

Состояние системы «ПОЛ*- антиоксиданты» у беременных, больных сахарным диабетом типа 1, и их плодов

Н.П. Микаелян, Ю.А. Князев,
В.А. Петрухин, А.Г. Максина, А.В. Микаелян

*Российский государственный медицинский университет МЗ РФ
(ректор — акад. РАМН В.Н. Ярыгин),
Московский областной НИИ акушерства и гинекологии
(дир. — член-корр. РАМН В.И. Краснопольский)*

Образование активированных кислородных метаболитов (АКМ) в клетках сдерживается на низком уровне системой ферментативных и неферментативных антиоксидантов [1, 2]. При патологических состояниях баланс в системе «АКМ — антиоксиданты» нарушается [5], что может привести к активации деструктивных процессов. Основное внимание уделяется деструктивному действию АКМ, при этом их регуляторная функция мало изучена, за исключением оксида азота.

Развитие окислительного стресса установлено при более чем 100 заболеваниях и патологических состояниях. В некоторых случаях АКМ и окислительные реакции с их участием становятся главным патогенетическим фактором заболеваний. Доказана ведущая роль дестабилизации цитомембран при ИБС, хронических неспецифических заболеваниях легких и других заболеваниях, в развитии акушерской патологии (гестозы, плацентарная недостаточность) [6, 8, 9]. В наших предыдущих исследованиях у беременных доказано участие в механизмах сахарного диабета (СД) усиленного ПОЛ цитомембран, которое приводит к деструкции липидного матрикса, нарушению мембранной проницаемости, деятельности важнейших ферментов и изменению функционального состояния мембрано-рецепторного комплекса [6-8].

Целью настоящего исследования явилось изучение состояния системы «ПОЛ-антиоксиданты» у беременных женщин с СД I типа и их плодов.

Объем и методы исследования

Под наблюдением находилось 98 женщин, больных СД I типа, в III триместре беременности: из них 22 женщины наблюдались в родах и через 1 ч, 1 сутки и через 5-7 суток после родов. Возраст больных 18-40 лет (средний возраст $26 \pm 5,4$ года). Срок заболевания от 5 до 16 лет, суточная доза инсулина составляла в среднем 72 ЕД. К моменту исследования больные находились в состоянии компенсации СД, что подтверждалось нормогликемией натощак и в течение дня, аглюкозурией. Контрольную группу составили 30 беременных женщин без эндокринной патологии.

Объектом исследования служили мембраны эритроцитов (МЭ) и мононуклеарные клетки (МНК), выделенные по описанному нами методу [7]. Показатели пуповинной крови, взятой до

первого вдоха новорожденного, расценивались нами как данные плода. Об интенсивности ПОЛ в выделенных плазматических МЭ судили по содержанию малонового диальдегида (МДА) и гидроперекисей (ГП), которое оценивали в реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [11, 15]. Антиокислительную активность (АОА) крови определяли по способности плазмы тормозить накопление ТБК-активных продуктов ПОЛ в суспензии желточных липопротеидов [4]. Активность каталазы определяли по методу [4] на основе реакции разложения H_2O_2 . Активность CuZn-СОД исследовали путем измерения процента торможения скорости реакции восстановления нитросинего тетразолия при ферментном образовании супероксидного радикала [10].

Количество инсулиновых рецепторов определяли по методу [13]. Связывание ^{125}I -инсулина с рецепторами цитомембран исследовали с использованием метода вытеснения меченого инсулина из комплекса с рецепторами возрастающими количествами немеченого гормона в условиях равновесия [13]. Общее количество инсулинсвязывающих мест и сродство рецепторов к гормону определяли по методу L. Scatchard [17], P. Meys и I. Roth [14].

Коэффициент упорядоченности и гидрофобности МЭ, а также концентрацию тиоловых групп изучали методом электронно-парамагнитно-резонансной (ЭПР) спектроскопии с помощью спиновых зондов на радиоспектре E-4 («Varian», США).

Статистический анализ данных проводили с помощью программы для персонального компьютера, разработанной на кафедре медицинской и биологической кибернетики РГМУ, с использованием статистических критериев, не зависящих от характера распределения — точного метода Фишера, критерия хи-квадрата, t-критерия Стьюдента. Значимость коэффициентов корреляции определялась с использованием Z-преобразования Фишера по критерию Стьюдента (t-критерий).

Результаты и их обсуждение

Результаты исследований свидетельствуют о том, что содержание АКМ ПОЛ в мембранах клеток крови на протяжении физиологической беременности имеет тенденцию к возрастанию; концентрация МДА и ГП в крови наибольших значений достигает к моменту родов, превышая начальные значения в 1,8 (МДА) и в 2 (ГП) раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Известно, что умеренно выраженная интенсификация процессов ПОЛ во время беременности у здоровых женщин является приспособительной реакцией, направленной на обеспечение нормального течения беременности и родов, явля-

* ПОЛ — перекисное окисление липидов.

ясь одним из этапов синтеза простагландинов и стероидных гормонов.

При СД усиливаются окислительные процессы, создаются условия для накопления АКМ, о чем свидетельствует значительное увеличение содержания МДА и ГП в сыворотке крови и МЭ по сравнению с контролем. Наиболее интенсивное накопление АКМ нами отмечено у беременных с тяжелыми формами гестоза и длительной декомпенсацией СД типа I [8], когда содержание МДА достигает $38,6$ мкмоль на 2×10^9 клеток, а ГП – $9,8$ отн. ед. на 2×10^9 клеток. Компенсация СД I типа приводила к снижению, но не нормализации их содержания, что свидетельствует о том, что инсулин оказывает проокислительное действие. У беременных с СД типа I выявлено снижение АОА в сыворотке крови и МЭ.

При изучении с помощью спиновой метки одного из наиболее активных групп белка – SH (тиоловых групп), играющих антиоксидантную роль, оказалось, что имеет место изменение конформации поверхностных белков, свидетельствующее об их агрегации и полимеризации. Это может привести к снижению функционирования полных насосов МЭ. Изучение при аллоксановом диабете активности Na^+ , K^+ -АТФазы подтверждает это предположение. При экспериментальном диабете резко снижается активность этого фермента как в МЭ, так и в почечной ткани у крыс.

Содержание глутатиона, восстанавливающего в физиологических условиях метгемоглобин в оксигемоглобин и обеспечивающего высокую концентрацию оксигемоглобина в тканях, в условиях окислительного стресса у беременных с СД типа I снижается в 2,5 раза ($p < 0,01$). Концентрация тиоловых групп, входящих в состав липопротеидных комплексов мембран, снижается в 1,9 раза ($p < 0,05$).

Активность CuZn COD снижается в 1,9 раза ($p < 0,05$). Активность каталазы в III триместре беременности у женщин с СД снижается в 6,3 раза ($p < 0,001$). Однако даже при компенсации СД I типа у беременных в эритроцитах снижена активность каталазы, глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы [9], что приводит к накоплению активированных кислородных метаболитов. Изменение липидного состава и интенсификация процессов ПОЛ в мембранах приводит к нарушению мембранных структур. АКМ способны связывать липиды и белки цитомембран, повышая их жесткость, уменьшая способность к деформации, ускоряя старение клетки.

При изучении параметров структурной организации МЭ мы выявили повышение микровязкости мембран и снижение гидрофобности у беременных при СД I типа. Прослеживается четкая взаимосвязь между возрастом степени активации ПОЛ и снижением доступности тиоловых группировок (т. е.

повышенной агрегацией белков) ($p < 0,006$) на поверхности клеточных мембран. В связи с тем что свободные тиоловые группы являются основными структурами, обеспечивающими действие мембранных антиоксидантов, уменьшение их доступности для спиновой метки указывает, с одной стороны, на деструктивные изменения в мембране (повышение жесткости), с другой, на снижение ее способности связывать активные кислородные метаболиты ПОЛ.

Таким образом, при СД у беременных резко снижается уровень антиоксидантов ферментной и неферментной природы вследствие полимеризации белков, что может привести к снижению активности протеинкиназы, т.е. инсулинового рецептора, являющегося интегральным белком в липидном матриксе мембраны.

Изучение инсулинсвязывающей активности (ИСА) в мононуклеарах (МНК) и выяснение взаимосвязи инсулинрезистентности и состояния инсулиновых рецепторов (ИР) осуществляли у леченных инсулином беременных, больных СД I типа (в III триместре беременности), с различной потребностью в инсулине. Мононуклеары выделяли у 52 беременных женщин с СД I типа в III триместре беременности. Согласно характеру связывания ^{125}J -инсулина с МН все больные были разделены на 2 группы: в I-ю вошли 32 беременных с повышенным, во 2-ю 20 беременных с пониженным связыванием ^{125}J -инсулина (табл. 1).

В табл. 1 представлены величина максимального специфического связывания ^{125}J -инсулина, параметры инсулинрецепторного взаимодействия, определенные с помощью построения графических зависи-

Таблица 1

Параметры инсулинрецепторного взаимодействия в МНК беременных, больных СД ($M \pm m$)

Группа	Связывание ^{125}J -инсулина, % к общему количеству		R_0 , нмоль/мг белка	K_e , 10^7 M^{-1}	K_f , 10^7 M^{-1}
	максимальное специфическое	неспецифическое			
1-я	$30,4 \pm 3,4$	$7,4 \pm 0,9$	$0,53 \pm 0,1$	$31,0 \pm 4,9$	$8,7 \pm 1,2$
	$>0,05$	$<0,01$	$>0,1$	$<0,01$	$<0,05$
2-я	$13,9 \pm 1,8$	$3,3 \pm 1,09$	$0,16 \pm 0,03$	$16,3 \pm 1,1$	$5,9 \pm 0,4$
	$<0,01$	$>0,1$	$<0,001$	$>0,1$	$>0,1$
Контрольная	$29,3 \pm 1,9$	$3,2 \pm 0,9$	$0,55 \pm 0,07$	$18,0 \pm 2,3$	$5,1 \pm 0,9$

Примечание. p_1 – различия с контрольной группой;
 p_2 – различия между 1-й и 2-й группами;
 R_0 – количество инсулинсвязывающих мест,
 K_e и K_f – сродство свободных и максимально занятых ИР соответственно.

мостей Скатчарда [17] и Мейтса и Рота (Ке и Кф) [14] для каждого больного, а также средние значения величин для обеих групп больных (см. рисунок).

Снижение связывания во 2-й группе больных определяется количеством ИР, а повышение связывания в 1-й группе – сродством свободных и занятых рецепторов. Для 2-й группы характерно и значимое увеличение показателей неспецифического связывания меченого гормона, что можно предположительно объяснить изменением свойств ПМ, которое может влиять на сродство ИР.

Максимальное специфическое связывание ^{125}J -инсулина с МН варьировало (от 8,5 до 60,3 %), но средняя величина связывания ($22,3 \pm 2,1\%$) достоверно ($p < 0,05$) отличалась от контрольной величины. Исходя из того, что у больных 1-й группы максимальное специфическое связывание было близким к норме, можно предположить, что инсулинотерапия приводит к нормализации активности ИР у больных с повышенным сродством ИР и не вызывает увеличения

количества ИР у тех больных, у которых оно исходно не увеличено. По-видимому, у последних нарушение аффинитета ИР играет в патогенезе СД 1 типа большую роль, чем у больных с повышенным сродством ИР, которое может быть следствием нарушения метаболизма из-за инсулиновой недостаточности. Полученные данные свидетельствуют о гетерогенности инсулинзависимой формы диабета у беременных.

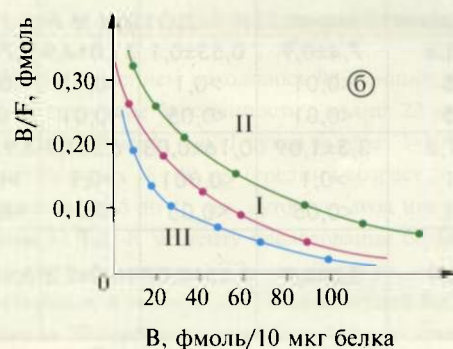
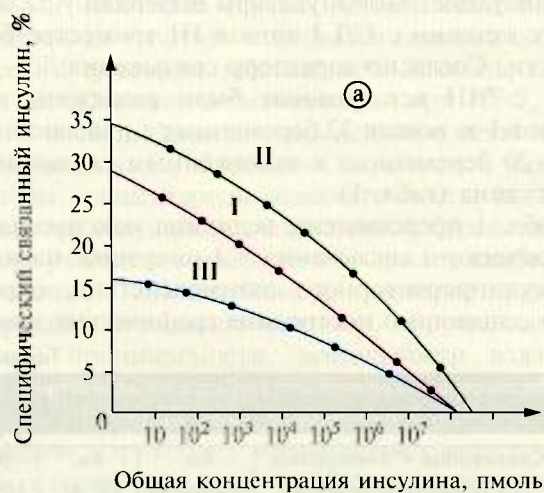
Через 1 ч после родов у 9 больных СД типа 1 отмечалось возрастание максимального специфического связывания инсулина с $22,8 \pm 3,2$ до $27,6 \pm 0,6\%$ ($p < 0,05$) (табл. 2) за счет повышения как количества, так и сродства свободных и максимально занятых ИР. Неспецифическое связывание соответствовало контролю. Отсутствовала корреляция между длительностью заболевания, суточной дозой инсулина и максимальным специфическим связыванием ^{125}J -инсулина. Это свидетельствует о том, что более высокие дозы экзогенного инсулина не приводят к снижению активности ИР в МНК у больных СД 1 типа; возможно, имеет место дефект не только на рецепторном, но и на пострецепторном уровне.

У 7 больных, получавших наиболее высокие суточные дозы инсулина (100–120 ед), максимальное специфическое связывание ^{125}J -инсулина было близким к норме. Снижение активности ИР в МНК при СД 1 типа обусловлено количеством связывающих инсулин мест ($0,35 \pm 0,06$ нмоль на 1 мг белка по сравнению с $0,55$ нмоль на 1 мг белка в норме).

Анализ полученных данных по Мейтсу и Роту показал отсутствие изменений по сравнению с нормой приведенного сродства свободных ($24 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ против $18 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) и занятых ($7,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ против $5,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) ИР. Сравнение максимального специфического связывания ^{125}J -инсулина у больных с компенсированным и декомпенсированным диабетом не выявило значительного различия ($p < 0,05$).

Таким образом, инсулинотерапия и достижение компенсации у больных с СД 1 типа беременных не обязательно приводит к нормальной активности ИР в МНК. Это подтверждается и данными авторов [12, 16], показавших снижение специфического связывания инсулина с адипоцитами у больных инсулинзависимым компенсированным диабетом с длительностью заболевания 10 лет. По-видимому, большее значение имеет определение исходной степени сродства ИР.

Как видно из табл. 2, перед родами резко снижаются ИСА и утилизация глюкозы мононуклеарами, а также АОА сыворотки крови, при низких значениях МДА и инсулина. Во время родов в пуповинной крови, взятой до первого вдоха новорожденного,



Специфическое связывание инсулина МН у беременных, больных сахарным диабетом I типа. I – контроль; II – 1-я группа (с повышенным связыванием); III – 2-я группа (с пониженным связыванием).

Таблица 2

Влияние родового стресса на состояние системы «ПОЛ-АОА»
и инсулинсвязывающую активность мононуклеаров беременных, больных СД I типа (M±m)

Группа	Максимальное специфическое связывание, %	МДА (сыв.), нмоль/мл	АОА (сыв.), %	Утилизация глюкозы мононуклеарами, в % в час
Контроль (небеременные здоровые женщины)	Нет данных	5,6±0,56	58±2,0	Нет данных
Контроль (при физиологическом течении беременности (36-39 нед.))	29,3±2,3	6,21±0,33	58,3±2,9	48,0±1,9
Больные СД I типа, небеременные	17,8±1,3 *	6,3±0,4*	52,1±0,3	29,1±2,8*
Беременные с СД I типа (36-39 нед.)	19,2±1,3*	3,8±0,21	26,0±2,4*	38,2±1,5
в конце 2-го периода (из вены роженицы)	22,8±1,2*	10,2±0,8	57,6±1,1	45±2,7
из пуповины	12,7±0,67*	6,9±0,29	59,9±1,5	40,0±1,7
через 1 час после родов	27,9±0,7	9,8±0,5	58,3±2,1	38,6±2,2*
через 1 сутки после родов	26,4±1,3 *, **	10,5±0,2	56±2,1	нет данных
через 5-7 суток после родов	14,8±0,9 *	9,4±1,2	55,8±2,4	32±2,3 *
через 1 час после кесарева сечения	27,6±1,6	4,4±0,7	60,3±1,82	37,3±1,4 *

Примечание. * – различия с контрольной группой; ** – различия с группой беременных с СД I типа до родов.

которое расценивалось нами как данные плода, ИСА МНК понижается еще значительно, однако потребление глюкозы клетками восстанавливается до нормальных величин, в то время как в венозной крови у рожениц в конце II периода родов ИСА МНК повышается ($p < 0,05$) по сравнению со значениями до родов. Улучшается также усвояемость глюкозы, при этом высокое содержание МДА сыворотки крови компенсируется повышенной активностью АОА.

После родов во все сроки исследования усвояемость глюкозы МН понижается, несмотря на то, что ИСА в 1-е сутки после родов высокая. Повышение процента связывания меченого инсулина МНК при низком уровне потребления глюкозы имеет компенсаторный характер.

Выводы

1. Активация свободнорадикальных реакций ПОЛ при сахарном диабете у беременных приводит к окислительному повреждению цитомембран.

2. Дисбаланс в системе «ПОЛ-антиоксиданты» у беременных с СД обусловлен преобладанием продукции активированных кислородных метаболитов на фоне снижения функционирования антиоксидантов ферментной (каталаза, CuZn COD) и неферментной (тиоловые группы, глутатион) природы.

3. Окислительный стресс у беременных с сахарным диабетом приводит к снижению инсулинсвязывающей активности клеток крови в результате полимеризации мембранных белков (в том числе протектиназы).

Литература

1. Владимиров Ю. А., Азизова О. А., Деев А. И. и др. // Итоги науки и техники. Серия биофизика. т. 29 М.: ВИНТИ, 1991. 249 с.
2. Кузина Е. Н., Глушенко Н. Н. // Биохимия, 1996, т. 61, вып. 6, С. 993 – 997.
3. Клебанов Г. И., Бабенкова И. В., Теселькин Ю. О. и др. // Лаб. дело. -1983. -№ 3. -С. 33 -35.
4. Мамонтова Н. С., Белобородова Э. И., Тюкалова Л. И. // Клин. лаб. диагн. 1994. № 1. С. 27-28.
5. Менщикова Е. Б., Зенков Н. К. // Успехи соврем. биологии. 1993. Т. 113. № 4. С. 442.
6. Микаелян А. В. Нарушения состояния плода и энергетический обмен у беременных с хроническими неспецифическими заболеваниями легких: Дис. канд. мед. наук – М., 1993.
7. Микаелян Н. П. Метаболический статус и инсулинсвязывающая активность клеток крови и печени при экстремальных состояниях. Автореф. дисс. доктора биол. наук. -М., 1992.
8. Микаелян Н. П., Князев Ю. А., Максина А. Г. и др. // Вестник РАМН, 1997 № 7, С. 54-56.
9. Федорова М. В., Краснопольский В. И., Петрухин В. А. Сахарный диабет, беременность и диабетическая фетопатия. - М. 2001.
10. Чевари С., Чаба И., Секей И. // Лаб. дело. 1985. № 11. С. 678 - 680.
11. Brichard S. M., Lederer J. And Henquin J. C. // Diabete metabolisme. 1991. - №17. - P. 435-440.
12. Brichard S. M., Dsbuguois B., Girard J. // Mol. Cel. Endocrinol., 1993. -№91. -P. 91-97.
13. Kahn C. R., Freychet P., Roth I., Newille D. M. Ir. -J. biol. chem. -1974. - vol. 249, № 7ю-Р. 2249- 2257.
14. De Meyts P. // Methods in Molecular Biology. - Ntw York, Marul, Dekker, 1976. - P. 301- 383.
15. Osacawa I., Matsushita S. // Lipids. - 1980. -vol. 15. -№ 3. - P. 137- 140.
16. Pedersen O. // Dan. Med. Bull. - 1984. - vol. 31. -P. 1-32.
17. Scatchard L. // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 1949. - 51, N 6. -P. 660-672.