

Перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита и содержание 2,3 - дифосфолипидов у детей, больных сахарным диабетом 1 типа

Р.А. Киреев, *Н.А. Курмачева, В.В. Игнатов

Кафедра биохимии и биофизики
(зав.- канд. биол. наук Г.В. Мельников)
Саратовского государственного университета,
*Саратовский областной детский и подростковый
эндокринологический центр

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) является метаболическим процессом, представленным практически во всех органах и тканях млекопитающих. Через стадию перекисных производных полиненасыщенных жирных кислот осуществляется синтез простагландинов; образование гидроперекиси холестерина является одним из звеньев синтеза некоторых стероидных гормонов; с помощью митохондриальной системы ПОЛ происходит регуляция активности мембраносвязанных ферментов эндоплазматического ретикула и, вероятно, осуществляется альтернативный путь окисления ненасыщенных жирных кислот [8].

Активные формы кислорода, образуемые в процессе ПОЛ, обеспечивают цитотоксическое действие фагоцитов [10,21,22], являются механизмом регуляции процесса деления клеток [9,23], обеспечивают модуляцию апоптоза, ротацию липидного и белкового компонентов биомембран [4,29].

Действие внешних прооксидантов (радиация, УФ-свет, гипоксия) и активация эндогенных механизмов генерации активированных кислородных метаболитов (O_2^- , H_2O_2 , $OH^\bullet$, RO_2) приводят к напряжению механизмов антиоксидантной защиты (AO_3) и развитию окислительного стресса, который может проявляться на клеточном, тканевом и организменном уровнях [27]. Возникновение окислительного стресса - важный фактор развития воспалительных процессов, сердечно-сосудистых заболеваний [11].

Немаловажную роль в патогенезе сахарного диабета (СД) и диабетических ангиопатий отводят свободнорадикальному окислению, в том числе ПОЛ [5,26]. Усиление процессов ПОЛ при СД способствует нарушению проницаемости мембран, пространственной ориентации и каталитической активности ферментных ансамблей, подавлению синтеза проинсулина, а также гибели β -клеток [6,15,28].

Значение процессов ПОЛ при повреждении эритроцитарных мембран станет понятным, если учесть, что эритроциты содержат мощный катализатор перекисного окисления - гемоглобин, а в омывающей их плазме имеются транспортируемое негемовое железо и липиды, содержащие перекиси. Система антиоксидантов,

тормозящих перекисное окисление, а также сывороточный альбумин, связывающий перекиси липидов, в норме успешно справляются с "перекисной опасностью", но нарушение какого-либо звена в этих защитных системах ведет к повреждению мембран красных кровяных клеток [1].

Целью данного исследования явилось изучение процессов ПОЛ и AO_3 , а также оценка содержания 2,3 - дифосфолипидов в мембранах эритроцитов и сыворотке крови детей с СД 1 типа.

Объем и методы исследования

Обследовано 156 детей с СД 1 типа. Больные разделены на 3 группы в зависимости от длительности заболевания и наличия сосудистых осложнений: 1-я группа - 35 детей с впервые выявленным СД (средняя длительность заболевания $4 \pm 0,37$ мес.); 2-я группа - 76 детей с длительностью заболевания в среднем $3 \pm 1,7$ года; 3-я группа - 45 детей со средней длительностью заболевания $7 \pm 2,5$ лет. Больные 1-й группы находились в состоянии субкомпенсации, средний уровень HbA_{1c} у них был равен $7,76 \pm 0,6\%$; сохранялась остаточная секреция С-пептида ($278,6 \pm 23,7$ пкмоль/л при норме 298-1324 пкмоль/л). Дети 2-й группы не имели клинических признаков декомпенсации диабета, однако средний уровень HbA_{1c} у них был равен $8,91 \pm 0,7\%$, что отражало состояние метаболической декомпенсации. У 64,8% детей 2-й группы не выявлено сосудистых осложнений, у 35,2% больных имелись начальные стадии диабетической микроангиопатии. Дети 3-й группы характеризовались наиболее неудовлетворительными показателями углеводного обмена, средний уровень HbA_{1c} у них составил $10,1 \pm 0,9\%$; на момент обследования не было проявлений острых осложнений диабета, однако у 92,7% больных имелись "поздние" диабетические осложнения (ретинопатия, нефропатия, полинейропатия, хайропатия в различных сочетаниях), у 43,8% пациентов выявлены жировая инфильтрация печени или жировой гепатоз, у 27,4% отмечалась задержка роста, у 16,2% детей был диагностирован синдром Мориака.

В качестве контрольной группы обследовано 25 практически здоровых детей с нормальной толерантностью к глюкозе и отсутствием наследственной предрасположенности к СД.

Кровь для исследования брали из локтевой вены натощак. При необходимости добавляли гепарин, центрифугировали при 3000 об/мин, отбирали сыворотку. Эритроциты трижды отмывали физиологическим раствором, центрифугируя при 1500 об/мин.

Интенсивность ПОЛ определяли по концентрации диеновых конъюгатов (ДК), малонового диальдегида (МДА) [12]. О состоянии АОЗ судили по активности каталазы в эритроцитах [9], содержанию церулоплазмина (ЦП) [7] и α -токоферола [16] в сыворотке крови. О процессе «старения» эритроцитов судили по пероксидазной активности метгемоглобина [13], показателем гипоксических состояний служил уровень 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ).

Уровень HbA_{1c} и C-пептида определяли в лаборатории клинической биохимии.

Статистическую обработку осуществляли на компьютере с помощью программы Med-Stat. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

У детей с СД 1 типа установлено увеличение интенсивности процессов ПОЛ и снижение АОЗ, нарушение кислородтранспортной функции эритроцитов. У больных всех групп происходило накопление первичных и вторичных продуктов липидной пероксидации, увеличение интенсивности хемилюминесценции в эритроцитах и сыворотке крови (см. таблицу).

Как видно из таблицы, у детей 1-й группы выявлено нарастание содержания ДК в 3,6 раза, МДА - в 2,9 раза по сравнению с контролем. Во 2-й и 3-й группах мы также отмечали увеличение уровня ДК и МДА по сравнению с контрольными значениями, причем у больных 3-й группы с продолжительностью заболевания от 7 до 12 лет и наличием поздних диабетических осложнений содержание продуктов ПОЛ было наиболее высоким. С увеличением про-

дольностью заболевания от 2 до 5 лет установлено снижение ДК по сравнению с 1-й группой в 1,2 раза, а в сравнении с 3-й группой - в 1,3 раза. Уровень высокотоксичного МДА во 2-й группе был ниже по сравнению с 1-й группой в 1,3 раза и в 1,8 раза по сравнению с 3-й группой. Интересно отметить, что показатели хемилюминесценции в мембранах эритроцитов во 2-й группе не снижались по сравнению с уровнем продуктов ПОЛ, продолжали нарастать с увеличением продолжительности заболевания. Повидимому, у детей с СД при длительности заболевания от 2 до 5 лет происходит включение механизмов, способствующих обрыву цепных реакций ПОЛ [2] до молекулярных продуктов и предотвращению накопления ДК и МДА. Интенсивность хемилюминесценции и высокое содержание ДК и МДА у больных 1-й и 3-й групп свидетельствуют о быстром образовании и накоплении высоко реакционных радикалов (ОН, RO) [18], обладающих способностью вступать в реакцию цепного окисления липидов мембранных структур и способствующих накоплению продуктов пероксидации.

На фоне интенсификации процессов ПОЛ у больных всех групп установлено снижение активности АОЗ. Как видно из рис.1, отмечалось снижение уровня ЦП, обладающего способностью перехватывать супероксидный радикал [25] и тормозить аутоокисление липидов [19, 24]. По сравнению с контрольными значениями у больных 1-й группы уровень ЦП был ниже в 1,4 раза, во 2-й группе в 1,3 раза и у больных 3 группы в 1,1 раза.

Уровень продуктов ПОЛ и параметры хемилюминесценции нативных эритроцитов и сыворотки крови у детей, больных СД (M $\pm$ m)

Показатели	Контроль	Группы		
		1-я	2-я	3-я
Эритроциты				
ДК, ед.опт.пл.	1,36±0,073	4,98±0,095*	4,01±0,083*	5,27±0,102*
МДА, мкмоль/л	1,49±0,069	4,27±0,201*	3,40±0,185*	5,98±0,243*
I _{max} (интенсивность свечения), мВ	1,01±0,088	1,74±0,116*	2,09±0,128*	2,8±0,095*
S (светосумма импульсов), имп/с	11,79±0,668	28,95±1,763*	34,72±1,385*	39,97±1,504*
Сыворотка				
I _{max} (интенсивность свечения), мВ	1,54±0,049	3,12±0,529*	4,91±0,487*	5,26±0,533*
S (светосумма импульсов), имп/с	21,16±0,514	51,24±2,105*	59,14±2,192*	65,16±1,898*

*p < 0,001 по сравнению с контролем.

должительности заболевания происходило нарастание интенсивности хемилюминесценции как в мембранах эритроцитов, так и в сыворотке крови. Несмотря на то, что во всех группах мы отмечали достоверное увеличение продуктов ПОЛ по сравнению с контролем, у детей 2-й группы с продолжи-

Изменения антиокислительной активности плазмы подтверждались снижением концентрации α -токоферола во всех группах в 3,2-4,3 раза по сравнению с контролем. В отличие от α -токоферола, уровень которого у больных всех групп был значительно сниженным по сравнению с контролем, уровень ЦП

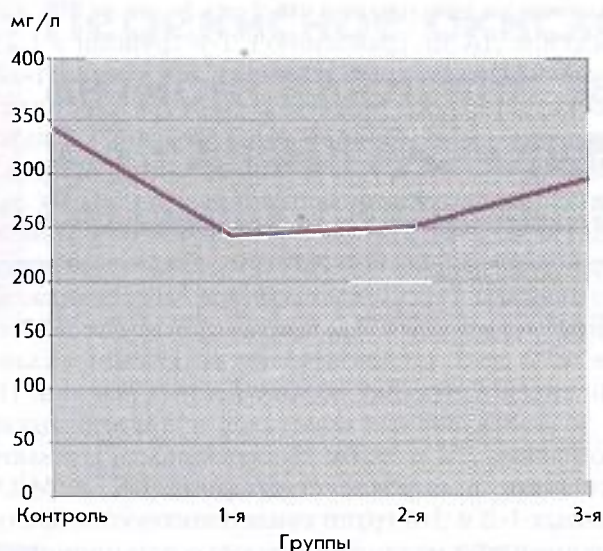


Рис. 1. Содержание церулоплазмينا в сыворотке крови у детей с СД.

постепенно повышался по мере увеличения продолжительности заболевания. Повышение активности ЦП у детей с длительностью СД от 7 до 12 лет можно объяснить нарастающей активностью хемилюминесценции в плазме, что свидетельствует о компенсаторно-приспособительной реакции, направленной на нейтрализацию гипероксидации [15, 17].

В эритроцитах мы также отмечали снижение системы АОЗ, что проявилось уменьшением антиперекисного эффекта каталазы во всех группах больных по сравнению с контролем (рис. 2) в 1,3-1,5 раза. Изменения каталазной активности эритроцитов имели разнонаправленный характер: во 2-й группе больных фиксировалось увеличение ферментативной активности в 1,1 раза по сравнению с 1-й группой и в 1,2 раза по отношению к 3-й группе. Увеличение активности каталазы во 2-й группе можно рассматривать как благоприятный фактор, направленный на снижение процессов ПОЛ в мембранах эритроцитов и дезинтоксикацию. Увеличение пероксидазной функции метгемоглобина во всех группах свидетельствует о процессах физиологического старения эритроцитов, т.е. происходит нарушение биологического восстановления метгемоглобина в гемоглобин, что проявляется функциональной неполноценностью эритроцитов [3] (метгемоглобин является мощным источником образования свободных радикалов в клетке). Однако во 2-й группе мы отмечали снижение пероксидазной функции метгемоглобина в 1,14 раза по сравнению с 1-й и 3-й группами, что свидетельствует о некотором восстановлении биологической функции гемоглобина.

Нарастание уровня 2,3-ДФГ (рис. 3) свидетельствует о развитии тканевой гипоксии у больных всех групп.



Рис. 2. Активность каталазы и пероксидазная функция метгемоглобина в эритроцитах у детей с СД.

2,3-ДФГ образуется в эритроцитах в процессе гликолиза, уменьшает сродство гемоглобина к кислороду и вызывает большую отдачу кислорода тканям [20]. Увеличение концентрации фосфата в эритроцитах является мерой компенсации, обеспечивающей оксигенацию тканей при низком pO_2 .

Таким образом, у детей с СД 1 типа установлено нарушение проантиоксидантного равновесия в клеточных мембранах и сыворотке крови, а также активизация процессов, приводящих к нарушению функциональных свойств эритроцитов. При развитии многих патологических состояний может развиваться неспецифический адаптационный синдром. В развитии большинства адаптационных реакций

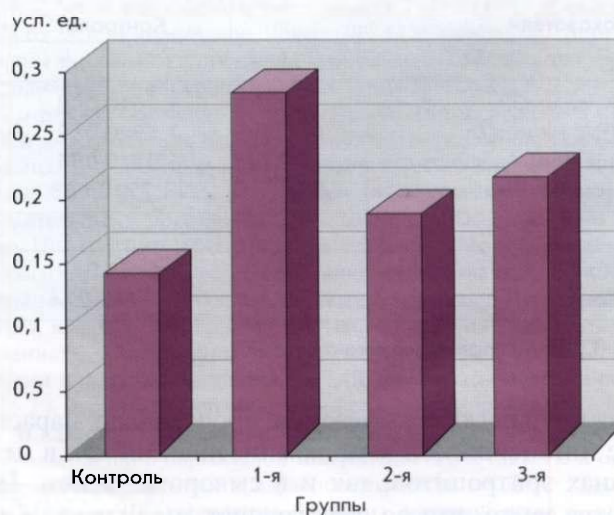


Рис. 3. Содержание 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах у детей с СД.

прослеживаются два этапа: начальный этап срочной, но несовершенной адаптации и последующий этап долговременной адаптации [14].

На основании данных, полученных нами, можно предположить, что у детей с впервые выявленным СД происходит «срочный» этап адаптации, проявляющийся в увеличении интенсивности свободнорадикальных процессов и содержания продуктов ПОЛ, снижении АОЗ, нарастании уровня 2,3-ДФГ в эритроцитах и сыворотке крови. Важной чертой этого этапа адаптации является то, что деятельность организма протекает на пределе физиологических возможностей, почти при полной мобилизации функционального резерва. При длительности СД от

2 до 5 лет по сравнению как с 1-й группой, так и при длительности диабета более 7 лет наблюдались снижение продуктов ПОЛ, активизация антиоксидантной системы, частичная нормализация функции гемоглобина и замедление процесса старения эритроцитов, а также снижение уровня 2,3-ДФГ, свидетельствующее об увеличении сродства гемоглобина к кислороду и снижении гипоксических явлений. Полученные данные свидетельствуют о том, что у детей с небольшой продолжительностью СД развивается долговременная адаптация к заболеванию. По мере увеличения продолжительности СД процесс долговременной адаптации нарушается.

Литература

1. Владимиров Ю.А., Арчаков А.Н. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах - М.: Наука, 1972, - с. 252.
2. Владимиров Ю.А. Биологические мембраны и патология клетки - М.: Знание, 1979, - с. 48.
3. Вопросы биохимии, биофизики и патологии эритроцитов // Под ред. Г.М. Франка - М.: Наука, 1967.
4. Григлевски Р.Е. // Новости фармации и медицины, 1997, № 1-2, с. 2-8.
5. Дедов И.И., Горелышева В.И., Смирнова О.М. // Пробл. эндокринологии, 1995, № 5 - с. 16-19.
6. Коган А.Х., Кудрин А.Н., Николаев С.М. Свободнорадикальное окисление липидов в норме и патологии - М., 1986, - с. 68-71.
7. Колб В.Г., Камышников В.С. // Справочник по клинической химии - Минск, 1982, - с. 290.
8. Колесова О.Е., Маркин А.А., Федорова Т.Н. // Лаб. дело, 1984, № 9, с. 540-546.
9. Королюк М.А., Иванова Л. И., Майорова И.Г. // Лаб. дело, 1988, № 1, с. 16-19.
10. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1989, с. 344.
11. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. // Терапев. арх., 1991, № 11, с. 85.
12. Методы биохимических исследований // Под ред. проф. М.И. Прохоровой -Л.: Изд-во Лен. ун-та - 1982, с. 272.
13. Методы исследований в профпатологии // Под ред. О.Г. Архиповой - М.: Медицина, 1988, с. 153.
14. Меерсон Ф.З., Малышев И.Ю. Феномен адаптационной стабилизации структур и защита сердца - М.: Наука, 1993, с. 4.
15. Мид Дж. Свободные радикалы в биологии - М., 1979, т. 1, с. 68-87.
16. Паранич А.В., Соломенко Э.Н. // Лаб. дело, 1987, № 9, с. 682-686.
17. Санина А.К. // Вопр. Мед. химии, 1986, № 5, с. 7-14.
18. Шляпинтох В.Я., Карухин О.Н. Хемилюминесцентные методы исследования - М.: Наука, 1966.
19. Allen R.G., Balin A.K. // Free Radicals Biol. And Med., 1989, v. 6, p. 623.
20. Benesch R., Benesch R.E. // Biochem. Biophys Res. Commun, 1967, v. 26, p. 162-167.
21. Clark R.A. // J. Infect Dis., 1990, v. 161, p. 1140.
22. Cohen M. S. // Free Radicals Biol and Med., 1988, v. 5, p. 81.
23. Cross A.R., Jones O.T. // Biochem et biophys acta., 1991, v. 1057, p. 281.
24. Dormandy T // Lancet, 1978, v. 1, № 3, p. 647.
25. Iamashoji S., Kajimoto G. // FEBS Letters, 1983, v. 152, № 1, p. 168-170.
26. Jennigs P.E., Barnett A.H. // Diabet. Med., 1988, № 5, p. 111-117.
27. Sies H. // Amer. J. Med., 1991, v. 91, p. 315.
28. Sinclair A.I. // Diabet Rev., 1993, v. 2, p. 7-10.
29. Thompson C.B. // Science, 1995, v. 267, p. 1456-1462.