

Экспериментальные статьи

ШЕСТАКОВА С. А., МИТРЕЙКИН В.Ф.,  
ГРИГОРЕНКО Г. А.

## Состояние антиоксидантного статуса тромбоцитов как показатель окислительного стресса в ткани головного мозга при сахарном диабете

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова  
e-mail: ggrigorenko2006@yandex.ru

### Реферат

При экспериментальном сахарном диабете параллельно с увеличением срока заболевания отмечены прогрессирующее снижение буферной емкости системы антиокислительной защиты (САЗ) в ткани головного мозга крыс за счет истощения ферментативных и неферментных компонентов и одновременно активация процесса пероксидации липидов. Сходные изменения системы САЗ и уровня липопероксидации обнаружены в тромбоцитах больных диабетической невропатией. Длительное введение  $\alpha$ -липоевой кислоты оказало положительное влияние на исследованные показатели САЗ и уровень малонового диальдегида в ткани головного мозга и в тромбоцитах. Обсуждается возможность использования антиокислительного статуса тромбоцитов как показателя окислительного стресса в нервной ткани головного мозга.

**Ключевые слова:** окислительный стресс, сахарный диабет, головной мозг, тромбоциты, антиокислительная защита, пероксидация липидов.

Shestakova S. A., Mitreykin V. F., Grigorenko G. A.

## The antioxidant status of platelet as an indicator of oxidative stress in diabetic brain tissue

Saint-Petersburg Pavlov State Medical University  
e-mail: ggrigorenko2006@yandex.ru

### Abstract

In experimental diabetes mellitus the increase of disease noted a progressive reduction of the buffer capacity of antioxidant protection system in brain tissue of rats due to depletion of enzymatic and nonenzymatic components and simultaneously to activate the process of lipids peroxidation. Similar changing of antioxidant system and peroxidation level found in platelets of patients with diabetic neuropathy. A long introduction of tiotic acid has had a positive effect on the studied indicators of antioxidant protection and level of MDA in brain tissue and platelets. Discusses the possibility of using platelets antioxidant status data as an indicator of oxidative stress in brain neural tissue. **Keywords:** oxidative stress, diabetes mellitus, brain, antioxidative protection, lipids peroxidation.

**Keywords:** oxidative stress, diabetes mellitus, brain, platelets, antioxidative protection, lipid peroxidation.

### Введение

Поражение различных отделов нервной системы является частым осложнением сахарного диабета (СД), приводящим больных к ранней инвалидизации. Одним из ключевых звеньев в патогенезе неврологических осложнений СД является состояние окислительного стресса, формирующееся вследствие возникновения прооксидантно-антиоксидантного дисбаланса в клетках нервной ткани и способное вызвать их окислительное повреждение [3, 9, 12].

В связи с известными трудностями изучения указанных процессов в ткани головного мозга у больных диабетической невропатией, особое значение приобретают исследования, выполненные на экспериментальных моделях СД, позволяющие отслеживать в динамике состояние системы антиоксидантной защиты (САЗ) и свободнорадикального окисления

в головном мозге животных. Показано повышение уровня интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) и снижение некоторых компонентов системы антиоксидантной защиты в ткани головного мозга у крыс с СД 1 типа [4, 9, 11]. Однако роль отдельных компонентов в общей буферной емкости САЗ и последовательность их изменений на этапах становления и прогрессирования неврологических осложнений СД остаются неясными.

Требуется также своего решения и важный для клиницики вопрос об установлении и использовании периферических маркеров развивающегося в ткани головного мозга окислительного стресса у больных диабетической невропатией с целью оценки его тяжести и контроля эффективности проводимой терапии. В этом отношении привлекают внимание тромбо-

циты периферической крови как легко доступный для исследований материал, который может служить в определенных отношениях адекватной моделью некоторых возбудимых клеток, в первую очередь, серотонинергических нейронов в центральной нервной системе (ЦНС) [14, 15].

Возможность использования тромбоцита в качестве модели центрального серотонинергического нейрона обосновывается наличием у них сходных свойств, таких как возбудимость, обмен и транспорт биологических активных веществ — серотонина, катехоламинов и простагландинов, механизмы функционирования рецепторных систем и ряда ферментов, наличие сходных систем метаболизма липидов и внутриклеточных посредников секреции, включая  $Ca^{++}$ , метаболиты фосфоинозитидного пути и простаноиды [13, 15].

Высказано предположение об общности происхождения тромбоцитов (мегакариоцитов) и серотонинергических нейронов из эмбриональной эктодермы [13], чем можно отчасти объяснить сходства у тромбоцита и нейрона. Все это позволило рассматривать тромбоциты у людей с рядом психоневрологических расстройств, в основе которых лежит нарушение серотонинергических механизмов в ЦНС (мигрень, эндогенные психозы и др.), в качестве модели серотонинергического нейрона [15]. В то же время нельзя не отметить, что сходства тромбоцита с нейроном выходят за пределы общих для них механизмов захвата, депонирования и секреции биогенных аминов. Сходные системы механизма липидов, в частности, простаноидов, позволяют предположить наличие общих закономерностей в развитии процессов ПОЛ и регулирующей их интенсивности САЗ в тромбоците и нейроне и, следовательно, возможность использования тромбоцита как модели нейрона в аспекте формирования окислительного стресса.

Для проверки этой гипотезы мы поставили перед собой следующие задачи:

1) исследовать состояние антирадикального и антиперикисного звеньев САЗ и интенсивность ПОЛ (по уровню МДА) в ткани головного мозга у крыс в динамике течения СД;

2) исследовать состояние отдельных компонентов системы антиоксидантной защиты и процессов ПОЛ в тромбоцитах у больных СД 1 типа с нейропатией;

3) оценить влияние  $\alpha$ -липовой кислоты, обладающей выраженными антиоксидантными свойствами, на состояние компонентов САЗ и уровень ПОЛ в ткани головного мозга крыс с СД и в тромбоцитах больных диабетической нейропатией;

4) сопоставить показатели САЗ и ПОЛ в тромбоцитах больных диабетической нейропатией и в ткани головного мозга крыс с СД до и после воздействия  $\alpha$ -липовой кислотой.

#### Материал и методы исследования

Опыты выполнены на 70 нелинейных белых крысах-самцах массой 180–240 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. СД 1 типа моделировали введением 5 %-го раствора аллоксана — 170 мг/кг подкожно. Тяжесть СД оценивали по уровню

гликемии натошак глюкометром («Глюкотренд», «Рош Диагностика», Швейцария), глюкозурии (тест-полоски «Lachema», Чехия) и по изменению массы тела. В опыт брали крыс с выраженными признаками СД через 30, 60 и 90 суток после введения аллоксана. Группе крыс с СД сроком 60 суток вводили раствор этилендиаминовой соли  $\alpha$ -липовой кислоты эспа-липон («Эспарма», Германия) — 100 мг/кг внутрибрюшинно ежедневно в течение 1 месяца. Группу сравнения составили животные с СД сроком 90 суток, не получавшие эспа-липона. Крыс декапитировали под легким эфирным наркозом, на холоде извлекали кусочки ткани из фронтопариетальных отделов мозга, из которых готовили 10 %-й гомогенат на фосфатном буфере pH 7,8.

В полученных гомогенатах измеряли содержание малонового диальдегида (МДА) согласно [1] и выражали в нмоль МДА/мг липидов. Общие липиды определяли фосфорно-ванилиновым методом (наборы Bio-latest, Chemapol, Чехия).

Активность ферментов в гомогенатах определяли спектрофотометрически: супероксиддисмутазы (СОД) — как описано в работе [5] и выражали в условных единицах/мг белка; глутатионпероксидазы (ГП) — с использованием глутатионредуктазы по убыли НАДФН в ходе реакции разложения перекиси водорода при  $\lambda=340$  нм, глутатионредуктазы (ГР) — по убыли НАДФН в реакции восстановления окисленного глутатиона [10] и выражали в мкмоль НАДФН/мин на мг белка. Белок определяли по Лоури. Антирадикальную активность (АРА) в гомогенатах определяли по изменению оптической плотности раствора устойчивого свободного радикала дифенилпикрилгидразила (ДФПГ) после добавления к нему антиоксиданта при  $\lambda=517$  нм [16]. Клинические исследования выполнены на 56 больных СД 1 типа обоего пола, средний возраст —  $36,5 \pm 4,8$  года. Контрольную группу составили 20 практически здоровых доноров, средний возраст которых составил  $25,3 \pm 3,7$  года. Больные были скомпенсированы по схеме интенсивной инсулинотерапии: среднесуточная доза инсулина —  $31,7 \pm 7,4$  МЕ.

Данное исследование являлось открытым, рандомизированным, контролируемым. Включались больные СД 1 типа с диабетической периферической полинейропатией. 36 больных получали лечение  $\alpha$ -липовой кислотой (эспа-липон): внутривенный курс — капельно в дозе 600 мг/сутки в течение 14 суток и затем пероральный курс в той же дозе — 60 суток.

Для получения тромбоцитов из венозной крови, взятой из локтевой вены и стабилизированной цитратом, обогатенную тромбоцитами плазму центрифугировали трижды при 2000 об./мин по 10 минут, отмывая осадок трис-HCL-буфером с глюкозой и ЭДТА. Затем осадок резурспендировали в трис-HCL-буфере и готовили гомогенат, в котором определяли содержание МДА и активность компонентов САЗ указанными выше методами.

Результаты исследования обработаны на персональном компьютере IBM PC с использованием пакета прикладных программ Windows XP.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Результаты исследования и их обсуждение

У крыс на 30-е сутки развития СД содержание МДА в гомогенатах мозга было на 27 % выше, чем у контрольных (в контроле — 0,89–0,050,  $p=0,008$ ). В дальнейшем отмечался прогрессирующий рост уровня МДА, достигший максимума на 90-е сутки СД, когда он в 1,9 раза превысил уровень МДА в контрольной группе ( $p=0,001$ ) (рис. 1).

Активность СОД в гомогенатах мозга на 30-е сутки развития СД незначительно повысилась. Однако уже на 60-е сутки она снизилась по сравнению с таковой в контроле (11,6–0,67, в контроле — 12,1–0,81,  $p=0,008$ ), а на 90-е сутки была в 1,8 раза ниже, чем в контрольной группе ( $p=0,001$ ) (рис. 1). Активность глутатионпероксидазы в ранние сроки СД не отличалась от контрольных значений. Снижение ее активности отмечено только на 90-е сутки заболе-

вания (0,83–0,07, в контроле — 1,41–0,18,  $p=0,035$ ) (рис. 2).

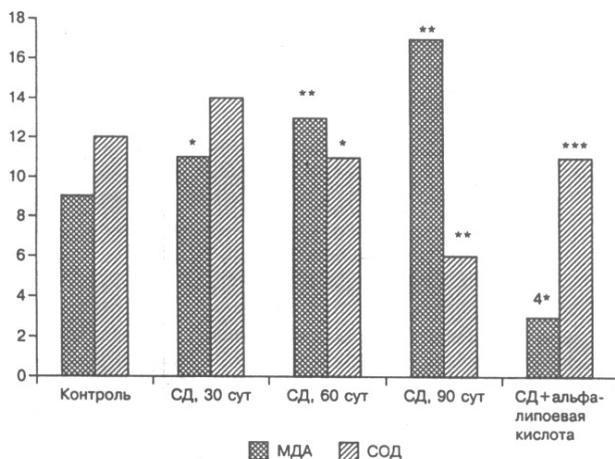
Активность глутатионредуктазы в ткани мозга была на 34 % ниже, чем в контроле, уже на 30-е сутки СД (в контроле 11,6–1,13,  $p=0,031$ ), и это снижение сохранялось во все последующие сроки СД (рис. 2).

Состояние неферментативного звена САЗ, определяемое по общей АРА, в ткани мозга на 30-е сутки СД проявилось некоторым ее ростом. На 60-е сутки СД величина АРА не отличалась от контрольных значений, а на 90-е сутки она снизилась в 2,6 раза по сравнению с контролем (в контроле 0,74–0,22,  $p=0,005$ ) (рис. 2).

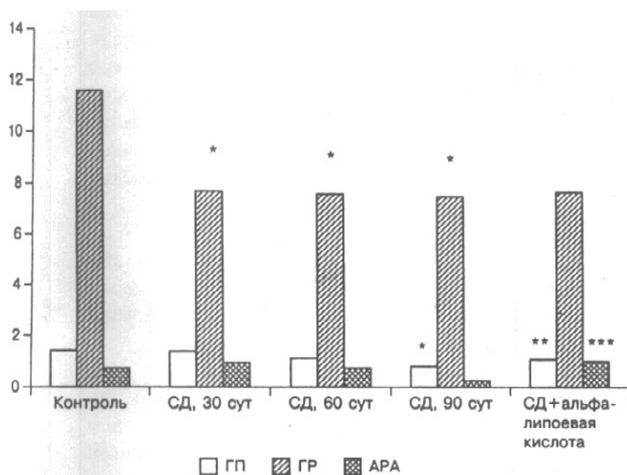
Введение крысам с СД сроком 60 суток эспалипона оказало положительный эффект на состояние САЗ в ткани мозга: повысилась активность СОД в 1,8 раза ( $p=0,006$ ), глутатионпероксидазы — на 32 % ( $p=0,024$ ), АРА — в 3,6 раза ( $p=0,008$ ) по сравнению с показателями у крыс, не получавших эспалипона (рис. 1; 2). Одновременно уровень МДА снизился в 2,7 раза по сравнению с соответствующим контролем ( $p=0,001$ ) (рис. 1). Данные о повышении образования МДА в ткани мозга крыс с СД, подтвержденные в работах [4, 8, 12], указывают на интенсификацию процессов ЛП, которая, судя по динамике изменений МДА, начинается рано и достигает в течение 3 месяца двукратного увеличения по сравнению с контролем. Повышенная генерация активных форм кислорода, обеспечившая усиление процессов ЛП, облегчается тем, что индуцированные гипергликемией процессы гликирования белков, сопряженные с автоокислением, и связывание конечных продуктов гликирования с рецепторами [12] происходят в клетках нервной ткани с их особенностями химического состава, метаболизма и функционирования [7].

Как показало наше исследование, нарастание процессов ЛП сочетается со снижением буферной емкости САЗ, наиболее выраженным в поздние сроки течения СД за счет ферментативных и неферментативных ее компонентов. При этом доля их участия оказывается неравноценной, а последовательность вовлечения в формирование недостаточности САЗ неодинаковой.

Активность СОД, которая является ключевым ферментом САЗ на раннем этапе образования свободных радикалов [7], после незначительного подъема, по-видимому, адаптивного характера, в течение 3 месяцев снижается почти в 2 раза. Это снижение, вероятно, обусловлено инактивацией фермента из-за его гликирования и фрагментации [6] и ускоренным функциональным изнашиванием при избыточной генерации супероксидного радикала. В отличие от СОД, уменьшение активности ГП происходит только на 90-е сутки, и, следовательно, его вклад в снижение возможностей САЗ существенен на более поздних этапах СД. Поскольку в ткани мозга ГП содержится во всех клеточных органеллах, где осуществляет антиперекисную защиту, а действие каталазы ограничено ее локализацией в редких пероксиосомах, снижение активности ГП должно вносить особенно большой вклад в развитие недостаточности САЗ. Уменьшение



**Рис. 1.** Уровень МДА (нмоль на 1 мг липидов×10<sup>-1</sup>) и активность СОД в динамике течения СД: \* —  $p \leq 0,01$ ; \*\* —  $p \leq 0,001$  по сравнению с контролем; \*\*\* —  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*\* —  $p \leq 0,001$  по сравнению с группой животных с СД на 90-е сутки



**Рис. 2.** Активность ГП, ГР и АРА в гомогенатах мозга крыс в динамике течения СД: \* —  $p \leq 0,05$  по сравнению с контролем; \*\* —  $p \leq 0,05$ ; \*\*\* —  $p \leq 0,01$  по сравнению с группой животных с СД на 90-е сутки

## Состояние системы антиоксидантной защиты и перекисного окисления липидов в тромбоцитах у больных с диабетической невропатией и у здоровых доноров

Таблица 1

Компонент системы антиоксидантной защиты и ПОЛ	Здоровые доноры (контроль)	Больные с диабетической невропатией	После лечения $\alpha$ -липоевой кислотой	
			внутривенный курс (14-е сутки)	пероральный курс (60-е сутки)
СОД, усл. ед./мг белка	0,92±0,007	0,56±0,11*	0,74±0,14***	0,79±0,09***
АРА, мкэкв/мг белка	90,57±8,6	50,46±6,56*	57,4±9,92***	67,1±5,41***
Глутатион вост., мкмоль/мг белка	2,73±0,38	1,79±0,67*	2,21±0,68***	2,23±0,44***
Глутатион окисл., мкмоль/мг белка	0,35±0,09	0,49±0,02	0,14±0,03*	0,2±0,05***
МДА, нмоль/мг белка	0,37±0,05	1,28±0,22**	1,09±0,18***	0,74±0,13***

\* —  $p < 0,01$ ; \*\* —  $p < 0,001$ ; \*\*\* —  $p < 0,05$ .

ее активности, вероятно, обусловлено окислительной модификацией фермента в условиях некомпенсированного окислительного стресса. Кроме того, она может лимитироваться нарастающим дефицитом глутатиона, на что указывает согласованная динамика изменений активности ГП и ГР. Уже на 30-е сутки СД активность ГР снижалась, опережая изменения ГП, что свидетельствует о торможении регенерации глутатиона.

Снижение активности ГР, положительно коррелирующее с уменьшением содержания восстановленного глутатиона в ткани мозга, обнаружено у крыс со стрептозоциновым диабетом [11]. Регенерация глутатиона лимитируется и дефицитом NADPH из-за усиления его расхода при активизации полиолового пути метаболизма глюкозы при СД [12]. В уменьшение буферной емкости САЗ в поздние сроки СД еще более весомый вклад вносит падение АРА.

Таким образом, в развитие патологических процессов ткани головного мозга при СД согласованно вовлекаются разные компоненты САЗ. При этом они последовательно подвергаются деградации и истощению, что приводит к прогрессированию дефицита резервных возможностей САЗ и привносит в динамику формирования ее недостаточности эффект взаимоусиливающего влияния, а не просто суммации. Соответственно, в ткани мозга наблюдаются прогрессирующие проявления окислительного стресса, приводящего к структурным нарушениям.

Выявленные на ультраструктурном уровне повреждения клеточных элементов в ткани головного мозга у крыс усиливались в динамике течения СД, коррелируя со степенью выраженности окислительного стресса и достигая наибольших изменений в более отдаленные сроки СД [2]. Для оценки состояния САЗ и уровня интенсивности ПОЛ у больных с диабетической невропатией было проведено определение содержания МДА и активности антиокислительных ферментов и неферментных компонентов САЗ в тромбоцитах (табл. 1).

Как видно из данных табл. 1 выявлено значимое увеличение более чем в 3 раза уровня содержания МДА в тромбоцитах больных СД, свидетельствующее о повышении интенсивности процессов ПОЛ. Одновременно обнаружено статистически достоверное снижение компонентов САЗ: активности СОД — в 1,6 раза, антирадикальной активности — 1,8 раза, содержания восстановленного глутатиона — в 1,5 раза. Следовательно, в тромбоцитах больных СД существенно снижена общая антиоксидантная защита, как за счет ферментативного звена (СОД), так и неферментных компонентов САЗ (АРА, восстановленная форма глутатиона), что отражается на степени интенсификации ПОЛ.

У больных, получивших курс лечения  $\alpha$ -липоевой кислотой, отмечена положительная динамика в виде уменьшения интенсивности ПОЛ (снижение уровня МДА в 1,7 раза как после внутривенного, так и после окончания курса перорального приема  $\alpha$ -липоевой кислоты (табл. 1). Активность СОД и АРА повышались на протяжении всего курса лечения. Уровень глутатиона в большей степени изменился после внутривенного курса, на что указывает увеличение в 4 раза глутатионового индекса, характеризующего баланс восстановленного и окисленного глутатиона. Необходимо отметить, что, хотя и наступило улучшение показателей САЗ под влиянием лечения, однако они не достигли численных значений, соответствующих показателям здоровых доноров.

Полученные данные об изменении антиокислительного статуса тромбоцитов и усилении в них процессов ПОЛ у больных СД с невропатией имеют двойное значение. Во-первых, тромбоциты как составляющая тромбоцитарно-сосудистого гемостаза оказывают существенное влияние на процессы формирования эндотелиальной дисфункции, нарушения микроциркуляции и гемореологии, т. е. усугубляют нарушения сосудистого компонента патогенеза диабетической невропатии. Во-вторых, изменение антиоксидантного статуса тромбоцитов происходит в том

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

же направлении, что и в нервной ткани головного мозга диабетических крыс.

Сравнительный анализ полученных результатов, характеризующих состояние САЗ и уровень ПОЛ в тромбоцитах у больных СД и в нервной ткани диабетических крыс, показал однонаправленный характер возникших при СД изменений: снижение общей буферной емкости САЗ и повышение интенсификации ПОЛ, что создает условия для формирования состояния окислительного стресса. Используемая  $\alpha$ -липоевая кислота также оказала сходное влияние на исследуемые показатели в тромбоцитах и в нервной ткани мозга: улучшила, но не нормализовала показатели САЗ. Исключение составило АРА, характеризующее неферментное звено САЗ, которое даже несколько превысило контрольные значения в нервной ткани крыс с СД.

Положительное действие  $\alpha$ -липоевой кислоты в клинике, подтвержденное данными [3, 12], как и

в эксперименте, обусловлено ее множественными эффектами, в первую очередь, антиоксидантным действием (кроме замещающего эффекта,  $\alpha$ -липоевая кислота участвует в регенерации других естественных антиоксидантов — аскорбиновой кислоты и  $\alpha$ -токоферола), метаболическим действием (улучшение функции ферментов цикла трикарбоновых кислот, утилизации глюкозы) и др. [12].

Таким образом, однонаправленность изменений компонентов САЗ и уровня ПОЛ в ткани головного мозга животных с СД и в тромбоцитах больных диабетической нейропатией, а также сходство положительного эффекта  $\alpha$ -липоевой кислоты на показатели САЗ в тромбоцитах и в нервной ткани расширяют представления о тромбоците как модели серотонинергического нейрона и обосновывают возможность использования антиоксидантного статуса тромбоцитов в качестве показателя состояния САЗ центрального нейрона и, следовательно, окислительного стресса в нервной ткани головного мозга.

## Литература

1. *Вопросы мед. химии.* — 1987. — Т. 33. — №1. — С. 118–122.
2. *Вопросы мед. химии.* — 1990. — Т. 36. — № 2. — С. 88–91.
3. *Журн. неврол. психиатр.* — 2000. — № 10. — С. 57–64.
4. *Метаболическая терапия в кардиологии, эндокринологии и неврологии: Материалы междунар. симп.* — СПб., 1998. — С. 25–29.
5. *Проблемы эндокринологии.* — 1993. — Т. 39. — № 5. — С. 40–43.
6. *Проблемы эндокринологии.* — 2006. — Т. 52. — № 5. — С. 37–43.
7. *Успехи физиол. наук.* — 2003. — Т. 34. — № 3. — С. 21–34.
8. *Acta Chem. Scand.* — 1963. — Vol. 17. — № 13. — P. 1635–1640.
9. *Beutler, E. Red Cell Metabolism / E. Beutler.* — N.-Y.; London, 1975.
10. *Biochem. J.* — 1991. — Vol. 279. — P. 263–267.
11. *Cephalalgia.* — 1988. — Vol. 8. — № 1. — P. 7–23.
12. *Diabet. Metab. Res. Rev.* — 2001. — Vol. 17. — P. 189–212.
13. *Diabetologia.* — 2001. — Vol. 44. — P. 1973–1988.
14. *Immunol. Cell Biol.* — 1994. — Vol. 72. — № 2. — P. 109–114.
15. *Metabolism.* — 1993. — Vol. 65. — № 11. — P. 1435–1439.
16. *Rec. Adv. Neuropsychopharm.* — 1981. — Vol. 31. — P. 203–211.