

◆ КЛИНИЧЕСКАЯ ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2006

УДК 616.379-008.64-053.2-092-085]-07:616.153.915

В. В. Новицкий, Е. Б. Кравец, М. В. Колосова, Е. А. Степовая, Е. В. Юрченко,
Т. Ю. Коцевец**ЛИПИДНЫЙ СПЕКТР МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ
У ДЕТЕЙ**

ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет, Томск

Целью настоящего исследования явилось изучение липидного спектра мембран эритроцитов и сыворотки крови у детей и подростков с сахарным диабетом (СД) 1-го типа на фоне патогенетической терапии в зависимости от стажа заболевания, тяжести течения, наличия сосудистых осложнений.

Обследовано 99 пациентов с СД 1-го типа и 40 здоровых детей аналогичного возраста. Пациенты находились на базисном режиме инсулинотерапии.

Установлено, что течение СД 1-го типа у детей сопровождается не только нарушениями липидного обмена сыворотки крови атерогенного характера (повышение общего холестерина, триглицеридов, холестерина липопротеинов низкой и очень низкой плотности), но и нарушениями липидного спектра мембран эритроцитов (снижение содержания общих липидов и фракции фосфатидилхолина (ФХ) при повышении уровня фракций лизофосфатидилхолина и фосфатидилинозита; увеличение содержания насыщенных и снижение уровня ненасыщенных жирных кислот во фракциях ФХ и фосфатидилэтаноламина; повышение микровязкости глубоких и модификацией наружных слоев мембран). Проведение комплексной базисной терапии не сопровождалось полной нормализацией изучаемых параметров липидного спектра сыворотки крови и мембран эритроцитов при СД, осложненном микроангиопатиями, что требует оптимизации традиционных терапевтических схем.

Ключевые слова: сахарный диабет 1-го типа у детей и подростков, липидный спектр мембран эритроцитов, липидный спектр сыворотки крови, патогенетическая терапия.

The present study was undertaken to examine the lipid spectrum of erythrocytic membranes and serum in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus (DM-1) during pathogenetic therapy in relation to the duration of the disease, its severity, and the presence of vascular events.

Ninety-nine patients with DM-1 and 40 healthy children of the same age were examined. The patients were on basic bolus insulin therapy.

In children, DM-1 was ascertained to be accompanied by not only atherogenic serum lipid metabolic disturbances (the elevated levels of total cholesterol, triglycerides, low- and very low-density lipoprotein cholesterol), but also by the impaired lipid spectrum of erythrocytic membranes (reductions in the level of total lipids and the fraction of phosphatidylcholine (PC) with an increase in the level of fractions of lysophosphatidylcholine and phosphatidylinositol; elevated levels of saturated fatty acids and decreased levels of unsaturated fatty acids in the fractions of PC and phosphatidylethanolamine; the enhanced microviscosity of deep membranous layers and the modified outer membranous ones). Complex basic therapy resulted in incomplete normalization of the study parameters of the lipid spectrum of serum and erythrocytic membranes in DM complicated by microangiopathies, which requires optimization of conventional therapeutic regimens.

Key words: type 1 diabetes mellitus in children and adolescents, erythrocytic membranous lipid spectrum, serum lipid spectrum, pathogenetic therapy.

Несмотря на успехи в диабетологии, особенно в последние годы, сахарный диабет (СД) 1-го типа (СД1) остается одним из приоритетных заболеваний, социальная и медицинская значимость которых очевидна. Основной причиной инвалидизации и летальности при СД являются сосудистые осложнения, главная роль в патогенезе которых принадлежит гипергликемии и ее метаболическим эффектам: усилению аутоокисления глюкозы, образованию конечных продуктов гликозилирования, активации процессов перекисного окисления липидов, повышению уровня свободных радикалов. При развитии диабетических микроангиопатий отмечаются заинтересованность практически всех звеньев микроциркуляции, активация процессов свертывания крови, имеют место существенные изменения агрегационной способности эритроцитов и их структурно-метаболического статуса, в частности липидного спектра мембран. Известно, что, участвуя в организации липидного бислоя, липиды осуществляют поддержание конформации мембран-

ных ферментов, контролируют взаимодействие между субъединицами внутри олигомерных комплексов, обладая молекулярной памятью, что позволяет многим краткосрочным событиям, протекающим в липидном бислое, влиять на долговременные параметры его функционирования. Липидный бислой, являющийся основной структурной единицей биологической мембраны, обладает одновременно и текучестью, и упорядоченностью, в связи с чем в мембране осуществляются взаимодействия ближнего и дальнего порядка [1, 3, 5, 6, 8–10, 13, 19]. В связи с вышеизложенным представляется весьма целесообразным изучение липидного спектра мембран эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с СД1, так как необходим поиск новых схем лечения, направленных на предупреждение развития сосудистых осложнений [14].

Целью настоящего исследования явилось изучение липидного спектра мембран эритроцитов и сыворотки крови у детей и подростков с СД1 на фоне патогенетической терапии в зависимости от стажа

заболевания, тяжести течения, наличия сосудистых осложнений.

Материалы и методы

Исследование проводили на базе эндокринологического отделения детской городской больницы № 1 Томска. Под наблюдением находилось 99 пациентов в возрасте от 5 до 15 лет с СД1 и 40 здоровых детей аналогичного возраста (группа контроля). Обследование в стационаре включало проведение общеклинических методов исследования, определение степени метаболического контроля СД, оценку физического и полового развития, скрининг специфических осложнений диабета. Оценку физического развития проводили на основании анализа показателей длины и массы тела с использованием перцентильных таблиц с пересчетом SDS роста. Для оценки полового развития использовали классификацию Tanner (1968). Компенсацию СД оценивали по уровню гликированного гемоглобина, гликемии натощак и показателю постпрандиальной гликемии. Доклиническую диагностику нефропатии проводили с использованием наборов фирмы "Randox" иммунотурбидиметрическим методом. Тест считался положительным, если концентрация альбумина в моче превышала 30 мг/л. Скрининг диабетической ретинопатии проводили с помощью исследования глазного дна методом прямой офтальмоскопии. Все пациенты находились на базис-болюсном режиме инсулинотерапии.

Изучение липидного спектра сыворотки крови, включающее определение общего холестерина (ХС), триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеинов высокой и низкой плотности (ХС ЛПВП, ХС ЛПНП), проводили ферментативным методом с использованием наборов "Bioscon" (Германия) на автоанализаторе FP-900 ("Lab. Systems", Финляндия). Липидный экстракт мембран эритроцитов получали по методу J. Folch и соавт. [20]. Содержание общих липидов (ОЛ) в мембранах эритроцитов определяли методом Bloor (1947) и Bragdon (1951) [2]. Спектр липидов мембран эритроцитов (общие фосфолипиды — ОФЛ, ХС, ТГ, эфиры ХС — ЭХС) оценивали методом тонкослойной хроматографии на пластинках "Sorbfil" (Россия). Определение содержания фракции фосфолипидов в мембранах эритроцитов (лизофосфатидилхолин — ЛФХ, фосфатидилинозиты — ФИ, сфингомиелин — СФМ, фосфатидилхолин — ФХ, фосфатидилсерин — ФС, фосфатидилэтаноламин — ФЭА, полиглицерофосфаты — ПГФ, фосфатидные кислоты — ФК) осуществляли в системе хлороформ:метанол:вода на пластинках Silufol UV 254 (Чехия) [12]. Идентификацию фракции фосфолипидов проводили с использованием стандартов фирмы "Sigma" (США) и качественных реакций. Определение жирно-кислотного спектра фракций липидов крови [7] проводили на газожидкостном хроматографе "Tracor 540" (США). Полученные в результате газожидкостной хроматографии пики отдельных жирных кислот идентифицировали с помощью индивидуальных метиловых эфиров жирных кислот и их стандартных смесей фирмы "Sigma". Измерение собствен-

ной флюоресценции теней эритроцитов и флюоресценцию зондов, находящихся в мембранах эритроцитов, проводили на спектрофлуориметре "Hitachi" MPF-4; в качестве флюорофора использован пирен [4].

Результаты исследования обрабатывали методами вариационной статистики. Достоверность различий сравниваемых показателей устанавливали с использованием *t*-критерия Стьюдента в случаях, когда распределения подчинялись нормальному закону, и с использованием непараметрических критериев в случаях отклонения распределений от нормального.

Результаты и их обсуждение

Все дети поступали в отделение в фазе клинικο-метаболической декомпенсации без кетоза (56 человек) и фазе кетоацидоза (31 человек) или кетоацидотической комы (12 человек). Отставание в физическом развитии отмечено у 37 (37,7%) детей, при этом чаще отставание в росте регистрировалось у мальчиков (18 пациентов). Вероятность регистрации отставания в росте возрастала с давностью патологического процесса. Рост менее 3 перцентилей был у 8 мальчиков. Коэффициент стандартного отклонения роста к хронологическому возрасту составил $2,14 \pm 0,06$. Задержка полового развития имела место у 20 (26,2%) детей. Задержка пубертата у мальчиков и менархе у девочек чаще отмечалась при стаже заболевания более 7 лет, коррелировалась с тяжестью патологического процесса и длительностью декомпенсации. Ретинопатия диагностирована у 31 (26,4%) ребенка, нефропатия — у 29, полинейропатия — у 56 детей. Стадия не-пролиферативной ретинопатии (1-я стадия) диагностирована у 20 больных, препролиферативной ретинопатии (2-я стадия) — у 9, пролиферативная ретинопатия обнаружена у 2 больных. Диабетическая нефропатия в стадии микроальбуминурии диагностирована у 20 детей, в стадии протеинурии — у 9 детей. Отмечался рост патологии желудочно-кишечного тракта, что коррелировалось с давностью заболевания и уровнем компенсации (при Hb A_{1c} менее 9% доля случаев заболеваний желудочно-кишечного тракта составила 7,43%, при Hb A_{1c} более 10% — 46,4%). В этой клинической группе выявлено снижение секреторно- и кислотообразующей функций желудка. Дисбиоз кишечника в компенсированной форме выявлен у 85,7% больных СД, в субкомпенсированной — у 14,3%. Жировой гепатоз был диагностирован у 75% детей с СД. Практически у всех обследованных отмечались функциональные нарушения желчевыделения (спазм сфинктера Одди, гипомоторная дискинезия).

Изучение показателей обмена липидов в сыворотке крови позволяет утверждать, что развитие СД1 у детей сопровождается существенными изменениями атерогенного характера (повышение общего ХС, ТГ, ХС ЛПНП и холестерина липопротеинов очень низкой плотности — ХС ЛПОНП), коррелирующими с наличием сосудистых осложнений заболевания и полностью не нормализую-

Таблица 1

Показатели липидного обмена у детей с СД1 ($X \pm m$)

Показатель, ммоль/л	Контроль	СД1 без осложнений	Сосудистые осложнения СД1 (нефро-, ретинопатии)
ХС	4,51 $\pm$ 0,13	4,68 $\pm$ 0,19 $p_1 = 0,003$	5,69 $\pm$ 0,23 $p_2 < 0,01$
ХС ЛПВП	1,10 $\pm$ 0,03	1,37 $\pm$ 0,08 $p_1 = 0,9$	1,35 $\pm$ 0,08 $p_2 < 0,01$
ХС ЛПНП	2,78 $\pm$ 0,11	2,70 $\pm$ 0,17 $p_1 = 0,01$	3,35 $\pm$ 0,16 $p_2 < 0,05$
ХС ЛПОНП	0,61 $\pm$ 0,05	0,57 $\pm$ 0,08 $p_1 = 0,007$	0,81 $\pm$ 0,08 $p_2 < 0,05$
ТГ	1,37 $\pm$ 0,10	1,32 $\pm$ 0,18 $p_1 = 0,01$	1,76 $\pm$ 0,18 $p_2 < 0,01$

Примечание. Достоверность различий: p_1 — между группами больных с сосудистыми осложнениями и без них; p_2 — между группой контроля и группой с сосудистыми осложнениями.

щимися после проведения комплексной базисной терапии (табл. 1).

Состав липидов мембран эритроцитов у детей с СД1 (по данным тонкослойной хроматографии) существенно отличался от аналогичных показателей в группе контроля. У детей с СД в фазе декомпенсации без кетоацидоза было установлено снижение уровня ОЛ (2,57 $\pm$ 0,11 мг/мл; $p < 0,001$), увеличение содержания фракции ТГ (23,61 $\pm$ 1,22%; $p < 0,001$) по сравнению с нормой (соответственно 3,45 $\pm$ 0,07 мг/мл; 14,76 $\pm$ 1,52%). Содержание фракций ОФЛ, ХС, ЭХС, состав фосфолипидов не претерпевали существенных изменений по сравнению с контролем. После проведенной традиционной комплексной терапии и достижения фазы клинико-метаболической субкомпенсации полной нормализации состава липидов мембран эритроцитов не отмечалось (табл. 2).

Известно, что текучесть мембраны снижается при увеличении содержания ХС, а при повышении содержания ненасыщенных и ветвящихся гидрофобных хвостов фосфолипидных молекул она повышается. Фосфолипиды с ненасыщенными и ветвящимися жирно-кислотными хвостами не могут быть плотно упакованы вследствие стерических препятствий, возникающих в результате их большей жесткости, что и увеличивает текучесть мембраны [15–18].

Анализ жирно-кислотного состава фракции ФХ у детей с СД в фазе декомпенсации без кетоацидоза

до начала лечения позволил установить факт снижения уровня арахидоновой кислоты (2,60 $\pm$ 0,76%; $p < 0,05$) по сравнению с контролем (7,79 $\pm$ 1,84%). Проведение терапии не приводило к нормализации состава жирных кислот фракции ФХ: содержание арахидоновой кислоты оставалось ниже контрольных значений (0,77 $\pm$ 0,29%; $p < 0,05$) и не отличалось от такового до начала лечения; количество линолевой кислоты соответствовало 1,67 $\pm$ 0,62%, что оказалось достоверно ниже контроля (11,73 $\pm$ 3,09%; $p < 0,05$) и уровня до лечения (7,94 $\pm$ 1,15%; $p < 0,01$). В фазе клинико-метаболической субкомпенсации уровень пальмитиновой кислоты существенно ($p < 0,01$) превышал контрольные значения (55,22 $\pm$ 6,33% при 31,71 $\pm$ 3,03% в норме). Статистически значимых изменений других жирных кислот фракции ФХ выявлено не было. В фазе декомпенсации без кетоацидоза во фракции ФХ отмечено достоверное повышение содержания насыщенных жирных кислот (65,89 $\pm$ 2,98%; $p < 0,05$) и снижение уровня полиненасыщенных жирных кислот (10,48 $\pm$ 1,73%; $p < 0,05$) по сравнению с контрольными значениями (54,92 $\pm$ 2,97 и 19,52 $\pm$ 4,22% соответственно). Достижение фазы клинико-метаболической субкомпенсации в анализируемой клинической подгруппе не характеризовалось нормализацией изучаемых параметров. Состав жирных кислот фракции ФЭА у детей с СД в фазе декомпенсации без кетоацидоза до начала лечения характеризовался снижением содержания арахидоновой кислоты до 3,59 $\pm$ 0,63% при 6,78 $\pm$ 0,6% в контроле ($p < 0,01$). Суммарное содержание полиненасыщенных жирных кислот фракции ФЭА у детей с СД в фазе декомпенсации без кетоацидоза до начала лечения составляло 9,61 $\pm$ 0,95% и было существенно ниже контроля (15,0 $\pm$ 2,34%; $p < 0,05$).

Анализ характеристики мембран эритроцитов у детей с СД в процессе терапии (по данным флюоресцентного анализа) позволяет утверждать, что соотношения интенсивностей флюоресценции липотропного зонда пирен I_{370}/I_{470} и I_{390}/I_{470} при длине волны возбуждения $\lambda_v = 285$ нм в мембранах эритроцитов периферической крови у детей с СД в фазе декомпенсации без кетоацидоза до начала терапии составляли соответственно 2,20 $\pm$ 0,12 усл. ед. ($p < 0,001$) и 1,97 $\pm$ 0,09 усл. ед. ($p < 0,01$), что достоверно превышало соответствующие значения в норме. При $\lambda_v = 340$ нм соотношения I_{370}/I_{470} , I_{370}/I_{390} также отличались от значений у здоровых детей. Достижение фазы клинико-метаболической суб-

Таблица 2

Фракции фосфолипидов мембран эритроцитов (в %) у детей обследуемых групп ($X \pm m$)

Группы обследованных	ЛФХ	ФИ	СФМ	ФХ	ФС	ФЭА	ПГФ	ФК
Контроль	8,01 $\pm$ 0,69	8,08 $\pm$ 0,64	10,51 $\pm$ 0,80	21,78 $\pm$ 0,87	10,83 $\pm$ 1,14	16,37 $\pm$ 1,33	9,23 $\pm$ 0,98	12,25 $\pm$ 1,17
Больные СД1 до лечения	9,69 $\pm$ 0,49	9,07 $\pm$ 0,44	11,47 $\pm$ 0,67	19,63 $\pm$ 1,03	11,63 $\pm$ 0,66	16,84 $\pm$ 0,78	10,53 $\pm$ 0,56	11,33 $\pm$ 0,58
Больные СД1 после базисной терапии	11,30 $\pm$ 1,00**	10,33 $\pm$ 0,84**	11,06 $\pm$ 0,86*	18,18 $\pm$ 1,14**	11,40 $\pm$ 0,44*	16,45 $\pm$ 1,25*	10,56 $\pm$ 0,66*	12,02 $\pm$ 0,59*

Примечание. Достоверность различий с группой контроля: * — $p > 0,05$, ** — $p < 0,05$.

компенсации не сопровождалось нормализацией изучаемых характеристик.

Существенное нарушение деформируемости эритроцитов вследствие особенностей в липидном и фосфолипидном составе мембран эритроцитов приводит к затруднению движения клеток по капиллярам, ухудшая реологические характеристики крови и активируя гиперкоагуляционные процессы [11], что может способствовать формированию сосудистых осложнений при СД1.

В связи с изложенным выше очевидно, что детализация существующих знаний о характере патологических изменений в мембранах клеток периферической крови, сосудистых структурах, микроциркуляции на молекулярном, клеточном, органном и организменном уровнях необходима для понимания взаимодействия отдельных механизмов развития патологических процессов, расширения имеющихся представлений о стадийности их развития и причинно-следственных отношениях патогенетических факторов на разных стадиях болезни, что позволит оценить вероятность формирования сосудистых осложнений и предложить новые подходы в терапии СД.

Выводы

1. Течение СД1 у детей сопровождается нарушениями липидного обмена атерогенного характера (повышение общего ХС, ТГ, ХС ЛПНП и ХС ЛПОНП), что может явиться одним из факторов риска развития микроангиопатий.

2. Нарушения липидного спектра мембран эритроцитов при СД1 в фазе субкомпенсации у детей характеризуются снижением содержания ОЛ и фракции ФХ при повышении уровня фракций ЛФХ и ФИ; увеличением содержания насыщенных и снижением содержания ненасыщенных жирных кислот во фракциях ФХ и ФЭА; а также повышением микровязкости глубоких и модификацией наружных слоев мембран.

3. Проведение комплексной базисной терапии не сопровождалось полной нормализацией изучаемых параметров липидного спектра сыворотки крови и мембран эритроцитов при СД, осложненном микроангиопатиями, что требует оптимизации традиционных терапевтических схем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балашова Т. С. // Пробл. эндокринолог. — 1994. — № 3. — С. 12—15.
2. Биохимические методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. А. А. Покровского. — М., 1969.
3. Болдырев А. А., Курелла Е. Г., Павлова Т. Н. Биологические мембраны. — М., 1992.
4. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флюоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. — М., 1980.
5. Владимиров Ю. А. // Пат. физиол. — 1989. — № 4. — С. 7—12.
6. Горбунов Н. В. // Бюл. exper. биол. — 1993. — № 11. — С. 448—490.
7. Дунаева А. Н. // Лаб. дело. — 1983. — № 10. — С. 57—59.
8. Конев С. В. Структурная лабильность биологических мембран и регуляторные процессы. — М., 1987.
9. Максина А. Г., Микаэлян Н. П., Князев Ю. А. // Биофизика. — 1992. — Т. 37, вып. 2. — С. 306—310.
10. Микаэлян Н. П., Максина А. Г., Князев Ю. А. // Лаб. дело. — 1991. — № 9. — С. 41—46.
11. Мчедlishvili Г. И. // Тезисы докладов 1-го Рос. конгресса по патофизиологии. — М., 1996. — С. 277.
12. Прохорова М. И., Тулякова З. Н. Большой практикум по углеводному и липидному обмену. — Л., 1965.
13. Пузикова О. З., Афонин А. А. // Сахарный диабет. — 2001. — № 1. — С. 2—5.
14. Родбард Х. Е. // Сахарный диабет. — 2004. — № 2. — С. 20—24.
15. Селищева А. А., Козлов Ю. П. Метаболизм фосфолипидов и биологические мембраны. — Иркутск, 1988.
16. Сторожок С. А., Соловьев С. В. // Вопр. мед. химии. — 1992. — № 2. — С. 14—16.
17. Сторожок С. А., Санников А. Г. // Вопр. мед. химии. — 1996. — Т. 42, № 2. — С. 103—109.
18. Текучесть мембран в биологии / Под ред. Р. Элоя: Пер. с англ. — Киев, 1989. — Т. 1.
19. Юшков П. В., Опаленко К. В. // Сахарный диабет. — 2001. — № 1. — С. 53—56.
20. Folch J., Less M., Sloane-Stanley A. G. H. // J. Biol. Chem. — 1957. — Vol. 226. — P. 497—509.

Поступила 10.10.05

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2006

УДК 616.735-02:616.379-008.64:312.6

Д. С. Метревели, М. З. Сулханишвили, М. З. Маргвелашвили

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ РЕТИНОПАТИИ СРЕДИ БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА

Кафедра эндокринологии (зав. — проф. Д. С. Метревели) Государственной медицинской академии Грузии, Тбилиси

Существование диабетической ретинопатии (ДР) на доклиническом этапе эволюции сахарного диабета 2-го типа (СД2) невозможно объяснить с позиции общепринятой теории этиопатогенеза диабетической микроангиопатии. Цель исследования — изучение распространенности ДР среди пациентов с вновь выявленным СД2 и анализ возможных причин формирования этого осложнения на раннем этапе заболевания. Выявлено, что распространенность ДР среди больных с вновь выявленным СД2 составляет 16,4%. Шанс наличия ДР у вновь выявленных больных СД2 в возрасте старше 45 лет в 2,6 раза больше, чем в возрасте до 45 лет. Исходя из результатов исследования, выдвинуто предположение о существовании патогенетических механизмов, обуславливающих инициацию диабетической микрососудистой патологии до стабилизации гипергликемии, на этапе сниженной толерантности к глюкозе.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, диабетическая ретинопатия, распространенность.

The fact that diabetic retinopathy (DR) exists at the preclinical stage of evolution of type 2 diabetes mellitus (DM-2) cannot be explained in the context of the commonly accepted theory of the etiopathogenesis of diabetic microangiopathy. The purpose of the study was to explore the prevalence of DR among patients with new-onset DM-2 and to analyze the possible causes of development