

УДК 616.42:616.053/2.5+616.379-008.64

©Коллектив авторов

### **АКТИВНОСТЬ NAD(P)-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ С РАЗНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ИНСУЛИНЗАВИСИМОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА.**

*А.А.Савченко, Е.В.Крюкова, В.Т.Манчук*

Институт медицинских проблем Севера СО РАМН  
660022, г.Красноярск, ул.Партизана Железняка, д.3Г.  
Телефон/Факс: (3912)231-963, эл.почта:imprn@scn.ru

Исследовали активность NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у детей и подростков с разной продолжительностью инсулинзависимого сахарного диабета (ИЗСД). Обнаружено, что уровень ряда исследуемых NAD(P)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови у детей и подростков изменяется пропорционально длительности ИЗСД и на фоне инсулинотерапии до нормы не восстанавливаются. Предполагается, что выявленные изменения внутриклеточного метаболизма лимфоцитов крови у детей и подростков, отражающие снижение энергетических и пластических процессов, соответствуют нарушению функциональной реактивности иммунокомпетентных клеток и являются метаболической основой иммунопатогенетических осложнений ИЗСД.

**Ключевые слова:** диабет, лимфоциты, метаболизм, активность NAD(P)-зависимых дегидрогеназ.

**ВВЕДЕНИЕ.** Инсулинзависимый сахарный диабет (ИЗСД) является одним из наиболее распространенных эндокринных заболеваний в детском возрасте с ранним развитием осложнений. Ежегодно число больных увеличивается на 5-7%, а каждые 12-15 лет - удваивается [1,2]. Ситуация осложняется тем, что заместительная терапия не останавливает прогрессирование данного патологического процесса. В связи с этим повышается актуальность углубленного изучения нарушения обмена веществ в динамике развития ИЗСД.

Известно, что одной из причин развития ИЗСД являются аутоиммунные реакции к  $\beta$ -клеткам островков Лангерганса поджелудочной железы [2,3]. Причем, основную роль в реализации данной аутоиммунной реакции играют лимфоциты. Последние, являясь основными эффекторами иммунитета, имеют богатый набор рецепторов, через которые осуществляется регуляция их функциональной активности [4,5]. Разнообразие и выраженная интенсивность метаболических реакций в иммунокомпетентных клетках, четкая зависимость синтетических и энергетических процессов от гормонального статуса организма позволяют использовать лимфоциты периферической крови в качестве объекта исследования нарушения внутриклеточного обмена веществ при ИЗСД.

Целью данного исследования явилось изучение активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови у детей и подростков с разной продолжительностью ИЗСД.

#### ДЕГИДРОГЕНАЗЫ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ДИАБЕТЕ

Выбор в качестве показателей метаболизма лимфоцитов уровней активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ связан с тем, что именно эти ферменты, в значительной степени, обуславливают адаптивные изменения внутриклеточного обмена веществ, определяя интенсивность энергетических и синтетических реакций [6-8].

**МЕТОДИКА.** Обследовано 55 детей и подростков в возрасте от 7 до 17 лет с ИЗСД, находившихся на стационарном лечении в эндокринологических отделениях Краевой детской клинической больницы и Института медицинских проблем Севера СО РАМН (г.Красноярск). Группу контроля составили 84 здоровых детей и подростков в том же возрастном диапазоне. По длительности заболевания детей и подростков с ИЗСД разделили на 3 группы: 1-12 месяцев - 23 детей (начальный диабет), 1-5 лет - 18 детей, с длительностью более 5 лет - 14 детей. Началом заболевания считали время первой инъекции инсулина. В группе начального диабета 3 ребенка (13%) находились в субкомпенсированном состоянии и 20 детей (87%) - в стадии декомпенсации. В группе обследуемых с продолжительностью ИЗСД 1-5 лет 4 человека (22%) находились в стадии субкомпенсации и 14 (78%) - в стадии декомпенсации. Группа больных с продолжительностью заболевания свыше 5 лет состояла из 4 детей и подростков (29%), находящихся в стадии субкомпенсации, и 10 (71%) - в стадии декомпенсации. Уровень глюкозурии у детей с начальным диабетом варьировал от 0 до 180 г/сут. В группе детей и подростков с продолжительностью ИЗСД 1-5 лет уровень глюкозурии составлял от 17 до 123 г/сут, а у длительно болеющих - от 6 до 60 г/сут.

Все дети получали рекомбинантный инсулин человека в дозе от 0,32 до 1,45 Ед/кг по интенсифицированной схеме (3 дозы инсулина короткого действия перед каждым приемом пищи и 2 дозы инсулина продленного действия - утром и вечером). Степень компенсации за последние 3 месяца контролировали по уровню гликированного гемоглобина (от 6,4 до 15,5%) независимо от длительности заболевания. Все дети были осмотрены узкими специалистами для раннего выявления осложнений и сопутствующих заболеваний (окулист, невропатолог, кардиолог, ЛОР-врач, стоматолог, ортопед).

Выделение общей фракции лимфоцитов осуществляли по общепринятому методу в градиенте плотности фиколл-верографина с последующей очисткой от прилипающих клеток [9]. Определение активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах проводили биолюминесцентным методом [10]. Данным методом определяли активность следующих ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), прямой и обратной реакции лактатдегидрогеназы (ЛДГ и Обр.ЛДГ), прямой и обратной реакции малатдегидрогеназы (МДГ и Обр.МДГ), NAD- и NAD(P)-зависимых глутаматдегидрогеназ (NAD(P)-ГДГ и NAD(P)-ГДГ), NAD и NAD(P)-зависимых изоцитратдегидрогеназ (NAD-ИЦДГ и NAD(P)-ИЦДГ) и глутатионредуктазы (ГР). Активность дегидрогеназ выражали в ферментных единицах (1 Ед=1 мкмоль/мин [6] на 10000 клеток).

Достоверность различий оценивали с помощью критерия Манна-Уитни. Степень взаимосвязи между исследуемыми параметрами определяли с помощью метода линейной корреляции. Статистическую обработку осуществляли, используя пакет прикладных программ SPSS 8,0.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Активность NAD- и NAD(P)-зависимых оксидоредуктаз в лимфоцитах крови у детей и подростков с разной продолжительностью ИЗСД представлены на рис.1 и 2. Обнаружено, что уровень активности некоторых исследуемых ферментов изменяется пропорционально длительности заболевания. Так, у детей с ИЗСД в лимфоцитах крови обнаружено снижение активности NAD(P)-ГДГ в зависимости от продолжительности заболевания (рис.2). В лимфоцитах у детей с длительностью заболевания 0-12 месяцев активность данного фермента значительно повышена ( $p<0,001$ ), но с увеличением продолжительности ИЗСД более 5 лет снижается до диапазона здоровых детей. Отрицательная динамика активности данного фермента

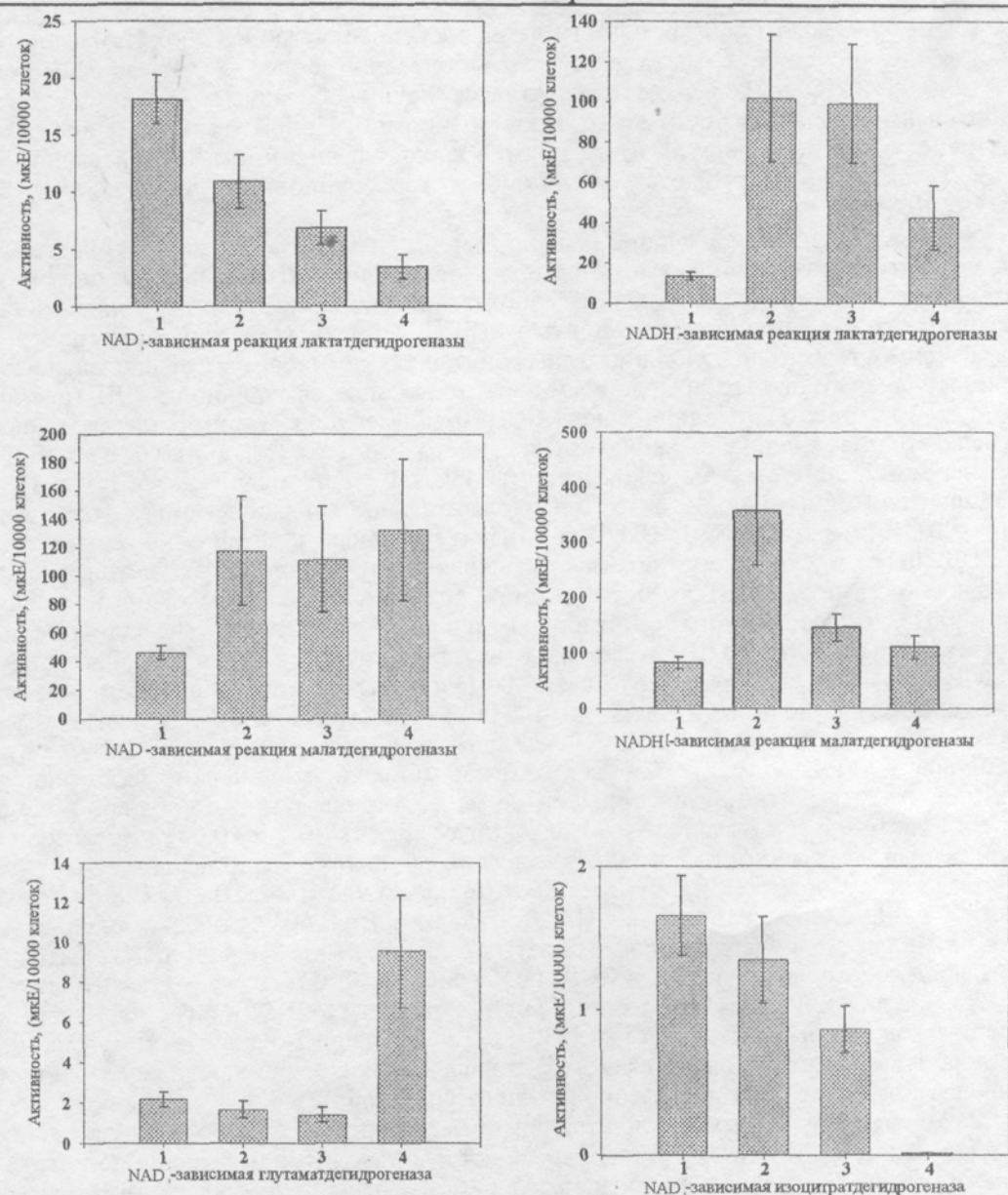


Рисунок 1.

Активность NAD-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови здоровых детей (1) и детей с продолжительностью ИЗСД 1-12 месяцев (2), 1-5 лет (3) и более 5 лет (4).

лимфоцитов крови в зависимости от длительности ИЗСД подтверждается результатами корреляционного анализа ( $r=-0,21$ ,  $p<0,05$ ). Аналогичным образом в зависимости от продолжительности заболевания в лимфоцитах крови изменяется активность Обр.ЛДГ и Обр.МДГ ( $r=-0,19$ ,  $0,1>P>0,05$ , для обоих ферментов). У детей с продолжительностью ИЗСД 0-12 месяцев активность Обр.ЛДГ и Обр.МДГ достоверно повышена относительно уровней выявляемых в лимфоцитах здоровых детей ( $p<0,001$ ), но затем снижается (рис.1). Однако, если активность анаэробной реакции ЛДГ в лимфоцитах крови детей и подростков с продолжительностью заболевания более 5 лет остается повышенной ( $p<0,001$ ), то уровень Обр.МДГ снижается до диапазона нормы. Уровень ГЗФДГ (у здоровых:  $0,81\pm 0,13$  мкЕ), значительно сниженный (до минимального уровня детекции билюминесцентным

#### ДЕГИДРОГЕНАЗЫ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ДИАБЕТЕ

методом -  $0,01 \pm 0,001$  мкЕ;  $p < 0,001$ ) у детей с длительностью ИЗСД 0-12 месяцев и 1-5 лет, у больных с длительностью заболевания более 5 лет повышается ( $0,19 \pm 0,08$  мкЕ;  $p < 0,05$  относительно всех групп обследуемых), но остается достоверно ниже относительно уровня нормы. Положительная динамика активности данного фермента лимфоцитов крови в зависимости от длительности ИЗСД также подтверждается результатами корреляционного анализа:  $r = 0,18$ , ( $0,1 > p > 0,05$ ).

Среднегрупповые значения активности ряда NAD(P)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов также показывают последовательное изменение уровней в зависимости от продолжительности заболевания. Но отсутствие корреляционной взаимосвязи с продолжительностью ИЗСД определяет внутригрупповую независимость активности данных лимфоцитарных дегидрогеназ от длительности патологического процесса. Подобным образом изменяется активность ЛДГ (рис.1). У детей с продолжительностью ИЗСД 0-12 месяцев в лимфоцитах крови выявляется тенденция снижения уровня данного фермента ( $0,1 > p > 0,05$ ). Снижение активности у детей с продолжительностью ИЗСД 1-5 лет продолжается ( $p < 0,01$ ) и становится минимальной у детей с продолжительностью заболевания более 5 лет ( $p < 0,001$ ). Активность NAD-ИЦДГ в лимфоцитах крови у детей с длительностью ИЗСД 0-12 месяцев соответствует выявляемому у здоровых детей, но с увеличением продолжительности диабета снижается до минимального уровня ( $p < 0,001$ ), определяемого с помощью биoluminesцентного метода (рис.1). Активность NAD(P)-ИЦДГ в лимфоцитах крови детей с продолжительностью ИЗСД 0-12 месяцев достоверно выше ( $p < 0,01$ ) и с увеличением продолжительности заболевания продолжает возрастать ( $p < 0,001$ ) (рис.2). Уровень ГР в лимфоцитах детей с продолжительностью ИЗСД 0-12 месяцев достоверно ниже ( $p < 0,01$ ), чем у здоровых детей (рис.2). С увеличением продолжительности заболевания активность фермента повышается, тем не менее, оставаясь ниже уровня нормы в группе детей с длительностью ИЗСД более 5 лет ( $0,1 > p > 0,05$ ). Достоверно сниженная активность Г6ФДГ в лимфоцитах крови больных с продолжительностью ИЗСД 0-12 месяцев ( $p < 0,001$ ) достигает минимума в группе детей с продолжительностью ИЗСД 1-5 лет ( $p < 0,001$ ), но у больных с длительностью заболевания более 5 лет повышается (рис.2). Активность МДГ в лимфоцитах крови больных ИЗСД повышена ( $p < 0,01$ ) во всем исследуемом диапазоне длительности заболевания (рис.1). Уровень NAD-ГДГ в группах детей и подростков с продолжительностью ИЗСД 0-12 месяцев и 1-5 лет статистически не отличается от диапазона, выявляемого у здоровых детей, но при продолжительности заболевания более 5 лет достоверно повышается ( $p < 0,05$ ) (рис.1).

Анализ полученных результатов показывает, что у детей и подростков уже на стадии раннего диабета выражены изменения в метаболизме иммунокомпетентных клеток крови. Так, снижение активности Г6ФДГ (первого и ключевого фермента пентозофосфатного пути), несомненно, может отразиться на многих внутриклеточных пластических процессах [11,12]. В то же время ингибирование самой Г6ФДГ определяется повышением активности при диабете альдозоредуктазного-сорбитолдегидрогеназного пути метаболизма глюкозы [13,14], что, соответственно, приводит к снижению активности начальных реакций гликолиза.

Субстратная недостаточность начальных реакций гликолитического пути и, соответственно, снижение концентрации глюкозо-6-фосфата приводит также к нарушению метаболического контроля гликолиза на уровне фосфофруктокиназы [6,15]. Следовательно, субстратный поток гликолиза возрастает на уровне глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы ГЗФДГ [14,16]. Диабетическая активация сорбитолдегидрогеназы и повышение уровня глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназной реакции могут вызывать повышение концентрации NADH в цитоплазматическом компартменте клеток. По-видимому, именно эти процессы способствуют увеличению активности анаэробной реакции ЛДГ и Обр.МДГ в лимфоцитах детей и подростков с ранним диабетом.

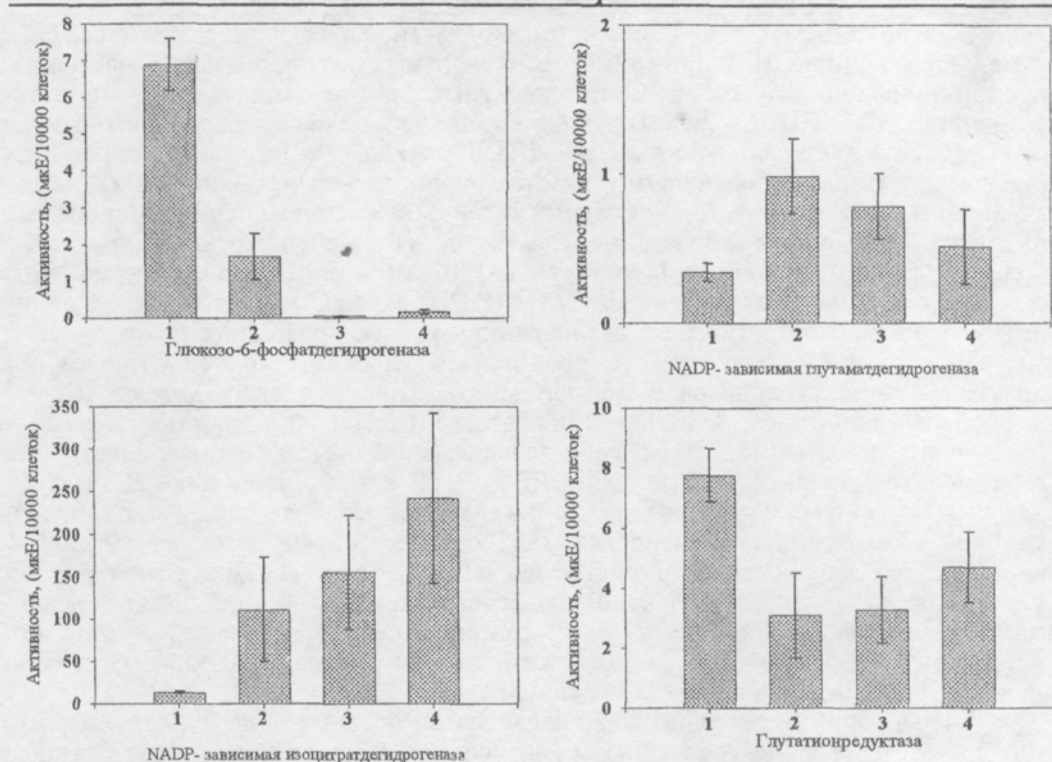


Рисунок 2.

Активность NADP-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах крови здоровых детей (1) и детей с продолжительностью ИЗСД 1-12 месяцев (2), 1-5 лет (3) и более 5 лет (4).

Известно, что активация аэробного гликолиза вызывает повышенный синтез ацетил-КоА с соответствующим стимулированием интенсивности окислительно-восстановительных реакций цикла Кребса. Однако сохранение активности NAD-ИЦДГ в лимфоцитах крови у детей с начальным диабетом на уровне нормы, но повышение уровня МДГ позволяет предположить, что субстратная стимуляция реакций цикла Кребса не привела к равномерному повышению интенсивности ферментативных реакций митохондриального компартмента.

В иммунокомпетентных клетках больных детей с впервые выявленным ИЗСД установлено достоверное повышение активности вспомогательных дегидрогеназных реакций (NAD(P)-ГДГ и NAD(P)-ИЦДГ).

Активность NAD(P)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови у детей и подростков с начальным диабетом отражает состояние внутриклеточного метаболизма при почти полном отсутствии инсулина, так как эту группу составили дети с впервые выявленным ИЗСД. Инсулинотерапия в значительной степени стабилизирует углеводный обмен. Однако полученные нами результаты не позволяют констатировать, что состояние пластических и энергетических процессов иммунокомпетентных клеток у детей с продолжительностью ИЗСД 1-5 лет и более 5 лет соответствует уровню здоровых детей. Прежде всего необходимо отметить дальнейшее снижение активности Г6ФДГ, что определяет понижение наработки интермедиатов для реакций макромолекулярного синтеза. Кроме того, понижение (по сравнению с группой детей с начальным диабетом) активности анаэробной реакции ЛДГ и обратной реакции МДГ в лимфоцитах крови у больных детей пропорционально длительности заболевания позволяет предположить снижение интенсивности терминальных реакций гликолиза. В этом случае повышение уровня ГЗФДГ у детей с продолжительностью ИЗСД более 5 лет можно расценивать как компенсаторную реакцию, целью которой является перенос продуктов липидного катаболизма на окислительно-восстановительные реакции гликолиза.

#### ДЕГИДРОГЕНАЗЫ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ДИАБЕТЕ

С увеличением продолжительности заболевания в лимфоцитах детей с ИЗСД изменяется активность и внутримитохондриальных дегидрогеназ. В частности, пропорционально с увеличением продолжительности заболевания снижается активность NAD-ИЦДГ - лимитирующего фермента цикла трикарбоновых кислот [6,17]. В то же время активность NADP-ИЦДГ повышается, что можно определить как компенсаторную реакцию внутримитохондриального метаболизма. При этом активность МДГ в лимфоцитах больных детей остается повышенной и не зависит от продолжительности заболевания. Только у детей с продолжительностью ИЗСД более 5 лет возрастает активность NAD-ГДГ, что, по-видимому, может быть связано с пониженным уровнем NAD-ИЦДГ и, как следствие, снижением интенсивности субстратного потока на данном участке лимонного цикла.

Необходимо отметить, что среднестатистический уровень глюкозурии практически не различался в обследуемых группах больных детей с разной продолжительностью ИЗСД. При этом только в группе детей с продолжительностью ИЗСД 1-5 лет выявлены взаимосвязи уровня глюкозурии с внутриклеточной активностью Обр.ЛДГ ( $r=0,62$ ,  $p<0,001$ ) и Обр.МДГ ( $r=0,44$ ,  $p<0,05$ ). Можно предположить, что выявленная слабая зависимость между уровнем глюкозурии и активностью метаболических ферментов в лимфоцитах крови у детей и подростков с разной продолжительностью ИЗСД связана с тем, что нарушение углеводного обмена наиболее выражено на стадии декомпенсации заболевания. В то же время, в сформированных группах детей с разной продолжительностью ИЗСД соотношение обследуемых на разных стадиях заболевания было приблизительно равным.

Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что уровень ряда исследуемых NAD(P)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови у детей и подростков изменяется пропорционально длительности ИЗСД. Причем для NADP-ГДГ и ГЗФДГ, анаэробной реакции ЛДГ и обратной реакции МДГ пропорциональная зависимость от продолжительности заболевания подтверждается линейным корреляционным анализом. В целом можно утверждать, что инсулинотерапия не приводит к восстановлению активности метаболических ферментов лимфоцитов до уровня нормы. Так, изменение активности исследуемых NAD- и NADP-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов периферической крови у детей с ранним диабетом позволяет предположить выраженную активацию терминальных реакций гликолиза, увеличение субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот (прежде всего за счет повышения уровней вспомогательных дегидрогеназных реакций), но при снижении активности ключевой реакции пентозофосфатного цикла. С увеличением продолжительности заболевания (на фоне инсулинотерапии) в иммунокомпетентных клетках детей и подростков, прежде всего, необходимо отметить понижение активности NADH-зависимых реакций ЛДГ и МДГ, что отражает снижение уровня субстратного потока на терминальном участке гликолиза. При этом установлено выраженное снижение активности аэробной реакции ЛДГ. Пропорционально увеличению продолжительности ИЗСД в лимфоцитах крови детей и подростков изменяются метаболические реакции и в митохондриальном компартменте. Так, снижение субстратного потока в цикле Кребса на участке NAD-ИЦДГ компенсируется повышением активности NAD-ГДГ и, соответственно, увеличением роли продуктов аминокислотного обмена в энергетических процессах. Не зависимо от продолжительности заболевания в иммунокомпетентных клетках детей и подростков снижается активность Г6ФДГ, что может привести к ингибированию ряда синтетических процессов. Установленные изменения внутриклеточного метаболизма лимфоцитов крови у детей и подростков, отражающие снижение энергетических и пластических процессов, несомненно соответствуют нарушению функциональной реактивности иммунокомпетентных клеток и являются метаболической основой иммунопатогенетических осложнений ИЗСД.

1. Дедов И.И., Сунцов Ю.И., Кудрякова С.В., Рыжкова С.Г. (1998) Пробл. эндокринологии. №2, 47-51.
2. Жук Е.А. (1997) Иммунология. №2, 16-18.
3. Serreze D.V., Fleming S.A., Chapman H.D. et al. (1998) J.Immunol. **161**, 3912-3918.
4. Жумагалиева Г.Д., Скрябина Э.Г., Смирнов В.В. и др. (1997) Пробл. эндокринологии. №1, 9-11.
5. Vorobiev D.V., Vetrova E.G., Larina I.M. et al. (1996) Eur.J.Appl.Physiol. **74**, 534-540.
6. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. (1998) Биологическая химия, М. Медицина.
7. Stangl G.I., Kirchgessner M. (1999) Lipids, **33**, 889-895.
8. Tsukamoto N., Chen J., Yoshida A. (1998) Blood Cells Mol. Dis, **24**, 231-238.
9. Boyum A. (1968) J.Clin.Lab.Invest., **21**, 77-80.
10. Савченко А.А., Сунцова Л.Н. (1989) Лаб.дело., №11, 23-25.
11. Biagiotti E., Bosch K.S., Ninfali P. et al. (2000) J.Histochem.Cytochem., **48**, 971-978.
12. Verle P., Nhan D.H., Tinh T.T. et al. (2000) Trop.Med.Int.Health. **5**, 203-206.
13. Gupta D., Raju J., Prakash J., Baquer N.Z. (1999) Diabetes Res.Clin.Pract., **46**, 1-7.
14. Obrosova I.G., Fathallah L., Lang H.J., Greene D.A. (1999) Diabetologia., **42**, 1187-1194.
15. Markov A.K., Neely W.A., Didlake R.H. et al. (2000) Metabolism., **49**, 698-703.
16. Riddell M.C., Bar-Or O., Hollidge-Horvat M. et al. (2000) J.Appl.Physiol., **88**, 1239-1246.
17. Velot C., Srere P.A. (2000) J.Biol.Chem. **275**, 12926-12933.

Поступила 20.10.00.

# THE ACTIVITY OF NAD(P)-DEPENDENT DEHYDROGENASES IN BLOOD LYMPHOCYTES BY CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH DIFFERENT DURATION OF INSULIN-DEPENDENT DIABETES MELLITUS

A.A.Savchenko, E.V.Krukova, V.T.Manouch

Institute for Medical Problems of the North,  
Siberian Division of Russian Academy of Medical Sciences  
Zheleznjak str., 3-G, Krasnoyarsk, 660022, Russia;  
tel./fax: (3912)-231-963; e-mail: impn@scn.ru

The levels of blood lymphocyte NAD(P)-dependent dehydrogenases were investigated in children and teenagers with different duration of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). The level of some NAD(P)-dependent dehydrogenases changed proportionally in dependence of IDDM duration and insulin therapy did not restore their activities to the normal level. It is suggested that these changes may reflect decrease of energy metabolism and plastic processes in blood lymphocytes from diabetic children and teenagers reflecting. These changes correspond to altered functional reactivity of immunocompetent cells and represent metabolic basis of immunopathogenic complications of IDDM.

**Key words:** diabetes mellitus, lymphocytes, metabolism, activity of NAD(P)-dependent dehydrogenases.