

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 618.3-06:616.379-008.64]-092-07

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

## МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЙ ФУНКЦИЙ МЕМБРАНОРЕЦЕПТОРНОГО АППАРАТА ПРИ ИНСУЛИНЗАВИСИМОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН

Отдел эндокринологии и патологии обмена веществ Российского государственного медицинского университета

Известно, что все конечные эффекты действия инсулина в клетках — следствие сложной цепи метаболических событий, начинающихся с обязательного формирования активного комплекса инсулин — инсулиновый рецептор (ИР). «Вмонтированный» в мембрану рецептор оказывается включенным в сложную систему взаимодействий, во многом определяющих его функциональное состояние. Такие мембранные факторы, как белки и липиды, оказывают влияние на аффинность рецептора. Вероятно, изменение аффинности часто опосредовано изменениями в микроокружении рецептора. Связывающие характеристики рецептора в первую очередь необходимо сопоставить с такими интегральными показателями физико-химического состояния липидного матрикса, как его жидкость [14], проницаемость и другие свойства мембран.

Данные литературы о характере инсулин-рецепторных взаимодействий у больных инсулин-зависимым сахарным диабетом (ИЗСД) весьма противоречивы [8, 13, 15]. Интенсивность рецепторного связывания инсулина тканевыми клетками весьма вариабельна и отрицательно коррелирует с уровнем как эндогенного, так и экзогенного инсулина [17].

Установлено, что при нормальной беременности у женщин, несмотря на постоянное возрастание концентрации инсулина в циркуляторном русле, толерантность к глюкозе снижается [6]. У больных сахарным диабетом при беременности доза инсулина возрастает в 2—3 раза.

При ИЗСД может наблюдаться инсулинрезистентность вследствие нарушений инсулин-рецепторных взаимодействий в клетках и структурно-функциональных свойств мембран [3—5].

В настоящей работе нами проведено исследование параметров структурной организации мембран и факторов, влияющих на инсулин-рецепторные взаимоотношения в мембранах клеток крови, у женщин с ИЗСД в III триместре беременности.

### Материалы и методы

Состояние мембранорецепторного аппарата изучено у 68 больных ИЗСД женщин в III триместре беременности. Возраст больных составил 18—40 лет (средний возраст  $26 \pm 5,4$  года). Срок заболевания — от 5 до 16 лет. Нами изучены инсулин-рецепторные связи в эритроцитах (Эр) у беременных женщин с ИЗСД, у которых суточная доза инсулина составляла в среднем 72 ЕД. К моменту исследования больные находились в состоянии компенсации сахарного диабета, что подтверждалось нормогликемией, натощак и в течение дня, аглюкозурией. Контрольная группа состояла из 20 жен-

щин в III триместре беременности, без эндокринной патологии. Концентрацию инсулина определяли с помощью наборов для радиоиммунологического анализа, количество инсулиновых рецепторов в плазматических мембранах (ПМ) Эр — по описанному нами методу [5]. Связывание  $^{125}\text{I}$ -инсулина с рецепторами ПМ Эр исследовали по методу I. Roth (1983) с использованием метода вытеснения  $^{125}\text{I}$ -инсулина из комплекса с рецепторами возрастающими количествами неметченого гормона в условиях равновесия [9]. Общее количество инсулинсвязывающих мест и сродство рецепторов к гормону определяли по методу L. Scatchard [15]. P. Meyts и I. Roth [11], чувствительность клеток к инсулину оценивали по степени утилизации глюкозы Эр. Об интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) и выделенных ПМ Эр судили по содержанию гидроперекисей (ГП) [1] и малонового диальдегида (МДА), используя колориметрический метод с тиобарбитуровой кислотой [12], антиокислительную активность (АОА) крови определяли в модификации Г. И. Клебанова и соавт. [2]. Структурно-функциональные свойства мембран Эр оценивали по изменению в мембранах Эр концентрации МДА, ГП, АОА, а также путем измерения концентрации тиоловых групп, микровязкости и гидрофобности эритроцитных мембран посредством вычисления коэффициента упорядоченности и гидрофобности эритроцитных мембран методом ЭПР-спектроскопии с помощью спиновых зондов на радиоспектрометре E-4 («Varian», США).

### Результаты и их обсуждение

Полученные результаты показали, что в эритроцитных мембранах у беременных с ИЗСД значительно увеличивается «жесткость» липидного бислоя мембраны. Повышенная «жесткость» мембран, по-видимому, может служить одной из причин нарушения связывания инсулина с рецепторами, так как латеральная диффузия рецепторов, способность их к агрегированию и интернализации при этом резко затрудняются. Как видно на рис. 1, при 2-часовой инкубации Эр, взятых у беременных женщин, больных ИЗСД, с инсули-

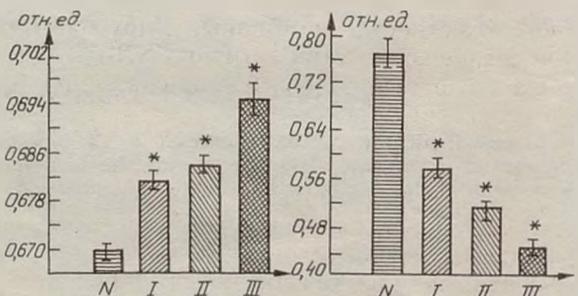


Рис. 1. Структурная организация эритроцитных мембран беременных при инкубации клеток инсулином.

Слева — коэффициент упорядоченности, справа — коэффициент гидрофобности N — интактные Эр; I—III — Эр, подвергнутые действию инсулина в дозах 20, 80, и 1000  $\mu\text{г}/\text{мл}$  соответственно. \*  $p < 0,001$  достоверность по отношению к группе здоровых беременных.

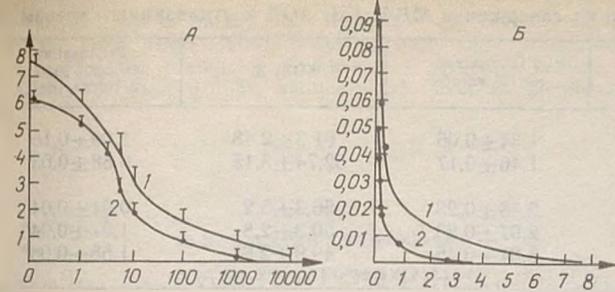


Рис. 2. Анализ инсулин-рецепторного взаимодействия у больных ИЗСД, резистентным к инсулинотерапии.

А — кривые конкурентного вытеснения  $^{125}\text{I}$ -инсулина немеченым инсулином в разных концентрациях в Эр здоровых лиц (1) и больных сахарным диабетом (2). По оси ординат специфическое связывание  $^{125}\text{I}$ -инсулина Эр (в % от общего инсулина в расчете на  $2 \cdot 10^9$  клеток в 1 мл); по оси абсцисс — логарифм концентрации немеченого инсулина (в нг/мл). Б — те же данные в координатах графика Скетчарда. По оси ординат — отношение  $^{125}\text{I}$ -инсулина связанного к свободному; по оси абсцисс — связанный инсулин (в нг/мл в расчете на  $2,0 \cdot 10^5$  клеток в 1 мл).

ном *in vitro* в концентрациях 20, 80 и 1000 пг/мл в прямой зависимости от дозы инсулина происходит возрастание коэффициента упорядоченности и снижение гидрофобности мембран Эр по сравнению с интактными клетками. Повышение микровязкости мембран Эр связано, по-видимому, с глубокими метаболическими нарушениями, в частности, усилением ПОЛ, приводящими, как известно, к увеличению «жесткости» липидного бислоя мембран [7].

При изучении одной из наиболее активных групп белка — SH с помощью спиновой метки отмечено изменение конформации поверхности белков, т. е. усиление процессов ПОЛ мембран, сочетается с агрегацией поверхностных белков мембран. Мембранодеструктивное воздействие процессов ПОЛ, изменение микровязкости и гидрофобности клеточных мембран ведут к повышению их проницаемости, что способствует смещению ионного равновесия и накоплению воды в клетке. Кроме того, проведенные у беременных с ИЗСД исследования поверхностных тиоловых группировок мембран Эр показали их малую доступность зонду. В связи с тем что свободные тиоловые группы являются основными структурами, обеспечивающими действие мембранных антиоксидантов, уменьшение их доступности указывает на деструктивные изменения в мембране. При беременности у больных ИЗСД низкая доступность тиоловых групп говорит о высокой упорядоченности мембранных белков, т. е. о повышении «жесткости» мембраны. С другой стороны, уменьшение количества активных SH-группировок снижает способность мембраны связывать активные перекисные радикалы.

Таким образом, у беременных с ИЗСД отмечаются выраженные структурно-функциональные изменения в эритроцитных мембранах. Наряду с повышением пассивной проницаемости мембраны для воды, что обусловлено снижением гидрофобности, нарушается активный транспорт через мембрану веществ, требующих для этого взаимодействия с мембранными рецепторами. Об этом говорит повышение упорядоченности липопротеидных структур мембраны. В результате этих изменений нарушается функция Эр, не только как переносчика связанного с гемоглобином кислорода, но и как транспортера биологически ак-

тивных веществ [10]. С другой стороны, изменение структурно-функциональной организации эритроцитных мембран может свидетельствовать о подобных нарушениях в клетках других тканей, в частности  $\beta$ -клетках островков Лангерганса. В результате окисления белковосвязанных SH-групп в инсулиновом рецепторе может наступить ослабление инсулин-рецепторного взаимодействия вследствие полимеризации белков.

Нами изучено инсулин-рецепторное взаимодействие на Эр больных ИЗСД с признаками инсулинрезистентности: суточная доза инсулина была выше 60 ЕД и в среднем составляла 80 ЕД. На момент исследования больные были в состоянии компенсации сахарного диабета. Специфическое связывание инсулина рецепторами на Эр оказалось значительно меньшим, чем у здоровых лиц, причем это снижение определялось уменьшением концентрации рецепторов на Эр (рис. 2).

При изучении инсулин-рецепторных взаимоотношений у беременных с ИЗСД оказалось, что в последний триместр беременности, несмотря на удовлетворительную компенсацию диабета, связывание инсулина с рецепторами на Эр было значительно снижено по сравнению со здоровыми беременными с такими же сроками беременности. Как видно на рис. 3, это снижение обусловилось в большей степени уменьшением концентрации рецепторов на клетках и в меньшей степени снижением сродства рецепторов к инсулину.

Результаты исследования зависимости между дозой инсулина и характером изменения одного из метаболических эффектов инсулина свидетельствует, что при физиологическом уровне инсулина *in vitro* утилизация глюкозы Эр у беременных с ИЗСД (длительность заболевания 5—12 лет) осуществляется в меньшей мере, чем в контроле, однако при увеличении концентрации инсулина в пробах в 4 раза этот процесс возрастал до нормы. Исходя из этого, можно сделать заключение, что у беременных с длительно существующим ИЗСД имеется резистентность к инсулину, проявляющаяся понижением чувствительности на пороговые физиологические дозы инсулина, но на максимальные концентрации его ответ не нарушен. При ИЗСД у беременных вторично развивается инсулинрезистентность, которая зависит от состояния ИР клеток и вводимой дозы инсулина.

Изучение влияния стрессорных факторов на структурную организацию эритроцитных мембран, таких, как, интенсификация свободнорадикального окисления и снижение активности эндогенных антиоксидантов, показало, что у всех беременных женщин, больных ИЗСД, *in vitro* по

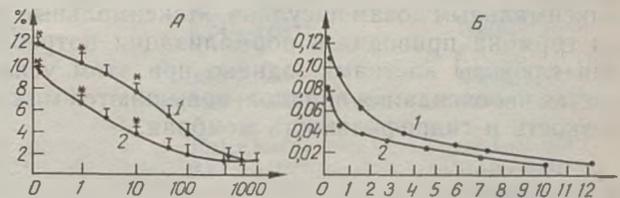


Рис. 3. Анализ инсулин-рецепторных взаимодействий у беременных ИЗСД.

Обозначения те же, что на рис. 2.

Статистически достоверно отличающиеся значения обозначены знаком \*

Условие опыта	МДА, ммоль на 10 <sup>6</sup> клеток	ГП, отн. ед. на 10 <sup>6</sup> клеток	АОА, %	Утилизация глюкозы, ммоль (2·10 <sup>6</sup> клеток)/ч
Контроль 1 — здоровые беременные (n=15)	3,1±0,7	1,34±0,06	61,3±2,48	1,09±0,15
Контроль 2 — больные ИЗСД беременные (n=12)	3,65±0,06	1,46±0,17	52,74±3,15	0,88±0,03
Эр+инсулин				
20 пг/мл (n=12)	3,83±0,08	2,48±0,23	56,3±3,2	0,91±0,04
80 пг/мл (n=10)	3,83±0,08	2,97±0,23	50,3±2,8	1,07±0,04*
1000 пг/мл (n=10)	8,03±0,9*	3,81±0,45	49,9±2,8	1,58±0,08*

\* Достоверные различия по отношению к контролю.

сравнению с контролем происходит усиление ПОЛ и снижение АОА в сыворотке крови. В эритроцитарных мембранах значимых различий АОА в сравниваемых группах не отмечено. Различия в содержании МДА и ГП в Эр, взятых от больных ИЗСД, в контроле и после 2-часовой инкубации Эр с инсулином в концентрациях 20 и 80 пг/мл были незначительными (см. таблицу). Добавление инсулина к Эр в более высокой концентрации усиливало образование ПОЛ (резко возрастала концентрация ГП и МДА;  $p < 0,05$ ) и не вызывало изменения АОА, т. е. инсулин в высоких концентрациях оказывал у беременных с ИЗСД прооксидантное действие. В то же время инсулин в больших концентрациях (80 и 1000 пг/мл) усиливает процессы утилизации глюкозы Эр ( $p < 0,05$ , см. таблицу), причем существует тесная корреляционная связь при указанных дозах между АОА и степенью утилизации глюкозы ( $r = 0,65$  и  $r = 0,76$ ;  $p < 0,05$ , соответственно). Следовательно, внесение инсулина в высокой концентрации к Эр приводило к повышению утилизации глюкозы, значительному возрастанию содержания МДА и не вызывало изменения АОА по сравнению с контролем. Вероятно, можно говорить об относительной недостаточности активности антиоксидантных ферментов на фоне усиления липидной пероксидации под влиянием высокой концентрации инсулина (1000 пг/мл).

В условиях активации ПОЛ, несмотря на компенсаторное утолщение клеточной мембраны, судя по увеличению содержания липидного фосфора (с  $2,67 \pm 0,11$  ммоль на  $10^6$  клеток в контроле до  $3,82 \pm 0,19$  ммоль при ИЗСД;  $p < 0,01$ ), мембраны Эр остаются функционально неполноценными, о чем свидетельствуют сниженная чувствительность клеток к инсулину и сниженная концентрация ИР.

Таким образом, проведенные эксперименты с Эр беременных свидетельствуют о том, что ИЗСД характеризуется развитием инсулинрезистентности вследствие нарушения чувствительности клеток к пороговым физиологическим и субмаксимальным дозам инсулина. Максимальные дозы гормона приводят к нормализации потребления глюкозы клетками, однако при этом усиливается пероксидация липидов, повышаются вязкость и гидрофильность мембран.

## Выводы

1. У беременных женщин, страдающих ИЗСД с признаками инсулинрезистентности, выявлено нарушение чувствительности клеток к пороговым физиологическим и субмаксимальным дозам

инсулина. Максимальные дозы гормона приводят к нормализации потребления глюкозы клетками.

2. Большие дозы инсулина вызывают активацию интенсивности пероксидации липидов, высокую упорядоченность белков мембраны, уменьшение количества тиоловых групп, снижение АОА в мембранах и, следовательно, снижение способности мембран связывать активные перекисные радикалы.

3. Структурно-функциональные изменения в мембранах Эр сопровождаются снижением аффинности ИР, снижением числа инсулинсвязывающих мест в мембранах.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилов Б. В., Мишкорудная М. И. // Лаб. дело.— 1983.— № 3.— С. 33—35.
2. Клебанов Г. И., Бабенкова И. В., Теселькин Ю. О. и др. // Там же.— 1988.— № 5.— С. 59—61.
3. Максина А. Г., Микаелян Н. П., Князев Ю. А., Дайняк Б. А. // Биофизика.— 1992.— Т. 37, вып. 2.— С. 306—309.
4. Микаелян Н. П., Князев Ю. А., Беспалова В. А. и др. // Пробл. эндокринолог.— 1990.— Т. 36, № 2.— С. 28—31.
5. Микаелян Н. П. Метаболический статус и инсулинсвязывающая активность клеток крови и печени при экстремальных состояниях: (Экспериментально-клиническое исследование): Дис. ... д-ра биол. наук.— М., 1991.
6. Anderson O., Kuhl I. // Europ. J. clin. Invest.— 1986.— Vol. 16, N 3.— P. 226—232.
7. Burton G. W. // Biochim. biophys. Acta. Biomembranes.— 1986.— Vol. 860, N 1.— P. 64—90.
8. Fantus I. G., Savielakis G. A., Hedo J. A., Gordon P. // J. biol. Chem.— 1982.— Vol. 257, N 14.— P. 8277—8283.
9. Kahn C. R., Freychet P., Roth I., Neville D. M. Jr. // Ibid.— 1974.— Vol. 249, N 7.— P. 2249—2257.
10. Kikugawa K., Kosugi H., Asakara T. // Arch. Biochem.— 1984.— Vol. 229, N 1.— P. 7—14.
11. De Meyts P., Roth I. // Biochem. biophys. Res. Commun.— 1975.— Vol. 66, N 8.— P. 11.
12. Osakawa T., Mathushita S. // Lipids.— 1980.— Vol. 15, N 3.— P. 137—140.
13. Pedersen O. // Dan. med. Bull.— 1984.— Vol. 31.— P. 1—32.
14. Roth I., Taylor S. I. // Ann. Rev. Physiol.— 1982.— Vol. 44.— P. 639—651.
15. Scatchard L. O. // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1949.— Vol. 51, N 6.— P. 660—672.
16. Shinitzky M., Henkart P. // Int. Rev. Cytol.— 1980.— Vol. 60.— P. 121—147.
17. Zick R., Hurter P., Meuer B. et al. // Münch. med. Wschr.— 1983.— Bd 125.— Suppl. 1.— S. 27.

Поступила 06.05.93

N. P. Mikaelyan, Yu. A. Knyazev, A. G. Maxina, V. A. Pelurukhin — MECHANISMS OF MEMBRANORECEPTOR FUNCTION DISTURBANCES IN PREGNANT PATIENTS WITH INSULIN-DEPENDENT DIABETES MELLITUS

Summary. Studies of membranoreceptor system in patients with insulin-dependent diabetes mellitus revealed that insulin resistance in pregnant patients with type I diabetes is caused by disordered cellular sensitivity to threshold

physiological and submaximal insulin doses, whereas the maximal doses of the hormone normalize glucose consumption by the cells. High insulin doses intensify lipid peroxidation, normalize the status of membranous proteins, reduce the number of thiol groups, reduce AOA level in membranes,

and, hence, reduce membranous capacity to bind active peroxide radicals. Structural and functional changes in red cell membranes are associated with reduced affinity of insulin receptors, reduction in the number of insulin-binding sites in membranes, this disordering intracellular effects of insulin.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.379-008.64-092:612.017.11-07

В. М. Фролов, Н. А. Пересадин, А. М. Петруня, Л. Л. Пинский

## ИММУННЫЙ СТАТУС БОЛЬНЫХ ИНСУЛИННЕЗАВИСИМЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Кафедра клинической иммунологии и генетики (зав.— проф. Н. А. Пересадин) Луганского медицинского института

За последние годы появилось значительное количество работ, свидетельствующих о ведущей роли иммунных и иммунопатологических сдвигов в формировании диабетических ангиопатий, а также развитии гнойно-воспалительных осложнений сахарного диабета (СД) [1, 2, 5].

### Материалы и методы

Обследовано 48 больных инсулиннезависимым СД (ИНЗСД), в том числе 20 мужчин и 28 женщин, в возрасте от 38 до 56 лет. У 12 пациентов (5 мужчин и 7 женщин) в возрасте от 38 до 49 лет был впервые выявленный СД. Из сопутствующей патологии отмечались жировой гепатоз (у 3), гепатохолецистит (у 4), хронический панкреатит (у 6), хронический гастрит (у 2), ишемическая болезнь сердца (ИБС; у 3), гипертоническая болезнь (ГБ; у 2), микроангиопатии нижних конечностей (у 6) и сетчатки (у 7), ожирение (у 3). Исследования проводились в стадии компенсации углеводного обмена, достигнутой применением пероральных антидиабетических средств.

Из 10 больных ИНЗСД с приобретенной потребностью в инсулине было 4 мужчин и 6 женщин в возрасте от 45 до 56 лет. Из сопутствующей патологии отмечались хронический гастрит (у 3), жировой гепатоз (у 4), хронический персистирующий гепатит (ХПГ; у 3), хронический панкреатит (у 4), ИБС (у 4), ГБ (у 3), ожирение (у 4), микроангиопатии нижних конечностей (у 7) и сетчатки (у 8), простая диабетическая ретинопатия (у 2). Длительность приема пероральных сахароснижающих средств в данной группе составляла от 4 до 7 лет, длительность инсулинотерапии колебалась от 7 мес до 3,5 лет. Суточная доза инсулина составляла 10—32 ЕД. Больные находились в стадии компенсации нарушений углеводного обмена, достигнутой введением инсулина.

Остальные 26 человек (11 мужчин, 15 женщин) были

в возрасте от 42 до 56 лет. Сопутствующие заболевания были следующими: жировой гепатоз (у 7), ХПГ (у 5), хронический гастрит (у 9), хронический панкреатит (у 13), ИБС (у 6), ожирение (у 4), микроангиопатии нижних конечностей (у 14) и сетчатки (у 19), простая диабетическая ретинопатия (у 5) и пролиферативная диабетическая ретинопатия (у 2). Компенсация нарушений углеводного обмена достигалась использованием пероральных антидиабетических средств, длительность приема которых составляла 3—10 лет.

Контрольная группа состояла из 85 (53 мужчин, 32 женщин) практически здоровых лиц (разовые доноры Луганской областной станции переливания крови) в возрасте от 30 до 50 лет, ранее не болевших заболеваниями печени и поджелудочной железы и имевших нормальные показатели теста толерантности к глюкозе.

Объем исследований клеточных факторов иммунитета включал определение популяций Т- и В-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup> и CD22<sup>+</sup>), субпопуляций Т-хелперов/индукторов (CD4<sup>+</sup>) и Т-супрессоров/киллеров (CD8<sup>+</sup>) с помощью моноклональных антител (МКА) в цитотоксическом тесте. Подсчитывался индекс CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> — соотношение между иммунорегуляторными субпопуляциями хелперов и супрессоров [3, 4]. Использовались коммерческие МКА фирмы «Orto Diagnostic Systems» США.

### Результаты и их обсуждение

Исследование иммунного статуса больных ИНЗСД показало наличие умеренной Т-лимфопении, снижение количества CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов и, что наиболее важно, числа CD8<sup>+</sup>-клеток (Т-супрессоры/киллеры) (см. таблицу). Вследствие этого иммунорегуляторный индекс CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> с нарастанием выраженности патологического процесса имел четкую тенденцию к повышению,

Иммунные показатели при ИНЗСД, изученные с помощью МКА

Иммунный показатель	Практически здоровые лица	Группа обследованных больных ИНЗСД		
		с впервые выявленным СД (n=12)	с длительностью заболевания 1—5 лет (n=26)	с приобретенной потребностью в инсулине (n=10)
CD3 <sup>+</sup> :				
%	72,6±2,2	61,4±2,2*	52,7±2,1*	45,7±1,9**
абс.	1,45±0,04	1,04±0,04*	0,74±0,03**	0,60±0,02**
CD4 <sup>+</sup> :				
%	47,5±2,2	42,8±1,3	38,3±1,6*	34,2±1,4**
абс.	0,95±0,04	0,73±0,02*	0,54±0,02**	0,44±0,02**
CD8 <sup>+</sup> :				
%	22,8±1,5	20,4±1,3	15,1±1,1*	12,1±1,2**
абс.	0,46±0,03	0,35±0,02*	0,21±0,02**	0,16±0,02**
CD4/CD8	2,08±0,08	2,10±0,06	2,54±0,07*	2,83±0,07**
CD22 <sup>+</sup> :				
%	23±1,5	20,7±2,1	25,5±2,2*	26,8±2,1*
абс.	0,46±0,03	0,35±0,04*	0,36±0,04*	0,35±0,05*

Примечание. Достоверность показателей в сравнении со здоровыми: одна звездочка —  $p < 0,05$ , две —  $p < 0,01$ .