

Н. П. Микаелян^{1, 2*}, В. В. Потемкин³, А. А. Терентьев¹, И. О. Кулаева², Е. Ю. Францева³

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МЕМБРАН КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1-ГО ТИПА И ПРИ ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2-ГО ТИПА

¹Кафедра биологической химии лечебного факультета, ²НИЛ патологии сердечно-сосудистой системы, ³кафедра эндокринологии лечебного факультета РНИМУ им. Н. И. Пирогова, Москва

*Микаелян Нина Погосовна, д-р биол. наук, проф. каф., гл. научн. сотрудник НИЛ патологии сердечно-сосудистой системы; 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1; E-mail: ninmik@yandex.ru

♦ В основе метаболической недостаточности у больных СД 1-го типа и впервые выявленным СД 2-го типа лежит угнетение аэробного синтеза АТФ вследствие активации гликолитических процессов, возрастание концентрации лактата и развитие ПОЛ. Нарушение равновесия в системе ПОЛ—АОЗ на фоне дислипидемии и возрастание уровня лактата свидетельствуют о развитии окислительного стресса, особенно выраженного при СД 2-го типа. Снижение степени утилизации глюкозы эритроцитами и ингибирование активности K^+ , Na^+ -АТФазы указывает на снижение чувствительности клеток к инсулину. Изменения изучаемых показателей зависят от типа диабета и длительности течения заболевания. Полученные нами данные отражают общеприспособительные механизмы в развитии заболевания, которые способствуют адаптации к отрицательному влиянию активных форм кислорода.

Ключевые слова: инсулиновые рецепторы, утилизация глюкозы клетками, ферменты-антиоксиданты, глюкозоинсулиновый гомеостаз, метаболический статус

N.P. Mikayelyan, V.V. Potiyemkin, A.A. Terentyev, I.O. Kulayeva, Ye.Yu. Frantzeva

THE PATHOGENIC MECHANISMS OF DERANGED FUNCTIONAL ACTIVITY OF CELL MEMBRANES IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE I AND PRIMARILY DETECTED DIABETES MELLITUS TYPE II

The chair of biochemistry, the medical department of N.I. Pirogov Russian national research medical university, Moscow
The research laboratory of cardio-vascular system pathology of N.I. Pirogov
Russian national research medical university, Moscow

The chair of endocrinology, the medical department of N.I. Pirogov Russian national research medical university, Moscow

♦ In patients with diabetes mellitus type I and primarily detected diabetes mellitus type II the metabolic deficiency inherently occurs of aerobic synthesis of ATP as a result of glycolytic processes activation, lactate concentration increase and lipid peroxidation development. The misbalance in the lipid peroxidation-antioxidant defense system against the background of dyshyperlipemia and lactate concentration increase testifies the development of oxidative stress, especially marked under diabetes mellitus type II.

The degree decrease of glucose utilization by erythrocytes and inhibition of activity of K^+ , Na^+ -ATPase indicate the desensitivity of cells to insulin. The alterations of under study indicators depend on diabetes type and duration of disease course. The findings reflect the manifestation of common adaptive mechanisms in disease development which promote the adaptation to the negative impact of active forms of oxygen.

Key words: insulin receptor, glucose utilization by cells, enzyme-antioxidant, glucose-insulin homeostasis, metabolic status

Сахарный диабет (СД) является одной из важнейших медико-социальных проблем вследствие высокой распространенности, ранней инвалидизации и сокращения продолжительности жизни больных. Изучение механизмов инсулиновой регуляции, этиологии и патогенеза СД, поиски новых методов лечения проводятся в мире очень широко и интенсивно. В последнее время главные задачи исследований — переход от диагностики диабета к его предсказанию, от лечения к предупреждению диабетических осложнений [1].

Результаты многих исследований, в частности испытания DCCT (The DiaControl and Complication Trial), свидетельствуют о том, что одной из основных причин развития поздних сосудистых осложнений диабета является гипергликемия [1, 9]. Однако молекулярные механизмы, определяющие взаимосвязь между нарушением гомеостаза глюкозы и развитием диабетических ангиопатий, окончательно не ясны. Накапливается все больше данных о том, что повреждающее действие гипергликемии на сосудистую стенку опосредуется свободными радикалами. При этом установлено, что в механизмах повышения перекисного окисления липидов (ПОЛ) при диабете участвует не только гипергликемия, но и гипoinsулинемия [7, 10]. Между тем недостаточно изучены закономерности изменений свободнорадикальных процессов и особенно-

сти функционирования различных компонентов антиоксидантной защиты (АОЗ) у больных СД.

Целью исследования являлось изучение особенностей изменения функциональной активности мембран клеток крови у больных СД 1-го типа и впервые выявленным СД 2-го типа.

Проведено комплексное исследование структурно-функционального статуса мембран на модели эритроцитов и особенностей нарушения глюкозоинсулинового гомеостаза у 42 пациентов с сахарным диабетом 1-го и 2-го типа. В контрольную группу были включены 20 практически здоровых доноров, не предъявлявших на момент обследования жалоб (мужчины и женщины в возрасте от 25 до 55 лет). Исследовали липидный состав сыворотки и мембран эритроцитов, степень переокисления липидов, утилизацию глюкозы эритроцитами, а также состояние ферментов АОЗ у 23 больных, страдающих СД 1-го типа, длительность которого варьировала от 1 года до 10 лет. Степень компенсации СД была определена с учетом содержания глюкозы в сыворотке крови утром натощак и концентрации гликированного гемоглобина (HbA_{1c}). Компенсацию углеводного обмена у больных считали при показателе HbA_{1c} ниже 7,0%. У 19 пациентов 40—65 лет был впервые выявлен СД 2-го типа (СД2). Показатели метаболизма глюкозы у них на момент первичного обращения

за медицинской помощью указывали на декомпенсированное течение заболевания (средний уровень HbA_{1c} 14,6%, суточная гликемия 16,26 ммоль/л, доза инсулина 0,95 Ед/кг). Больные СД 1 получали человеческий рекомбинантный инсулин в индивидуальной дозе по интенсифицированной схеме (от 0,35 до 1,66 Ед/кг).

Данное исследование одобрено комитетом по этике РНИМУ. Больные давали информированное согласие на участие в данном исследовании.

Об интенсивности ПОЛ в выделенных плазматических мембранах эритроцитов судили по ранее описанному нами методу [4, 5], т. е. по содержанию гидроперекисей (ГП) и малонового диальдегида (МДА), используя цветную реакцию с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [14]. Содержание общего холестерина (ОХ), триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП) в сыворотке крови определяли на автоанализаторе Aigone 200 ферментным методом с помощью комбинированных диагностических наборов фирмы "Bioson" (Германия). Концентрацию ХС ЛПНП и ХС ЛПОНП оценивали по расчетным формулам W. T. Friedwald (1972), коэффициент атерогенности (КА) — по формуле А. Н. Климова (1999). Активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы определяли с помощью наборов фирмы "Sigma", концентрацию восстановленного глутатиона (GSH) и окисленного глутатиона (GSSG) — по методу Hissin, Hilf (1976). Содержание лактата и АТФ крови определяли с помощью наборов фирмы "Boehringer", активность Na^+ , K^+ -АТФазы — по модифицированному методу [3]. Антиокислительную активность (АОА) оценивали с помощью метода Г. И. Клебанова и соавт. (1988). Результаты исследования обрабатывали с использованием критерия t Стьюдента.

Данные исследований, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что у больных СД 1 типа и в впервые выявленным СД 2 усилен синтез активных кислородных метаболитов в мембранах эритроцитов, на это указывает высокая концентрация перекисленных продуктов. Однако при этом АОА сыворотки по сравнению с контрольной группой повышается ($p < 0,05$). При анализе процессов свободнорадикального окисления липидов у больных СД 1-го типа, обнаружено достоверное повышение широкого спектра продуктов липопероксидации: ДК в 1,72 раза ($p < 0,01$), ГП в 1,48 раза ($p < 0,05$) и МДА в 1,25 раза ($p < 0,01$) по сравнению с контрольной группой. Активация процессов ПОЛ у больных СД 1-го типа, наблюдалась с

одновременным увеличением содержания общих липидов в 1,36 раза относительно контрольной группы ($p < 0,001$).

У больных СД 1 липопротеиновый спектр сыворотки крови характеризовался повышением концентрации ОХ и индекса атерогенности. При этом выраженность метаболических нарушений у пациентов с СД 1 зависела от длительности диабета, стадии компенсации углеводного обмена и наличия сосудистых осложнений: отмечено заметное повышение содержания ОХ у пациентов, у которых заболевание длилось более 5 лет или имелись сосудистые осложнения.

У пациентов с впервые выявленным СД 2 обнаружены более выраженные и разнообразные отклонения показателей липидного обмена (см. табл. 1). Повышение содержания общего холестерина и триацилглицеридов в сыворотке крови сопровождалось снижением уровня ХС ЛПВП. Отмечалось снижение степени утилизации глюкозы эритроцитами и концентрации АТФ крови в 1,9 раза ($p < 0,05$) при резком возрастании уровня лактата до $2,83 \pm 0,4$ (при $1,14 \pm 0,09$ в контрольной группе, $p < 0,05$). Установлено также, что указанные изменения носят однонаправленный характер независимо от типа диабета, но более выражены при впервые выявленном диабете 2-го типа. Недостаток АТФ у диабетических больных связан, по-видимому, со снижением степени утилизации глюкозы клетками ($r = 0,87$, $p < 0,05$), нарушением фосфорилирования глюкозы и недостаточной наработкой АТФ. Достоверное повышение концентрации лактата, МДА и других ТБК-активных продуктов ($p < 0,05$) свидетельствует о наличии оксидативного стресса. Выявленное нами достоверное снижение активности мембраносвязанной K^+ , Na^+ -АТФазы в эритроцитах может указывать на структурную модификацию липидного матрикса мембран и нарушение синтеза АТФ. В свою очередь дефицит АТФ в организме в связи с нарушением фосфорилирования углеводов, а также белков, по-видимому, может способствовать изменению свойств мембрано-рецепторного аппарата и приводить к гипоксии.

Активация процессов ПОЛ у больных СД 1-го типа наблюдалась одновременно с увеличением содержания общих липидов в 1,36 раза относительно контрольной группы ($p < 0,05$), при впервые выявленном СД 2 концентрация общих липидов повышалась в 1,53 раза ($p < 0,05$).

Анализ липидного спектра у больных позволил установить повышение показателей ОХ, ХС ЛПНП и ТГ по сравнению с референтными значениями независимо от типа диабета. Показатели ХС ЛПОНП и ХС ЛПВП у диабетических больных не отличались от соответствующих референтных показателей на липидограммах (табл. 2).

При СД 1-го типа гиперлипотеинемия, как правило, является вторичной, развивается вследствие абсолютной инсулиновой недостаточности, снижения активности липопротеинлипазы. У больных независимо от типа СД дислипотеинемия является одной из ведущих причин развития инсулинорезистентности, раннего атеросклероза и формирования сосудистых осложнений. Об этом свидетельствуют исследования G. Boden и G. Shulman [8], которые описали внутриклеточные механизмы развития

Таблица 2

Сравнение показателей липидного спектра у больных СД 1 и впервые выявленным СД 2 с референтными величинами

Показатель	Больные СД 1 ($M \pm m$)	Больные СД 2 ($M \pm m$)	Референтные величины
ОХ, ммоль/л	$5,88 \pm 0,28$	$6,88 \pm 0,08$	3,40—5,20
ХС ЛПНП, ммоль/л	$4,28 \pm 0,35$	$4,88 \pm 0,11$	< 3,40
ХС ЛПОНП, ммоль/л	$0,73 \pm 0,14$	$0,86 \pm 0,19$	< 0,90
ХС ЛПВП, ммоль/л	$1,67 \pm 0,10$	$1,35 \pm 0,10$	> 1,00
ТГ, ммоль/л	$1,98 \pm 0,54$	$2,63 \pm 0,54$	0,40—1,80
КА, усл. ед.	$2,78 \pm 0,31$	$1,89 \pm 0,31$	< 3,50

Таблица 1
Изменение метаболических показателей крови у больных СД 1 и впервые выявленным СД 2 ($M \pm m$)

Показатель	Контрольная группа	Больные СД 1	Больные с впервые выявленным СД 2
АОА, усл. ед.	$13,98 \pm 1,13$	$17,46 \pm 0,92^*$	$15,17 \pm 1,2$
МДА, мкмоль/л	$1,86 \pm 0,12$	$2,45 \pm 0,12^{**}$	$2,93 \pm 0,12^{**}$
СОД, усл. ед.	$1,85 \pm 0,02$	$1,5 \pm 0,04^*$	$1,2 \pm 0,01^{**}$
GSH, мкмоль/л	$3,92 \pm 0,11$	$2,58 \pm 0,09^*$	$2,03 \pm 0,01^{**}$
GSSG, мкмоль/л	$1,75 \pm 0,08$	$1,93 \pm 0,08$	$2,16 \pm 0,11^*$
Активность Na^+ , K^+ -АТФазы, мкмоль P/ч · мг белка	$8,107 \pm 0,04$	$4,032 \pm 0,03^{**}$	$3,61 \pm 0,03^{**}$
АТФ, мкмоль/л	$621 \pm 26,8$	$364,7 \pm 17,6^{**}$	$317,8 \pm 17,9^*$
Утилизация глюкозы эритроцитов, мкмоль ($2 \cdot 10^9$) кл/ч	$1,68 \pm 0,05$	$0,91 \pm 0,02^*$	$0,87 \pm 0,03^*$

Примечание. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

инсулинорезистентности, обусловленные аккумуляцией липидов. Известно, что инсулинотропная активность жирных кислот повышается со степенью их насыщенности. Установлено также ингибирующее влияние повышенной концентрации липидов на функцию β -клеток поджелудочной железы [11]. Выраженная интенсификация свободнорадикальных реакций у больных диабетом приводит к повреждению липидных и белковых компонентов клеток, способствует образованию и накоплению высокотоксичных липоперекисных соединений, таких как ДК, ГП, МДА, усиливающих процессы дестабилизации клеточных мембран и субклеточных структур, и, следовательно, может оказывать негативное влияние на течение диабета.

При сравнительном анализе показателей АОА установлено, что у больных СД 1-го типа достоверно повышалась общая АОА крови на 25% относительно контрольной группы ($p < 0,05$) (см. табл. 1), что свидетельствует о мобилизации защитных механизмов для нейтрализации свободных радикалов. По данным F. Mercuri и соавт. [12], общая способность плазмы крови связывать свободные радикалы позволяет получить более надежную информацию об антиоксидантной емкости, чем оценка активности каждого из присутствующих в ней антиоксидантов.

Как следует из представленных в табл. 1 данных, у больных СД 1-го типа повышение активности липопероксидации сопровождается достоверным снижением восстановленного глутатиона в 1,13 раза относительно контрольной группы ($p < 0,05$), что может свидетельствовать о снижении внутриклеточных защитных механизмов против перекисей липидов. Известно, что все свои основные функции глутатион выполняет в восстановленной форме, выступая эффективной ловушкой радикалов [13]. У больных СД 1 типа также выявлено существенное снижение активности СОД в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$). СОД рассматривается в качестве фермента, выполняющего не только защитную, но и регуляторную функцию, являясь ключевым звеном системы регуляции стационарной концентрации супероксидного анион-радикала [2]. Существует мнение, что удаление супероксидного анион-радикала необходимо для защиты от окисления внутриклеточного глутатиона [6]. Можно предполагать, что полученные нами данные отражают общеприспособительные механизмы в развитии заболевания, которые способствуют адаптации к отрицательному влиянию активных форм кислорода. Следовательно, у диабетических больных по сравнению с контрольной группой наблюдается гиперактивация ПОЛ с включением разных механизмов АОЗ, как ферментативных, так и неферментативных.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что наиболее выраженная активация процессов ПОЛ с повышением концентрации ГП, ДК и МДА наблю-

дается у больных с впервые выявленным СД 2-го типа по сравнению как с больными СД 1-го типа, так и с контрольной группой.

Выводы

1. В основе метаболической недостаточности у больных СД 1-го типа и впервые выявленным СД 2-го типа лежит угнетение аэробного синтеза АТФ вследствие активации гликолитических процессов, возрастание концентрации лактата и развитие ПОЛ. Увеличение концентрации метаболитов ПОЛ и повышение уровня лактата свидетельствуют о развитии оксидативного стресса, особенно выраженного при СД 2-го типа. Снижение степени утилизации глюкозы эритроцитами и ингибирование активности K^+ , Na^+ -АТФазы указывают на снижение чувствительности клеток к инсулину.
2. СД у больных протекает с нарушением липидного обмена, активацией процессов липидной пероксидации, проявляющейся увеличением содержания как первичных, так и вторичных продуктов ПОЛ, изменением структурно-функциональных свойств эритроцитарной мембраны, а также нарушениями в системе АОЗ. Изменения изучаемых показателей зависят от типа диабета и длительности течения заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин М. И., Клебанова Е. М. // Тер. арх. — 2003. — № 1. — С. 72—77.
2. Зенков Н. К., Панкин В. З., Менищикова Е. Б. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. — М.: Майк "Наука/Интерпериодика", 2001.
3. Макаренко Е. В. // Лаб. дело. — 1986. — № 3. — С. 14—17.
4. Микаелян Н. П., Князев Ю. А., Максина А. Г., Петрухин В. А. // Пробл. эндокринол. — 1994. — Т. 40, № 4. — С. 4—7.
5. Микаелян Н. П., Князев Ю. А., Петрухин В. А., Микаелян А. В. // Сахарный диабет. — 2006. — № 1. — С. 15—17.
6. Нелаева А. А., Трошина И. А. // Сахарный диабет. — 1999. — № 3. — С. 25—29.
7. Смирнова О. М., Никонова Т. В., Дедов И. И. Свободно-радикальное окисление и антиоксидантная защита при сахарном диабете: Пособие для врачей. — М., 2003.
8. Boden G., Shulman G. // Eur. J. Clin. Invest. — 2002. — Vol. 32 (suppl 3). — P. 14—23.
9. Brownlee M. // Nature. — 2001. — Vol. 414. — P. 813—820.
10. Evans J. L. et al. // Endocr. Rev. — 2002. — Vol. 23. — P. 599—622.
11. Mc Garry J. D., Dobbins R. L. // Diabetologia. — 1999. — Vol. 42. — P. 128—138.
12. Mercuri F., Quagliari L., Ceriello A. // Diabetes Technol. Ther. — 2000. — Vol. 10, N 2—3. — P. 157—167.
13. Munday R., Winterbourne C. C. // Biochem. Pharmacol. — 1989. — Vol. 38. — P. 4349—4352.
14. Osacawa I., Matsushita S. // Lipids. — 1980. — Vol. 15, N 3. — P. 137—140.

Поступила 31.01.12