателях активности фагоцитоза не отмечалось.

Таблица 13

Показатели фагоцитоза у больных с метаболическим синдромом до и после лечения озоном ($M \pm \sigma$)

Группы обследованных	I max	S
До лечения, n=25	359,67±154,43*	260892,0±97102*

После лечения, n=15	203,05±96,53	36943,2±34338
---------------------	--------------	---------------

* – достоверность различий по сравнению с уровнями до лечения ($p \leq 0,05$).

Монотерапия больных метаболическим синдромом из основной группы заключалась во внутривенном введении озono-кислородной смеси в составе озонированного физиологического раствора. Чтобы оценить, как изменяются в результате такого лечения показатели газов, в крови, взятой из кубитальной, вены определялось парциальное напряжение кислорода (pO_2) и углекислого газа (pCO_2), а также pH. В исходных пробах крови обследованных лиц с диагнозом МС средние уровни показателей pH были достоверно ниже нормы ($p \leq 0,05$). Это свидетельствовало о накоплении в организме продуктов закисления внутренней среды в результате гипоксических нарушений метаболизма. Подтверждением явилось снижение в 2 раза величины pO_2 . О нарушении аэробных реакций в тканях свидетельствовало снижение в 1,5 раза уровня $pC O_2$ крови.

После проведения курса озонотерапии показатель pH повысился до уровня нормы, что указывало на улучшение работы ферментных систем, зависящих от величины данного параметра. Отмечалось достоверное увеличение показателя pO_2 на 30% и показателя pCO_2 на 12,5% , что свидетельствовало об улучшении снабжения тканей кислородом и только частичном восстановлении аэробных процессов, поскольку полного восстановления исследуемых параметров за анализируемый период в 3 недели не отмечалось.

Таким образом, анализ биохимических показателей плазмы крови и эритроцитов больных с метаболическим синдромом, леченных стандартными лекарственными препаратами или озоном в виде озонированного физиологического раствора, выявили более выраженную коррекцию баланса антиоксидантных ферментов, нормализацию свободно-радикальных реакций и уровней продуктов окисления белков (ОМБ) и липидов (ДК, ТК и ОШ) при монотерапии озоном.

Следствием улучшения метаболических показателей после проведенной терапии, явилось и улучшение клинического состояния больных. У обследованных из кон-

трольной группы хорошие результаты лечения имели место у 88 % больных, у 12% – неудовлетворительные. У больных с МС, в лечении которых применялось внутривенное введение озонированного физиологического раствора с низкими терапевтическими концентрациями, хорошие результаты отмечались у 90% , удовлетворительные у 10% при отсутствии неудовлетворительных.

В связи с вышесказанным можно утверждать, что интересным и важным представляется углубленное изучение различных сторон метаболизма при МС. В последнее время важную роль в патогенезе и прогрессировании метаболических нарушений придают интенсификации свободно-радикальных процессов. Важно отметить, что окислению подвергаются не только липиды, но и белки, в том числе белковые компоненты ферментов, рецепторов, ионных каналов плазматических мембран, определяющих возможность нормального функционирования различных клеток и тканей в целостном организме. Кроме того, МС характеризуется рядом нарушений липидного обмена, включающих гипертриглицеридемию. Эти показатели могут служить важными критериями в диагностике МС, а также в контроле за эффективностью проводимого лечения.

Данное исследование было посвящено изучению при метаболическом синдроме активности антиоксидантных ферментов и связанных с изменением их состояния свободно-радикальных реакций.

Обнаруженный дисбаланс в активности основных антиоксидантных ферментов СОД, каталазы, ГПО, ГЛР, снижении общего пула неферментативной антиоксидантной защиты при повышенных показателях свободно-радикального окисления позволило сделать заключение о развитии окислительного стресса при метаболическом синдроме.

В наших исследованиях развитие указанного варианта окислительного стресса подтверждалось достоверным увеличением активности фагоцитоза, повышением в среднем, хотя и не у всех больных, уровней оксида азота. В результате имело место значительное увеличение в крови продуктов пероксидации белков и липидов, в том

числе и в эритроцитах. Вследствие этого ухудшается транспорт кислорода в ткани, его полноценная утилизация, что отражается на показателях газов крови и рН крови.

При анализе биохимических показателей крови больных с МС после проведенного лечения выявлена идентичность в коррекции уровней липидограммы, hs- СРБ в обеих сравниваемых группах. Однако в отношении уровней глюкозы более эффективным (в 4 раза) оказалось стандартное лечение с применением сахароснижающих препаратов больными с сахарным диабетом 2 типа.

Оба варианта лечения оказались сравнимыми в коррекции большинства показателей окислительного стресса. В обеих группах имела место тенденция к снижению показателей свободно-радикального окисления и продуктов перекисидации липидов. Принципиальным отличием явилось более резкое увеличение активности СОД и каталазы у больных контрольной группы, что можно объяснить дополнительной интоксикацией организма больных производными лекарственных препаратов и дополнительной активностью систем детоксикации с выработкой АФК и, соответственно, и антиоксидантных ферментов, контролирующих их уровень. Подтверждением этому явилось повышение у больных контрольной группы после лечения количества ОШ и в плазме и в эритроцитах и неизменностей количества ОМБ. Использование озонотерапии оказалось более эффективным для коррекции токсических проявлений окислительного стресса. Имело место достоверное снижение до нормы показателей фагоцитоза и оксида азота, коррекция в балансе антиоксидантных ферментов, снижении уровней токсических продуктов перекисидации липидов и белков, что положительно в свою очередь отразилось на функционировании эритроцитов, в частности, их кислородтранспортной функции.

На основании проведенных исследований можно заключить, что использование озона в лечении больных с МС сопоставимо в эффективности коррекции показателей метаболизма и окислительного стресса со стандартной терапией и даже превосходит по некоторым параметрам. В связи с этим использование озонированного физиологического раствора может представлять как монотерапию, так и дополнительным к стандартной терапии при высоких уровнях глюкозы.

Выводы:

1. При метаболическом синдроме имеют место следующие нарушения:
 - достоверное по сравнению с нормой увеличение уровня глюкозы в 2 раза;
 - выраженные дислипидемии, проявляющиеся повышением уровней общего ХС, ТГ, апо В, ХСЛПНП при снижении ХСЛПВП;
 - повышение на 90% значения коэффициента атерогенности;
 - увеличение количества hs- СРБ на 180%.
2. После проведенного курса лечения больных с метаболическим синдромом как в основной группе с монотерапией озоном, так и в контрольной группе со стандартной терапией, отмечалась достоверная нормализация уровней липидов, апо В и hs- СРБ. Исключением явилось более выраженное снижение уровней глюкозы в контрольной группе.
3. Метаболический синдром характеризуется развитием окислительного стресса, проявляющегося разбалансировкой про- и антиоксидантных систем организма.
4. Активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах больных метаболическим синдромом до лечения отличается нарушением баланса: активность СОД и каталазы достоверно снижена на 77% и 34%, соответственно, активность ГПО и ГЛР, напротив, повышена на 300% и 200%.
 Внутривенная озонотерапия способствует восстановлению баланса антиоксидантных ферментов, а именно повышению активности СОД и каталазы и снижению ГПО и ГЛР. При стандартной терапии динамика изменения активностей ферментов сходная, но отличается резким увеличением активности СОД и каталазы.
5. Активация свободно-радикального окисления в крови больных с МС проявляется достоверным повышением параметров хемилуминограммы: I_{max} на 40% в плазме и на 30% в эритроцитах; S – на 43% и на 21%, соответственно; tg -2α соответственно, в плазме и в эритроцитах, на 73% и 30%.

После проведенного лечения больных из основной и контрольной групп наблюдается тенденция к снижению величин показателей I_{\max} и S в обеих группах. Значение $tg - 2\alpha$ достоверно доходит до нормы в обеих группах, что косвенно свидетельствует о снижении количества и активности неферментативных антиоксидантов.

6. Развитие окислительного стресса при метаболическом синдроме в большей степени связано с активностью фагоцитоза и уровнем оксида азота, величины которых повышаются по сравнению с нормой, соответственно для фагоцитоза I_{\max} – в 1,88 раза, S – в 2,76 раз; уровень NO в среднем в 1,5 раза.

После проведенного лечения в группе больных из основной группы активность фагоцитоза снижается до нормы, в контрольной группе не изменяется. Содержание оксида азота у больных в обеих группах с исходно сниженным уровнем повышается, что, предположительно, свидетельствует об активации эндотелиальной – NO синтазы, при исходно высоких, напротив, снижается только в основной группе, что, возможно, связано с его макрофагальным происхождением.

7. Следствием активации свободно-радикальных реакций в крови больных с метаболическим синдромом является значительное увеличение количества продуктов пероксидации белков и липидов:

- содержание ОМБ, соответственно, для различных группировок аминокислот увеличивается от 6,7 до 58,8 раз;
- содержание продуктов липопероксидации: ДК – на 21%, ТК – на 16%, конечных продуктов ОШ – почти в 5 раз.

После проведенного лечения в основной группе больных с МС отмечается тенденция к снижению уровней ДК и ТК. После лечения озоном в плазме и эритроцитах уровни ОШ достоверно снижаются, в крови больных контрольной группы достоверно повышаются.

Уровни ОМБ остаются в течении трех недель наблюдения без изменений в крови больных контрольной группы, в крови больных основной группы после озонотерапии достоверно снижаются.

Список сокращений:

- 2,4-ДНФГ – 2,4-динитрофенилгидразин
 АГ – артериальная гипертония
 АОС – антиоксидантная система
 АФК – активные формы кислорода
 ИБС – ишемическая болезнь сердца
 ИР – инсулинорезистентность
 ЛП – липопротеины
 ЛПВП – липопротеины высокой плотности
 ЛПНП – липопротеины низкой плотности
 ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности
 ЛППП – липопротеины промежуточной плотности
 МДА – малоновый диальдегид
 ДК – диеновые конъюгаты
 ТК – триеновые конъюгаты
 ОШ – основания Шиффа

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Масленников О.В. Озонотерапия в лечении и профилактике осложнений сахарного диабета / О.В. Масленников, М.В. Ведунова, И.А. Грибкова, **М.В. Радаева** // Казанский медицинский журнал. – 2007. - №4. - т. 88, приложение. – с. 140-141.
2. Конторщикова К.Н. Патогенетические механизмы лечебного воздействия озона на организм человека. Оценка эффективности использования озоновых технологий у больных метаболическим синдромом / К.Н. Конторщикова, М.В. Ведунова, **М.В. Радаева**, И.Е. Окрут. // Харьковська хірургічна школа. – 2007. - №3 (26). – т. 4. – с. 26-27.
3. Масленников О.В. Озонотерапия при заболеваниях, ассоциированных с атеросклерозом / О.В. Масленников, М.В. Ведунова, И.А. Грибкова, **М.В. Радаева** // Казанский медицинский журнал. – 2007. - №4. - т. 88, приложение. – с. 128-130.
4. Радаева М.В. Состояние перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы как показатель эффективности и безопасности озонотерапии / **М.В. Радаева**, К.Н. Конторщикова, Е.Ф. Королева // Казанский медицинский журнал. – 2007. - №4. - т. 88, приложение. – с. 129-131.

5. Контрщикова К.Н. Озонотерапия в коррекции обменных нарушений при метаболическом синдроме / К.Н. Контрщикова, М.В. Ведунова, **М.В. Радаева**, Е.Ф. Королева // Вестник физиотерапии и курортологии. – 2008. - № 5. – с.35-37.

6. Масленников О.В. Сахарный диабет и атеросклероз. Применение озонотерапии / О.В. Масленников, М.В. Ведунова, И.А. Грибкова, **М.В. Радаева** // Вестник физиотерапии и курортологии. – 2008. - № 5. – с.98-100.

7. Радаева М.В. Состояние антиоксидантной и детоксицирующих систем при коррекции метаболических нарушений малыми дозами озона / **М.В. Радаева**, М.В. Ведунова, К.Н. Контрщикова // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского – 2008. - № 2. – с. 100-102.