

В.Е. Маркевич, Н.В. Глущенко

ОСОБЛИВОСТІ ЕНЕРГЕТИЧНОГО ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ

ДІТЕЙ ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ 1 ТИПУ

Сумський державний університет, медичний інститут, м. Суми

ВСТУП

У разі цукрового діабету 1 типу (ЦД-1) у дитячому віці тривалість життя хворих залишається нижче середньопопуляційної. Основними причинами смерті є серцево-судинні ускладнення (міокардіодистрофія, кардіальна автономна нейропатія) [1] та ускладнення з боку нирок (діабетична нефропатія) [2]. Зміни, що відбуваються в кардіоміоцитах зумовлені енергетичним дефіцитом внаслідок метаболічних порушень та активації перекисного окислення ліпідів [1]. Адекватним відображенням дизметаболічних процесів та стану енергетичного обміну клітин є активність ферментів аеробного та анаеробного гліколізу, зокрема сукцинатдегідрогенази лімфоцитів [3, 4, 5] та лактатдегідрогенази сироватки крові [6].

Сукцинатдегідрогеназа (СДГ) – належить до, так названої, сукцинатоксидазної системи ферментів. СДГ приймає участь у циклі лимонної кислоти (цикл Кребса, цикл трикарбонових кислот), є одним із ключових ферментів кінцевого метаболічного шляху окисного руйнування вуглеводів, жирів та білків. Даний ензим міцно зв'язаний із внутрішньою мембраною мітохондрій і його функція не залежить від системи НАД/НАДН⁺, що дозволяє зберегти енергосинтезуючу активність мітохондрій в умовах гіпоксії. Активність СДГ відображає енергетичний потенціал клітин, функціональний стан та кількість активних мітохондрій [6].

Лактатдегідрогеназа (ЛДГ, К.Ф.1.1.1.27) – цитозольний цинквмісний фермент анаеробного гліколізу, каталізує зворотню реакцію окислення L-лактату в піруват [7].

Визначення активності вказаних ферментів дозволить вивчити особливості енергетичного забезпечення у дітей хворих на ЦД-1 та провести подальшу корекцію метаболічних порушень.

МЕТА РОБОТИ

За показниками активності ферментів крові аеробного та анаеробного гліколізу дослідити стан енергетичного забезпечення дітей хворих на ЦД-1 залежно від рівня глікемічного контролю та тривалості хвороби.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Під спостереженням знаходилось 70 дітей хворих на ЦД-1. Стан компенсації ЦД-1 оцінювався згідно ISPAD (Consensus for the Management of Type 1 Diabetes Mellitus in Children and Adolescents 2000). Оптимальний рівень глікемічного контролю (ГК) мали 10 дітей (група I), субоптимальний – 30 (група II), рівень ГК із високим ризиком для життя (ГКВР) – 30 хворих (група III). Групу порівняння склали 30 практично здорових дітей.

Стан аеробного гліколізу оцінювали за активністю СДГ у лімфоцитах периферичної крові, яку визначали кількісним цитохімічним методом Пірса (1957) в модифікації Р.П. Нарцисова (1969) із використанням нітросинього тетразолію фірми “SIGMA-ALDRICH” (Швейцарія) [8]. Матеріалом для дослідження була периферійна кров, яку забирали з пальця вранці з 8.00 до 9.00 годин ранку натщесерце та відразу готували нативні мазки. Метод оснований на властивості пара-нітротетразолію фіолетового утворювати у місцях локалізації СДГ нерозчинні у воді гранули формазану. Підрахунок гранул формазану здійснювали у 50 лімфоцитах під мікроскопом “Біолам Р-15”, окуляр 10x40. Підраховували загальну кількість гранул у клітині, загальну кількість лімфоцитів із гранулами формазану, а також визначали показник співвідношення загальної кількості гранул до загальної кількості клітин із гранулами формазану (гранул/клітину).

Стан анаеробного гліколізу визначався за активністю ЛДГ у сироватці крові, котру досліджували кінетичним методом за допомогою наборів реактивів фірми “Ольвекс Діагностікум” (Росія) на напівавтоматичному фотометрі МІКРОЛАВ 300 (США). Дослідження проводилось при довжині хвилі 340 нм. та температурі 37°C.

Статистична обробка результатів досліджень здійснювалася за допомогою програми Excel. Використовувалися методи варіаційної статистики, придатні для медико-біологічних досліджень [9]. Для всіх показників визначали середньоарифметичне (M), похибку середньоарифметичного (m). Показник достовірності (P) визначали за допомогою критерію Ст'юдента (t). Показники парної кореляції використовували для оцінки характеру та ступеня взаємозв'язку між різними параметрами.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що загальна кількість клітин з гранулами, що відображає активність СДГ, знижувалась навіть у дітей із оптимальним рівнем ГК та була на 19% меншою відносно групи порівняння (табл. 1). Проте, у хворих інших груп вона не відрізнялась від показників здорових дітей, що можна розцінювати як компенсаторно-приспосувальну реакцію організму.

Загальна кількість гранул у пацієнтів із ЦД-1 незалежно від показників рівня глікемічного контролю була майже на 36% нижчою відносно групи порівняння (табл. 1).

Найбільш важливим показником активності СДГ та стану аеробного гліколізу, є показник співвідношення загальної кількості гранул до загальної кількості клітин із гранулами формагану [10]. Встановлено, що у разі оптимального рівня ГК мало місце зниження даного показника на 13% відносно здорових дітей (табл. 1). Він був ще меншим у випадку субоптимального рівня ГК та ГКВР (на 32% нижчим відносно групи порівняння). Відомо, що із підвищенням фракції глікованого гемоглобіну (HbA1c) погіршується дисоціація оксигемоглобіну, що призводить до значної тканинної гіпоксії

[11]. Підтвердженням даного твердження є знайдена нами зворотня кореляція середньої сили між рівнем HbA1c та показником гранул/клітину у дітей всіх груп ($r = -0,411$, $p < 0,01$).

Зниження загальної кількості клітин із гранулами у випадку оптимального рівня ГК свідчить про ранній розвиток метаболічних порушень. Але, із підвищенням рівня глікемії відбувається напруження компенсаторних реакцій у вигляді збільшення загальної чисельності клітин до показників здорових дітей, що може призвести до швидкого виснаження їх функціональної активності. Звертає увагу той факт, що такі показники як загальна кількість гранул та гранул/клітину, виявилися зниженими у всіх хворих на ЦД-1. Отже, зменшення активності СДГ відбувається ще на початкових етапах розвитку діабету, котре зберігається у міру погіршення рівня глікемічного контролю. Встановлені порушення аеробного гліколізу можуть призводити до тривалої та стійкої тканинної гіпоксії, що може бути одним із факторів розвитку хронічних діабетичних ускладнень.

Таблиця 1

**Морфометричні показники активності СДГ лімфоцитів
дітей хворих на ЦД-1 залежно від рівня глікемічного контролю**

Показник	Група порівняння n=30	I група n=10	II група n=30	III група n=30
Загальна кількість клітин із гранулами	36,8±3,214	29,75±2,954	36,39±1,273	36,29±1,577
Загальна кількість гранул	494,3±19,704	312,67±22,578 P	319,47±23,384 P	318,24±22,369 P
Гранул/клітину	12,54±0,658	10,93±1,659	8,55±0,499 P	8,55±0,478 P

Примітка:

P – достовірність показників відносно групи порівняння ($P < 0,001$).

Аналіз активності СДГ у хворих на ЦД-1 залежно від тривалості хвороби встановив, що із збільшенням терміну захворювання, знижуються показники, котрі характеризують активність СДГ (табл. 2). Так, загальна кількість гранул мала тенденцію до зменшення. У дітей із вперше виявленим ЦД-1 вона була на 28%, а у хворих із тривалістю хвороби від 1 до 5 років на 31% нижчою відносно групи порівняння. Найбільше зниження кількості гранул формагану встановили у випадку тривалого (5 років і більше) перебігу діабету. У даної категорії пацієнтів їх було на 39% менше ніж у здорових. Проте, загальна кількість клітин із гранулами не мала залежності від тривалості ЦД-1 та практично не відрізнялась від групи порівняння, що свідчить про зниження функціональної активності лімфоцитів.

Показник співвідношення гранул/клітину зменшувався вже на початку хвороби (рис. 1). Так, у разі вперше виявленого ЦД-1 він був на 24,2% нижчим порівняно зі здоровими. У випадку тривалості діабету від 1 до 5 років він був уже на 30% меншим відносно групи порівняння. У дітей із перебігом хвороби понад 5 років мало місце значне зниження показника гранул/клітину, котрий був достовірно на 38% нижчим порівняно зі здоровими дітьми.

Таблиця 2

**Морфометричні показники активності СДГ лімфоцитів дітей
хворих на ЦД-1 залежно від тривалості хвороби**

Показник	Група порівняння n=30	Вперше виявлений n=17	Тривалість від 1-5 років n=28	Тривалість 5 і більше років n=25
Загальна кількість гранул	463,92±23,696	334,2±25,49 P	320,93±21,237 P	283,3±21,285 P
Загальна кількість клітин із гранулами	37±2,657	36,7±1,557	35,77±1,453	35,3±2,53

Примітка:

P – достовірність показників відносно групи порівняння (P<0,001).

Таким чином, дебют ЦД-1 супроводжується порушенням енергетичного забезпечення, котре підтверджується зниженням активності СДГ. Причому, встановлені зміни зберігаються протягом усього перебігу хвороби. Відомо, що ферментний статус лімфоцитів аналогічний стану енергетичного забезпечення клітин головного мозку, міокарда, печінки, нирок, слизової оболонки шлунково-кишкового тракту [5]. Окрім того, дослідження ферментативного статусу лімфоцитів має “ велике значення у доклінічній діагностиці стану хворого, прогнозуванні розвитку захворювання і оцінці повного одужання ” [12]. Відомо, що із зниженням резервних можливостей клітин підвищується вірогідність їхньої загибелі та прогресування хвороби, оскільки існує тісний взаємозв’язок між енергетичним обміном та функціонально-метаболічним статусом організму [13]. Саме тому, рання діагностика та своєчасна корекція метаболічних розладів може завадити прогресуванню хвороби та її хронічних ускладнень.

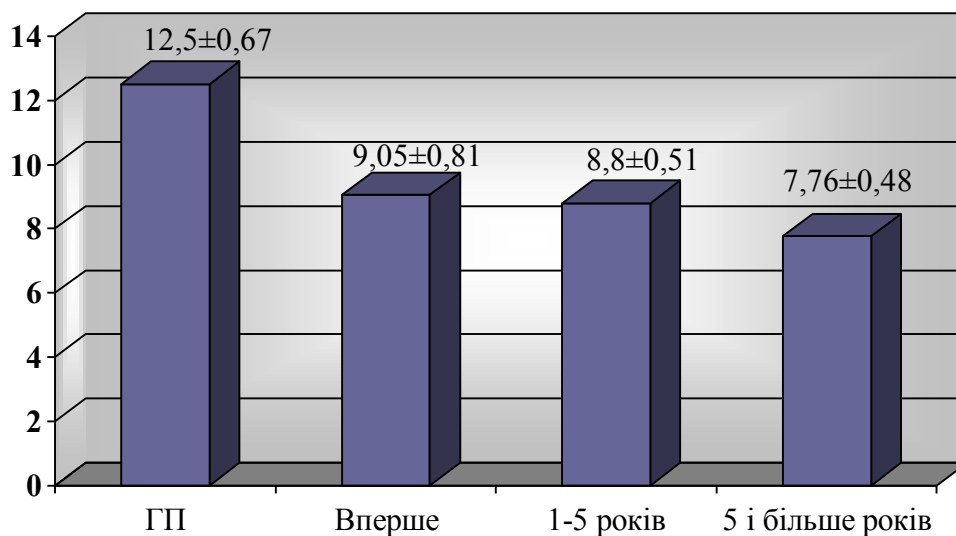


Рисунок 1. Активність СДГ (гранул/клітину) лімфоцитів дітей хворих на ЦД-1 залежно від тривалості хвороби

Однією із характерних особливостей СДГ – є її незалежність від концентрацій окисленої та відновлювальної форм НАД/НАДН⁺. Зазначене явище дозволяє на деякий час зберегти енергосинтезуючу функцію мітохондрій в умовах гіпоксії у разі порушення

НАД-залежного дихання клітин. Проте, в умовах хронічного кисневого голодування з метою адекватного забезпечення клітин енергією активується анаеробний гліколіз [6], котрий призводить до накопичення лактату. Саме тому, в якості об'єктивного відображення інтенсивності даного шляху енергозабезпечення ми вибрали визначення активності загальної ЛДГ у сироватці крові.

Встановлено, що активність ЛДГ сироватки крові була збільшена у 3-4 рази у всіх дітей хворих на ЦД-1, причому діапазон коливань показників був досить значним від 253,3 до 3558,7 Од/л.

Аналіз вмісту ензиму залежно від рівня глікемічного контролю з'ясував, що найбільша активність ферменту була встановлена у хворих I групи (табл. 3). Так, у них вона виявилась у 4,4 рази більшою відносно групи порівняння. У хворих II групи мало місце підвищення ЛДГ у 3,6 рази порівняно зі здоровими дітьми. Стабільно високою активність ЛДГ залишалась і у пацієнтів III групи. Так, у них показник вмісту ферменту у сироватці крові був у 3 рази вищим відносно показника здорових. Між рівнем HbA1c у дітей всіх груп та сироватковим вмістом ферменту встановлений дуже слабкий зворотній кореляційний зв'язок ($r = -0,204$).

Таблиця 3

Вміст ЛДГ у сироватці крові залежно від рівня глікемічного контролю

Фермент Од/л	Група порівняння n=30	I група n=10	II група n=30	III група n=30
ЛДГ сироватки	308,29±10,84	1364,53±98,715 P	1109,57±32,705 P	923,1±85,939 P

Примітка:

P – достовірність показників відносно групи порівняння ($P < 0,001$).

Активність ЛДГ у хворих на ЦД-1 незалежно від тривалості хвороби була стабільно високою. Так, у них вміст ензиму у сироватці крові від 3,5 до 4,2 разу перевищував показник здорових дітей (табл. 4). Звертає увагу знайдена позитивна

кореляція між терміном хвороби та рівнем ферменту, котра мала місце лише у випадку вперше виявленого ЦД-1 та у разі тривалості діабету понад 5 років ($r = 0,604$, $p < 0,05$). Відсутність кореляції у дітей із перебігом хвороби 1-5 років можна пояснити компенсаторно-приспосувальними реакціями, направленими на підтримання адекватного енергообміну.

Таким чином, у міру погіршення рівня глікемічного контролю та збільшення терміну захворювання, показник активності ЛДГ був значно вищим відносно групи порівняння.

Таблиця 4

**Вміст ЛДГ у сироватці крові дітей хворих на ЦД-1
залежно від тривалості хвороби**

Фермент Од/л	Група порівняння n=30	Вперше виявлений ЦД-1 n=17	Тривалість від 1-5 років n=28	Тривалість 5 і більше років n=25
ЛДГ сироватки крові	308,29±10,84	1297,16±115,633 P	1280,36±98,884 P	1093,83±98,397 P

Примітка:

P – достовірність показників відносно групи порівняння ($P < 0,001$).

Необхідно враховувати, що ЛДГ має 5 ізоферментів, тому підвищення його активності може бути зумовлене специфікою ізоферментного складу пошкодженого органа [7]. Підтвердженням є те, що занадто високі показники ферменту у сироватці крові (понад 2000 Од/л) були виявлені у дітей, що мали такі хронічні діабетичні ускладнення як діабетична нефропатія, гепатоз та кардіопатія.

Метаболічні розлади, що супроводжують ЦД-1 (неферментативне глікозилювання білків, пряма цитотоксична дія глюкози, порушення всіх видів обміну) призводять до тканинної та клітинної гіпоксії [2]. Енергетичний дефіцит у клітинах, у першу чергу в мітохондріях, супроводжується зниженням активності процесів аеробного гліколізу,

адекватним відображенням якого є активність СДГ лімфоцитів. Серед ендокринопатій, зумовлених мітохондріальними дисфункціями, ЦД займає перше місце [5]. Встановлено, що найбільшу кількість мітохондрій містять клітини проксимальних, дистальних ниркових каналців та кардіоміоцити [1, 14]. Окрім того, лімфоцити периферичної крові мають подібний метаболізм із зазначеними клітинами. Отже, визначення активності СДГ лімфоцитів можна використовувати як маркер ранньої доклінічної діагностики пізніх діабетичних ускладнень, зокрема діабетичної нефропатії та кардіоміопатії.

В умовах зниженого надходження кисню активується анаеробний гліколіз, котрий на деякий час забезпечує адекватною енергією клітини. Проте, він призводить до накопичення лактату та розвитку ацидозу, що у свою чергу викликає активацію процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ). Саме активація ПОЛ є одним із головних факторів розвитку та прогресування хронічних діабетичних ускладнень [15]. Одним із маркерів даного шляху окислення глюкози є активність ЛДГ сироватки крові, показник якої збільшується, за нашими дослідженнями, у всіх хворих на ЦД-1. Проте, на концентрацію ферменту в крові впливають супутні хронічні діабетичні ускладнення, що необхідно враховувати під час оцінки показника активності ЛДГ.

ВИСНОВКИ

1. Для дітей, хворих на цукровий діабет 1 типу, властивий енергетичний дисбаланс, котрий проявляється зниженням активності аеробного та активацією процесів анаеробного гліколізу.
2. Порушення енергетичного забезпечення виявляються навіть у хворих із оптимальним рівнем глікемічного контролю та у випадках вперше виявленого цукрового діабету.
3. Показник активності СДГ лімфоцитів слід використовувати як маркер ранньої доклінічної діагностики хронічних діабетичних ускладнень.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алимова И.Л. Формирование сердечно-сосудистых осложнений при сахарном диабете 1 типа у детей и их коррекция: дис. кандидата мед. наук: 14.00.09 / Алимова Ирина Леонидовна. – Смоленск, 2004. – 150 с.
2. Сахарный диабет у детей и подростков / [Дедов И.И., Кураева Т.Л., Петеркова В.А., Щербачева Л.Н.]. - М. : Универсум Паблишинг. - 2002. – 392 с.
3. Семячкина А.Н. Нарушения процессов клеточной биоэнергетики и методы их терапевтической коррекции у детей с мукополисахаридозами / А.Н. Семячкина, В.С. Сухоруков // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2005. - №1 - С. 18-21.
4. Нарушения клеточной биоэнергетики и их медикаментозная коррекция у детей с наследственными синдромами, сопровождающимися задержкой роста / М.И.Яблонская, П.В. Новиков, В.С. Сухоруков [и др.] // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2004. - №2. - С. 15-19.
5. Succinate dehydrogenase deficiency in human / J.-J. Brièrea, J. Favierb, V. El Ghouzzia [et al.] // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2005. - Vol. 62. - P. 2317-2324.
6. Энергетический обмен клетки в норме и патологии. Возможности его оценки / Н.В. Нагорная, Н.А. Четверик, А.А. Федорова [и др.] // Здоровье ребенка. – 2008. - №6(15). – С. 69-71.
7. Назаренко Г.И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований // Г.И. Назаренко, А.А. Кишкун. – М.: Медицина, - 2000. – 544 с.
8. Нарциссов Р.П. Применение п-нитротетразолия фиолетового для количественной цитохимии дегидрогеназ лимфоцитов человека / Р.П. Нарциссов // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. - 1969. - №5. - С. 85-91.

9. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. / Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. — К.: МОРИОН, 2001. - 408 с.
10. Синчихин С.П. Возможности использования иммунохимических и морфологических методов исследования в акушерстве и перинатологии / С.П. Синчихин, М.Е. Синчихина, З.Т. Наврузова [и др.] // Астраханский медицинский журнал. - 2008. - №1. – С. 85-96.
11. Газообмен и общий метаболизм у больных инсулинзависимым сахарным диабетом, осложненным кетоацидозом / Е.И. Соколова, Ю.И. Демидов, К.А. Зыков [и др.] // Пульмонология. – 2002. - №4. – С. 50-52.
12. Семенова Г.Ф. Ферментативный статус сукцинатдегидрогеназы в диагностике и прогнозе детской патологии с использованием анализатора изображения клетки / Г.Ф. Семенова, И.Ф. Тин, Е.Л. Толмачева [и др.] // Митохондрии в патологии: Материалы Всероссийского совещания. – Пущино, 2001. – С. 21-22.
13. Особенности энергетического обмена клеток в системе мать-плод-новорожденный, при беременности, осложненной гестозом / Н.Г. Белова, В.А. Желев, Л.А. Агаркова [и др.] // Сибирский медицинский журнал. – 2008. - №4. – С. 7-10.
14. Ершова С.А. Дисфункция митохондрий при нефропатиях у детей (Обзор литературы) / С.А. Ершова // Нефрология и диализ. - 2003. - Т.5. - №4. – С. 42-50.
15. Luczaj W. The present-day look at lipid peroxidation / W. Luczaj, E. Skrzydlewska // Postepy Biochem. – 2006. – Vol. 52(2). – P. 173-179.