

## КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.169:618.36 + 577.15: 577.17+577.164.1

© Коллектив авторов

### ЛИПИД-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В МЕМБРАНАХ ЭРИТРОЦИТОВ И ПЛАЦЕНТЫ ПРИ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У ЖЕНЩИН

*Н.П. Микаелян<sup>1\*</sup>, А.А. Терентьев<sup>1</sup>, А.Г. Максина<sup>1</sup>, А.В. Микаелян<sup>2</sup>, С.А. Новикова<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Российский государственный медицинский университет” им. Н.И. Пирогова, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1;  
тел.: (495)434-65-74; эл. почта: ninmik@yandex.ru

<sup>2</sup>Московский областной НИИ акушерства и гинекологии, 101000, Москва,  
ул. Покровка, 22-а.

Исследованы нарушения функций мембрано-рецепторного аппарата эритроцитов и плаценты при ожирении и сахарном диабете у женщин в III триместре гестации. Полученные данные по изучению липидного состава мембран эритроцитов, гомогенатов плаценты, гормон-рецепторных взаимодействий свидетельствуют о значительном нарушении метаболического статуса и гомеостаза плаценты у женщин с инсулинорезистентностью. Изменение липидного спектра мембран эритроцитов и плаценты, сниженная активность антиоксидантных ферментов, по-видимому, способствуют развитию фетоплацентарной недостаточности. Наличие отклонения в плацентарных гомеостатических процессах у женщин с СД2 на фоне ожирения является основанием для назначения адекватной терапии, направленной на ликвидацию дисбаланса в гормональном и антиоксидантном статусе, и следовательно, плацентарной недостаточности.

**Ключевые слова:** инсулиновые рецепторы, утилизация глюкозы клетками, ферменты-антиоксиданты, плацентарный гомеостаз, метаболический статус.

**ВВЕДЕНИЕ.** Первичная инсулинорезистентность (ИР) и сопутствующая системная гиперинсулинемия, которая, с одной стороны, выполняет компенсаторную ответную реакцию, поддерживающую нормальный транспорт глюкозы в клетки, с другой – является патологической, т.к. приводит к целой серии метаболических нарушений. По данным G. Reaven, инсулинорезистентность (ИР) имеется у 25% лиц среднего возраста [1]. Прогрессирование ИР и связанные с ней метаболические расстройства (гипергликемия, дислипидемия) сопровождаются абдоминальным ожирением [2, 3]. У женщин ожирение сопровождается также различными репродуктивными нарушениями, осложнением течения беременности и нарушением нормального развития плода и развитием плацентарной недостаточности [4, 5]. Различные изменения, происходящие в организме матери, вызывают соответствующие адаптивные реакции у плода, в значительной степени определяющиеся состоянием плаценты – органа, осуществляющего взаимосвязь между организмом матери и плодом [4, 6-9]. Развитие ИР и компенсаторной гиперинсулинемии у беременных с ожирением, являющимся основным патогенетическим фактором развития метаболического синдрома (МС), может привести к нарушению в липидном бислое мембран клеток, а также к дисбалансу системы перекисного окисления липид-антиоксидантной активности (ПОЛ-АОА) и тиреотропин (ТТГ) - тиреоидные гормоны [10, 11].

\* - адресат для переписки

Целью данной работы явилось изучение липид-белковых взаимоотношений в мембранах эритроцитов и плаценты, а также в системе тиреотропин - тиреоидные гормоны при ИР у женщин с ожирением и сахарным диабетом 2 типа (СД2).

**МЕТОДИКА.** Проводили комплексное исследование липидного состава сыворотки и мембран клеток крови, степени перекисного окисления липидов (ПОЛ), чувствительности клеток к инсулину, а также состояние системы тиреотропин (ТТГ) - тиреоидные гормоны у 90 женщин с конституционально-экзогенным и абдоминальным типами ожирения и у 50 женщин с СД2 в III триместре гестации. Контрольную группу составили 36 женщин с нормальным течением беременности. Эритроциты отделенные от плазмы, отмывали троекратным центрифугированием в среде Хэнкса без кальция и магния (рН 7,3) при 1900 g в течение 10 мин. В эритроцитарной взвеси определяли утилизацию глюкозы (УГ) эритроцитами и инсулинсвязывающую активность по методу, описанному ранее [4]. В гемолизатах отмытых эритроцитов (Эр) исследовали параметры ПОЛ-АОА, гормоны изучали в сыворотке крови, а также в 10% гомогенатах плаценты, приготовленных на изотоническом растворе хлорида натрия. Гомогенаты плаценты (ГП) центрифугировали на центрифуге Multifuge 1S|1S-R (Германия) в течение 15 мин при 10000 g при 4°C для осаждения митохондриальной фракции, после чего супернатант вновь подвергали центрифугированию при 15000 g в течение 1 часа. Для определения активности супероксиддисмутазы (СОД) эритроциты предварительно лизировали в 5 mM K,Na-фосфатном буфере, рН 7,4, на ледяной бане, после чего гем-содержащие белки осаждали смесью хлороформ : этанол (3: 5). АОА липидов плаценты, выделенных из гомогенатов по J. Folch et al. [12], определяли в модельной системе с линетолом. Липиды мембран Эр и ГП экстрагировали хлороформ-метаноловой смесью по методу [12]. Общее содержание липидов в мембранах определяли методом Тарановой Н.А. [13]. Препаративное разделение общих липидов проводили методом тонкослойной хроматографии [14] в системе растворителей гептан : диэтиловый эфир : этилацетат (в соотношении 80 : 20 : 1,5) на пластинках "Sorbfil" (Россия). Разделение фракций фосфолипидов мембран методом тонкослойной хроматографии [15] осуществляли в системе хлороформ : метанол : вода (в соотношении 32 : 12,5 : 2) на пластинках "Sorbfil". Идентификацию фракций липидов осуществляли с использованием соответствующих стандартов ("Sigma", США). Количественную оценку хроматограмм проводили с помощью разработанной компьютерной программы с использованием статистического пакета STATISTICA 6.0 и электронных таблиц EXCEL-95.

Об интенсивности ПОЛ в выделенных плазматических мембранах эритроцитов (МЭ) судили по содержанию малонового диальдегида (МДА) [16] и гидроперекисей [17]. АОА крови определяли по способности плазмы тормозить накопление ТБК-активных продуктов ПОЛ в суспензии желточных липопротеинов [18]. Утилизацию глюкозы Эр определяли в среде, содержащей  $2 \times 10^9$  кл/мл отмытых Эр, инкубированных с возрастающими концентрациями нативного инсулина [19]. 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 Эр, отмытыми трёхкратно, по ранее описанному нами методу [19]. Активность каталазы определяли по методу на основе разложения перекиси водорода, используя наборы фирмы "Sigma". Активность Cu,Zn-СОД исследовали путём измерения процента торможения скорости реакции восстановления нитросинего тетразолия при неферментном образовании супероксидного радикала [20]. Активность глутатионпероксидазы определяли наборами фирмы "Sigma". Содержание ТТГ, общих и свободных фракций  $T_3$ ,  $T_4$  в сыворотке крови и в ГП определяли радиоиммунологическим методом с помощью наборов ( $^{125}$ I) ("Cis Bio International", Франция), измеряя уровень радиоактивности супернатанта с помощью гамма-счётчика "Наркотест" (Россия). Тиреоидные гормоны и ТТГ из плацентарной ткани выделяли по методу, описанному [21, 22] в среде 96% ледяного этанола. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы

(Г-6-ФДГ) определяли кинетическим методом (набор фирмы “Sentinuch”, Италия), измеряя увеличение оптической плотности при 340 нм на спектрофотометре СФ-46. Количество антиоксидантных белков церулоплазмينا (ЦП) и апотрансферрина (ТФ) определяли ЭПР-спектроскопическим методом и методом хемилюминесценции [23].

Результаты исследования обрабатывали статистически, используя критерий t Стьюдента. Приведены средние величины  $\pm$  ошибка средних. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

Данное исследование одобрено комитетом по этике РНИМУ им. Н.И. Пирогова. Было получено информированное согласие больных на участие в данном исследовании.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** У беременных женщин с разными типами ожирения выявлялись однотипные изменения липидного и фосфолипидного (ФЛ) состава МЭ. У женщин с фетоплацентарной недостаточностью (ФПН) независимо от типа ожирения отмечалась склонность к нарастанию содержания свободного холестерина (СХ), по сравнению с контрольной группой. Отмечалась также склонность к увеличению содержания в МЭ атерогенных фракций липидов, достоверно снижался уровень  $\alpha$ -ЛП при значительном повышении уровня  $\beta$ -ЛП. В составе ФЛ мембран клеток достоверно увеличилась концентрация сфингомиелина (СФМ) с  $18,50 \pm 1,21$  до  $23,19 \pm 0,92$  и снижалась концентрация фосфатидилэтаноламина (ФЭА) с  $35,80 \pm 0,99$  до  $30,15 \pm 0,40$  ( $p < 0,01$ ). При СД2 в фазе компенсации у беременных с ФПН отмечается склонность к нарастанию содержания СХ, а при ожирении без признаков СД также ФЭА по сравнению с беременными без ФПН. У женщин с ожирением и СД2 с ФПН эта тенденция сохраняется на фоне уменьшения относительного содержания фосфатидилхолина (ФТХ). Отмечалась склонность к увеличению содержания атерогенных фракций липидов в сыворотке крови. Это свидетельствует о наличии у беременных женщин с ожирением и СД2 типа на фоне ожирения склонности к увеличению жёсткости мембран [9], что, по-видимому, может способствовать развитию ФПН.

Достоверное снижение инсулинсвязывающей активности (ИСА) и утилизации глюкозы (УГ) эритроцитами (табл. 1) в обеих исследуемых группах свидетельствует о наличии ИР. Резко выраженная гипергликемия и высокая степень ПОЛ отмечается особенно в группе беременных с ФПН.

Таблица 1. Показатели антиоксидантного статуса в МЭ и гомогенатах плаценты при фетоплацентарной недостаточности у женщин с ожирением и СД2; (активность ферментов в случае МЭ - в ед/мг Нb, в случае плаценты - в ед/ мг белка).

Группа	АОА, %	Cu,Zn-СОД	Катализа	Глутатион-пероксидаза	Утилизация глюкозы Эритроцитами ( $2 \times 10^9$ ) кл/час
<b>Группа сравнения</b>					
1. Венозная кровь	$56,7 \pm 2,3$	$1380 \pm 31$	$622 \pm 2,8$	$48,6 \pm 0,6$	$1,68 \pm 0,05$
2. Пупочная кровь	$56,2 \pm 2,9$	$1450 \pm 29,1$	$485 \pm 4,9$	$53,1 \pm 0,8$	$2,79 \pm 0,09$
3. Гомогенизаты плаценты	$57,3 \pm 3,3$	$297 \pm 11,8$	$430 \pm 2,3$	$0,65 \pm 0,09$	$3,2 \pm 0,06$
<b>Роженицы с ожирением</b>					
1. Венозная кровь	$41,7 \pm 2,4^*$	$923 \pm 29^*$	$510 \pm 4,3^*$	$46 \pm 0,6$	$0,93 \pm 0,04^*$
2. Пупочная кровь	$51,7 \pm 1,93$	$1255 \pm 22^*$	$421 \pm 4,6^*$	$41,9 \pm 0,8^*$	$2,1 \pm 0,004^*$
3. Гомогенизаты плаценты	$43,9 \pm 2,4^*$	$129 \pm 18,6^*$	$430 \pm 18$	$0,49 \pm 0,25^*$	$1,7 \pm 0,04^*$

Примечание: \* - отмечены статистически достоверные значения по отношению с группой сравнения.

## ЛИПИДЫ ЭРИТРОЦИТОВ И ПЛАЦЕНТЫ У ЖЕНЩИН С ДИАБЕТОМ И ОЖИРЕНИЕМ

В плацентарной ткани, взятой сразу после родов, определяли содержание общих и свободных фракций  $T_3$ ,  $T_4$ , тиреотропина, активность Г-6-ФДГ. Проведённые исследования показали, что содержание общих фракций  $T_3$  и  $T_4$ , а также свободной фракции  $T_3$  и уровня ТТГ в сыворотке крови женщин контрольной группы в III триместре беременности соответствовало физиологической норме, характерной для нормальных величин ( $p>0,05$ ). В то же время содержание свободного тироксина превышало этот показатель у небеременных женщин. Наличие более высокой концентрации тироксина в сыворотке крови матери в III триместре беременности необходимо для развития хориона.  $T_4$  стимулирует синтез факторов роста, осуществляющих пролиферацию и дифференциацию клеток трофобласта [2].

В плаценте женщин с ожирением уровень общего  $T_3$  оказался сниженным по сравнению с контрольной группой на 20,7% ( $p<0,01$ ). Содержание общего  $T_4$  в этих условиях также было ниже нормы на 31,4% ( $p<0,01$ ). При этом в плаценте происходит снижение уровня свободных фракций тиреоидных гормонов относительно данных в контрольной группе; св.  $T_3$  на 41,5% ( $p<0,01$ ), св.  $T_4$  - на 26,8% ( $p<0,01$ ). В плаценте женщин с ожирением снижена активность Г-6-ФДГ на 23,6% по сравнению с контролем ( $p<0,05$ ), что может способствовать падению степени включения глюкозы в пентозофосфатный цикл, что отрицательно скажется на генерации NADPH. В сыворотке крови у беременных с ожирением отмечается низкий уровень эстрогенов, которые оказывают пролиферативное действие на клетки [24, 25].

Гестационные особенности тиреоидной системы женщин с СД2 заключаются в низком содержании в сыворотке крови св.  $T_4$  и высоком уровне ТТГ (табл. 2). В плаценте этих женщин обнаружено снижение уровня общих фракций  $T_3$  на 25% ( $p<0,001$ ) и  $T_4$  на 32,4% ( $p<0,01$ ), а также их свободных фракций по сравнению с контрольными данными (св.  $T_3$  - на 53%, ( $p<0,001$ ); св.  $T_4$  - на 32%, ( $p<0,001$ )). Особенно резкое падение концентрации выявлено для св.  $T_3$ , в то время как уровень ТТГ был выше нормы на 52% ( $p<0,001$ ). Количественные изменения тиреоидных гормонов в плаценте носили ту же направленность, что и при ожирении, но степень их выраженности была более значительной. Отмечено достоверное повышение активности Г-6-ФДГ на 98%, что направлено на усиление генерации NADPH и, следовательно, на активацию процесса дейодирования фенольного кольца  $T_4$  с трансформацией его в активный  $T_3$ .

Таблица 2. Содержание тиреоидных гормонов и тиреотропина в плаценте, и церулоплазмينا и трансферрина - в сыворотке крови у женщин в III триместре гестации.

Группа	$T_3$ , нмоль/л	$T_4$ , нмоль/л	ТТГ, мЕд/л	ЦП, отн.ед.	ТФ, отн.ед.	ЦП/ТФ
Контроль	$2,3\pm0,03$	$107,7\pm3,5$	$2,9\pm0,5$	$3,96\pm0,05$	$2,05\pm0,03$	$1,84\pm0,03$
Ожирение	$1,82\pm0,01$	$74,89\pm1,4^*$	$2,1\pm0,03$	$2,67\pm0,12^*$	$2,55\pm0,1$	$1,05\pm0,01^*$
СД2	$1,72\pm0,01$	$72,81\pm1,6^*$	$3,6\pm0,6$	$2,3\pm0,08^*$	$2,94\pm0,13^*$	$0,78\pm0,01^*$

Примечание: \* - статистически достоверные значения по отношению к контролю.

У беременных женщин с ожирением, сопровождающимся СД2 в III триместре, отмечаются качественно одностипные нарушения липидного, липопротеинового и углеводного обменов (повышение уровня ОХ, ТГ, ЛПНП, холестерина ЛПОНП, постпрандиальной глюкозы и др.). Метаболические нарушения сопровождаются высокой концентрацией перекисных липопродуктов, таких как МДА, гидроперекиси (ГП) и др. и снижением антиоксидантной активности в эритроцитах у беременных (табл. 1), особенно в гомогенатах плаценты (до  $43,9\pm2,4$ , при  $57,3\pm3,3\%$  в группе сравнения ( $p<0,005$ )), что свидетельствует о наличии в крови и плаценте выраженного окислительного стресса.



Активация свободнорадикальных реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ) приводит к снижению утилизации глюкозы (УГ) в Эп ( $p<0,05$ ) и гомогенатах плаценты ( $p<0,01$ ) о чём свидетельствуют результаты наших исследований. Так, например, у беременных с ожирением на фоне СД2 содержание МДА увеличивается в МЭ в 1,8 раза, в гомогенатах плаценты в 2,3 раза, гидроперекиси – в 3 раза и в 1,9 раза соответственно. Как видно из таблицы 1, у этих пациенток в крови снижается активность антиоксидантных ферментов (каталазы, глутатионпероксидазы и супероксиддисмутаза), например, активность Cu,Zn-СОД, в плазме крови снижается в 1,5 раза ( $p<0,05$ ), в гомогенатах плаценты – в 2,3 раза, по сравнению с группой контроля ( $p<0,01$ ). В пуповинной крови новорожденных, родившихся у матерей с СД2 с ожирением, содержание МДА и ГП также было достоверно выше, чем в среднем у новорожденных в контроле.

Показатели белков-антиоксидантов ЦП и ТФ, имеющих в своём составе Cu и Fe, у женщин при ожирении и СД2 значительно отличаются от тех же параметров контрольной группы (табл. 2). Белок апотрансферрин, присоединив железо, превращается в ТФ, который переносит железо в клетку. Чем больше в крови ТФ, тем меньше апотрансферрина и тем ниже антиоксидантная активность сыворотки крови. При оценке состояния этих белков по отношению ЦП/ТФ, как видно из таблицы 2, содержание ЦП значительно ниже у беременных при СД2 ( $p<0,05$ ). Соотношение ЦП/ТФ при ожирении составляет  $1,05\pm0,01$ , при СД2 -  $0,78\pm0,001$  и  $1,84\pm0,03$  – в контроле ( $p<0,05$ ).

Следовательно, метаболические нарушения, некомпенсированная активация процессов липопероксидации в условиях ИР у беременных с ожирением и СД2 может привести не только к повреждению фосфолипидного бислоя, но и белков клеточных мембран (в том числе и инсулинового рецептора) и изменению липид-белковых взаимодействия в мембранах клеток.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** Выявление влияния ИР, а также дисбаланса в системе ТТГ - тиреоидные гормоны и ПОЛ-АОА в плаценте женщин с СД2 и ожирением, установление метаболических дефектов, приводящих к структурно-функциональным нарушениям плаценты, свидетельствует о развитии плацентарной недостаточности. Результаты исследования могут использоваться для прогноза состояния новорожденного. Отклонения в плацентарных гомеостатических процессах у женщин с СД2 на фоне ожирения является основанием для назначения адекватной терапии, направленной на ликвидацию дисбаланса в гормональном и антиоксидантном статусе, следовательно, и плацентарной недостаточности.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Reaven G.H.* (2002) *Circulation*, **106**, 286-288.
2. *Despres J.P.* (1998) *Obes. Res.*, **6**, 8S-17S.
3. *Jacob S., Machann J., Reft K. et al.* (1999) *Diabetes*, **48**, 1113-1119.
4. Микаэлян Н.П., Князев Ю.А., Петрухин В.А., Федорова М.В. (2002) Пробл. эндокр., №5, 33-36.
5. *Kuhl C.* (1998) Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus, 21(1.2.), 5-23.
6. *Koch R., Sharma A.M.* (1999) *Curr. Hypertens. Rep.*, **1**, 127-130.
7. Радзинский В.Е., Смалько П.Я. (2001) Биохимия плацентарной недостаточности, М.: РУДН, 165.
8. Федорова М.В., Краснополянский В.И., Петрухин В.А. (2001) Сахарный диабет, беременность и диабетическая фетопатия, М., Медицина, с. 67-133.
9. *Vijay V., Joshi M.D.* (1994) *Handbook of Placental Pathology*, New York, Tokyo, Igaku-Shoin, 220.
10. Троицкая С.Ю., Федотова Е.А., Щуркина А.В. (2001) Вестник РГМУ, **2**(17), 160-163.

## ЛИПИДЫ ЭРИТРОЦИТОВ И ПЛАЦЕНТЫ У ЖЕНЩИН С ДИАБЕТОМ И ОЖИРЕНИЕМ

11. Федотова Е.А., Троицкая С.Ю., Микаелян Н.П., Князев Ю.А., Потемкин В.В. (2000) Актуальные вопросы эндокринологии, Пермь, с. 67.
12. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley A.G.H. (1957) J. Biol. Chem., **226**, 497-509.
13. Таранова Н.А., Говорова Л.В. (1987) Вопр. мед. химии, №2, 132-136.
14. Финдлей Дж.Б., Эванз У.Г. (1990) Биологические мембраны. Методы, М.: Мир.
15. Прохорова М.И., Тушикова З.Н. (1965) Большой практикум по углеводному и липидному обмену, Л.: Изд-во ЛГУ.
16. Osacawa T., Matsushita S. (1980) Lipids, **15**, 137-140.
17. Гаврилов В.Б., Мешкорудная М.И. (1983) Лаб. дело, №3, 33-35.
18. Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселькин Ю.О., Комаров О.С., Владимиров Ю.А. (1988) Лаб. дело, №5, 59-61.
19. Микаелян Н.П. (1991) Метаболический статус и инсулинсвязывающая активность клеток крови и печени при экстремальных состояниях. Дисс. д.б.н., Москва.
20. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беликов Ю.Н. (2004) Кардиология, **44**(2), 72-81.
21. Максина А.Г. (1996) Структурно-функциональные изменения клеточных мембран при разных вариантах эндокринных нарушений. Дисс. д.б.н., Москва.
22. Друккер Н.А., Бондаренко Т.И., Королева Е.В., Донченко Л.А. (2003) Росс. Вестн. акушера-гинеколога, **3**(2), 55-57.
23. Barss V.A. (1989) Med. Clin. N. Amer., **73**(3), 685-700.
24. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М. (2003) Тер. Архив, №1, 72-77.
25. Semmler K., Emmrich P. (1989) Z. Geburtsh. Perinatol., **193**(3), 124-128.

Поступила: 16. 11. 2009.

## LIPID-PROTEINIC INTERACTION IN ERYTHROCYTIC AND PLACENTAL MEMBRANES IN WOMEN WITH INSULIN RESISTANCE

*N.P. Mikaelyan<sup>1</sup>, A.A. Terentyev<sup>1</sup>, A.G. Maxina<sup>1</sup>, A.V. Mikaelyan<sup>2</sup>, S.V. Novikova<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Russian State Medical University, ul. Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997 Russia;  
e-mail: ninmik@yandex.ru

<sup>2</sup>Moscow Regional Research Institute for Obstetrics and Gynecology, ul. Pokrovka, 22-a, Moscow, 101000 Russia

Disturbances of erythrocyte and placental membrane function have been studied in placenta of pregnant women with obesity and diabetes mellitus type 2. The results of this study demonstrate significant metabolic impairments in women with insulin resistance. Changes in lipid spectrum of erythrocyte membranes and decreased activity of antioxidant enzymes obviously contribute to the development of fetoplacental insufficiency. This changes point to necessity of the antioxidant therapy in pregnant women with obesity and diabetes mellitus type 2.

**Key words:** insulin receptors, glucose utilization, antioxidant enzymes, placental homeostasis, metabolic status.