

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2000

УДК 616.379-008.64-07:616.153.1

И. А. Бондарь, А. Б. Пупышев, В. В. Климонтов

АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ СЫВОРОТКИ И ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ТИПА 1

Кафедра внутренних болезней (зав. — акад. РАМН Л. Д. Сидорова) лечебного факультета, Центральная научно-исследовательская лаборатория (зав. — канд. мед. наук Г. Н. Шорина) Новосибирского медицинского университета

Изучена активность трех лизосомальных ферментов в сыворотках и лейкоцитах крови у 115 больных сахарным диабетом (СД) типа 1 в зависимости от сосудистых осложнений заболевания, гликемического контроля и состояния перекисного окисления липидов (ПОЛ). В сыворотках крови больных декомпенсированным СД обнаружено повышение активности N-ацетилглюкозаминидазы и β-галактозидазы в 1,7 раза, кислой РНКазы в 1,6 раза по сравнению с контролем. Сдвиги активности ферментов не исчезли при достижении компенсации заболевания. Повышенная активность лизосомальных ферментов регистрировалась у больных с впервые выявленным СД. Наиболее высокий уровень выявлен у пациентов с выраженными сосудистыми осложнениями. У этих же больных в лейкоцитах крови обнаружен дефицит активности N-ацетилглюкозаминидазы и β-галактозидазы. Установлены корреляционные связи между изменениями активности лизосомальных ферментов в сыворотке, лейкоцитах и накоплением продуктов ПОЛ (диеновые конъюгаты, малоновый диальдегид) в мембранах эритроцитов. Полученные данные свидетельствуют об изменениях лизосомального аппарата клеток у больных СД, роли реакций ПОЛ в этих изменениях и их взаимосвязи с развитием ангиопатий.

Activities of 3 lysosomal enzymes in blood serum and leukocytes were studied in 115 with type 1 diabetes with and without vascular complications, different glycaemic and lipid peroxidation (LPO) status. Serum activities of N-acetylglucosaminidase and β-galactosidase were increased by 1.7 times and of acid RNase by 1.6 times in patients with decompensated diabetes vs. the control. Shifts in enzymatic activities did not disappear with compensation of disease. Increased activities of lysosomal enzymes were observed in the patients with first diagnosed diabetes mellitus. The highest levels were observed in patients with pronounced vascular complications. Deficient activities of N-acetylglucosaminidase and β-galactosidase were detected in the blood leukocytes of these patients. Correlations between changes in the serum and leukocyte activities of lysosomal enzymes and accumulation of lipid peroxides (dienic conjugates and malonic dialdehyde) in erythrocyte membranes were disclosed. These data indicate alteration of the cellular lysosomal system in diabetics, contribution of LPO reactions to these shifts, and their relationships with development of microangiopathies.

Изменения различных структур клетки в условиях многочисленных нарушений метаболизма при сахарном диабете (СД) недостаточно изучены. Установлено, что высокая чувствительность к изменениям обмена веществ и гормональной регуляции свойственна лизосомам [5].

На экспериментальных моделях показано, что СД сопровождается лабилизацией мембран лизосом клеток ряда органов, прежде всего печени и миокарда, с соответствующим усилением катаболических процессов, повышением активности лизосомальных ферментов (ЛФ) в сыворотке крови и активацией клеточной аутофагии [5, 13—15]. В развитии этих нарушений большое значение имеет дефицит инсулина. Лабилизация лизосом в условиях инсулиновой недостаточности продемонстрирована и в опытах *in vitro* [18].

Вместе с тем в развитии изменений лизосом при СД не исключена роль других механизмов. В частности, известно, что лабилизация лизосомальных мембран может наступать в результате избыточного накопления продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [16], интенсивность которого значительно повышается при СД [1, 3].

В литературе имеются противоречивые данные об изменениях активности ЛФ у больных СД и их взаимосвязи с диабетическими ангиопатиями (ДА) и гликемическим контролем [6, 7, 17, 20]. В связи с этим целью работы явилось изучение активности ряда ЛФ в сыворотке и лейкоцитах крови у больных СД типа 1 в зависимости от клинических осо-

бенностей заболевания, выраженности нарушений углеводного обмена и уровня ПОЛ.

Материалы и методы

Обследовано 115 больных СД типа 1 (62 мужчины и 53 женщины) в возрасте от 15 до 50 лет с длительностью заболевания от 2 нед до 28 лет. В зависимости от наличия и степени выраженности ДА больные были распределены на 3 группы: 1-ю составили 22 пациента без сосудистых осложнений, 2-ю — 68 обследованных с начальными стадиями ДА (непролиферативная ретинопатия, микроальбуминурия или протеинурия до 0,5 г/сут, функциональная стадия ангиопатии конечностей), 3-ю — 25 больных с выраженными ангиопатиями (препролиферативная или пролиферативная ретинопатия, клинически явная нефропатия, ангиопатия конечностей с трофическими нарушениями).

Клинико-лабораторная характеристика обследованных представлена в табл. 1, демонстрирующей, что группы больных были сопоставимы по половому, возрастному составу, показателям углеводного обмена и различались по длительности заболевания.

Исходное обследование проводили на фоне декомпенсации СД; 71 больной обследован повторно после нормализации гликемии. У всех больных изучали активность ЛФ и показатели ПОЛ в сыворотке крови, у 46 пациентов проводили сравнительное изучение активности ЛФ в сыворотке и

Таблица 1

Характеристика групп обследованных

Показатель	Группа		
	1-я (n = 22)	2-я (n = 68)	3-я (n = 25)
Пол, м/ж	13/9	35/33	14/11
Возраст, годы	27,1 ± 2,1	32,0 ± 1,2	32,6 ± 1,7
Длительность СД, годы	3,0 ± 0,6	10,8 ± 0,7	18,7 ± 1,5
Hb A _{1c} , %	8,1 ± 0,6	8,9 ± 0,4	9,1 ± 0,7
Среднесуточная гликемия, ммоль/л:			
при 1-м обследовании	13,1 ± 0,6	13,3 ± 0,3	13,1 ± 0,6
при 2-м обследовании	7,4 ± 0,4	8,1 ± 0,3	7,7 ± 0,7

лейкоцитах крови в период декомпенсации СД. В исследование не включали пациентов с наличием инфекций, а также получавших антиоксидантные и лизосомотропные препараты. Контрольную группу составили 25 здоровых доноров.

Кровь для исследования активности ЛФ брали из вены локтевой, в 7–8 ч. Выделение лейкоцитов проводили с помощью декстрана Т-500 и осмотического лизиса эритроцитов согласно D. Wengert и C. Williams (1991). Определение активности N-ацетилглюкозаминидазы, β-галактозидазы в концентрате лейкоцитов проводили флюориметрическим методом по методике тех же авторов с использованием в качестве субстратов 4-метилумбеллиферил-N-ацетил-β-D-глюкозаминида и 4-метилумбеллиферил-β-D-галактопиранозида соответственно. В сыворотках активность данных ферментов определяли спектрофотометрическим методом по A. Vaget (1972). В качестве субстрата N-ацетилглюкозаминидазы использовали 4-нитрофенил-β-D-глюкозаминид, β-галактозидазы — 4-нитрофенил-β-D-галактопиранозид. Активность кислой РНКазы в лейкоцитах и сыворотке крови регистрировали спектрофотометрически по модифицированному методу С. De Duve и соавт. (1976). Содержание белка в лейкоцитах определяли по O. Lowry и соавт. (1951). Для оценки интенсивности процессов ПОЛ определяли уровень малонового диальдегида (МДА) по М. С. Гончаренко, А. М. Лагиновой (1985), диеновых конъюгатов (ДК) по В. П. Верболович и соавт. (1989) в гемолизатах эритроцитов.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью стандартных методов вариационной статистики, включая корреляционный анализ, с использованием пакета анализа Microsoft Excel на IBM PC Pentium. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены как $M \pm m$.

Результаты и их обсуждение

В сыворотке крови больных декомпенсированным СД типа I обнаружено повышение активности ЛФ: N-ацетилглюкозаминидазы в 1,7 раза ($1113,8 \pm 55,1$ нмоль/ч/мл; $p < 0,001$), β-галактозидазы в 1,7 раза ($1,54 \pm 0,13$ нмоль/ч/мл; $p < 0,01$), кислой РНКазы — в 1,6 раза ($10,5 \pm 0,3$ нмоль/ч/мл; $p < 0,001$) по сравнению с контролем. Достоверно ($p < 0,01$) повышенная активность N-ацетилглюкозаминидазы и кислой РНКазы регистрировалась уже у больных с впервые выявленным СД. Выраженное повышение активности всех исследован-

Таблица 2

Активность ЛФ (в нмоль/ч/мл) в сыворотке крови у больных СД типа I в зависимости от выраженности ДА и компенсации заболевания

Группа обследованных	N-ацетилглюкозаминидаза	β-Галактозидаза	Кислая РНКазы
Фаза декомпенсации			
1-я (n = 22)	995,2 ± 61,2*	1,38 ± 0,20	8,3 ± 0,5*
2-я (n = 68)	1048,9 ± 67,4*	1,52 ± 0,24*	10,0 ± 0,4***
3-я (n = 25)	1395,0 ± 142,7*****	1,73 ± 0,18*	14,6 ± 0,9*****
Фаза компенсации			
1-я (n = 15)	949,9 ± 153,0	1,30 ± 0,24	8,9 ± 0,9*
2-я (n = 40)	984,3 ± 74,1*	1,54 ± 0,20*	9,3 ± 0,6*
3-я (n = 16)	1196,7 ± 74,4***	2,03 ± 0,30*	12,9 ± 1,1*****
Контрольная (n = 25)	668,0 ± 32,6	0,90 ± 0,16	6,4 ± 0,4

Примечание. Здесь и в табл. 3: звездочки — достоверность ($p < 0,05$) различий с показателями: одна — в контроле; две — в 1-й группе; три — во 2-й группе.

ных ЛФ выявлено у пациентов с длительным (более 10 лет) течением заболевания, осложненным развитием ДА. Как видно из табл. 2, активность ЛФ возрастала по мере увеличения выраженности сосудистых осложнений. При этом наиболее высокая активность ферментов отмечена в группе больных с развернутой нефропатией, пре- и пролиферативной ретинопатией, ангиопатией нижних конечностей с трофическими расстройствами.

Вопреки данным, приведенным в работе [9], нами не выявлено зависимости активности ЛФ от степени гипергликемии и уровня гликированного гемоглобина, не отмечено также влияния на активность ферментов кетоацидоза. Оптимизация инсулинотерапии и достижение компенсации углеводного обмена не сопровождалась исчезновением описанных сдвигов активности ЛФ, хотя прослеживалась тенденция к уменьшению их выраженности. Это подтверждает предположение о том, что дефицит инсулина не является единственным фактором, определяющим изменения лизосом у больных СД.

Изменения активности ЛФ в лейкоцитах больных декомпенсированным СД были противоположны наблюдавшимся в сыворотке. По сравнению с контролем обнаружены снижение активности N-ацетилглюкозаминидазы ($762,4 \pm 56,1$ нмоль/ч/мг белка; $p < 0,05$), β-галактозидазы ($52,9 \pm 5,1$ нмоль/ч/мг белка; $p < 0,01$) и тенденция к снижению активности кислой РНКазы ($205,5 \pm 40,8$ нмоль/ч/мг белка; $p > 0,05$). При этом значительный дефицит N-ацетилглюкозаминидазы и β-галактозидазы выявлен у больных с выраженными ДА, в то время как у пациентов без сосудистых осложнений или с их начальными стадиями активность ферментов оставалась нормальной или менялась незначительно (табл. 3). Полученные результаты согласуются с данными авторов, показавших снижение активности ЛФ в лейкоцитах крови у больных с длительным СД типа I [6] и ДА [20].

Как показали результаты работы, изменения активности ЛФ сочетались со значительным усилением процессов липопероксидации, о чем свиде-

Таблица 3

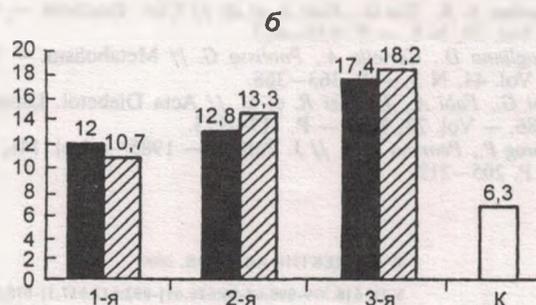
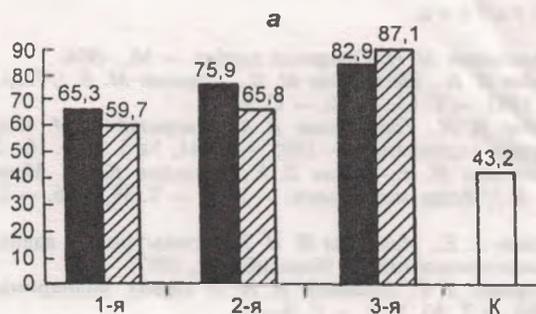
Активность ЛФ (в нмоль/ч/мг белка) в лейкоцитах крови у больных декомпенсированным СД типа I в зависимости от выраженности ДА

Группа обследованных	N-ацетилглюкозаминидаза	β -Галактозидаза	Кислая РНКаза
1-я (n = 14)	906,7 \pm 94,4	58,3 \pm 10,6	230,6 \pm 35,5
2-я (n = 20)	763,2 \pm 69,4	54,0 \pm 6,1*	193,9 \pm 22,4
3-я (n = 12)	592,8 \pm 51,8*	44,8 \pm 7,2*	195,8 \pm 33,7
Контрольная (n = 15)	956,1 \pm 72,9	75,2 \pm 6,5	263,6 \pm 40,8

тествовало избыточное накопление в мембранах эритроцитов первичных (ДК) и вторичных (МДА) продуктов ПОЛ (см. рисунок). Содержание этих веществ было повышено по сравнению с контролем в 1,7 раза (74,6 \pm 4,4 мкмоль/мл; в контроле — 43,2 \pm 1,6 мкмоль/мл) и в 2,2 раза (13,5 \pm 1,3 мкмоль/мл; в контроле — 6,3 \pm 0,2 мкмоль/мл) соответственно. Интенсификация ПОЛ регистрировалась при различной длительности СД, начиная с клинической манифестации заболевания (ДК 67,9 \pm 7,1 мкмоль/мл, МДА 12,6 \pm 1,8 мкмоль/мл), что подтверждает данные, приведенные в работе [3]. Наиболее высокие показатели отмечены в 3-й группе больных. Содержание продуктов ПОЛ оставалось повышенным и при достижении компенсации СД.

Установлены достоверные ($p < 0,05$) корреляционные связи между содержанием МДА и активностью ЛФ: N-ацетилглюкозаминидазы в сыворотке ($r = 0,51$), β -галактозидазы в сыворотке ($r = 0,34$) и лейкоцитах ($r = -0,45$), а также между содержанием ДК и активностью β -галактозидазы в сыворотке ($r = 0,38$) и лейкоцитах ($r = -0,46$) и кислой РНКазы в лейкоцитах ($r = -0,31$). Эти данные указывают на то, что реципрокные изменения активности ЛФ в сыворотке и лейкоцитах крови при СД могут быть отражением лабильности лизосомальных мембран, опосредованной окислительным стрессом. Известно, что одним из ранних следствий интенсификации свободнорадикальных процессов является дестабилизация лизосом, сопровождаемая высвобождением их ферментов за пределы лизосомальной мембраны [12]. При этом ЛФ попадают в цитозоль и кровяное русло. Обнаруженная нами зависимость активности ЛФ от выраженности ДА может объясняться, таким образом, более высоким уровнем ПОЛ у больных с ангиопатиями. Доказано, что генерация свободных радикалов и накопление липоперекисей играют важную роль в патогенезе ДА, способствуя развитию эндотелиальной дисфункции, модификации липопротеинов, гипервязкости и гиперкоагуляции крови [1, 8].

В литературе продолжают обсуждаться возможные механизмы вовлечения ЛФ в развитие патологических процессов [4, 11]. Считается, что индуцированное окислительным стрессом повреждение клетки опосредуется через дестабилизацию лизосом [16]. В определенных условиях лизосомальные гидролазы способны проявлять активность внеклеточно. Сообщалось, в частности, о повреждающем действии выделяющихся из лейкоцитов ЛФ на эндотелий [10, 19]. Кроме того, лизосомальные гликозидазы включаются в катаболизм гликолипидов, гликопротеинов и гликозаминогликанов плазматических мембран и внеклеточного матрикса [11].



Показатели ПОЛ (в мкмоль/мл): ДК (а) и МДА (б) у больных СД типа I в зависимости от выраженности ДА и компенсации заболевания.

Темные столбики — фаза декомпенсации, заштрихованные столбики — фаза компенсации. По осям абсцисс — группы обследованных. К — контрольная группа.

Последнее особенно важно в случае базальных мембран почечных клубочков, поскольку известно, что характерное для СД снижение содержания в них гликозаминогликана гепарансульфата сопровождается потерей зарядоселективности и патологическим увеличением проницаемости для белка [2]. В связи с этим особый интерес представляет обнаруженная нами достоверная ($p < 0,05$) корреляционная зависимость между величиной суточной протеинурии и активностью в сыворотке N-ацетилглюкозаминидазы — фермента, вовлеченного в катаболизм гепарансульфата: $r = 0,45$ и $r = 0,72$ соответственно в период декомпенсации и компенсации заболевания. Возможная роль ЛФ в формировании ДА заслуживает проверки в дальнейших исследованиях.

В заключение необходимо отметить, что изученные в работе реципрокные сдвиги активности ЛФ в клетках и сыворотке крови на фоне активации перекисных процессов являются патогенетическим обоснованием для разработки методов мембраностабилизирующей и антиоксидантной терапии при СД.

Выводы

1. У больных СД типа I имеют место разнонаправленные изменения активности ЛФ (N-ацетилглюкозаминидазы, β -галактозидазы и кислой РНКазы) в сыворотке и лейкоцитах крови: на фоне повышения активности ферментов в сыворотке наблюдается ее снижение в клетках.

2. Наибольшие сдвиги активности ЛФ в сыворотке и лейкоцитах крови наблюдаются у больных с выраженными стадиями сосудистых осложнений СД.

3. Изменения активности ЛФ у больных СД типа I взаимосвязаны с интенсификацией процессов ПОЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин М. И. Сахарный диабет. — М., 1994.
2. Дедов И. И., Шестакова М. В., Мозговая М. Е. // Тер. арх. — 1993. — Т. 65, № 10. — С. 9—13.
3. Дедов И. И., Горелышева В. А., Смирнова О. М. и др. // Пробл. эндокринологии. — 1995. — Т. 41, № 5. — С. 16—20.
4. Маянская Н. Н., Панин Л. Е., Николаев Ю. А., Маянская С. Д. // Вопр. мед. химии. — 1990. — Т. 36, № 6. — С. 5—8.
5. Панин Л. Е., Маянская Н. Н. Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении. — Новосибирск, 1987.
6. Чугунова Л. Г., Дубинина И. И. // Пробл. эндокринологии. — 1994. — Т. 40, № 5. — С. 9—11.
7. Burlina A. B., Goi G., Fabi A. et al. // Clin. Biochem. — 1987. — Vol. 20, N 6. — P. 423—427.
8. Giugliano D., Ceriello A., Paolisso G. // Metabolism. — 1995. — Vol. 44, N 3. — P. 363—368.
9. Goi G., Fabi A., Lorenzi R. et al. // Acta Diabetol. Latina. — 1986. — Vol. 23, N 2. — P. 117—125.
10. Gorog P., Pearson J. D. // J. Pathol. — 1985. — Vol. 146, N 3. — P. 205—212.
11. Holtzman E. Lysosomes. — 2-d Ed. — New York; London, 1989.
12. Kalra J., Claudhary A. K., Lorne M. K., Prasad K. // Mol. Cell Biochem. — 1990. — Vol. 94, N 1. — P. 1—8.
13. Kutryk M. J., Pierce G. N., Dhalla N. S. // Basic Res. Cardiol. — 1987. — Vol. 82, N 3. — P. 271—278.
14. Lenk S. E., Bhat D., Blakeney W., Dunn W. A. // Am. J. Physiol. — 1992. — Vol. 263, N 5. — P. E856—E862.
15. Mohanam S., Bose S. M. // Diabetologia. — 1983. — Vol. 25, N 1. — P. 66—70.
16. Ollinger K., Brunk U. T. // Free Radic. Biol. Med. — 1995. — Vol. 19, N 5. — P. 565—574.
17. Sawant J. M. // J. Postgrad. Med. — 1993. — Vol. 39, N 4. — P. 183—186.
18. Thorne D. P., Lockwood T. D. // Biochem. — 1990. — Vol. 266, N 3. — P. 713—718.
19. Ward P. A. // J. Lab. Clin. Med. — 1991. — Vol. 118, N 5. — P. 421—426.
20. Waters P. J., Flynn M. D., Pennock C. A. et al. // Diabet. Med. — 1995. — Vol. 12, N 8. — P. 670—673.

Поступила 12.04.99

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ. 2000

УДК 616.379-008.64-06:616.611-092:612.017.11-078.33

А. С. Ефимов, Д. Ч. Таджиева, И. Н. Пишель

ИММУННЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИИ

Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко (дир. — член-корр. АМН Украины Н. Д. Тронько) АМН Украины, Киев

Изучен характер изменений уровня циркулирующих иммуноглобулинов и продукции аутоантител к базальной мембране клубочков почки (БМП) у больных инсулинзависимым сахарным диабетом (ИЗСД) с разными стадиями диабетической нефропатии (ДН). Результаты исследования показали, что число больных с положительной реакцией на наличие аутоантител к БМП растет по мере усиления выраженности клинических проявлений ДН. При этом большая часть пациентов с положительной реакцией на антитела имеет III-IV стадию развития ДН.

При анализе изменений концентраций иммуноглобулинов в сыворотке крови пациентов с разной степенью ДН установлено, что уровень IgG максимален при начальных стадиях ИЗСД (без выявленной ДН), затем постепенно снижается, а уровень IgM имеет тенденцию к повышению, достигающую статистической значимости у больных с выраженной нефропатией.

У пациентов с выявленными антителами к БМП достоверно повышены показатели соотношения концентраций IgG/IgD и IgM/IgD и снижены показатели соотношения концентраций IgA/IgG и IgA/IgM. При этом достоверных различий от показателей контрольной группы достигали только значения соотношений между иммуноглобулинами классов IgG/IgD и IgA/IgG.

У 26,8% больных ИЗСД определяется наличие антител к БМП, причем число больных с положительной реакцией на наличие антител возрастает по мере прогрессирования нефропатии, что может свидетельствовать об участии аутоиммунных механизмов в развитии и прогрессировании ДН.

Changes in the levels of circulating immunoglobulins and production of autoantibodies to basal membrane of renal glomeruli were studied in patients with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) at various stages of diabetic nephropathy (DN). The number of patients with positive reaction to autoantibodies to renal basal membrane (RBM) increases as clinical symptoms of DN augment. The greater part of patients with positive reaction to antibodies have stage III-IV DN. Measurements of serum immunoglobulin concentrations in patients with DN of different degree showed maximal levels of IgG in initial IDDM (without DN); later IgG level gradually decreases, while IgM level shows a tendency to increase, this increase attaining statistically significant values in patients with pronounced nephropathy. In patients with antibodies to RBM the ratios of IgG/IgD and IgM/IgD concentrations are elevated, while IgA/IgG and IgA/IgM ratios are lowered; only the IgG/IgD and IgA/IgG ratios differed significantly from the control. 26.8% patients with IDDM had antibodies to basal membrane of renal glomeruli. The number of patients with positive reaction to these antibodies increases with the progress of nephropathy, which can be indicative of the involvement of autoimmune mechanisms in development and progress of DN.

Диабетическая нефропатия (ДН) является основной причиной смертельных исходов при сахарном диабете (СД) типа 1 и развивается у 40—50% больных СД этого типа и у 5—10% больных СД типа 2 [3, 4, 7]. В настоящее время обсуждается роль иммунных нарушений в формировании и прогрессировании ДН. Предпосылкой к формированию гипотезы об иммунном генезе ДН послужило частое выявление повышенного содержания циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и иммуноглобулинов в крови, а также отложений иммуноглобулинов и комплемента в структурах почки больных [5, 6]. Однако среди исследователей нет единого мнения в объяснении этих фактов. Многие рассматривают существующие иммунные отклонения, присущие ДН, как неспецифические эпифеномены [8]. Накопленные к настоящему времени данные позволяют предполагать участие иммунокомплексного механизма в развитии ДН.

лбулинов в крови, а также отложений иммуноглобулинов и комплемента в структурах почки больных [5, 6]. Однако среди исследователей нет единого мнения в объяснении этих фактов. Многие рассматривают существующие иммунные отклонения, присущие ДН, как неспецифические эпифеномены [8]. Накопленные к настоящему времени данные позволяют предполагать участие иммунокомплексного механизма в развитии ДН.