

Клиническая медицина

УДК 616.831-005.1-06 + 615.203+615.38

Статус антиоксидантной и прооксидантной систем при остром ишемическом инсульте, отягощенном и неотягощенном сахарным диабетом

Г.В. Цаканова¹, В.А. Айвазян¹, А.С. Бояджян¹,
Э.А. Аракелова¹, Г.С. Григорян²

¹Институт молекулярной биологии НАН РА

²Научно-медицинский центр «Святой Григорий Просветитель»
МЗ РА

0014, Ереван, ул. Асратяна, 7

Ключевые слова: ишемический инсульт, диабет, антиоксиданты, гидроперекиси липидов

Поражения церебральных структур при сосудистой ишемии головного мозга происходят в результате последовательного нарастания комплекса патологических расстройств на молекулярно-клеточном уровне, обусловленных снижением уровня кислорода артериальной крови, с одной стороны, и с другой – токсическим воздействием интермедиатов недоокисленного кислорода – окислительным стрессом. Окислительный стресс играет важную роль в патогенезе острого ишемического инсульта (ИИ). Образование свободных радикалов и последующее повреждение ими тканей являются одним из существенных факторов, определяющих тяжесть протекания и исход ИИ [1, 7, 10]. Высокое содержание в мозговой ткани полиненасыщенных жирных кислот, наиболее подверженных индуцируемой свободными радикалами пероксидации, и ионов железа, катализирующих генерацию свободных радикалов, на фоне относительно низкого содержания ферментов, катализирующих нейтрализацию свободных радикалов, делает этот орган наиболее уязвимым к окислительному стрессу [4, 6, 8]. Вследствие нарушения структурно-функциональной целостности гематоэнцефалического барьера у больных ИИ, индуцируемые ишемией деструктивные процессы находят свое отражение и на системном уровне и регистрируются как в спинномозговой жидкости, так и кровотоке [2, 11].

С другой стороны, известно, что поздние осложнения диабета, в частности диабетические ангиопатии церебральных артерий, приводят

к нарушению микроциркуляции и способствуют развитию ишемии мозга. Сахарный диабет является одним из факторов риска ИИ, и распространенность ИИ, тяжесть его протекания и частота летальных исходов среди больных диабетом намного выше, чем у тех, кто им не страдает [3, 12]. Сравнительный анализ молекулярных механизмов, ответственных за развитие индуцируемых ишемией деструктивных процессов у больных ИИ, отягощенным и неотягощенным сахарным диабетом, может в значительной степени повысить эффективность прогнозирования, профилактики и лечения ИИ у больных сахарным диабетом.

В настоящей работе проведен сравнительный анализ функционального статуса антиоксидантной системы организма и интенсивности индуцируемого оксидативным стрессом процесса перекисного окисления липидов в крови больных ИИ, неотягощенным и отягощенным сахарным диабетом типа 2 (ИИд). В исследование были также вовлечены здоровые лица (ЗЛ) в качестве контроля.

Материал и методы

Среднестатистическая характеристика исследуемых групп представлена в табл. 1.

Таблица 1

Среднестатистическая характеристика исследуемых групп

Исследуемая группа	ИИ	ИИд	ЗЛ
п	39	35	38
Возраст (M±σ), лет	69±9	69±9	55±9
Женщины/ мужчины	13/26	11/24	21/17

Среди больных ИИ у 7 пациентов наблюдался кардиоэмболический инсульт, а у 32 – атеротромбоэмболический. У 5 больных зона инфаркта была локализована в стволовой части мозга, а у 34 – в корково-подкорковых участках полушарий головного мозга. 27 пациентов страдали атеросклерозом, 17 – артериальной гипертонией, 9 – ишемической болезнью сердца, 4 – застойной сердечной недостаточностью и 8 – мерцательной аритмией. Среди больных ИИд у 7 пациентов наблюдался кардиоэмболический инсульт, у 28 – атеротромбоэмболический, у 5 больных зона инфаркта была локализована в стволовой

части мозга, а у 30 – в корково-подкорковых участках полушарий головного мозга. 33 пациента страдали атеросклерозом, 16 – артериальной гипертонией, 6 – ишемической болезнью сердца, 12 – застойной сердечной недостаточностью и 7 – мерцательной аритмией. Средняя давность заболевания диабетом у больных ИИД составляла 11 ± 7 лет ($M \pm \sigma$). У всех больных ИИД наблюдались ангио- и невропатии, характерные для поздних этапов развития диабета.

Больные ИИ и ИИД находились на лечении в НМЦ «Святой Григорий Просветитель» МЗ РА. Диагностирование больных проводилось врачами вышеотмеченного центра согласно Международной классификации болезней (10-е издание; МКБ-10). Группу ЗЛ (без наследственной отягощенности ИИ, инфарктом миокарда и сахарным диабетом) составили сотрудники НАН РА. Никто из субъектов исследования не страдал онкологическими или аутоиммунными заболеваниями, не переносил инфаркт миокарда, острых инфекционных заболеваний и не подвергался хирургическим операциям как минимум за 12 месяцев до забора крови. Все субъекты дали согласие предоставить кровь для проведения настоящего исследования. На проведение последнего было также получено разрешение Комитета по этике Института молекулярной биологии НАН РА.

Забор крови проводили в 9:00 часов натощак пункцией из локтевой вены. У больных ИИ и ИИД забор крови проводили на первый день от начала инсульта. Пробы сразу помещали в лед, затем центрифугировали при 3000g в течение 10 минут и отбирали сыворотку, которую использовали в последующих экспериментах. Образцы сыворотки хранили при -30° С.

Общую активность неферментативных низкомолекулярных водорастворимых антиоксидантов в сыворотке крови определяли фотохемилюминесцентным анализом на приборе Photochem (Analytik Jena AG, Germany). Определение проводили при использовании коммерческого набора соответствующих реагентов (ACW; Analytik Jena AG, Germany), включающего в качестве фотосенсибилизатора люминол и аскорбиновую кислоту в качестве стандарта. Антиоксидантная активность автоматически рассчитывалась программным обеспечением прибора Photochem в эквивалентных единицах концентрации аскорбиновой кислоты (ммоль/л).

Определение ферроксидазной активности церулоплазмينا в сыворотке крови проводили ранее описанным методом, при использовании в качестве субстрата железистого сульфата аммония (соль Мора) [5]. Активность выражали в микромолях продукта (железный сульфат аммония), образующегося в 1 л сыворотки за 1 мин (мкмоль/л/мин^{-1}).

Количественное содержание гидроперекисей липидов в сыворотке

крови, как показатель интенсивности процесса перекисного окисления липидов, определяли ранее описанным методом [9] и выражали в единицах оптической плотности при длине волны 480 нм (А480).

Статистическую обработку полученных данных, включающую непараметрический U-тест Манна-Уитни и корреляционный анализ Спирмена, проводили, используя программный пакет «SPSS-13». Значения $p < 0,05$ были приняты как статистически достоверные.

Результаты и обсуждение

Среднестатистические значения определенных нами параметров для всех четырех групп исследуемых лиц представлены в табл. 2.

Следует отметить, что нами не было выявлено какой-либо статистически достоверной корреляции между значениями определяемых параметров, с одной стороны, и возрастом и полом субъектов исследования, с другой.

Таблица 2

Показатели оксидативного стресса и функциональной активности антиоксидантной системы ($M \pm \sigma$) в сыворотке крови больных ИИ, ИИд и ЗЛ

Исследуемая группа (n)	Содержание гидроперекисей липидов, А480	Общая активность низкомолекулярных водорастворимых антиоксидантов, ммоль/л	Ферроксидазная активность церулоплазмينا, мкмоль/л/мин ⁻¹
ИИ (39)	0,09 ± 0,03	3,4 ± 1,1	475 ± 107
ИИд(35)	0,12 ± 0,04	2,8 ± 0,9	574 ± 129
ЗЛ (38)	0,03 ± 0,01	2,5 ± 0,8	429 ± 94

Примечание. Значения p даны в тексте

Результаты настоящего исследования показали значительное статистически достоверное повышение уровней гидроперекисей липидов в сыворотке крови в обеих группах больных по сравнению с группой ЗЛ. Так, у больных ИИ содержание гидроперекисей липидов в среднем в 3 раза, а у больных ИИд – в 4 раза превышает аналогичный пока-

затель ЗЛ ($p < 0,0001$). Повышенное содержание гидроперекисей липидов в крови у больных ИИ и ИИд является показателем интенсификации процесса перекисного окисления липидов, индуцируемого окислительным стрессом, характерным для патогенеза инсульта [1, 10]. Более высокие уровни гидроперекисей липидов в крови у больных ИИд, по сравнению с больными ИИ (в 1,3 раза, $p < 0,05$), по-видимому, и являются одним из факторов, определяющим более тяжелое протекание инсульта при его осложнении диабетом [3, 12].

Что касается общей активности низкомолекулярных водорастворимых антиоксидантов в сыворотке крови, то у больных ИИ она в среднем в 1,4 раза достоверно превышала эту активность у ЗЛ и в 1,3 раза таковую больных ИИд ($p < 0,0001$). У больных ИИд этот показатель достоверно не отличался от характерного для ЗЛ значения ($p > 0,05$).

В случае ферроксидазной активности церулоплазмينا статистически достоверные изменения наблюдались лишь у больных ИИд. Согласно полученным данным, в сыворотке крови больных ИИд ферроксидазная активность церулоплазмينا в среднем в 1,3 раза выше, чем в случае ЗЛ, а также больных ИИ ($p < 0,0001$). У больных ИИ этот показатель достоверно не отличался от характерного для ЗЛ значения ($p > 0,05$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что одним из компенсаторных механизмов в ответ на окислительный стресс при инсульте является повышение функциональной активности антиоксидантной системы. Причем, если в случае ИИ активация наблюдается на уровне низкомолекулярных неферментативных компонентов этой системы, то в случае ИИд активируется церулоплазмин – антиоксидант ферментативной природы. Иными словами, механизмы компенсаторного ответа на окислительный стресс на уровне антиоксидантов при ИИд отличны от таковых, наблюдаемых при ИИ. Очевидно, что характерные для патогенеза диабета сдвиги на метаболическом и молекулярно-клеточном уровне приводят к нарушению компенсаторных механизмов, обеспечивающих защиту организма от окислительного стресса при участии низкомолекулярных водорастворимых антиоксидантов неферментативной природы. Несмотря на то, что полученные нами данные не позволяют ответить на вопрос о том, каким образом характерные для патогенеза диабета сдвиги приводят к нарушению вышеотмеченных компенсаторных механизмов, результаты настоящего исследования наглядно демонстрируют необходимость применения низкомолекулярных водорастворимых антиоксидантов для повышения эффективности лечения ИИд.

**Հակաօքսիդանտային և պրոօքսիդանտային համակարգերը
շաքարախտով բարդացած և առանց շաքարախտի սուր իշեմիկ
կաթվածի ժամանակ**

**Գ.Վ. Յականովա, Վ.Ա. Այվազյան, Ա.Ս. Բոյաջյան,
Է.Ա. Առաքելովա, Գ.Ս. Գրիգորյան**

Աշխատանքում համեմատվել են հակաօքսիդանտային համակարգի ֆունկցիոնալ ակտիվությունը և լիպիդների պերօքսիդացման գործընթացի ինտենսիվությունը երկրորդ տիպի շաքարախտով բարդացած և առանց շաքարախտի իշեմիկ կաթվածով հիվանդների մոտ:

Ստացված արդյունքները վկայում են, որ շաքարախտով բարդացած կաթվածի ժամանակ լիպիդների պերօքսիդացման գործընթացները ավելի ինտենսիվ են ընթանում քան առանց շաքարախտային բարդացումների կաթվածի դեպքում, ինչը, ըստ երևույթին, այն որոշիչ գործոններից է, որոնք պատասխանատու են կաթվածի ավելի ծանր կլինիկական ընթացքի համար շաքարախտով հիվանդների մոտ՝ համեմատած նրանց հետ, ովքեր շաքարախտով չեն տառապում: Տույց է տրված նաև, որ շաքարախտով բարդացած կաթվածի ժամանակ ի պատասխան օքսիդատիվ սթրեսին զարգացող կոմպենսատոր մեխանիզմները՝ հակաօքսիդանտների մակարդակով, տարբերվում են այն կոմպենսատոր մեխանիզմներից, որոնք նկատվում են առանց շաքարախտային բարդացումների կաթվածի դեպքում: Ստացված տվյալները վկայում են շաքարախտով բարդացած կաթվածի բուժման համար ջրալուծ ցածր մոլեկուլային զանգված ունեցող հակաօքսիդանտների կիրառման կարևորության մասին:

State of antioxidant and pro-oxidant systems in acute ischemic stroke complicated and non-complicated by diabetes mellitus

**G.V. Tsakanova, V.A. Aivazyan, A.S. Boyajyan, E.A. Arakelova,
G.S. Grigoryan**

In the work a comparative analysis of the functional activity of antioxidant system and intensity of lipid peroxidation process in ischemic stroke patients complicated and non-complicated by diabetes mellitus type 2 was performed. The results obtained suggest that stroke complicated by diabetes is characterized by higher intensity of the lipid peroxidation process as compared to stroke non-complicated by diabetes, that, probably, is one of the determining factors responsible for more severe clinical course of strokes in patients with diabetes mellitus compared to

those, who are not suffering from diabetes. It is also shown that mechanisms of the compensatory response to oxidative stress on the level of antioxidants in stroke patients complicated by diabetes differ from those detected in stroke non-complicated by diabetes. The data obtained testify to the importance of application of low molecular weight water soluble antioxidants in treatment of stroke complicated by diabetes.

Литература

1. Скворцова В.И., Нарциссов Я.Р., Бодыхов М.К. и др. Оксидантный стресс и кислородный статус при ишемическом инсульте. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2007, 107(1), с. 30-36.
2. Baskaya M.K., Muralikrishna A., Dogan R.A. et al. The biphasic opening of the blood-brain barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats. *Neuroscience Letters*, 1997, 226: 33-36.
3. Bonow R.O., Gheorghade M. The diabetes epidemic: a national and global crisis. *American Journal of Medicine*, 2004, 8 (116 Suppl. 5A): 2S-10S.
4. Chan P.H. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke*, 1996, 27, p. 1124-1129.
5. Erel İ. Automated measurement of serum ferroxidase activity. *Clinical Chemistry*, 1998, 44: 2313-2319.
6. Evans P.H. Free radicals in brain metabolism and pathology. *British Medical Bulletin*, 1993, 49, p.577-587.
7. Lee J.M., Ziffel G.J., Choi D.N. The changing landscape of ischemic brain injury mechanisms. *Nature*, 1999, 399, p.A7-A14.
8. McCord J.M. Iron, free radicals, and oxidative injury. *Journal of Nutrition*, 2004, 134, p.3171S-3172S.
9. Mihaljevi B., Ra B.K., Ra D. The reevaluation of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanistic aspects of the response. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996, 21(1), 1996, p.53-63.
10. Ozkul A, Akyola A., Yenisey C., Arpacic A., Kiyiloglu N., Tataroglu C. Oxidative stress in acute ischemic stroke. *Journal of Clinical Neuroscience*, 2007, 14(11), p.1062-1066.
11. Stanimirovic D.B. Mediators of inflammation and blood-brain barrier permeability in cerebral ischemia. In: *Progress in Inflammation Research*, (Parnham M.J., Ed.), Birkhäuser Verlag, Basel (Switzerland), 2001, p.253-267.
12. Tuomilehto J., Rastenyte D., Jousilahti P. et al. Diabetes mellitus as a risk factor for death from stroke. Prospective study of the middle-aged Finnish population. *Stroke*, 1996, 27(2):210-215.