

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 543.544.5.068.7

©Коллектив авторов

ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ЭРИТРОЦИТОВ ДЕТЕЙ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ЗАБОЛЕВАНИЯ ДИАБЕТОМ 1-ГО ТИПА

В.А. Митянина^{1,2,4*}, В.Н. Купцов², С.В. Савельев^{2,3}, В.И. Швеи¹, А.А. Селищева^{2,4}

¹Московская Государственная Академия Тонкой химической технологии
им. М.В. Ломоносова, 119571 Москва, пр-т Вернадского, д. 86;
факс: +7(495)434-87-11; эл. почта: mityanina31@mail.ru

²Автономная некоммерческая организация
“Институт биомедицинских проблем”, Москва

³Институт морфологии человека РАМН, Москва

⁴Биологический факультет Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, Москва

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии сравнили полный профиль молекулярных видов фосфолипидов и церамидов в липидном экстракте эритроцитов детей, не страдающих нарушениями углеводного обмена, и детей, больных диабетом 1-го типа. Впервые установлено статистически значимое увеличение количества лизофосфатидилхолина в двух группах больных детей с разными сроками заболевания (меньше года и больше года) по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Изменения остальных классов липидов были статистически недостоверны. Установлена зависимость содержания молекулярных видов фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов, содержащих остаток арахидоновой кислоты (20:4), от длительности заболевания. Обнаруженный сдвиг в метаболизме липидов свидетельствует об активации фосфолипазы A_2 и хроническом воспалительном процессе на разных стадиях диабета, в который вовлечены клетки (эритроциты), не участвующие в иммунном ответе.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, липидомика, лизофосфатидилхолин, арахидоновая кислота, эритроциты, диабет 1-го типа.

ВВЕДЕНИЕ. Сахарный диабет 1 типа (СД1) обусловлен дефицитом гормона инсулина в организме. В настоящее время развитие диабета связывают с процессом хронического воспаления [1, 2]. Так, у пациентов с СД1 отмечен повышенный уровень провоспалительных маркеров (интерлейкин-8, ФНО- α и др.) и активность ряда ферментов, в первую очередь фосфолипазы A_2 (ФЛАЗА A_2), которая секретируется из клеток [3]. В результате увеличения фосфолипазной

* - адресат для переписки

активности происходит изменение липидного состава мембран клеток и плазмы крови, так как образуются два новых соединения - лизофосфолипид и жирная кислота, которые, как известно, обладают биологической активностью [4].

Определение фосфолипидного состава мембран эритроцитов и плазмы у пациентов, страдающих сахарным диабетом, проводили в основном в группах пациентов с сахарным диабетом 2 типа (СД2) [5]. В случае СД1 в литературе представлены противоречивые результаты о состоянии липидов, что может быть связано как с точностью используемого метода анализа (ТСХ, ГЖХ, ВЭЖХ), так и с эффективностью инсулинотерапии пациентов [6-9]. Анализ методом ТСХ с последующим денситометрическим анализом фосфолипидного состава эритроцитов взрослых, больных СД1, не выявил отличий от контроля, но в этой работе было отмечено появление у диабетиков лизофосфатидилхолина (лФХ) [7]. Достоверное уменьшение количества фосфатидилсерина (ФС) в эритроцитах взрослых пациентов с СД1 было выявлено в исследованиях, проведенных тем же методом [8]. Эти данные не были подтверждены в исследовании [9], где обнаружили достоверное увеличение лФХ, сфингомиелина (СМ), фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилинозитола (ФИ) и ФС в эритроцитах детей, болеющих СД1 в течении 10 лет. В выше цитируемых исследованиях нарушение липидного состава рассматривали как изменения в соотношении общих классов липидов, и лишь небольшая часть работ посвящена изучению содержания отдельных молекулярных видов внутри класса, которые определялись методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ/МС) [10].

Таким образом, цель данной работы заключалась в определении полного профиля молекулярных видов фосфолипидов и церамидов (Цер) и их содержания в эритроцитах здоровых детей и детей, болеющих СД1 менее года и более года. Возможно, что такое исследование позволит найти биохимический липидный маркер ранних стадий болезни.

МЕТОДИКА.

Формирование групп. Для исследования липидного состава эритроцитов были сформированы три группы детей от 3 до 17 лет, проходящих лечение в Российской клинической детской больнице (г. Москва). *Первая группа* (контрольная) состояла из 14 детей, не страдающих нарушением углеводного обмена ($m=7$, $d=7$), *вторая группа* включала 14 детей ($m=7$, $d=7$), болеющих СД1 меньше года, и *третью группу* составили 16 детей ($m=6$, $d=10$), болеющих СД1 больше года. Все родители предоставили информированное согласие на участие в данном исследовании.

Получение грубого липидного экстракта эритроцитов (ГЛЭ). Кровь объемом 2 мл отбирали из локтевой вены в асептических условиях в одинаковое время для всех групп (утром натощак) в стерильную пробирку, содержащую ЭДТА. Эритроциты отделяли от плазмы центрифугированием (10 минут, при 900 g), затем их трижды отмывали в изотоническом растворе NaCl, добавляли 3 мл метанола и 0,2 мл деионизованной воды, согласно незначительно модифицированной методике [11]. Экстракцию проводили при интенсивном перемешивании 15 мин. Далее добавили 3 мл хлороформа и продолжали перемешивание еще 15 мин. Смесь центрифугировали 15 мин при комнатной температуре и 500 g, супернатант отбирали, к осадку добавляли 56 мл смеси хлороформ-метанол 2:1 и ещё раз перемешивали в течение 20 мин. После центрифугирования в тех же условиях, отбирали второй супернатант и объединяли с предыдущим. К объединённому экстракту добавили 0,5 объема 1% NaCl, перемешивали 10 мин, центрифугировали. Нижний хлороформный слой отбирали и упаривали досуха на роторном испарителе. Из 2 мл цельной крови получали $2,0 \pm 0,3$ мг ГЛЭ.

ВЭЖХ/МС анализ. Определение отдельных молекулярных видов липидов проводили методом ВЭЖХ/МС. Перед анализом сухую плёнку ГЛЭ растворяли в 1,5 мл смеси ацетонитрил:2-пропанол (2:3). Разделение производили

на колонке Polaris C18 (“Varian Inc”, США) 2×100 мм. Общий объём наносимого образца ГЛЭ составлял 10 мкл. В качестве элюента применяли линейный градиент растворителей А и Б от 80 до 98% Б за 20 минут, за которым следовал 10-минутный изократический участок с соотношением растворителей 2:98, где А – водный раствор формиата триэтиламмония (0,1% (по объёму) муравьиной кислоты и 0,1% (по объёму) триэтиламина) и Б – смесь ацетонитрил : изопропанол 2:3 (по объёму), содержащая те же количества муравьиной кислоты и триэтиламина, что и А. Расход элюента в течение всего процесса анализа составлял 0,2 мл·мин⁻¹. В качестве детектора был использован квадрупольный масс-спектрометрический анализатор (Varian MS 1200, США), снабженный электроспрейным источником ионов. В качестве осушающего газа в источнике был применён азот с температурой 220°C. Напряжение на источнике составляло -4500 В. Для обнаружения анионных аддуктов осуществляли сканирование диапазона m/z от 500 до 920. Оптимальное время сканирования составляло 0,5 с. В этом режиме проводили запись хроматограммы по полному ионному току. Для интерпретации полученных масс-спектров использовали общедоступную базу данных молекулярных ионов фосфолипидов проекта LIPID MAPS (www.lipidmaps.org), каталог “Avanti Polar Lipids” (США) и собственную базу данных.

В качестве стандартов для ВЭЖХ/МС при идентификации разных классов липидов использовали синтетические препараты производства “Avanti Polar Lipids” 99% чистоты: Цер 17:0/S18; СМ 17:0/S18; лФХ 17:0; фосфатидилхолин (ФХ) 16:0/18:2; ФЭ 16:0/18:1; плазмалоген 1-стеарил-2-олеилфосфатидилэтанолламин (пФЭ) 18:0/18:1; ФС 16:0/18:2. Были получены следующие уравнения калибровочных кривых: $Y=20402x^{0,8536}$ (лФХ), $Y=23080x^{0,8015}$ (ФХ), $Y=36249x^{0,8184}$ (пФЭ), $Y=25807x^{0,8057}$ (ФЭ), $Y=24317x^{0,8136}$ (ФС), $Y=48235x^{0,7733}$ (СМ), $Y=27821x^{0,7549}$ (Цер). В работе использовали органические растворители (изопропанол, метанол, хлороформ, триэтиламин) производства “Merck” (Германия), ацетон и муравьиную кислоту производства “Химмед” (Россия). Деионизованную воду с сопротивлением >18 МОм получали на установке УВОИ-МФ-7, “Медиана-Фильтр” (Россия).

Пример записи молекулярных фракции разных классов липидов. Фосфолипиды (ФЛ) обозначены как: ФЛ N1:M1/N2:M2, где ФЛ – класс фосфолипида, N1, N2 – число атомов углерода в ацильном заместителе в положениях *sn1* и *sn2*, соответственно, M1, M2 – число двойных связей в указанных заместителях. В случае плазмалогенов к обозначению заместителя добавляется буква “п”, при этом наличие двойной связи между положениями 1 и 2 в заместителе не указывается. Сфингомиелины и церамиды обозначены как: СМ X:Y/S18 или DS18 и Цер X:Y/S18 или DS18, где X - число атомов углерода и Y - число двойных связей в ацильном заместителе; S и DS - остаток сфингозина или сфинганина соответственно.

Статистическая обработка результатов. Для статистической обработки результатов использовали программу “Statistica” (версия 8.0). Проверку выборочного распределения на нормальность проводили с помощью теста Шапиро-Уилка. Поскольку параметры не всегда соответствовали критерию нормального распределения, то оценку статистической значимости различий в группах наблюдения проводили с использованием непараметрических критериев Манна-Уитни, Вилкоксона. За уровень статистически значимых принимали изменения при $p<0,05$. Каждое измерение проводилось в двух повторностях. В таблицах приведены средние и стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Клинические характеристики трёх групп детей представлены в таблице 1, из которой следует, что между контрольной группой 1 и группами 2 и 3 наблюдались значимые различия в уровне глюкозы, гликированного гемоглобина и холестерина, в то время как уровень триацилглицеридов (ТАГ) достоверно не отличался. Показатель острой фазы воспаления (скорость оседания эритроцитов - СОЭ) во всех группах детей был также одинаков и находился в пределах нормы ($N=2-12$ мм·час⁻¹).

ЛИПИДЫ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Таблица 1. Клинические характеристики групп пациентов.

Показатель группы	Группа 1 Контроль (n=14)	Группа 2 Диабет < 1 года (n=14)	Группа 3 Диабет >1 года (n=16)
Пол (м:ж)	7:7	7:7	6:10
Возраст (год)	8,57±3,88	7,64±4,86	12,62±1,93
Срок болезни (год)	-	0,4±0,2*	4,2±2,6
Глюкоза (ммМ)	4,64±0,38	11,53±3,93*	12,94±5,39*
HbA _{1c} (%)	5,94±0,34	9,31±2,71*	8,42±1,72*
Холестерин (ммМ)	3,76±0,90	4,74±1,10*	4,87±1,01*
Триглицериды (ммМ)	1,30±0,36	0,97±0,91	1,64±1,22
СОЭ (мм·час ⁻¹)	5,64±2,76	5,71±1,98	5,50±3,52

Примечание: данные представлены в виде средней ± стандартное отклонение; n - число человек; HbA_{1c} - гликозилированный гемоглобин. * - Статистически значимые отличия средних значений от контрольной группы, p<0,05.

Забор крови, приготовление липидного экстракта, определение липидного профиля методом ВЭЖХ/МС с ионизацией электроспреем описаны в разделе “Методы исследования”. Для разделения липидов использовалась хроматографическая система, которая позволяла выявлять одновременно пять классов ФЛ (лФХ, ФХ, ФЭ, ФС и СМ) и метаболиты СМ - церамиды. При сравнении хроматограмм липидных экстрактов эритроцитов здоровых детей и больных СД1 не было выявлено видимых отличий (данные не приводятся). Полный профиль молекулярных ионов в липидных экстрактах эритроцитов здоровых детей и детей, больных СД1 приведен в таблице 2. Качественно он не отличается от профиля молекулярных ионов в эритроцитах взрослых здоровых добровольцев, идентификация которого была проведена ранее [12]. Для количественного определения использовали калибровочные кривые, полученные с помощью стандартов для каждого класса липидов (уравнения калибровочных кривых приведены в разделе “Методика”).

В таблице 2 приведено содержание каждого класса липидов и отдельных молекулярных видов для трех групп пациентов. Обнаружено, что только в случае лФХ наблюдается достоверно значимое изменение его содержания относительно контрольной группы, как при малых сроках заболевания, так и при увеличении срока болезни. Увеличение количества лФХ происходит за счёт трёх молекулярных видов 16:0 (*m/z* 540,3), 18:0 (*m/z* 568,3), 18:1 (*m/z* 564,4). Несмотря на тот факт, что изменения количества всех классов липидов, кроме лФХ, статистически незначимы, наблюдаются достоверные отличия в содержании отдельных молекулярных видов внутри классов липидов. Так, внутри класса ФХ значительно изменяется количество двух молекулярных видов 18:2/18:2 (*m/z* 826,4) и 16:0/20:4 (*m/z* 826,4), причем последний достоверно понижается с увеличением срока заболевания.

Таблица 2. Профиль липидных молекулярных ионов эритроцитов здоровых детей и детей, больных СД1 в мол. %.

Класс и состав липида	m/z [±] [M+45]	Группа 1 Контроль (n=14)	Группа 2 Диабет <1года (n=14)	Группа 3 Диабет >1года (n=16)	p 1/2	p 1/3	p 2/3
лФХ		2,47±0,55	3,19±1,01	3,22±0,84	0,02	0,007	н.з.
16:0	540,3	1,30±0,33	1,85±0,62	1,76±0,51	0,0077	0,0080	н.з.
18:1	564,4	0,10±0,05	0,11±0,07	0,14±0,06	н.з.	0,0371	н.з.
18:0	568,3	1,07±0,24	1,23±0,32	1,32±0,31	н.з.	0,0245	н.з.
ФХ		36,53±2,12	36,65±1,45	36,30±2,26	н.з.	н.з.	н.з.
16:0/18:2	802,5	13,23±1,21	12,31±1,48	13,18±1,69	н.з.	н.з.	н.з.
16:0/18:1	804,5	8,86±1,12	9,08±1,49	8,32±0,82	н.з.	н.з.	н.з.
16:0/18:0	806,6	1,42±0,23	1,43±0,24	1,45±0,17	н.з.	н.з.	н.з.
18:2/18:2	826,4-1	0,37±0,11	0,46±0,14	0,55±0,12	н.з.	0,0002	н.з.
16:0/20:4	826,4-2	2,75±0,55	3,19±0,61	2,65±0,51	н.з.	н.з.	0,0122
18:0/18:2	830,5	5,34±0,59	5,48±0,70	5,71±0,86	н.з.	н.з.	н.з.
18:0/18:1	832,5	3,73±0,42	3,64±0,47	3,47±0,37	н.з.	н.з.	н.з.
16:0/22:6	850,4	0,83±0,35	1,06±0,26	0,97±0,35	н.з.	н.з.	н.з.
нФЭ		14,37±1,31	14,11±0,99	13,62±1,12	н.з.	н.з.	н.з.
16:0/18:1	700,5	0,92±0,11	0,80±0,14	0,88±0,10	0,0175	н.з.	н.з.
16:0/20:4	722,5	2,11±0,37	2,05±0,28	1,98±0,33	н.з.	н.з.	н.з.
18:0/18:1	728,5	1,00±0,16	0,84±0,14	0,89±0,13	0,0098	0,0425	н.з.
18:1/20:4	748,5	4,37±0,28	4,41±0,37	4,23±0,41	н.з.	н.з.	н.з.
16:0/22:4	750,5	4,60±0,56	4,48±0,37	4,37±0,71	н.з.	н.з.	н.з.
20:0/20:4	778,6	1,37±0,22	1,53±0,46	1,27±0,39	н.з.	н.з.	н.з.
ФЭ		12,89±1,23	12,36±1,22	13,09±1,46	н.з.	н.з.	н.з.
16:0/18:2	714,4	1,64±0,26	1,49±0,33	1,91±0,30	н.з.	0,0168	0,0014
16:0/18:1	716,5	5,26±0,74	4,30±0,51	4,91±0,72	0,0005	н.з.	н.з.
18:0/18:2	742,5	2,11±0,83	2,71±1,06	2,42±1,22	н.з.	н.з.	н.з.
18:0/18:1	744,5	1,97±0,22	1,79±0,24	1,81±0,21	н.з.	н.з.	н.з.
18:2/20:4	762,6	0,82±0,40	1,15±0,36	1,01±0,26	0,0347	н.з.	н.з.
16:0/22:4	766,5	1,09±0,30	0,92±0,21	1,03±0,13	н.з.	н.з.	н.з.
ФС		3,63±1,45	4,20±2,35	3,66±1,03	н.з.	н.з.	н.з.
18:0/20:4	810,4	2,41±0,94	3,02±1,74	2,59±0,77	н.з.	н.з.	н.з.
18:0/22:6	834,3	1,22±0,57	1,18±0,66	1,07±0,32	н.з.	н.з.	н.з.

ЛИПИДЫ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Таблица 2. Продолжение.

Класс и состав липида	m/z^* [M+45] ⁻	Группа 1 Контроль (n=14)	Группа 2 Диабет <1года (n=14)	Группа 3 Диабет >1года (n=16)	p 1/2	p 1/3	p 2/3
СМ		24,51±1,51	23,58±1,60	24,02±1,32	н. з.	н. з.	н. з.
14:0/S18	719,5	0,38±0,09	0,50±0,11	0,51±0,13	0,0082	0,0054	н. з.
15:0/S18	733,5	0,30±0,12	0,28±0,06	0,28±0,07	н. з.	н. з.	н. з.
16:1/S18	745,5	0,56±0,08	0,50±0,11	0,63±0,07	н. з.	0,0302	0,0016
16:0/S18	747,5	7,58±0,98	6,51±1,04	6,97±1,49	н. з.	н. з.	н. з.
18:0/S18	775,6	0,85±0,17	0,91±0,23	1,02±0,28	н. з.	н. з.	н. з.
22:0/S18	831,5	2,57±0,52	2,71±0,40	2,57±0,28	н. з.	н. з.	н. з.
24:2/S18	855,4	1,62±0,37	1,50±0,28	1,61±0,28	н. з.	н. з.	н. з.
24:1/S18	857,5-1	3,75±0,48	3,83±0,41	3,66±0,49	н. з.	н. з.	н. з.
24:2/DS18	857,5-2	1,49±0,22	1,42±0,35	1,49±0,22	н. з.	н. з.	н. з.
24:0/S18	859,5	5,41±0,57	5,42±0,85	5,28±0,54	н. з.	н. з.	н. з.
Цер		4,65±0,96	4,80±0,85	4,65±1,17	н. з.	н. з.	н. з.
22:0/S18	666,6	0,66±0,12	0,69±0,20	0,62±0,15	н. з.	н. з.	н. з.
24:2/S18	690,5	0,82±0,19	0,78±0,21	0,88±0,26	н. з.	н. з.	н. з.
24:1/S18	692,5	1,72±0,51	1,94±0,44	1,84±0,54	н. з.	н. з.	н. з.
24:0/S18	694,6	1,45±0,33	1,39±0,24	1,31±0,34	н. з.	н. з.	н. з.

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые изменения в обследованных группах. * - молекулярные ионы ФС, ФЭ и пФЭ не образуют формиатные аддукты [M+45]⁻; н. з. - не значимо. В скобках количество детей в группе.

Увеличение содержания лФХ может происходить в результате активации двух ферментов: ФЛазы_{A₂} и лецитинхолестеринацилтрансферазы. Известно, что при воспалении происходит повышение активности ФЛазы_{A₂}, и что этот фермент обладает специфичностью по отношению к остатку арахидоновой кислоты (АК) во *sn*-2 положении [4, 13]. Поэтому далее было рассчитано содержание молекулярных ионов отдельных классов изучаемых липидов, содержащих остаток арахидоновой кислоты (рисунок). Помимо указанного выше изменения содержания иона ФХ 16:0/20:4 (*m/z* 826,4) в группах 2 и 3 наблюдается схожая динамика для молекулярного иона ФЭ 18:2/20:4 (*m/z* 762,6) и для суммарного содержания всех масс-ионов с АК.

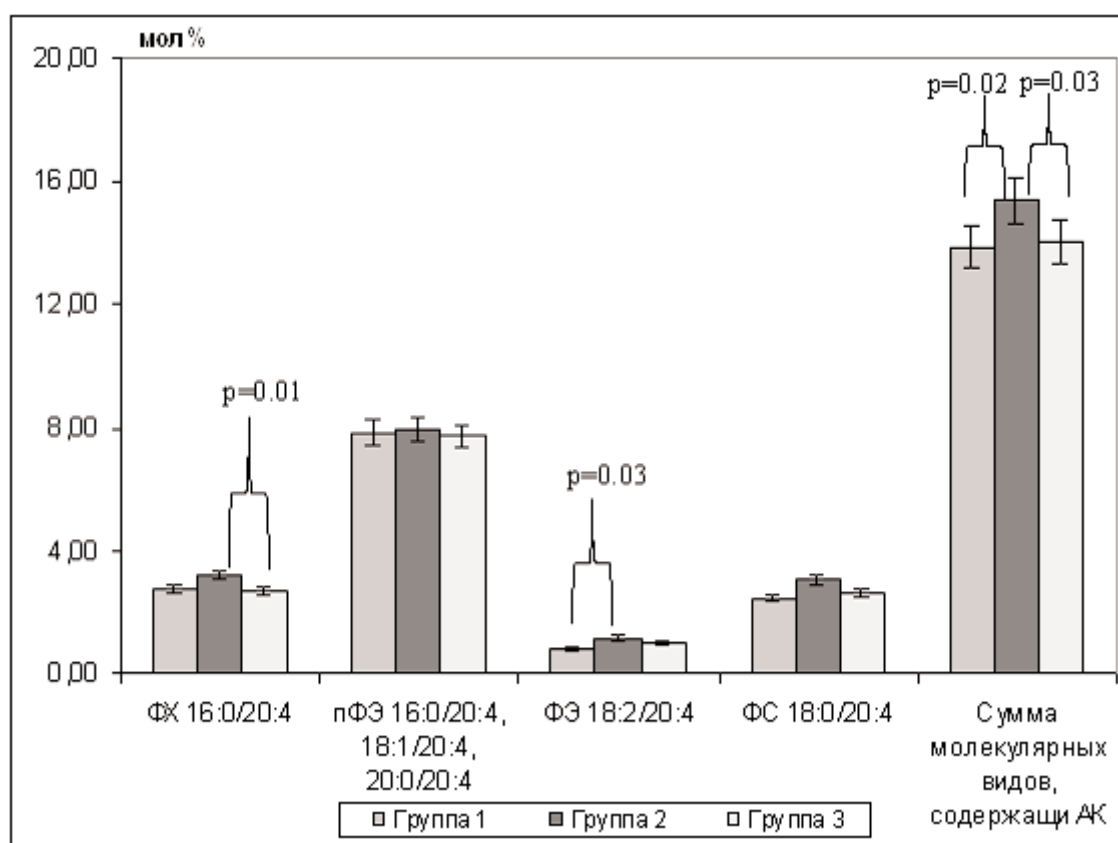


Рисунок.

Изменение количества липидных молекулярных видов, содержащих остаток арахидоновой кислоты (АК) в sn-2 положении в зависимости от срока заболевания СД1. Группа 1 - контрольная, группа 2 - дети, болеющие СД1 меньше года, группа 3 - дети, болеющие СД1 больше года.

ФХ - фосфатидилхолин, пФЭ - плазмалоген фосфатидилэтаноламин, ФЭ - фосфатидилэтаноламин, ФС - фосфатидилсерин.

В настоящее время при констатации нарушения липидного обмена при СД1 и СД2 обычно имеют в виду метаболизм ТАГ и холестерина, так как инсулин контролирует активность некоторых ферментов метаболизма этих соединений [14]. Многие авторы рассматривали дислипидемию как изменение соотношения в классах липидов [15, 16], и лишь немногие работы посвящены изучению липидных изменений на уровне индивидуальных липидных молекулярных видов [10].

В данной работе методом ВЭЖХ/МС с электроспрейной ионизацией исследован липидный состав эритроцитов детей, болеющих СД1, с разными сроками заболевания. Работ, посвященных изучению липидного состава эритроцитов детей, больных СД1, крайне мало и их результаты как правило, не согласуются друг с другом [6-9]. В результате проведенных исследований впервые показан сдвиг в метаболизме отдельного класса липидов, а именно статистически значимое увеличение количества лФХ у больных диабетом по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$) не только при длительном сроке заболевания, что согласуется с литературными данными, но и в самом начале клинического выявления болезни. Следует отметить отсутствие изменений при развитии СД1 в содержании класса церамидов и постоянство их жирнокислотного состава, хотя было показано такие изменения при стрессорных воздействиях на организм человека [17].

Увеличение содержания лФХ в мембране эритроцитов больных СД1 может приводить к нарушению их функциональной активности, т.к. этот биологически активный ФЛ участвует в процессах пролиферации, адгезии и миграции клеток [4]. В случае эритроцитов наибольший по содержанию молекулярный вид лФХ 16:0 (m/z 540,3) может образовываться при действии ФЛазаА₂ на следующие молекулярные виды ФХ: 16:0/18:2 (m/z 802,5), 16:0/18:1 (m/z 804,5), 16:0/18:0 (m/z 806,6), 16:0/20:4 (m/z 826,4), 16:0/22:6 (m/z 850,4), но достоверно изменяется количество только одного молекулярного вида 16:0/20:4 (m/z 826,4) у группы 3 по отношению к группе 2 (рисунок), из которого при воздействии ФЛазыА₂ могут образоваться два липидных медиатора воспаления – лФХ и АК. Нами была проанализирована динамика всех молекулярных видов липидов эритроцитов детей, содержащих АК. Показано, что на разных сроках СД1 вклад в изменение общих молекулярных видов, содержащих АК, вносят молекулярные виды разных классов липидов (рисунок). У детей, болеющих СД1 меньше 1 года, происходит увеличение молекулярных видов, содержащих АК, за счёт увеличения ФЭ 18:2/20:4 (m/z 762,6), а затем при длительном сроке СД1 идёт снижение молекулярных видов, содержащих АК, за счёт уменьшения ФХ 16:0/20:4 (m/z 826,4).

Сопряжённость диабета 1-го типа и воспаления в настоящее время является известным фактом, но, как правило, под этим понимают локальный воспалительный процесс в области поджелудочной железы, в котором участвуют клетки иммунной системы (Т-лимфоциты, макрофаги) [18, 19]. В настоящей работе найдены признаки воспалительного процесса в эритроцитах, которые не относятся к клеткам иммунной системы и через кровоток распределены по всему организму, т.е. хроническое воспаление имеет системный характер. Также полученные данные показывают, что существует липидный профиль, характерный для детей с разным сроком СД1, и что этот профиль может служить для диагностики данного заболевания (табл. 2).

Дальнейшие изучения липидомики пациентов с СД1 должны включать анализ как липидных классов, так и индивидуальных молекулярных видов. Полученные результаты свидетельствуют, что липидный состав эритроцитов детей с СД1 изменяется, что может приводить к известным функциональным нарушениям в эритроцитах [6]. Показано, что эти изменения зависят от длительности болезни, и возможно, их можно использовать в качестве биохимического маркера ранней диагностики СД1.

Работа выполнена в рамках ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” ГК 14.740.11.0120.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wellen K.E., Hotamisligil G.S. (2005) J. Clin. Invest., **115**, 1111-1119.
2. Luca C., Olefsky J.M. (2008) FEBS Letters, **582**, 97-105.
3. Pietropado M., Barines-Mitchell E., Kuller L.H. (2000) Diabetes, **56**, 1189-1197.
4. Meyerzu H., Jakobs K. (2007) Biochim. Biophys. Acta, **1768**, 923-940.
5. Prisco D., Paniccia R., Coppo M., Vanni D. (1989) Thrombosis Research, **54**, 751-758.
6. Watda C., Joiwiak Z. (1990) Clinica Chimica Acta, **188**, 211-220.
7. Freyburger G., Gin H., Heape A., Juguelin H., Boisseau M.R., Cassagne C. (1989) Metabolism, **38**, 673-678.
8. Labrousse S., Freyburger G., Gin H., Boisseau M.R., Cassagne C. (1996) Metabolism, **145**, 57-62.
9. Watda C., Joiwiak Z. (1989) J. Lab. Clin. Med., **113**, 235-240.
10. Orešić M., Simell S., Sysi-Aho M. (2008) J. Exp. Med., **205**, 2975-2984.
11. Bouhours J.-F., Bouhours D. (1984) J. Lipid Res., **25**, 613-619.

12. Корженевский Д.А., Селищева А.А., Савельев С.В. (2010) Биомед. химия, **56**(4), 747-757.
13. Kudo I., Murakami M. (2002) Prostaglandins & other Lipid Mediators, **68–69**, 3–58.
14. Vergés B. (2009) Diabetes Metabolism, **35**, 353–360.
15. Rubba P., Capaldo B., Falanga A. (1985) J. Endocrinol. Invest., **8**, 433–436.
16. Loh K.C., Thai A.C., Lui K.F. (1996) Ann. Acad. Med. Singapore, **25**, 228–232.
17. Lang F., Lang K.S., Lang P.A., Huber S.M., Wieder T. (2006) Antioxid. Redox Signal., **8**, 1183-1192.
18. Rabinovitch A., Suarez-Pinzon W. (1998) Biochem. Pharmacol, **55**, 1139–1149.
19. Erbagci A.B., Tarakcioglu M., Coskun Y., Sivasli E., Namiduru E.S. (2001) Clinical Biochemistry, **34**, 645–650.

Поступила: 01. 11. 2010.

ERYTHROCYTE LIPID COMPOSITION AT DIFFERENT STAGES OF TYPE 1 DIABETES IN CHILDREN

V.A. Mityanina^{1,2,4}, V.N. Kuptzov², S.V. Saveliev^{2,3}, V.I. Shvets¹, A.A. Selishcheva^{2,4}

¹M.V. Lomonosov Moscow State Academy of Fine Chemical Technology, Prospect Vernadskogo, 86, Moscow, 119571 Russia: fax: +7(495)434-87-11; e-mail: mityanina31@mail.ru

²ANO Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia

³Institute of Human Morphology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

⁴School of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Complete profiles of phospholipid and ceramide molecular species from erythrocyte lipid extracts of children without carbohydrate metabolism disorders, and children with type 1 diabetes were compared by means of high performance liquid chromatography/mass spectrometry. For the first time a statistically significant increase ($p < 0.05$) of lysophosphatidylcholine content in two groups of diabetic children with different duration of the disease (less than one year and more than one year) was found. Statistically significant changes in other lipid classes were not observed. The dependence of the content of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine molecular species containing arachidonic acid residue (20:4) on the duration of the disease was found. The observed shift in lipid metabolism suggests of phospholipase A₂ and chronic inflammatory process at different stages of diabetes mellitus, in cells (erythrocytes), which are not involved in the immune response.

Key words: mass spectrometry, lipidomics, lysophosphatidylcholine, arachidonic acid, erythrocytes, type 1 diabetes.