

2. Для обеспечения устойчивости профилактической программы требуется проведение дальнейшего регулярного мониторинга с использованием критериев, рекомендованных ВОЗ (уровень йода в моче, частота зоба).

ЛИТЕРАТУРА

1. Дедов И. И., Герасимов Г. А., Свириденко Н. Ю. и др. // Пробл. эндокринолог. — 1998. — № 1. — С. 24—27.
2. Дедов И. И., Герасимов Г. А., Свириденко Н. Ю. Йоддефицитные заболевания в Российской Федерации: Метод. пособие. — М., 1999.
3. Дедов И. И., Петеркова В. А., Безлепкина О. Б. // Врожденный гипотиреоз у детей: Метод. рекомендации. — М., 1999.
4. Касаткина Э. П., Шилин Д. Е., Матковская А. Н. // Пробл. эндокринолог. — 1993. — № 9. — С. 22—26.
5. Касаткина Э. П. // Там же. — 1997. — № 3. — С. 3—7.
6. Мельниченко Г. А., Мурашко Л. Е., Малясова С. В. // Медицина, Клин. эндокринолог.: Реф. сб. — 1999. — № 3. — С. 3—6.
7. Осокина И. В. // Пробл. эндокринолог. — 2000. — № 6. — С. 7—9.
8. Delange F., Benker G., Caron P. et al. // Eur. J. Endocrinol. — 1997. — Vol. 136. — P. 180—187.
9. De Long G., Robbins J., Condliffe P. G. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1989. — Vol. 14. — P. 321—324.
10. De Long G. // IDD Newsletter. — 1999. — Vol. 14, N 4. — P. 6—7.
11. Gerasimov G., Sviridenko N., Delange F. // Iodine in Pregnancy / Eds J. Stanbury et al. — New Delhi, 1998. — P. 171—180.
12. Glinioer D. // The Thyroid and Iodine / Eds J. Nauman et al. — Stuttgart; New York, 1996 — P. 129—143.
13. Hetzel B. S. // Lancet. — 1983. — Vol. 2. — P. 1126—1129.
14. Tanner J., Davies P. // J. Pediatr. — 1985. — Vol. 107, N 3. — P. 317—329.
15. WHO: Indicators for Assessing Iodine Deficiency Disorders and their Control Programmes: Report of a Joint WHO/UNICEF/ICCIDD Consultation, September, 1993. — Geneva, 1993.

Поступила 26.04.01

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ. 2002

УДК 618.3-06:616.379-008.64]-07:616.153.915-39

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

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС У БЕРЕМЕННЫХ, БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Российский государственный медицинский университет, Московский областной НИИ акушерства и гинекологии

Установлено, что при сахарном диабете у беременных происходит ассоциированное с глюкозой окислительное повреждение мембран клеток за счет активации свободнорадикальных реакций перекисного окисления липидов на фоне снижения активности антиоксидантов ферментной (каталаза, CuZn) и неферментной (тиоловые группы, глутатион) природы. Окислительный стресс у беременных с сахарным диабетом типа 1 приводит к снижению инсулин-связывающей активности клеток крови в результате полимеризации мембранных белков (в том числе протенины, являющейся инсулиновым рецептором).

Glucose-associated oxidation damage of the cell membranes due to enhanced lipid peroxidation in reduction of functioning of enzymatic (catalase, CuZn) and non-enzymatic (thiol groups, glutathione) antioxidant defenses is established in pregnant patients with diabetes mellitus. Oxidative stress in pregnant patients with type 1 diabetes mellitus reduces insulin-binding capacity of blood cells as a result of membrane protein's polymerization, of such insulin receptor as protein kinase, in particular.

Неотъемлемым для функционирования клеток организма человека является образование активированных кислородных метаболитов (АКМ: O_2 , H_2O_2 , OH , NO , RO , и др.) [3]. Эти высокорекреационные соединения обладают широким спектром биологического действия: NO -радикалы регулируют тонус сосудов, ингибируют адгезию гранулоцитов и агрегацию тромбоцитов [13], оказывают противоопухолевое и мутагенное действие [15]; H_2O_2 и гипогалоиды важны для микробицидного действия нейтрофилов [10, 16]; O_2 индуцирует [2], а NO ингибирует пролиферацию лимфоцитов [12]. В физиологических условиях образование АКМ в клетках сдерживается на низком уровне системой ферментативных и неферментативных антиоксидантов [1, 7]. При патологических состояниях баланс в системе АКМ—антиоксиданты может нарушаться; преобладание продукции АКМ в результате повышения их образования или истощения антиоксидантов сопровождается активацией деструктивных процессов, что получило название "окислительный стресс" [19].

Помимо деструктивных воздействий, АКМ (радикалы) выполняют и регуляторные функции. Развитие окислительного стресса установлено при многих заболеваниях и патологических состояниях. В некоторых случаях АКМ и окислительные реакции с их участием становятся главным патогенетическим фактором заболевания.

В нормальных условиях во всех клетках и мембранных структурах протекают свободнорадикальные реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ), развитие которых сдерживает-

ся жирорастворимыми антиоксидантами. Важную роль в ингибировании ПОЛ играет структурная организация мембран, поэтому различные повреждения структуры живой клетки неизбежно приводят к активации ПОЛ. Процессы ПОЛ являются компонентом и первичным медиатором стресс-реакции по Селле [7]. 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 [7].

Целью настоящего исследования явилось изучение состояния системы ПОЛ—антиоксиданты у беременных, больных СД типа 1.

Материалы и методы

Состояние системы ПОЛ—антиоксиданты изучено у 98 женщин с СД типа 1 в III триместре беременности: из них 16 женщин наблюдались в родах и через 1 ч, 1 сут и 5—7 сут после родов. Возраст больных составил 18—40 лет (средний возраст $26 \pm 5,4$ года), срок заболевания — от 5 до 16 лет, суточная доза инсулина — 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 и 11 небеременных женщин с СД типа 1, имевших инсулинорезистентность по инсулиновым кривым.

Объектом исследования служили мембраны эритроцитов (МЭ) и лимфоциты. Об интенсивности ПОЛ в выделенных плазматических МЭ судили по содержанию малонового диальдегида (МДА) и гидроперекисей (ГП), которое оценивали в реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [17]. Антиоксидательную активность (АОА) крови определяли по способности плазмы тормозить накопление ТБК-активных метаболитов ПОЛ в суспензии желточных липопротидов [4]. Активность каталазы определяли по методу [5] на основе реакции разложения H_2O_2 . Активность CuZn-супероксиддисмутазы (CuZnSOD) исследовали путем измерения процента торможения скорости реакции восстановления нитросинего тетразолия при ферментном образовании супероксидного радикала [9]. Количество инсулиновых рецепторов определяли по описанному нами методу [7]. Связывание ^{125}I -инсулина с рецепторами цитомембран исследовали по методу [14] с использованием метода вытеснения ^{125}I -инсулина из комплекса с рецепторами возрастающими количествами немеченного гормона в условиях равновесия [14]. Общее количество инсулинсвязывающих мест и сродство рецепторов к гормону определяли по L. Scatchard [18], P. De Meys и I. Roth [11], чувствительность клеток к инсулину оценивали по степени утилизации глюкозы клетками [7]. Коэффициент упорядоченности и гидрофобности эритроцитарных мембран, а также концентрацию тиоловых групп изучали методом электронно-парамагнитно-резонансной 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 χ^2 , t -критерия Стьюдента. Значимость коэффициентов корреляции определяли с использованием Z-преобразования Фишера по критерию Стьюдента (t -критерий).

Результаты и их обсуждение

Как видно на рис. 1, при 2-часовой инкубации эритроцитов с инсулином *in vitro* в концентрациях 20, 80 и 1000 пг/мл у беременных женщин с СД типа I в прямой зависимости от дозы инсулина происходит возрастание коэффициента упорядоченности и снижение коэффициента гидрофобности (МЭ) по сравнению с интактными клетками на 30% ($p < 0,05$). Использование инсулина приводит к повышению "жесткости" и гидрофильности цитомембран, что может свидетельствовать о глубоких метаболических нарушениях в клетке, в частности об усилении свободнорадикальных реакций ПОЛ (табл. 1).

Концентрация метаболитов ПОЛ (МДА, ГП) резко возрастает при введении в систему высоких концентраций инсулина. Как видно из табл. 1, различия в содержании МДА и ГП в эритроцитах, взятых от беременных больных СД типа I в контроле и после 2-часовой инкубации их с инсулином в концентрациях 20 и 80 пг/мл, были незначительными. Добавление инсулина к эритроцитам в концентрации 1000 пг/мл усиливало образование МДА и ГП в 2,2 раза и не вызывало изменений в содержании суммарного показателя АОА, т. е. инсулин в высоких концентрациях оказывал прооксидантное действие. Инсулин в больших концентрациях (80 и 1000 пг/мл) усиливал степень утилизации глюкозы эритроцитами. Вероятно, можно говорить об относительной недостаточности активности антиоксидантных ферментов на фоне усиления липидной пероксидации под влиянием высоких концентраций гормона.

Аналогичные исследования, проведенные *in vitro* с отмытыми мононуклеарами (МН), показали, что добавление инсулина

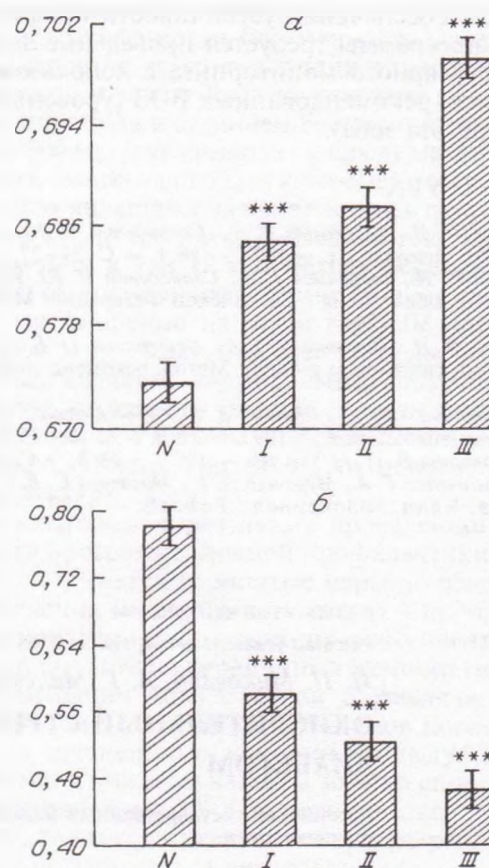


Рис. 1. Структурная организация мембран эритроцитов беременных с СД типа I при инкубации клеток с инсулином.

N — интактные эритроциты, I, II, III — эритроциты, подвергнутые действию инсулина в дозах 20, 80 и 1000 пг/мл соответственно. * — достоверность различий с группой здоровых беременных ($p < 0,001$). По осям ординат — отн. ед. а — коэффициент упорядоченности, б — коэффициент гидрофобности.

в систему в больших концентрациях (1000 пг/мл) приводит к повышению утилизации глюкозы МН на 35% ($p < 0,05$, $r = 0,78$) и возрастанию процента специфического связывания (табл. 2).

Определение активности СДГ в лимфоцитах показало, что активность фермента у беременных с СД типа I снижена по отношению к контролю в 2 раза, что свидетельствует о нарушениях в энергопродуцирующей системе клеток. При внесении в систему больших концентраций инсулина отмечается повышение активности СДГ в лимфоцитах и восстановление окислительного метаболизма в них.

При изучении с помощью спиновой метки одной из наиболее активных групп белка (SH), т. е. тиоловых групп, играющих антиоксидантную роль, выявлено, что имеет место изменение конформации поверхностных белков, что свидетельствует об их агрегации и полимеризации. Изучение нами при аллоксановом диабете активности Na^+ , K^+ -АТФазы подтверждает это предположение. При экспериментальном диабете резко снижается ак-

Таблица 1

Действие инсулина *in vitro* на содержание МДА, АОА и утилизацию глюкозы эритроцитами ($M \pm m$)

Условие опыта	МДА, нмоль/мл	АОА, %	Утилизация глюкозы, мкмоль/($2 \cdot 10^9$ кл/ч)
Контроль 1 (беременные здоровые женщины)	$3,1 \pm 0,7$ ($n = 15$)	$61,3 \pm 2,48$ ($n = 15$)	$1,09 \pm 0,15$ ($n = 10$)
Контроль 2 (беременные женщины с СД типа I)	$3,65 \pm 0,06$ ($n = 12$)	$52,74 \pm 5,15$ ($n = 12$)	$0,88 \pm 0,03$ ($n = 9$)
Эритроциты + инсулин 20 пг/мл	$3,83 \pm 0,08$ ($n = 11$)	$56,3 \pm 5,2$ ($n = 11$)	$0,91 \pm 0,04$ ($n = 11$)
Эритроциты + инсулин 80 пг/мл	$3,83 \pm 0,08$ ($n = 7$)	$50,3 \pm 5,8$ ($n = 7$)	$1,07 \pm 0,4^*$ ($n = 7$)
Эритроциты + инсулин 1000 пг/мл	$8,03 \pm 0,9^*$ ($n = 7$)	$49,9 \pm 4,8$ ($n = 7$)	$1,59 \pm 0,08^*$ ($n = 7$)

Примечание. Здесь и в табл. 2: * — достоверность различий с контролем 2.

Таблица 2

Действие инсулина *in vitro* на утилизацию глюкозы, процент специфического связывания и активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в лимфоцитах ($M \pm m$)

Условие опыта	Глюкоза, мкмоль/($6 \cdot 10^9$ кл/ч)	СДГ, ед.	Процент специфического связывания 125 I-инсулина
Контроль 1 (беременные здоровые женщины)	$0,73 \pm 0,04$ ($n = 8$)	$16,8 \pm 1,7$ ($n = 6$)	$28,3 \pm 2,9$ ($n = 15$)
Контроль 2 (беременные женщины с СД типа 1)	$0,49 \pm 0,03$ ($n = 7$)	$8,2 \pm 0,01$ ($n = 7$)	$21,7 \pm 2,0$ ($n = 10$)
Лимфоциты + инсулин 20 пг/мл	$0,46 \pm 0,07$ ($n = 8$)	$8,2 \pm 0,03$ ($n = 6$)	$20,7 \pm 2,1$ ($n = 8$)
Лимфоциты + инсулин 80 пг/мл	$0,67 \pm 0,05^*$ ($n = 7$)	$10,2 \pm 0,09$ ($n = 7$)	$23,1 \pm 3,3$ ($n = 7$)
Лимфоциты + инсулин 1000 пг/мл	$0,99 \pm 0,08^*$ ($n = 6$)	$14,3 \pm 2,1^*$ ($n = 5$)	$28,4 \pm 2,1^*$ ($n = 7$)

тивность этого фермента в мембранах эритроцитов и почечной ткани у животных [8].

Содержание глутатиона, восстанавливающего в физиологических условиях метгемоглобин в оксигемоглобин и обеспечивающего высокую концентрацию оксигемоглобина в тканях, в

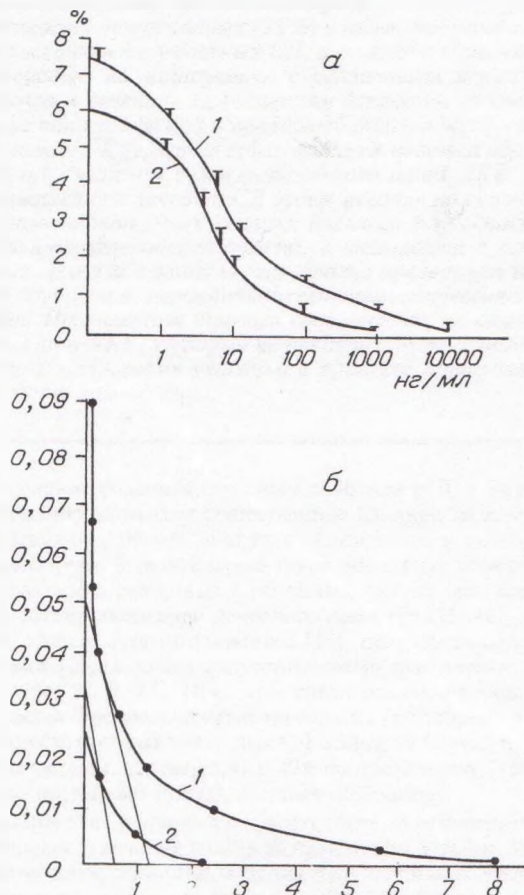


Рис. 2. Анализ инсулинрецепторного взаимодействия у беременных с СД типа 1.

Здесь и на рис. 3: а — кривые конкурентного вытеснения 125 I-инсулина немеченым инсулином в разных концентрациях в эритроцитах здоровых женщин (1) и больных СД (2). По осям ординат — специфическое связывание 125 I-инсулина эритроцитами (в % от общего инсулина при расчете на $2,0 \cdot 10^9$ клеток/мл); по осям абсцисс — логарифмы концентрации немеченого инсулина (в нг/мл); б — те же данные в координатах графика Скатчарда.

По осям ординат — отношение связанного 125 I-инсулина к свободному; по осям абсцисс — связанный инсулин (в нг/мл) в расчете на $2,0 \cdot 10^9$ клеток/мл.

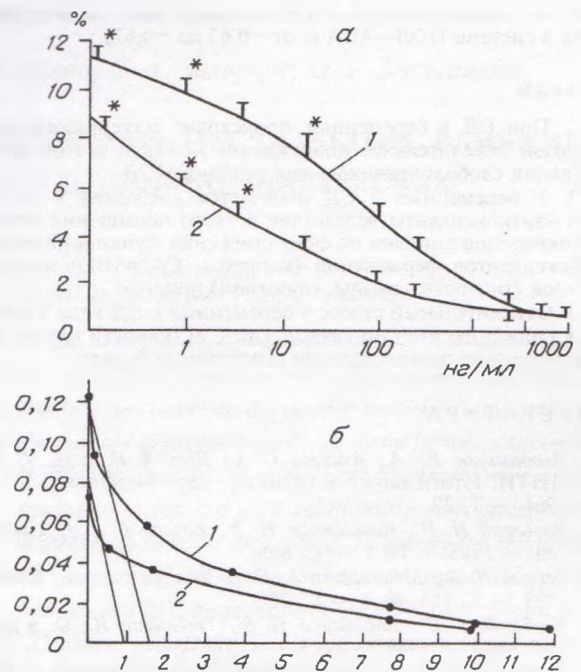


Рис. 3. Показатели уменьшения количества рецепторов у беременных с СД1.

условиях окислительного стресса у больных с СД типа 1 снижается в 2,5 раза ($p < 0,01$). Концентрация тиоловых групп, входящих в состав липопротеидных комплексов МЭ у беременных с диабетом, снижается в 1,9 раза ($p < 0,05$).

Активность CuZnSOD снижается в 1,9 раза ($p < 0,05$). SOD, находящаяся в мембране, осуществляет аннигиляцию радикалов внутри клетки, в результате чего образуется перекись водорода. Образующиеся в результате дисмутации ион-радикалов молекулы перекиси водорода в цитоплазме разлагаются на воду и кислород с помощью каталазы (в митохондриях, пероксисомах, лизосомах и в цитоплазме). Активность каталазы в III триместре беременности у женщин с СД снижается в 6,3 раза ($p < 0,001$). Таким образом, при СД у беременных женщин резко снижается уровень антиоксидантов ферментной и неферментной природы вследствие полимеризации белков, что может служить причиной снижения активности протеинкиназы, т. е. инсулинового рецептора, являющегося интегральным белком в липидном матриксе мембраны.

Изучение инсулинрецепторных связей у больных с СД типа 1, имевших "инсулинрезистентность" (ежедневная доза инсулина превышала 60 ЕД), показало, что к моменту обследования метаболические нарушения были компенсированы, что подтверждалось нормогликемией натощак и отсутствием кетоацидоза. Специфическое связывание инсулина рецепторами на эритроцитах оказалось значительно меньшим, чем у здоровых, причем это снижение определялось уменьшением концентрации рецепторов на эритроцитах ($p < 0,05$) (рис. 2).

В последний триместр беременности (при нормогликемии натощак и в течение дня, отсутствии кетоацидоза) связывание инсулина рецепторами на эритроцитах было значительно снижено по сравнению со здоровыми женщинами с беременностью таких же сроков. Как видно на рис. 3, это снижение связано с уменьшением концентрации рецепторов на клетках и в меньшей степени — со снижением сродства рецепторов к инсулину.

Во время родов в венозной крови процент связывания 125 I-инсулина с эритроцитами у рожениц снижается; в пуповинной крови инсулинсвязывающая активность снижается более чем в 2 раза. Через 1 ч и через 1 сут после родоразрешения у больных с СД типа 1 отмечается возрастание процента специфического связывания 125 I-инсулина до исходных значений за счет повышения как количества, так и сродства свободных и максимально занятых инсулиновых рецепторов. Через 5–7 сут после родов процент связывания вновь снижается. Концентрация МДА в эритроцитах до и во время родов мало отличается от контрольных значений. Однако после родов концентрация МДА в эритроцитах резко возрастает, но при стабильно нормальном уровне

АОА, что свидетельствует о компенсации имеющегося дисбаланса в системе ПОЛ—АОА (r от $-0,63$ до $-0,67$).

Выводы

1. При СД у беременных происходит ассоциированное с глюкозой окислительное повреждение мембран клеток за счет активации свободнорадикальных реакций ПОЛ.

2. У беременных с СД отмечается дисбаланс в системе ПОЛ—антиоксиданты вследствие резкого повышения степени перекисления липидов на фоне снижения функционирования антиоксидантов ферментной (каталазы, CuZnSOD) и неферментной (тиоловые группы, глутатион) природы.

3. Окислительный стресс у беременных с СД типа I приводит к снижению инсулинсвязывающей активности клеток крови в результате полимеризации мембранных белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Азизова О. А., Деев А. И. и др. // ВИНТИ. Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. — М., 1991. — Т. 29.
2. Вольский Н. Н., Капилакова Н. В., Козлов В. А. // Цитология. — 1988. — № 7. — С. 898.
3. Зенков Н. К., Менищикова Е. Б. // Успехи соврем. биол. — 1993. — Т. 113, № 3. — С. 286.
4. Клебанов Г. И., Бабенкова И. В., Теселькин Ю. О. и др. // Лаб. дело. — 1983. — № 3. — С. 33—35.
5. Мамонтова Н. С., Белобородова Э. И., Тюкалова Л. И. // Клин. лаб. диагн. — 1994. — № 1. — С. 27—28.
6. Менищикова Е. Б., Зенков Н. К. // Успехи соврем. биол. — 1993. — Т. 113, № 4. — С. 442.
7. Микаелян Н. П. Метаболический статус и инсулинсвязывающая активность клеток крови и печени при экстремальных состояниях (экспериментально-клиническое исследование): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1992.
8. Микаелян Н. П., Князев Ю. А., Гурина А. Е. и др. // Сахарный диабет. — 1999. — № 3. — С. 48—51.
9. Чевари С., Чаба И., Секей И. // Лаб. дело. — 1985. — № 11. — С. 678—680.
10. Clebanoff S. I. // Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. — New York, 1992. — P. 541.
11. De Meyts P., Roth I. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1975. — Vol. 66, N 8. — P. 11.
12. Denham S., Rowland I. J. // Clin. Expt. Immunol. — 1992. — Vol. 87. — P. 157.
13. Freeman B. // Chest. — 1994. — Vol. 105. — P. 579.
14. Kahn C. R., Freychet P., Roth I., Newille D. M. Jr. // J. Biol. Chem. — 1974. — Vol. 249, N 7. — P. 2249—2257.
15. Liu R. H., Hotchkiss J. H. // Mutat. Res. — 1995. — Vol. 339. — P. 73.
16. McKenna S. M., Davies K. I. A. // Oxygen Radicals in Biology and Medicine. — New York; London, 1998. — P. 829.
17. Osacawa I., Matsushita S. // Lipids. — 1980. — Vol. 15, N 3. — P. 137—140.
18. Scatchard L. O. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1949. — Vol. 51, N 6. — P. 660—672.
19. Sies H. // Am. J. Med. — 1991. — Vol. 91. — Suppl. 3. — P. S31.

Поступила 26.09.01