Биомедицинская химия, 2014 том 60, вып. 6, с. 689-694.

УДК 543.544.33
©Коллектив авторов

НЕЭТЕРИФИЦИРОВАННЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЖЕНЩИН, БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1-ГО ТИПА, НА ПОЗДНИХ СРОКАХ БЕРЕМЕННОСТИ

М.А. Шаблинский[1,2]*, А.Ю. Милентьев[1], Н.Ю. Лотош[1], А.А. Селищева[1,2], Б.А. Бадыштов[3], Н.В. Бесова[1], С.В. Савельев[1,4]

[1]Институт биомедицинских проблем, Москва
[2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр.12;
эл. почта: mshablinskiy@pochta.ru
[3]Центральная клиническая больница гражданской авиации, Москва
[4]Институт морфологии человека РАМН, Москва

С использованием газовой хроматографии проведено сравнительное изучение спектра и содержания индивидуальных неэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в сыворотке крови здоровых (ЗБЖ) и больных сахарным диабетом 1-го типа (ДБЖ) пациенток на третьем триместре беременности, а также практически здоровых небеременных женщин (ЗЖ).

В группах беременных женщин выявлена активация липидного метаболизма, что нашло свое отражение как в биохимических показателях жирового обмена, так и в содержании НЭЖК. Межгрупповых различий в составе НЭЖК не обнаружено. Между исследуемыми группами выявлены существенные различия в количественном содержании НЭЖК.

Ключевые слова: сахарный диабет 1-го типа (СД-1), беременность, неэтерифицированные жирные кислоты (НЭЖК), газовая хроматография (ГХ), С-пептид.

ВВЕДЕНИЕ

Характерные для беременности изменения липидного обмена, состоящие в накоплении холестерина и триацилглицеридов в течение первых двух триместров с последующим интенсивным липолизом и увеличением содержания в крови НЭЖК в третьем триместре, сопровождаются развитием резистентности к инсулину [1-5]. НЭЖК оказывают на β-клетки поджелудочной железы действие, направленность которого – стимулирующая либо ингибирующая – зависит от строения НЭЖК, их содержания и времени воздействия при повышенных концентрациях [6]. Учитывая это, можно предположить, что у беременных женщин, больных сахарным диабетом 1-го типа, риск аггравации заболевания и протекания беременности может, в случае непринятия соответствующих мер, оказаться неоправданно высоким. Составляющей комплекса подобных мер должен явиться контроль за изменением профиля НЭЖК и количественного содержания отдельных НЭЖК в крови.

Принимая во внимание сказанное, а также отсутствие в доступной литературе сведений о спектре и концентрации индивидуальных НЭЖК в крови беременных женщин, больных сахарным диабетом, целью данной работы явилось сравнительное изучение профиля и содержания индивидуальных НЭЖК в сыворотке крови здоровых и больных сахарным диабетом 1-го типа беременных пациенток, а также практически здоровых небеременных женщин.

МЕТОДИКА

Формирование групп

В исследовании приняли участие подписавшие добровольное информированное согласие пациентки, наблюдавшиеся в Московском областном научно-исследовательском институте акушерства и гинекологии (МОНИИАГ).

* - адресат для переписки

Группу “ДБЖ” составили 28 беременных женщин, страдающих сахарным диабетом 1-го типа в течение 4-15 лет, группу “ЗБЖ” – 29 беременных пациенток без указанной патологии, в группу “ЗЖ” вошли 33 практически здоровые небеременные женщины. Срок беременности у всех женщин к началу исследования составлял не менее 24 недель. Сформированные группы оказались также однородны по возрасту (табл. 1).

Биохимические исследования

Забор венозной крови производили натощак из локтевой вены. Сыворотку крови отбирали и хранили при -70°С до исследования.

Содержание триацилглицеринов (моль/л), глюкозы (моль/л), общего холестерина (моль/л) и холестерина липопротеинов высокой и низкой плотности (моль/л) в сыворотке крови определяли с использованием биохимического анализатора “KoneLab-30” (“Thermo Scientific”, США) и стандартных наборов реактивов фирмы “BioSystems” (Испания). Концентрацию С-пептида (нг/мл) определяли с использованием автоматического иммуноферментного анализатора “Nexgenfour” (“Adaltis”, Италия) и стандартного набора реактивов “C-peptide AccuBind ELISA Kit” (“Monobind Inc.”, США).

Получение суммарного липидного экстракта (СЛЭ)

Экстракцию липидов из сыворотки крови проводили по Блай-Дайеру [7] в модификации. К 200 мкл сыворотки последовательно добавляли 3 мл метанола, 1,5 мл 0,05% раствора муравьиной кислоты и, после интенсивного перемешивания, 6 мл хлороформа (“Merck”, Германия). После перемешивания и обработки ультразвуком (“Bandelin”, Германия) хлороформную фазу отбирали, а процедуру экстракции повторяли. Объединенные хлороформные фазы упаривали при температуре 30°С на вакуумном роторном испарителе (“Heidolph”, Германия). Суммарный липидный экстракт (СЛЭ) хранили при -20°С.

Выделение фракции НЭЖК из СЛЭ сыворотки крови человека методом твёрдофазной экстракции

Фракцию НЭЖК выделяли из СЛЭ методом твёрдофазной экстракции с использованием картриджей, содержащих 500 мкг аминопропилсиликагельного сорбента BondElut (“VarianInc.”, США). На колонку наносили 50 мкл растворённого в хлороформе СЛЭ. Элюирование производили последовательно смесями хлороформ - изопропанол, (2:1), 9 мл и диэтиловый эфир - уксусная кислота, (98:2), 12 мл, а затем метанолом, 7,5 мл. НЭЖК-содержащую фракцию упаривали при температуре 30°С на вакуумном роторном испарителе и хранили при температуре - 70°С.

Получение метиловых эфиров ЖК

Метиловые эфиры ЖК (МЭЖК) получали по Wu X. с соавт. [8] в модификации. После добавления 2 мл свежеприготовленного метилирующего реагента (15% серная кислота в метаноле) к фракции жирных кислот смесь инкубировали на водяной бане 1 ч при температуре 62°С. Затем охлаждали, добавляли 3 мл гексана и 3 мл раствора K_2CO_3 (0,26 г/мл), и отбирали органическую фазу, а водную фазу повторно экстрагировали 3 мл гексана и 3 мл воды. Объединенные органические фазы упаривали при температуре 30°С на вакуумном роторном испарителе и хранили при -20°С до исследования. Для оценки степени окисления ненасыщенных жирных кислот во время реакции метилирования использовали стандарт арахидоновой кислоты (20:4 n-6). Методом газовой хроматографии (см. ниже) установлено, что полученный метиловый эфир имел время удерживания, совпадающее с таковым индивидуального стандарта, и в анализируемой пробе не содержалось продуктов окисления в виде других метиловых эфиров.

Газохроматографический анализ метиловых эфиров жирных кислот

Анализ МЭЖК проводили на газовом хроматографе “Varian 3900”, США с пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой CP-7420 Select FAME (100 м, 0,25 мм, “Varian”, США). Температуры инжектора и пламенно-ионизационного детектора составляли соответственно 175°С и 275°С. В качестве носителя использовали гелий со скоростью

Таблица 1. Демографические и анамнестические показатели пациенток исследуемых групп.

Группы / Характеристика	ЗЖ ($x_{ср}$± S.D).	ЗБЖ ($x_{ср}$± S.D).	ДБЖ ($x_{ср}$± S.D).
Возраст (лет)	28,4±3,5(n=33)	30,7±5,4 (n=29)	28,7±4,7 (n=28)
Продолжительность гестации (недель)	—	30,9±3,9 (n=29)	27,3±7,7 (n=28)
Продолжительность болезни (лет)	—	—	9,8±5,5(n=28)

Примечание: здесь и в таблице 2 общее время = время при данной температуре + время перехода от одной температуры к другой при указанной скорости изменения температуры.

потока 1 мл/мин. Применяли режим деления потока 1:15 и температурную программу, представленную в таблице 2. Экстракт МЭЖК растворяли в 60 мкл гексана.

Идентификация и количественное определение МЭЖК

Для идентификации отдельных метиловых эфиров в исследуемых образцах использовали стандарт "37 Component FAME mix" ("Supelco", США), содержащий 37 метиловых эфиров жирных кислот.

Для количественного определения НЭЖК в липидном экстракте были построены калибровочные кривые для каждого компонента указанного стандарта в интервале концентраций от 400 до 0,1 мкмоль/л. Корректировку полученных значений проводили с использованием метилового эфира гептадекановой кислоты (17:0) ("Supelco") в качестве внутреннего стандарта. Анализ каждого образца проводили не менее, чем в двух повторностях (стандартная ошибка метода составила менее 2%).

Статистический анализ

Для статистической обработки результатов использовали программу "Statistica" (версия 8.0). Оценку статистической значимости различий в группах наблюдения проводили с использованием критерия Стьюдента. За уровень достоверно значимых принимали различия при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из анализа биохимических показателей (табл. 3) следует, что значения всех показателей липидного обмена в обеих группах беременных пациенток достоверно повышены по сравнению с зарегистрированными в группе практически здоровых небеременных женщин, что находится в соответствии с данными других авторов [9, 10].

Усреднённый по группе ДБЖ уровень глюкозы, находясь в нормальных пределах, оказался, тем не менее, достоверно выше, чем зарегистрированный в других группах (табл. 3). Это обусловлено тем, что у 18% больных сахарным диабетом пациенток, несмотря на проводимую инсулинотерапию, обнаружено содержание глюкозы в крови, превышающее верхнюю границу нормы.

В условиях экзогенно поступающего инсулина (группа ДБЖ) оценить секреторную функцию поджелудочной железы прямым измерением количества гормона в крови не представляется возможным. Поэтому в данной работе определяли содержание С-пептида, продуцируемого с инсулином в эквимолярных количествах. Было установлено, что содержание С-пептида в крови здоровых беременных женщин оказалось почти в два раза выше, чем выявленное у небеременных. Нельзя исключить, что отмечаемая другими авторами инсулинорезистентность, развивающаяся в третьем триместре, обуславливает необходимость большей продукции гормона для поддержания уровня глюкозы в нормальных пределах. Напротив, у пациенток, составивших группу беременных диабетиков, содержание С-пептида оказалось более чем в 4 и 2 раза меньшим по сравнению, соответственно, со здоровыми беременными и небеременными женщинами (табл. 3). Необходимо при этом отметить, что у значительного (82%) числа пациенток, страдающих диабетом, уровень С-пептида оказался ниже предела обнаружения используемым методом. Поэтому представленное значение рассчитано для образцов сывороток, в которых уровень С-пептида был в пределах чувствительности метода. Приведённые данные можно, вероятно, трактовать, как свидетельствующие о существенном повреждении островкового аппарата поджелудочной железы.

Из привёденной на рисунке типичной хроматограммы метиловых эфиров ЖК следует, что основными в крови пациенток всех групп являются пальмитиновая, стеариновая, олеиновая и линолевая кислоты. Высокая чувствительность используемого метода позволила, кроме того, выявить более двадцати минорных кислот, также присутствующих в крови всех обследованных лиц (табл. 4, рисунок). В целом это свидетельствует об отсутствии различий качественном составе НЭЖК у женщин, составивших исследуемые группы. Сходные профили НЭЖК в крови человека были ранее установлены и другими авторами [11-14].

Таблица 2. Температурная программа.

Скорость (°С/мин)	Шаг (°С)	Время при данной температуре (мин)	Общее время (мин)
	100	5	5
8,8	180	0	14,09
0,9	184	5	23,54
1,5	220	6	53,54
12	240	5	60,02

Таблица 3. Биохимические показатели сыворотки крови пациенток.

Параметр	Нормальные границы	ЗЖ ($x_{ср}$± S.D).	ЗБЖ ($x_{ср}$± S.D).	ДБЖ ($x_{ср}$± S.D).
Триацилглицерины	0,6-1,2	0,6±0,3 (n=33)	2,2±0,9(а) (n=19)	1,9±1,1(а) (n=22)
Общий холестерин	3,4-5,4	4,2±0,7 (n=33)	6,6±1,1(а) (n=19)	5,8±1,5(а) (n=22)
ЛНП холестерин	2,2-3,2	2,1±0,5 (n=26)	3,9±0,8(а) (n=19)	3,0±1,0(а,б) (n=14)
ЛВП холестерин	1,2-2,2	1,7±0,3 (n=26)	2,4±0,7(а) (n=19)	2,5±0,9(а) (n=14)
Глюкоза	3,9-6,0	3,9±0,4 (n=33)	3,6±0,8 (n=19)	5,6±2,6(а,б) (n=22)
С-пептид	0,7-1,9	1,32±0,52 (n=33)	2,83±2,21(а) (n=29)	0,36±0,16(а,б) (n=28)

Примечание: (а) - $p<0,05$ по сравнению с ЗЖ; (б) - $p<0,05$ по сравнению с ЗБЖ; остальные обозначения как в таблице 1.

Таблица 4. Концентрации различных НЭЖК (мкмоль/л) в сыворотке крови пациенток исследуемых групп (xср± S.D).

Параметр / **Кислота**	**ЗЖ** (n=33)	**ЗБЖ** (n=29)	**ДБЖ** (n=28)
Насыщенные жирные кислоты (НЖК)			
1. Миристиновая (C14:0)	16,71±4,11	16,66±3,52	16,94±4,24
2. Пальмитиновая (C16:0)	116,10±16,73	139,21±22,30(а)	133,13±24,65
3. Стеариновая (C18:0)	95,08±25,05	150,66±26,62(а)	121,09±18,57(б)
4. Арахиновая (C20:0)	1,24±0,78	2,30±1,42(а)	2,02±1,18
5. Бегеновая (C22:0)	1,29±1,23	1,53±0,67	1,43±0,85
6. Лигноцериновая (C24:0)	0,68±0,48	0,94±0,68	1,34±0,93
Сумма НЖК	**229,80±49,70**	**310,18±67,43(а)**	**276,00±59,19**
Мононенасыщенные жирные кислоты (МННЖК)			
7. Пальмитолеиновая (C 16:1 n-7 cis)	19,47±6,22	8,97±2,19(а)	8,37±3,08(а)
8. Олеиновая (C 18:1 n-9 cis)	91,13±23,06	136,14±33,59(а)	125,04±31,39
9. Элаидиновая (C 18:1 n-9 trans)	4,29±1,82	3,45±2,38	4,28±2,09
10. Цис-11-эйкозеновая (C 20:1 n-9)	1,17±0,81	2,02±1,21	1,29±0,73
11. Нервоновая (C 24:1 n-9)	2,27±1,00	8,81±2,87(а)	8,86±2,05(а)
СуммаМННЖК	**117,44±32,91**	**159,22±54,41(а)**	**147,46±49,94**
Полиненасыщенные жирные кислоты (ПННЖК)			
12. Линолевая (C 18:2 n-6 cis)	81,11±34,32	103,22±27,12	111,38±20,03
13. α-линоленовая (C 18:3 n-3)	0,92±0,42	2,10±0,85	1,66±0,86
14. Эйкозадиеновая (C 20:2)	2,84±1,92	3,91±1,89(а)	2,58±1,77(б)
15. Эйкозатриеновая (C 20:3 n-3)	1,67±1,33	2,32±2,63	2,43±1,55
16. Дигомо-γ-линоленовая (C 20:3 n-6)	0,66±0,45	1,15±1,37	1,99±1,24(а)
17. Арахидоновая (C 20:4 n-6)	7,11±2,48	3,11±1,98(а)	6,89±2,69(б)
18. Эйкозапентаеновая (C 20:5 n-3)	2,33±1,17	1,67±1,36(а)	1,91±0,92
19. Докозадиеновая (C 22:2)	0,89±0,83	1,27±1,36	1,46±1,10
20. Докозагексаеновая (C 22:6 n-3)	3,18±1,97	2,44±2,69	2,35±1,85(а)
Сумма ПННЖК	**99,65±27,09**	**120,41±32,87**	**132,64±34,91**
Сумма (МННЖК + ПННЖК)	**217,09±60,00**	**279,63±87,28(а)**	**280,09±84,85(а)**
Сумма (НЖК+МННЖК+ПННЖК)	**446,90±119,19**	**589,80±136,60(а)**	**556,10±121,45(а)**

Примечание: все обозначения как в таблице 1.

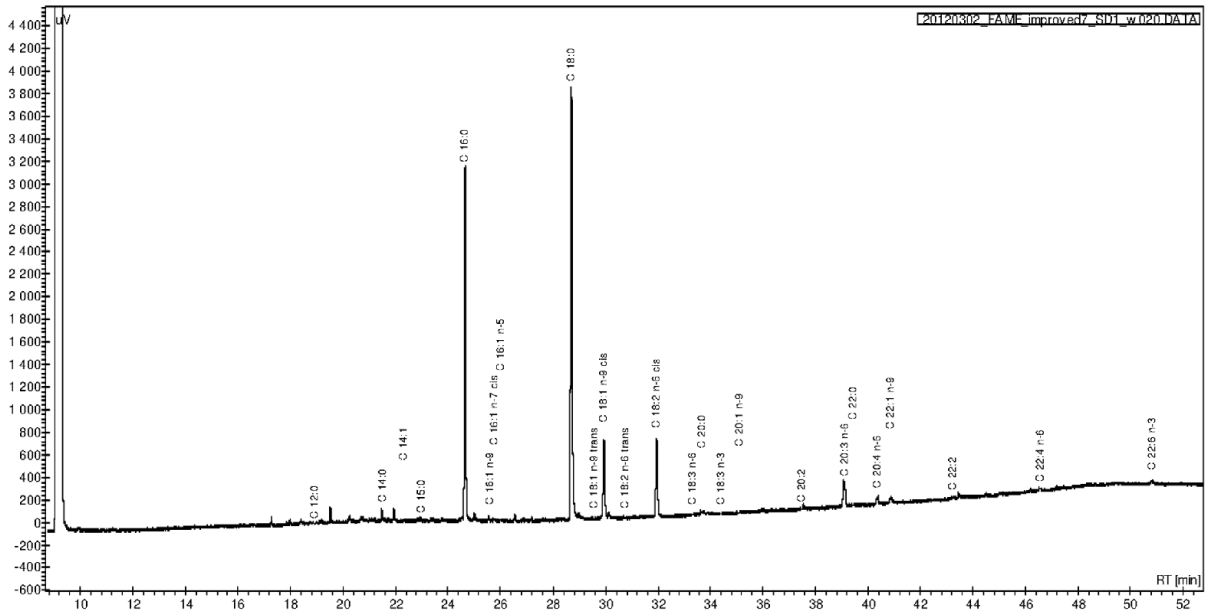

Рисунок. Типичная хроматограмма метиловых эфиров ЖК сыворотки крови.
$x_{ср}$ - среднее значение; S.D - среднее квадратическое отклонение; n - число наблюдений.

В отличие от этого, в количественном содержании индивидуальных НЭЖК между исследуемыми группами выявлены существенные различия. Так, при сравнении со здоровыми небеременными женщинами в группе ЗБЖ выявлено статистически значимое увеличение пальмитиновой, стеариновой, арахиновой, олеиновой, нервоновой, эйкозодиеновой жирных кислот и, напротив, достоверное снижение только пальмитолеиновой, арахидоновой и эйкозопентаеновой кислот (табл. 4). Неудивительно поэтому, что и суммарные значения содержания в крови в отдельности насыщенных, мононенасыщенных, ненасыщенных жирных кислот и в итоговом выражении (сумма (НЖК+МННЖК+ПННЖК) достоверно превышали аналогичные величины в группе сравнения (табл. 4).

Что касается группы ДБЖ, то значимое по сравнению с группой ЗЖ повышение выявлено в этом случае только в отношении нервоновой, эйкозатриеновой и докозагексаеновой НЭЖК и снижение – пальмитолеиновой кислоты. Важно, однако, заметить, что направленность изменений содержания всех изученных, за исключением эйкозадиеновой и арахидоновой жирных кислот, в этой группе, не достигая уровня статистической значимости, была такой же как и в группе ЗБЖ (табл. 4). Сказанное относится и к суммарным значениям насыщенных, мононенасыщенных, полиненасыщенных НЭЖК. Более того, суммарная величина ненасыщенных жирных кислот и итоговое значение, также как и в группе ЗБЖ, статистически значимо отличались от зарегистрированных в группе здоровых небеременных женщин. Сравнение групп беременных женщин позволило выявить только большее содержание в крови ЗБЖ стеариновой и эйкозодиеновой кислот и меньшее – арахидоновой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В ходе проведённых биохимического и газохроматографического исследований выявлена разной степени интенсификация липидного метаболизма в группах беременных женщин. Это нашло свое отражение как в интегральных показателях жирового обмена (табл. 3), так и в увеличении концентрации НЭЖК в периферической крови (табл. 4). Учитывая, с одной стороны, роль НЭЖК в энергетическом и пластическом обеспечении плода, эмульгации триацилглицеринов, которые являются одними из основных компонентов материнского молока, а с другой, соответствие полученных в настоящей работе данных имеющимся в литературе [3, 15], следует полагать, что выявленные изменения липидного обмена в крови беременных женщин целесообразны и связаны с адаптацией организма женщины к данному состоянию [16, 17]. В настоящей работе установлено, что уровень С-пептида, а следовательно, и инсулина, в крови здоровых беременных пациенток оказался более, чем в два раза

выше зарегистрированного у небеременных женщин. Не исключено поэтому, что одним из механизмов, реализующих отмеченное изменение жирового метаболизма, в частности, увеличение содержания НЭЖК, является осуществление через активацию липазы липопротеинов низкой плотности липолитического эффекта инсулина, находящегося в крови здоровых беременных женщин в повышенных, вследствие развивающейся инсулинорезистентности, концентрациях [15].

Таким образом, результаты настоящей работы указывают, что в дополнение к тому комплексу обследований, которому подвергаются женщины в период гестации, целесообразным для своевременного принятия корректирующих мер является регулярное исследование спектра и содержания индивидуальных НЭЖК в крови. Это представляется особенно актуальным для беременных женщин, больных сахарным диабетом.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Sivan E., Boden G.* (2003) Curr. Diab. Rep., **3**(4), 319-322.
2. *Sivan E., Homko C.J., Whittaker P.G., Reece E.A., Chen X., Boden G.* (1998) J. Clin. Endocrinol. Metab., **83**(7), 2338-2342.
3. *Chen X., Scholl T.O.* (2008) Obstet. Gynecol., **112**(2 Pt 1), 297-303.
4. *Dobbins R.L., Chester M.W., Stevenson B.E., Daniels M.B., Stein D.T., McGarry J.D.* (1998) J. Clin. Invest., **101**(11), 2370-2376.
5. *Herrera E.* (2002) Endocrine, **19**(1), 43-55.
6. *Itoh Y., Kawamata Y., Harada M., Kobayashi M., Fujii R., Fukusumi S., Ogi K., Hosoya M., et al.* (2003) Nature, **422**(6928), 173-176.
7. *Bligh E.G, Dyer W.J.* (1959) Can. J. Biochem. Physiol., **37**(8), 911-917.
8. *Wu X., Tong Y., Shankar K., Baumgardner J.N., Kang J., Badeaux J., Badger T.M., Ronis M.J.* (2011) J. Agric. Food Chem., **59**(2), 747-754.
9. *Gobl C.S., Handisurya A., Klein K., Bozkurt L., Luger A., Bancher-Todesca D., Kautzky-Willer A.* (2010) Diabetes Care, **33**(9), 2071-2073.
10. *Herrera E., Gomez-Coronado D., Lasuncion M.A.* (1987) Biol. Neonate, **51**(2), 70-77.
11. *Decsi T., Campoy C., Demmelmair H., Szabo E., Marosvolgyi T., Escolano M., Marchal G., Krauss-Etschmann S., Cruz M., Koletzko B.* (2011) Ann. Nutr. Metab., **59**(2-4), 107-116.
12. *Decsi T., Szabo E., Kozari A., Erhardt E., Marosvolgyi T., Soltesz G.* (2005) Acta. Paediatr., **94**(7), 850-855.
13. *Szabo E., Marosvolgyi T., Kozari A., Erhardt E., Soltesz G., Decsi T.* (2009) Pediatr. Diabetes, **10**(3), 209-212.
14. *Polette A., Durand P., Floccard B., Blache D.* (1992) Anal. Biochem., **206**(2), 241-245.
15. *Xiang A.H., Peters R.K., Trigo E., Kjos S.L., Lee W.P., Buchanan T.A.* (1999) Diabetes, **48**(4), 848-854.
16. *Ryan E.A., Enns L.* (1988) J. Clin. Endocrinol. Metab., **67**(2), 341-347.
17. *Brunzell J.D., Schwartz R.S., Eckel R.H., Goldberg A.P.* (1981) Int. J. Obes., **5**(6), 685-694.

Поступила: 31. 07. 2013.

NON-ESTERIFIED FATTY ACIDS OF BLOOD SERUM IN TYPE 1 DIABETIC WOMEN DURING LATE PREGNANCY

M.A. Shablinskiy[1,2], A.Yu. Milentyev[1], N.Yu. Lotosh[1], A.A. Selischeva[1,2], B.A. Badyshtov[3], N.V. Besova[1], S.V. Saveliev[1,4]

[1]Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia
[2]Lomonosov Moscow State University, Department of Biology,
1, bld. 12, Leninskie Gory, Moscow, 119991 Russia; e-mail: mshablinskiy@pochta.ru
[3]Central Clinical Hospital of Civil Aviation, Moscow, Russia
[4]Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

Using gas chromatography a comparative study of the range and content of individual non-esterified fatty acids in serum of patients with diabetes mellitus type 1 in the third trimester of pregnancy, and healthy pregnant and non-pregnant women has been carried out.

In groups of pregnant women there was activation of lipid metabolism, confirmed by corresponding changesinserum biochemical parameters, as well as in the content of non-esterified fatty acids. Intergroup differences in the non-esterified fatty acids were not found. However, there were significant differences between the examined groups in the quantitative content of non-esterified fatty acids.

Key words: diabetes type 1(DT1), pregnancy, non-esterified fatty acid (NEFA), gas chromatography (GC), C-peptide.