

Показатели перекисного окисления липидов и активность антиоксидантных ферментов в лимфоцитах периферической крови в дебюте ИЗСД

О.М. Смирнова, В.А. Горелышева

Эндокринологический научный центр
(дир. - акад. РАМН И.И. Дедов) РАМН, Москва

Многими исследователями установлена активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) при экспериментальном диабете и у больных сахарным диабетом. Изучение процессов ПОЛ и антиоксидантной защиты у больных инсулинзависимым сахарным диабетом (ИЗСД) выявило значительные изменения в этих системах. Процессы ПОЛ значительно активируются при длительном течении заболевания и играют определенную роль в патогенезе поздних осложнений диабета [1, 6, 11]. У больных с впервые выявленным ИЗСД состояние ПОЛ и антиоксидантной защиты изучено недостаточно. По данным ряда авторов, избыточное образование свободных интермедиатов кислорода, индуцированных цитокинами, играет важную роль в патогенезе ИЗСД. Такие цитокины, как интерлейкин-1 (ИЛ-1), фактор некроза опухолей (ФНО) и γ -интерферон, могут влиять на секрецию инсулина и оказывать цитотоксическое действие на β -клетки *in vitro* [15].

Избыточное количество свободных радикалов кислорода выделяется активированными макрофагами и поврежденными β -клетками [12, 13]. β -Клетки необычайно чувствительны к токсическому действию свободных радикалов кислорода [8] и процессы ПОЛ наиболее выражены в клетках островков Лангерганса [4]. Островковые клетки имеют слабую антиоксидантную защиту и особенно уязвимы для свободных радикалов, что является одной из причин их лизиса при ИЗСД [7, 14].

Целью настоящего исследования явилось изучение состояния ПОЛ и антиоксидантной ферментной защиты в лимфоцитах периферической крови у больных ИЗСД в дебюте заболевания.

Материалы и методы

Обследовано 22 больных с впервые выявленным ИЗСД в возрасте от 15 до 35 лет с длительностью заболевания от 1 мес до 1 года. На момент обследования все пациенты были в состоянии декомпенсации (гликогемоглобин А1с составил $10,76 \pm 0,42\%$). Среднесуточная гликемия была $12,6 \pm 0,43$ ммоль/л, доза инсулина — $0,50 \pm 0,04$ ЕД/кг в сутки. Контрольную группу составили 16 здоровых добровольцев в возрасте от 19 до 37 лет.

Всем больным проведено исследование остаточной секреции инсулина по уровню С-пептида в пробе с изокалорийным завтраком (660 ккал). Уровень базального и стимулированного С-пептида (нулевая и 60-я минута) определяли радиоиммунологическим методом с использованием наборов С-реп-CTRIA фирмы «CIS bio international» (Франция).

Уровни гликированного гемоглобина А1с определяли методом ионообменной хроматографии на микроколонках (фирма Bio-Rad, Париж) (норма — до 6%).

Для исследования ПОЛ использовали лизаты лимфоцитов, предварительно выделенные в градиенте плотности фиколл-верографина. Количество гидроперекисей (ГП) определяли методом В.Б. Гаврилова и М.И. Мишкорудной [2]. Уровни малонового диальдегида (МДА) определяли по изменению интенсивности окрашивания с тиобарбитуровой кислотой на спектрофотометре. Для оценки состояния антиоксидантной защиты клетки определяли активность супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГЛП), каталазы (К). Активность СОД определяли методом сопряженной калориметрии по I. Fridovich [10], ГЛП — методом P. Emmerson в модификации В.З. Ланкина [5], каталазы (КТ) — методом J. Ernst [9].

Количество β -лимфоцитов (CD21⁺), Т-хелперов/индукторов (CD4⁺) и Т-супрессоров/цитотоксических (CD8⁺) определяли с помощью моноклональных антител (ЛБ21, ЛТ4 и ЛТ8). Количество Т-лимфоцитов (CD3⁺), НК-клеток, экспрессию HLA-DR — антигенов определяли с помощью коммерческих моноклональных антител фирмы Becton Dickinson (Lew 4, Lew 7, анти-HLA-DR). Анализ проводили методом проточной цитофлюориметрии на проточном цитометре EPICS-C. Аутоантитела к микросомальному антигену тиреоцитов (АМАТ), тиреоглобулину (АТГ) человека, поверхностным антигенам клеток гипофиза (АА) и надпочечников (АН) крысы, фибробластам кожи (АФ) человека опре-

деляли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Антитела к поверхностным антигенам островковых клеток (АПОК) определяли методом непрямого иммунофлюоресцентного окрашивания (ИРИФ). Определение аутоантител к антигенному комплексу Р 64-69 кД (ГДК) проводили методом конкурентного иммунофлюоресцентного анализа с разрешением во времени (TRFIA).

Статистическая обработка полученных данных проведена на персональной ЭВМ с помощью пакета статистических программ CSS. Достоверность связи между двумя рядами наблюдений при изучении непараметрических данных определяли на основании коэффициента корреляции рангов Спирмена.

Результаты и их обсуждение

Изменения ПОЛ в лимфоцитах превосходили таковые в эритроцитах [3], тогда как активность антиоксидантных ферментов в дебюте заболевания существенно не отличалась от показателей контрольной группы (табл. 1)

Обнаруженные изменения свидетельствуют о том, что усиление процессов ПОЛ в дебюте ИЗСД происходит генерализованно и, по-видимому, не является специфичным. Более выраженная активация ПОЛ в лимфоцитах может свидетельствовать не только о метаболических нарушениях, но и о степени активности аутоиммунного процесса.

Изучение уровней продуктов ПОЛ и активности антиоксидантных ферментов в лимфоцитах периферической крови у больных с впервые выявленным ИЗСД в фазе компенсации через 1 год от начала заболевания (табл. 2) показало, что на фоне проводимой инсулинотерапии происходит снижение содержания МДА. Остается повышенным уровень ГП ($p < 0,05$). Снижение уровня МДА было достоверным по сравнению с исходным ($p < 0,01$). Существенного изменения активности ГЛП и КТ не отмечено. Произошло достоверное снижение активности СОД по сравнению с исходным уровнем ($p < 0,01$).

Таблица 1

Показатели ПОЛ и активности антиоксидантных ферментов в лимфоцитах у больных ИЗСД в дебюте заболевания (M±m)			
Параметры	Больные ИЗСД	Здоровые	p
МДА (нмоль/10 ⁶ кл.)	1,41±0,21	0,48±0,09	< 0,01
ГП (отн.ед./10 ⁶ кл.)	3,08±0,17	2,29±0,04	< 0,01
СОД (ед/г Нв)	12,77±1,03	9,18±0,85	< 0,05
ГЛП (ед/г Нв)	0,26±0,04	0,25±0,01	> 0,05
КТ (с ⁻¹ /10 ⁶ кл.)	3,24±0,30	3,34±0,14	> 0,05

Таблица 2

Показатели ПОЛ и активности антиоксидантных ферментов в лимфоцитах у больных с впервые выявленным ИЗСД через 1 год от начала заболевания (M±m)			
Параметры	Больные ИЗСД	Здоровые	p
МДА (нмоль/10 ⁶ кл.)	0,72±0,12	0,48±0,09	> 0,0
ГП (отн.ед./10 ⁶ кл.)	3,32±0,30	2,29±0,04	< 0,0
СОД (ед/г Нв)	7,09±0,92	9,18±0,85	> 0,0
ГЛП (ед/г Нв)	0,20±0,02	0,25±0,01	> 0,0
КТ (с ⁻¹ /10 ⁶ кл.)	3,89±0,83	3,43±0,14	> 0,0

Таким образом, в дебюте ИЗСД происходит активация процессов ПОЛ в клеточных мембранах. При относительной компенсации углеводного обмена не происходит полной нормализации этих показателей, хотя наблюдается некоторое их снижение. Активность антиоксидантных ферментов, несколько сниженная по сравнению с нормой, имеет тенденцию к повышению, но не достигает значений контрольной группы. Это может быть связано как с отсутствием полной компенсации углеводного обмена, так и с активностью аутоиммунного процесса.

Для установления возможной взаимосвязи между состоянием ПОЛ, активности антиоксидантных ферментов и аутоиммунитетом в дебюте ИЗСД нами изучен ряд корреляционных взаимоотношений между показателями клеточного и гуморального иммунитета, остаточной функцией β-клеток, состоянием ПОЛ и ферментной защиты в лимфоцитах. Пациенты, у которых в дебюте заболевания были выявлены АФ, имели достоверно более высокие уровни МДА. Уровень ГП в лимфоцитах отрицательно коррелировал с базальным уровнем С-пептида в дебюте заболевания ($r = 0,42$). В противоположность этому уровень МДА прямо коррелировал с уровнями базального и стимулированного С-пептида в дебюте заболевания ($r = 0,42$ натошак, $r = 0,42$ на 60-й минуте). Обнаружена прямая корреляционная связь между активностью СОД в лимфоцитах в дебюте заболевания и уровнем базального и стимулированного С-пептида ($r = 0,41$ натошак, $r = 0,41$ через 60 мин).

В дебюте заболевания установлены корреляционные взаимоотношения между рядом показателей ПОЛ, ферментной защиты и субпопуляционным составом лимфоцитов, аутоантителами, уровнем ИЛ-1. Имелась прямая корреляционная зависимость между МДА в лимфоцитах и количеством НК-клеток ($r = 0,39$), активированных Т-лимфоцитов ($r = 0,39$). Уровни МДА в лимфоцитах были выше у больных имеющими АФ и АН ($r = 0,36$ и $r = 0,49$ соответственно). Активность антиоксидантных ферментов

лимфоцитах отрицательно коррелировала с количеством Т-супрессоров/цитотоксических ($r = -0,38$), КТ – с количеством β -лимфоцитов ($r = -0,54$), КТ – с количеством активированных Т-лимфоцитов ($r = -0,38$). Уровни ГП и МДА в лимфоцитах отрицательно коррелировали с количеством Т-супрессоров/цитотоксических; этим фактам мы пока не находим объяснения.

Выявление более высоких уровней МДА в лимфоцитах у больных, имеющих АФ и АН, а также отрицательная корреляция между активностью ГЛП лимфоцитов и выявляемостью аутоантител к ГДК ($r = -0,44$), возможно, указывает, что усиление процессов ПОЛ и ослабление антиоксидантной защиты клеток в условиях активации иммунной системы является одним из повреждающих механизмов в общей цепи нарушений.

Интересная закономерность отмечена нами в изменении активности СОД в лимфоцитах: независимо от уровня метаболического контроля отмечалось синхронное снижение активности фермента. При этом имела связь корреляционная связь активности СОД в лимфоцитах и иммунологическими показателями: с наличием АФ ($r = -0,43$), количеством активированных Т-лимфоцитов ($r = -0,43$), НК-клеток ($r = -0,42$), Т-хелперов ($r = 0,43$), общим количеством Т-лимфоцитов ($r = -0,53$), Т-супрессоров ($r = -0,37$) на 12-м мес наблюдения. По-видимому, степень снижения активности ключевого фермента защиты клетки – СОД, в лимфоцитах отражает степень активности аутоиммунного процесса. Несмотря на достижение удовлетворительного метаболического контроля, генерализованный аутоиммунный процесс продолжается. При этом усугубляющийся дефицит активности СОД – в лимфоцитах отражает функциональное состояние этих клеток. Быть может, компенсаторно повышенная в начале заболевания активность СОД в лимфоцитах далее истощается или угнетается; эти изменения не зависят от характера медикаментозных воздействий.

Выводы

1. В дебюте ИЗСД отмечено усиление процессов ПОЛ в лимфоцитах периферической крови по сравнению со здоровыми лицами.

2. Уровни МДА и ГП положительно коррелировали с количеством НК-клеток, активированных Т-лимфоцитов, АФ, АН и отрицательно с количеством Т-супрессоров/цитотоксических в дебюте заболевания.

3. Активность антиоксидантных ферментов (СОД, ГЛП) в лимфоцитах периферической крови отрицательно коррелировала с показателями клеточного иммунитета.

4. Активность СОД в лимфоцитах в дебюте ИЗСД положительно коррелировала с базальным и стимулированным уровнем С-пептида.

Литература

1. Ефимов А.С. Диабетические ангиопатии - М., 1989 - С. 26-50.
2. Гаврилов В.В., Мишкорудная М.И. // Лаб.дело-1983.№ 3. С.33-36.
3. Горелышева В.А., Смирнова О.М, Дедев И.И.//Медико-фармац. вестник. - 1996. - N 4-5. - С. 47-54.
4. Корязова Л.К., Гулевский А.К.//Итоги науки и техники: Физиология человека и животных. - 1990. - Т. 14. - С. 70-79.
5. Ланкин В.З., Гуревич С.М., Котельцова Н.В.//Вопр. мед. химии. - 1976. - Т. 22, N 3. - С. 392-395
6. Науменко В.Г. Жирнокислотный спектр и перекисное окисление липидов в эритроцитах больных сахарным диабетом и диабетическими микроангиопатиями: Дисс. ... канд. мед. наук - Киев, 1986.
7. Asayama K., Kosy N.W., Burr I.M. // J. Lab. Clin. - 1986. - Vol. 107. - P. 459-464.
8. Burkard V., Koike T., Brenner H.H., Kolb H. // Diabetologia. - 1992. - Vol. 35. - P. 1028-1034.
9. Ernst J., Pemiston J. // Clin. Chem. - 1980. - Vol. 26. - P. 1103-1104.
10. Fridovich I. // Acc. Chem. Res. - 1972. - Vol. 5. N 10. - P. 321-326.
11. Jennings P.E., Jones A.F., Florkowski C.M. // Diabet. Med. - 1987. - Vol. 4/5. -P. 452-456.
12. Kroncke K.-D., Funda J., Berschick B. // Diabetologia. - 1991. -Vol. 34. - P. 232-238.
13. Madndrup-Poulsen T., Corbett J.A., McDaniel M.L., Nerup J. // Diabetologia. - 1993. - Vol.36. -P. 470-473.
14. Malaisse W.J., Malaisse-Lagae F., Sener A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1982. - Vol. 79. - P. 927-930.
15. Pukel Cx., Baquerizo H., Rabinovich A. //Diabetes. - 1988. -Vol. 37. - P.133-136.