УДК 577.169:618.36 + 577.15: 577.17+577.164.1

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ АКТИВНОСТЬЮ ИНСУЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ И АТФ КРОВИ НА ФОНЕ ДИСЛИПИДЕМИИ У ДЕТЕЙ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Гурина А.Е., Микаелян Н.П., Кулаева И.О., Микаелян А.В., Терентьев А.А.

ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», Москва, e-mail: ninmik@yandex.ru

Проведен анализ особенностей взаимосвязи энергетического обмена от состояния инсулиновых рецепторов на фоне дислипидемии у больных сахарным диабетом (СД) детей. Изучались следующие параметры у 70 детей, больных СД I и II типов: липидный и липопротеидный спектры, инсулинсвязывающая активность мембран лимфоцитов и эритроцитов, уровень АТФ, активность мембраносвязанного фермента Na^+, K^+-АТРазы, концентрация малонового диальдегида и другие показатели. Установлена прямая зависимость между активностью функции инсулиновых рецепторов и уровнями АТФ. Выраженность метаболических нарушений у пациентов с СД 1 зависела от длительности диабета, стадии компенсации углеводного обмена и наличия сосудистых осложнений: было отмечено выраженное повышение содержания общего ХС у пациентов с течением заболевания более 5 лет или с сосудистыми осложнениями. Пациенты с СД 2 характеризовались более выраженными и разнообразными отклонениями показателей липидного обмена. Повышение содержания общего холестерина и триацилглицеридов в сыворотке крови сопровождалось снижением холестерина ЛПВП. В основе метаболической недостаточности у детей, больных сахарным диабетом, лежат дислипидемия, нарушение структурно-функциональных свойств в мембрано-рецепторном аппарате клеток, сопровождающееся снижением уровня АТФ, угнетением активности мембраносвязанного фермента Na^+, K^+-АТРазы, резким снижением инсулинсвязывающей активности рецепторов и уменьшением потребления глюкозы клетками, что свидетельствует о снижении чувствительности клеток к инсулину. Пациенты с СД 2 характеризовались более выраженными и разнообразными отклонениями показателей липидного обмена.

Ключевые слова: АТФ, инсулинсвязывающая активность, сахарный диабет, дислипидемия, энергетический обмен

RELATIONSHIP BETWEEN THE ACTIVITY OF THE INSULIN RECEPTOR AND ATP BLOOD ON THE BACKGROUND OF CHILDREN DYSLIPIDEMIA IN DIABETES MELLITUS

Gurina A.E., Mikaelyan N.P., Kulayeva I.O., Mikaelyan A.V., Terentyev A.A.

Government, fiscal institution of higher professional education «Russian National Research Medical University them. Pirogov», Moscow, e-mail: ninmik@yandex.ru

In the study of the of the interplay between the state of the energy metabolism of insulin receptors on the background of dyslipidemia in patients with diabetes mellitus (DM) children. The following parameters were studied in 70 children with diabetes type I and II: lipid and lipoprotein spectral insulinsbinding active membrane cells and red blood cells, ATP levels, the activity of membrane-bound enzyme Na^+, K^+-ATPazy, the concentration of malondialdehyde and other indicators. Is a direct correlation between the activity of the insulin receptor function and levels of ATP. Of metabolic abnormalities in patients with type 1 diabetes depend on the duration of diabetes, the stage of compensation of carbohydrate metabolism and the presence of vascular complications has been a marked increase in the content of total cholesterol in patients over 5 years of disease or vascular complications. Patients with type 2 diabetes characterized by more open and diverse abnormalities in lipid metabolism. Elevated levels of total cholesterol and triacylglycerides in the serum was associated with decreased HDL cholesterol. At the heart of the metabolic deficiency in children with diabetes, there are dyslipidemia, structural – functional properties of membrane-receptor system cells, including a decrease in the level of ATP, inhibition of the activity of membrane-bound enzyme Na^+, K^+-ATPazy, a sharp decline insulinsbinding receptor activity and a decrease in consumption glucose by cells, which indicates a decrease in the sensitivity of cells to insulin. Patients with type 2 diabetes characterized by more open and diverse abnormalities in lipid metabolism.

Keywords: ATP insulinsbinding activity, diabetes mellitus, dyslipidemia, energy metabolism

Чтобы осуществить свое действие на метаболизм глюкозы после поступления в циркуляцию, инсулин связывается со специфическими рецепторами на мембранах клеток. Дефект инсулинового действия развивается вследствие нарушения связывания гормона, а также ухудшения образования вторичного посредника инсулинового действия, уменьшения транспорта глюкозы в клетку или дистальных дефектов основных ферментов, участвующих в утилизации глюкозы [5, 4].

Развивающийся ацидоз на фоне гипергликемии при СД у детей нарушает течение многих ферментативных реакций в организме и вместе с тем активирует некоторые фосфолипазы и протеазы, что ведет к усилению распада фосфолипидов и белков и к повышению концентрации ненасыщенных жирных кислот и усилению их перекисного окисления.[3]. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) усиливается, и в результате подавления и истощения антиоксидантной системы из-за активации

распада и торможения ресинтеза белковых компонентов данной системы. Продукты ПОЛ, в свою очередь, усугубляют нарушение структуры и функции мембран, в том числе и инсулинсвязывающую функцию. В результате формируется гипоксический тип метаболизма, резко усугубляющий течение СД у детей.

Тяжесть течения у детей и подростков СД типа 1 (СД 1) характеризуется быстрым развитием гипоксии и других метаболических осложнений, патогенез которых по-прежнему остается изученным недостаточно.

Целью работы является изучение состояния энергетического обмена и зависимость между активностью инсулиновых рецепторов и уровнями АТФ крови у детей, больных сахарным диабетом.

Материалы и методы исследования

При сахарном диабете у детей проводили комплексное исследование липидного состава сыворотки и мембран клеток крови, степени переокисления липидов, инсулинсвязывающую активность (ИСА) клеток крови, а также состояние ферментов антиоксидантной защиты (АОЗ). Обследовано 70 детей в возрасте 3–15 лет с сахарным диабетом 1 и 2 типа, в контрольную группу были включены 26 практически здоровых детей, не предъявляющих в момент обследования жалоб. 27 детей страдали СД 1, длительность которого варьировалась от 1 года до 10 лет. Степень компенсации СД была определена с учетом содержания глюкозы в сыворотке крови утром натощак и концентрации гликированного гемоглобина (Hb A_{1c}). Компенсацию углеводного обмена у детей считали при показателе Hb A_{1c} ниже 7,0 %. 17 детей 13–15 лет страдало СД 2 типа (СД 2). Показатели метаболизма глюкозы у них указывали на декомпенсированное течение заболевания (средний уровень Hb A_{1c} – 12,6 %, суточная гликемия – 11,26 ммоль/л, доза инсулина 0,95 Ед/кг). Больные СД 1 дети получали человеческий рекомбинантный инсулин в индивидуальной дозе по интенсифицированной схеме (от 0,35 до 1,66 Ед/кг). При СД 2 типе дети также получали корригирующую углеводный обмен терапию (препараты групп сульфонилмочевины и бигуанидов).

Липиды мембран эритроцитов экстрагировали хлороформ-метаноловой смесью по методу J. Folch et al. 1957 [11]. Общее содержание липидов в мембране эритроцитов определяли методом Тарановой Н.А., 1987 [8]. Препаративное разделение общих липидов проводили методом тонкослойной хроматографии [Финдлей Дж.Б., Эванз У.Г., 1990] [9] в системе растворителей гептан:диэтиловый эфир:этилацетат (в соотношении 80:20:1,5) на пластинках «Sorbfil» (Россия). Разделение фракций фосфолипидов мембран эритроцитов методом тонкослойной хроматографии по Прохоровой М.И., 1982 [7] осуществляли в системе хлороформ:метанол:вода (в соотношении 32:12,5:2) на пластинках «Sorbfil» (Россия). Идентификацию фракций липидов осуществляли с использованием соответствующих стандартов (фирма «Sigma», США). Количественную оценку хроматограмм проводили с помощью разработанной компьютерной программы.

Эритроциты, отделенные от плазмы, отмывали троекратным центрифугированием в среде Хэнкса без кальция и магния с pH 7,3 на центрифуге Multifuge 1S/ IS-R Германия) при 1900 g в течение 10 мин. Утилизацию глюкозы клетками крови определяли в среде, содержащей $2 \cdot 10^9$ кл/мл отмытых эритроцитов, инкубированных с возрастающими концентрациями нативного инсулина [6]. О количестве глюкозы, потребленной клетками, судили по разнице концентрации глюкозы в среде до и после инкубации. Активность инсулиновых рецепторов исследовали по связыванию ^{125}I – инсулина с лимфоцитами, полученными из цельной крови в одноступенчатом градиенте фиколла-верографина по методу Boum [10] и с эритроцитами, отмытыми трёхкратно, по ранее описанному нами методу [4]. Концентрацию АТР и лактата в периферической крови определяли с помощью наборов фирмы «Boehringer», активность Na^+, K^+–Ca^{2+}-АТРазы определяли по модифицированному методу [2].

Данное исследование одобрено комитетом по этике РНИМУ им. Н.И. Пирогова. Дети и их родители давали информированное согласие на участие в данном исследовании.

Оценку хроматограмм проводили с помощью разработанной компьютерной программы.

Результаты исследования обрабатывали при помощи t-критерия Стьюдента. Приведена среднеарифметическая ± ошибка средних показателей. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

У больных СД 1 липидный спектр сыворотки крови характеризовался повышением концентрации общего ХС и повышением индекса атерогенности. При этом выраженность метаболических нарушений у пациентов с СД 1 зависела от длительности диабета, стадии компенсации углеводного обмена и наличия сосудистых осложнений: было отмечено выраженное повышение содержания общего ХС у пациентов с течением заболевания более 5 лет или с сосудистыми осложнениями. Пациенты с СД 2 характеризовались более выраженными и разнообразными отклонениями показателей липидного обмена (табл. 1). Повышение содержания общего холестерина и триацилглицеридов в сыворотке крови сопровождалось снижением холестерина ЛПВП.

Механизмы развития гиперхолестеринемии при сахарном диабете связаны с нарушением гормональной регуляции, так как инсулярная недостаточность может быть связана не только с нарушением углеводного и липидного обмена, но и повышением уровня контринсулярных гормонов [1] и, следовательно, нарушением всех видов обмена веществ. Гипертриглицеридемия сопряжена с повышением содержания ЛПОНП. Как полагают, повышение образования ЛПОНП в печени происходит благодаря увеличенному поступлению жирных кислот [12], а также отсутствию ингибирующего влияния инсулина на продукцию и формирование ЛПОНП.

Таблица 1

Изменение некоторых метаболических показателей крови у больных сахарным диабетом типа 1 и 2 (X ± m)

Показатель	Контрольная группа	Больные сахарным диабетом типа 1	Больные сахарным диабетом типа 2
ЛПВП, мг/дл	292,8 ± 11,3	236,89 ± 9,8 $p_1 > 0,05$	295,17 ± 15,4 $p_1 > 0,05$; $p_2 > 0,05$
ЛПНП, мг/дл	457,06 ± 16,1	435,71 ± 12,5 $p_1 > 0,05$	533,31 ± 23,4 $p_1 > 0,05$; $p_2 > 0,05$
ЛПОНП, мг/дл	53,47 ± 3,9	53,45 ± 4,9 $p_1 > 0,05$	124,85 ± 13,2 $p_1 < 0,01$; $p_2 < 0,01$
Общий холестерин, мг/дл	169,63 ± 11,5	258,06 ± 9,8 $p_1 < 0,05$	303,80 ± 10,4 $p_1 < 0,001$; $p_2 < 0,01$
Общие триглицериды, мг/дл	150,39 ± 9,3	119,38 ± 8,7 $p_1 > 0,05$	213,67 ± 11,5 $p_1 < 0,001$; $p_2 < 0,01$
ХС/ФЛ	0,911 ± 0,26	0,960 ± 0,03 $p_1 < 0,01$	0,960 ± 0,09 $p_1 < 0,01$; $p_2 > 0,05$
ХС ЛПВП, мг/дл	57,87 ± 8,7	43,91 ± 7,1 $p_1 < 0,05$	48,13 ± 7,2 $p_1 < 0,05$; $p_2 > 0,05$
Активность Na^+, K^+- АТРазы, мкМольP_i/час·мг белка	0,107 ± 0,04	0,032 ± 0,03 $p_1 < 0,05$	0,061 ± 0,03 $p_1 < 0,05$; $p_2 > 0,05$
АТР, мкМоль/л	621 ± 26,8	364,7 ± 17,6 $p_1 < 0,01$	317,8 ± 17,9 $p_1 < 0,01$
МДА в плазме, мкмоль/мл	0,75 ± 0,03 $n = 26$	1,16+0,03 $p_1 < 0,001$ $n = 6$	1,18 ± 0,01 $p_1 < 0,001$ $n = 16$

Примечания: p_1 – уровень значимости различий по сравнению со значениями в контрольной группе; p_2 – уровень значимости различий по сравнению со значениями у пациентов сахарным диабетом типа 1. ЛПНП – липопротеины низкой плотности, ЛПОНП-липопротеины очень низкой плотности, ЛПВП – липопротеины высокой плотности, ХС ЛПВП – холестерин липопротеинов высокой плотности.

Как показало проведенное нами исследование, в мембранах эритроцитов у больных СД угнетена активность Na^+, K^+-АТРазы (табл. 1). Не исключено, что снижение активности Na^+, K^+-АТРазы является результатом структурной модификации липидного матрикса мембран эритроцитов у больных СД детей, вследствие повышения интенсивности свободно-радикальных процессов в мембранах клеток, о чём свидетельствуют высокие значения МДА ($p < 0,001$) (табл. 1). Структурно-функциональными изменениями в липидном бислое мембран эритроцитов можно объяснить уменьшение потребления глюкозы и синтеза АТР в клетках тканей организма.

Вышеуказанные изменения приводят к достоверному снижению активности инсулиновых рецепторов как эритроцитарных мембран, так и лимфоцитов, и не только при СД типа 2, но и при СД типа 1 (табл. 2).

При исследовании зависимости между активностью инсулиновых рецепторов в эритроцитах и лимфоцитах и уровнями АТФ крови у детей, больных СД с трудным достижением фазы компенсации в динамике у 35 детей с лабильным течением сахарного диабета, получающих инсулин в дозе от 0,6 до 1,0 ед./кг массы тела, показало выраженную тенденцию к снижению уровня АТФ крови (277,77 ± 17,43 мкмоль/л, $p < 0,05$ по сравнению с контролем) (табл. 2).

Низкий уровень АТФ крови отражает его недостаточное содержание в клетках, т.к. АТФ проходит через клеточные мембраны. У больных с синдромом хронической передозировки гормона через 1 час после завтрака с предварительным введением инсулина уровень АТФ еще больше снижался в отличие от больных в фазе декомпенсации, но без признаков передозировки инсулина (соответственно 228,52 ± 29,15 и 372,33 ± 41,76 мкмоль/л, $p < 0,02$).

Очевидно, что у больных первой группы имеется недостаток эффектов инсулина на метаболизм. Исследование активности инсулиновых рецепторов у этих детей показало снижение специфического связывания инсулина лимфоцитами (20,68 ± 4,0 %, контроль – 40,05 ± 3,8 %, $p < 0,05$). Выявленная положительная зависимость между сниженным уровнем АТФ крови и специфическим связыванием инсулина лимфоцитами ($r = 0,45$, $p < 0,05$) свидетельствует о развитии у детей с тяжелым СД типа I в фазе декомпенсации инсулинрезистентности, особенно выраженной при синдроме хронической передозировки инсулина, на фоне низкого уровня АТФ крови.

Таблица 2

Изменение содержания АТФ, активности инсулиновых рецепторов клеток крови и Na^+, K^+-АТФазы в эритроцитах у детей при сахарном диабете типа 1 и 2 (X ± m)

Группа больных	АТФ крови, мкМоль/л	ИСА в эритроцитах, %	ИСА в лимфоцитах, %	Активность Na^+, K^+-АТФазы, мкМольP_i/час·мг белка	Утилизация глюкозы эритроцитами, ($2 \cdot 10^9$) Кл/ч
Контроль	621 ± 26,8	29,1 ± 3,9	40,05 ± 3,8	0,107 ± 0,04	1,09 ± 0,015
СД типа I	364,7 ± 17,43 p < 0,05	22,6 ± 2,1 p > 0,05	20,68 ± 4,05 p < 0,05	0,032 ± 0,03 $P_<$ 0,05	0,88 ± 0,03
СД типа II	317,8 ± 17,9	17,5 ± 3,6	19,4 ± 4,9	0,42 ± 0,42	0,82 ± 0, 016

Примечание. p – уровень достоверности различий по сравнению со значениями в контрольной группе.

Как показало проведенное исследование, в мембранах эритроцитов у больных СД угнетена активность Na^+, K^+-АТФазы (табл. 1), что может указывать на нарушение структуры и функции мембраны в процессах активного транспорта ионов. Функционирование мембранной Na^+, K^+-АТФазы связано с гидролизом значительного количества АТФ.

Проведенное исследование состояния инсулиновых рецепторов на фоне дислипидемии показало, что у больных с лабильным течением СД 1 и значительным снижением инсулиносекреции имеет место снижение инсулинсвязывающей активности (ИСА) лимфоцитами. Так, ИСА в лимфоцитах у таких детей составляло 31,61 ± 3,9 %; в контрольной группе – 47, 9 ± 5,9 % ($p < 0,001$), что также подтверждает предположение о влиянии уровня ПОЛ на окислительную модификацию мембран клеток.

Выводы

1. В основе метаболической недостаточности у детей, больных СД, лежат нарушения структурно-функциональных свойств в мембрано-рецепторном аппарате клеток, сопровождающиеся снижением уровня АТР, угнетением активности мембраносвязанного фермента Na^+·K^+-АТРазы, резким снижением инсулинсвязывающей активности рецепторов и уменьшением потребления глюкозы клетками, что свидетельствует о снижении чувствительности клеток к инсулину.

2. СД у детей протекает с нарушением липидного обмена, активацией процессов липидной пероксидации, приводящей к изменению структурно-функциональных свойств мембран клеток.

Список литературы

1. Кравец Е.Б., Рязанцева Н.В., Яковлева Н.М., Бутусова В.Н., Тухватулин Р.Т., Новикова Л.К. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при сосудистых осложнениях сахарного диабета типа 1 // Сахарный диабет. – 2006. – № 1. – С. 10–17. (2006) Сахарный диабет, (1), 10–14.

2. Макаренко Е.В. АТФ азная активность эритроцитов при хронических заболеваниях печени и желудка // Лаб. дело. –1986. – № 3. – С. 14–17.

3. Меньщикова Е.Б, Зенков Н.К, Ланкин В.З. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. – М.: Медгиз, 2008. – 284.

4. Микаелян Н.П., Князев Ю.А., Максина А.Г., Петрухин В.А. Механизмы нарушений функций мембрано-рецепторного аппарата при инсулинзависимом сахарном диабете у беременных женщин // Проблемы эндокринологии. – 1994. – т. 40. – № 4. – С. 4–7.

5. Микаелян Н.П., Князев Ю.А., Петрухин В.А., Микаелян А.В. Инсулинрецепторное взаимодействие в лимфоцитах и эритроцитах у беременных с гестационным сахарным диабетом // Сахарный диабет. – 2006. – № 1. – 15–17.

6. Микаелян Н.П. Метаболический статус и инсулинсвязывающая активность клеток крови и печени при экстремальных состояниях: дис. ... д-ра биол. наук. – М., 1991.

7. Прохорова М.И., Тупикова З.Н. Большой практикум по углеводному и липидному обмену. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1965. – 220 с.

8. Таранова Н.А., Говорова Л.В. Механизмы метаболической адаптации и окислительный стресс при вирусных и бактериальных инфекциях у детей // Вопр. медиц. химии. – 1987. – 2. – С. 132–136.

9. Финдлей Дж.Б., Эванз У.Г. Биологические мембраны. Методы. – М.: Мир, 1990. – 424 с.

10. Boum A. Separation of leucocytes from blood and bone morrow Scand // J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – 21, Suppl. 97. – P. 77–89.

11. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley A.G.H. (1957) J. Biol. Chem., 226, (1), 497-509. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. – 1957. –Vol. 226. – P. 497–509.

12. Komosinska-Vassev K, Olczyk P, Winsz-Szczotka K. Effects of metabolic control and vascular complications on indices of oxidative stress in type 2 diabetic patients // Diabetes Res. Clin. Pract. – 2005. – № 68. – P. 207–216.

References

1. Kravets E.B., Ryazantseva N.V., Yakovleva N.M., Butusova V.N., Tukhvatulin R.T., Novikova L. K.Sakharniy diabet-Diabetes mellitus, 2006, no.1, pp. 13–15.

2. Makarenko E.V. Laboratornoe delo- Laboratory work, 1986, no 3, pp. 14–17.

3. Menschikova E.B., Zenkov N.K., Lankin V.Z., Okislitelniy stress-Oxidative stress, 2008, pp. 284.

4. Mikaelyan N.P., Knyazev Yu.A., Maksina A.G., Petrukhin V.A., Problemy endokrinologi-Problems of Endocrinology, 1994, t.40, no. 4, pp. 4–7.

5. Mikaelyan N.P., Knyazev Ju.A., Petrukhin V.A., Mikaelyan A.R., Sakharnii diabet- Diabetes mellitus, 2006, no. 1, pp. 15–17.

6. Mikaelyan N.P. 1991.

7. Prokhorova M.I., Tupikova Z.N. Bolshoi praktikum po uglevodnomu i lipidnomu obmenu.-A large workshop of carbohydrate and lipid metabolizm, 1965, pp. 220.

8. Taranova N.A.,Govorova L.V. Voprosi meditsinskoi khimii.- Questions of medical chemistry, 1987, pp. 132–136.

9. Findley Dj.B., Evanz U.G. Biologicheskie membrany-Biological membranes, 1990, pp. 424.

10. Boum A. Separation of leucocytes from blood and bone morrow Scand // J. Clin. Lab. Invest. 1968. 21, Suppl. 97. pp. 77–89.

11. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley A.G.H. (1957) J. Biol. Chem., 226, (1), 497-509. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226. pp. 497–509.

12. Komosinska-Vassev K, Olczyk P, Winsz-Szczotka K. Effects of metabolic control and vascular complications on indices of oxidative stress in type 2 diabetic patients // Diabetes Res. Clin. Pract. 2005. no. 68. pp. 207–216.

Рецензенты:

Торховская Т.И., д.б.н., ведущий научный сотрудник, ФГБУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» Российской академии медицинских наук (ФГБУ ИБМХ РАМН), г. Москва;

Белова О.В., д.б.н., заведующая лабораторией молекулярной иммунологии и биохимии, ФГУ «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины» Федерального медико-биологического агентства (ФГУ НИИ ФХМ ФМБА России), г. Москва.

Работа поступила в редакцию 30.11.2013.