

Липидный состав и активность Na^+, K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов у пациентов с сахарным диабетом 2 типа при дислиппротеинемиях

[Кравец Е.Б.], Степовая Е.А., Кошечев Т.Ю., Медведева О.Д., Яковлева Н.М., Ядмаа Оюунчимэг, Ананина Е.А.

ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет, Томск
(ректор – академик РАМН, профессор В.В. Новицкий)

Цель. Изучение особенностей липидного состава и активности Na^+, K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов у пациентов с сахарным диабетом 2 типа (СД2) при дислиппротеинемиях.

Материалы и методы. Обследовано 40 больных (22 мужчины и 18 женщин), больных СД2, в возрасте от 40 до 65 лет.

Результаты. Исследования свидетельствовали о нарушениях липидного состава мембраны эритроцитов, угнетении активности Na^+, K^+ -АТФазы у больных СД2 с дислиппротеинемиями, выраженность которых зависела от давности патологического процесса, тяжести диабетической дислиппротеинемии, уровня метаболической компенсации углеводного обмена.

Заключение. Исследование особенностей липидной дезорганизации мембраны эритроцитов у пациентов с СД2 позволяет разработать новые подходы в использовании комплексной липидокорректирующей терапии.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, диабетические дислиппротеинемии, эритроцит, мембрана, липиды, активность Na^+, K^+ -АТФазы

Lipid composition and Na^+, K^+ -ATPase activity in erythrocyte membranes of patients with type 2 diabetes mellitus and dyslipoproteinemia

[Kravets E.B.], Stepovaya E.A., Koshchevets T.Yu., Medvedeva O.D., Yakovleva N.M., Yadmaa Oyunchimeg, Ananina E.A.
Siberian State Medical University, Tomsk

Aim. To study lipid composition and Na^+, K^+ -ATPase activity in erythrocyte membranes of patients with type 2 diabetes mellitus and dyslipoproteinemia.

Materials and methods. The study included 40 patients (22 men and 18 women) aged 40-65 years with DM2.

Results. The patients had abnormal lipid composition and impaired Na^+, K^+ -ATPase activity in erythrocyte membranes. The magnitude of these changes depended on the duration of pathology, severity of diabetic dyslipoproteinemia, and quality of compensation of carbohydrate metabolism.

Conclusion. Aim. Investigation of lipid dysorganization in erythrocyte membranes in patients with type 2 diabetes mellitus yields data for the development of therapeutic modalities to correct dyslipoproteinemia.

Key words: type 2 diabetes mellitus, diabetic dyslipoproteinemia, erythrocyte, membrane, lipids, Na^+, K^+ -ATPase activity

Несмотря на значительные успехи в диабетологии сахарный диабет (СД) остается одной из глобальных медико-социальных проблем. Распространенность сердечно-сосудистых заболеваний среди больных СД 2 типа (СД2) в 2-4 раза выше, чем среди лиц без диабета [1, 2, 3]. Кроме известных неспецифических факторов риска атеросклероза при СД2, имеются дополнительные специфические факторы: инсулинрезистентность (ИР), компенсаторная гиперинсулинемия, гипергликемия. ИР имеет многофакторный генез. Помимо генетической основы, большой процент в ее развитии имеют такие внешние факторы, как переизбыток и гиподинамия [3, 4, 5, 6]. Резистентность жировой ткани к инсулину проявляется неспособностью последнего подавлять окисление липидов. Это способствует увеличению количества свободных жирных кислот (СЖК), угнетающих окисление глюкозы в мышцах. В свою очередь усиливается процесс синтеза липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) печенью. При этом в условиях гиперинсулинемии замедляется их элиминация, и в плазме крови повышается концентрация ЛПОНП, содержащих большое количество триглицеридов (ТГ), а также усиливается катаболизм липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). Таким образом, развитие ИР и гиперинсулинемии сопровождается развитием дислиппротеинемии, которая носит атерогенный характер [4]. Значительное повышение ТГ и неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в плазме крови сочетается с резким увеличением ТГ в β -клетках поджелудочной железы и способствует ускорению их апоптоза [4, 7, 8, 9]. Наличие ИР, гиперинсулинемии, гипергликемии и дислиппротеинемии не может не повлиять на изменение липидного бислоя клеточных мембран.

Структурные и функциональные особенности, а также его доступность для исследования делают эритроцит чрезвычайно удобной моделью для изучения действия повреждающих факторов и позволяют использовать его в качестве информативного тест-объекта для оценки состояния организма при патологии [10]. Поскольку в красных кровяных клетках полностью отсутствуют необходимые синтетические системы, обменные взаимодействия между эритроцитами и липопротеинами, реализуемые в кровотоке, приобретают особое значение для изучения диабетических дислиппротеинемий [11].

Цель

Целью настоящей работы явилось изучение особенностей липидного состава и активности Na^+, K^+ -АТФазы мембран эритроцитов у больных СД2 при дислиппротеинемиях.

Материалы и методы

Обследовано 40 больных (22 мужчины и 18 женщин) СД2 в возрасте от 40 до 65 лет с продолжительностью заболевания до 15 лет. Контрольную группу составили 19 практически здоровых лиц (11 мужчин и 8 женщин) аналогичного возраста с нормальными показателями углеводного обмена с учетом уровней гликемии натощак, постпрандиальной гликемии, глюкозо-толерантного теста (ГТТ), гликированного гемоглобина (HbA_{1c}), референтными величинами показателей обмена липидов (ОХ, ТГ, ХС ЛПВП, ХС ЛПНП), ИМТ – от 23,1 до 24,9 $\text{кг}/\text{м}^2$, без наследственной предрасположенности к сердечно-сосудистой патологии и СД.

Таблица 1

Клинико-лабораторная характеристика обследованных пациентов с СД2 (M±m)

Показатели		Контрольная группа	Больные СД2 с длительностью заболевания <5 лет	Больные СД2 с длительностью заболевания >5 лет
		n=19	n=16	n=24
Пол	женщины	7	10	8
	мужчины	9	14	11
Возраст, годы		50,74±5,91	54,92±6,39	57,63±6,34
ИМТ, кг/м ²		24,11±0,37	28,86±0,71*	29,02±0,49*
Уровень HbA _{1c} , %		5,45±0,28	7,31±0,71*	8,98±0,52* +
Уровень глюкозы натощак, ммоль/л		4,81±0,57	7,15±0,94*	9,22±0,81* +
Уровень постпрандиальной гликемии, ммоль/л		6,98±0,61	8,93±0,52*	10,32±0,58* +
Общий холестерин сыворотки крови, ммоль/л		4,50±0,47	6,49±0,25*	7,15±0,27* +
Триглицериды сыворотки крови, ммоль/л		1,11±0,25	2,69±0,34*	3,90±0,51* +
ХС ЛПНП сыворотки крови, ммоль/л		2,19±0,22	4,81±0,23*	6,14±0,32* +
ХС ЛПВП сыворотки крови, ммоль/л		1,34±0,08	1,04±0,06*	0,87±0,04* +
Индекс атерогенности		2,36±0,66	5,24±1,06*	7,20±0,74* +
Систолическое АД, мм рт.ст.		120,41±6,38	132,42±2,53*	138,12±3,33*
Диастолическое АД, мм рт.ст.		72,33±5,37	80,10±4,73	85,14±4,86*

Примечание: * p<0,05 – по сравнению с показателями в группе контроля; + p<0,05 – по сравнению с показателями у больных СД2 подгруппы А.

Пациенты с СД2 составили основную группу, которая с учетом давности патологического процесса была разделена на две подгруппы. В подгруппу А вошли 16 пациентов с длительностью заболевания до пяти лет, а в подгруппу В – 24 пациента с длительностью заболевания более пяти лет. Критериями включения в исследование явились: HbA_{1c}≥7,0%, ИМТ<30 кг/м², АД не более 140/80 мм рт.ст., общий холестерин (ОХС)≥4,5 ммоль/л, ХС ЛПНП≥3,0 ммоль/л; ТГ>1,77 ммоль/л; ХС ЛПВП<1,2 ммоль/л. Критерии исключения: заболевания печени не уточненного генеза, тяжелые соматические заболевания, злокачественные новообразования, злоупотребление алкоголем, прием гиполипидемических препаратов, антикоагулянтов, антиагрегантов и антиоксидантов в течение последних 3-х месяцев.

Все пациенты обследованы в момент госпитализации в дневном стационаре эндокринологической клиники СибГМУ и городской больницы №3 г. Томска.

Содержание ХЛ, ХС ЛПВП, ХС ЛПНП, ТГ в сыворотке крови определяли с помощью реактивов фирмы «Olvescs diagnostikum» и «Herbos» на полуавтоматическом анализаторе «Metrolab 2300».

Мембраны эритроцитов выделяли путем гипосмотического гемолиза [12], липидный экстракт получали по методу Folch J. с соавт. [13]. Определяли общее содержание липидов [14], общих фосфолипидов [15]. Липидный состав мембраны эритроцитов изучали с помощью метода тонкослойной хроматографии. Препаративное разделение нейтральных липидов проводили в системе растворителей гептан : диэтиловый эфир : этилацетат (80 : 20 : 1,5), фосфолипидов – в системе хлороформ : метанол : вода (32 : 12,5 : 2) на пластинках «Silufol UV254» (Чехия) [16, 17]. Идентификацию фракций липидов осуществляли с использованием стандартов «Sigma».

В мембранной суспензии микроиуретовым методом определяли содержание белка. Определение активности Na⁺, K⁺-АТФазы в мембране эритроцитов проводили методом, разработанным Казенновым А.М. и соавт. [18] и основанным на накоплении неорганического фосфора (Pi) в среде, содержащей АТФ, в результате его гидролиза под действием АТФазы.

Результаты исследования были обработаны с использованием стандартного набора программ Statistika for Windows (2002,

версия 6,0). Количественные показатели были проверены на нормальность с использованием критерия Shapiro Wilks W-test. Межгрупповые отличия оценивали непараметрическим критерием с помощью теста Манна-Уитни. Для непарно связанных групп использовали непараметрический критерий Вилкоксона. Корреляционный анализ проводили по методу Спирмена.

Результаты и их обсуждение

Анализ клинико-лабораторных показателей обследованных больных СД2 (табл. 1) выявил нарушения липидного обмена сыворотки крови в виде достоверного увеличения уровня ОХС, ТГ и ХС ЛПНП на фоне снижения ХС ЛПВП по сравнению с показателями у здоровых доноров (p<0,05). Также у пациентов с СД2 были установлены более высокие уровни HbA_{1c}, постпрандиальной и гликемии натощак по сравнению с аналогичными показателями в группе контроля (p<0,05). При этом наиболее выраженные изменения углеводного и липидного обмена были выявлены у больных СД2 подгруппы В, имевших длительность заболевания более пяти лет (p<0,05).

К настоящему времени сформировалось мнение, что при СД патология липидного обмена создает основу для дезорганизации структуры и функции мембраны эритроцитов [11]. Проведенное нами исследование особенностей липидного спектра мембраны эритроцитов у больных СД2 позволило получить фактические данные (табл. 2), указывающие на факт дезорганизации липидной компоненты мембраны красных кровяных клеток, выраженность которой зависела от давности патологического процесса, тяжести диабетической дислипидемии и степени компенсации углеводного обмена. Так, у всех больных СД2 имела место очевидная модификация липидного спектра мембраны в виде увеличения абсолютного содержания общих липидов с повышением относительного количества холестерина и фракции эфиров холестерина на фоне снижения доли фракции общих фосфолипидов (p<0,05). Наиболее существенные изменения липидной фазы мембраны эритроцитов были обнаружены у больных СД2 подгруппы В. Обнаружено увеличение содержания в мембране эритроцитов холестеринной фракции (на 39%) и эфиров холестерина (на 17%) на фоне снижения уровня общих фосфолипидов (на 59% от уровня

Таблица 2

Содержание общих липидов, общих фосфолипидов и их фракционный состав в мембране эритроцитов у больных СД2 с различной длительностью заболевания (M±m)											
Группы обследованных	Общие липиды, мг/мг белка	Общие фосфолипиды, мг/мг белка	Фракции общих липидов, %			Фракции фосфолипидов, %					
			ФЛ	ХС	ЭХС	ЛФХ	ФИ	СМ	ФХ	ФС	ФЭА
Контрольная группа	0,78±0,03	0,38±0,04	44,79±±0,63	34,68±±0,73	20,53±±0,55	3,43±±0,61	7,57±±0,73	19,23±±0,37	32,57±±0,42	13,52±±0,25	23,68±±0,55
Больные СД2 с длительностью заболевания <5 лет	1,21±0,13*	0,33±0,06*	26,10±±1,47*	51,40±±1,73*	23,50±±1,41	9,41±±1,6*	9,36±±0,91	15,16±±1,54*	21,48±±2,38*	19,49±±1,31*	25,10±±1,52
Больные СД2 с длительностью заболевания >5 лет	1,30±0,18*	0,25±0,05**	18,25±±2,13**	57,00±±1,88**	24,75±±2,42*	12,90±±1,23**	11,92±±0,91*	9,41±±0,66**	14,91±±1,20**	23,83±±0,48**	27,03±±1,14**

Примечание: * p<0,05 – по сравнению с показателями в группе контроля; + p<0,05 – по сравнению с показателями у больных СД2 с длительностью заболевания менее пяти лет. Фосфолипиды (ФЛ), холестерин (ХС), эфиры холестерина (ЭХС), лизофосфатидилхолин (ЛФХ), фосфатидилинозитол (ФИ), сфингомиелин (СМ), фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилэтанолламин (ФЭА).

в контроле) (p<0,001). Известно, что холестерин, встраиваясь между молекулами липидов, в значительной мере определяет текучесть и вязкость мембраны клеток, неблагоприятно сказываясь на состоянии мембраны эритроцитов и способствуя их гемолизу [19]. Наряду с этим у всех больных СД2 обращало на себя внимание отчетливое уменьшение в мембране эритроцитов абсолютного содержания фосфолипидов с перераспределением их относительного состава. Наиболее выраженные нарушения фосфолипидного спектра эритроцитарной мембраны были выявлены у больных СД2 подгруппы В: на фоне достоверного (p<0,01) снижения уровней фосфатидилхолина и сфингомиелина обнаружено увеличение содержания лизофосфатидилхолина (в 3,8 раза), фосфатидитинозитола (в 1,6 раза), фосфатидилсерина (в 1,7 раза) и фосфатидилэтанолламина (на 12%).

Полагают, что деградация фосфолипидного состава является одной из причин повышения ХС в мембране эритроцитов при патологии. В результате повышенной активности фосфолиполиза и свободно-радикального окисления происходит разрушение фосфолипидных молекул, вследствие чего уменьшается их содержание в мембране, замещаясь на молекулы ХС [20]. При дислипидопроteinемиях наибольшее значение приобретает нарушение взаимодействия липопротеинов и плазмолеммы. Изменение соотношения липопротеиновых комплексов приводит к нарушению равновесия миграции ХС.

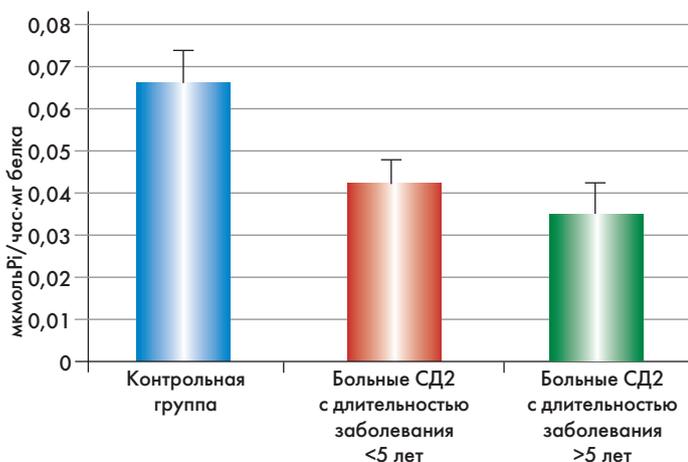


Рис. 1. Активность Na⁺,K⁺-АТФазы в мембране эритроцитов у больных СД2
Примечание: * p<0,05 – по сравнению с показателями в группе контроля

При этом значительное превалирование количества липопротеинов атерогенных классов над содержанием ЛПВП создает условия для преимущественного поступления ХС в мембраны эритроцитов. Полученные результаты были подтверждены данными корреляционного анализа между относительным содержанием холестерина в мембранах эритроцитов и показателями липидного обмена сыворотки крови: общего холестерина (r=0,54, p<0,01), триглицеридов (r=0,64, p<0,001), ХС ЛПНП (r=0,61, p<0,001), ХС ЛПВП (r=-0,40, p<0,05).

Дезорганизация липидного слоя мембраны эритроцитов может явиться причиной утраты способности клеток регулировать ионный и антиоксидантный гомеостаз, что может сопровождаться угнетением активности ионтранспортирующего энзима Na⁺,K⁺-АТФазы. Наши исследования показали, что у всех пациентов с СД2 имело место достоверное снижение активности данного фермента в мембране эритроцитов, наиболее выраженное в подгруппе с длительностью заболевания более пяти лет – до 0,035±0,003 мкмольPi/час·мг белка). Активность ионтранспортирующего энзима Na⁺,K⁺-АТФазы была в 1,9 раза ниже аналогичного показателя у здоровых доноров (0,065±0,004 мкмоль Pi/час·мг белка) (рис. 1). Такое ингибирование активности данного фермента является результатом не только выявленных структурных изменений липидного матрикса мембраны эритроцитов, но и процессов неферментного гликирования белков мембраны клеток крови при СД, способствующих модуляции мембранных ионтранспортных систем [21]. Так, проведенный нами корреляционный анализ позволил установить корреляционные связи между значениями активности Na⁺,K⁺-АТФазы и показателями, характеризующими структурно-функциональные свойства эритроцитарной мембраны: содержанием фосфолипидов (r=0,63, p<0,01), холестерина (r=-0,64, p<0,01), ЛФХ (r=-0,71, p<0,001), а также показателем HbA_{1c} (r=-0,68, p<0,001).

Поскольку состояние мембраны эритроцитов определяет их микрореологические особенности, обнаруженные изменения молекулярной организации мембраны эритроцитарных клеток можно рассматривать в качестве патогенетического звена развития диабетических ангиопатий. Таким образом, изучение липидного состава сыворотки крови и особенностей липидной дезорганизации мембраны эритроцитов у пациентов с СД2 не только позволяет судить об обмене липидными компонентами между мембраной эритроцитов и плазменными липопротеинами, но и открывает новые подходы в использовании комплексной липидокорректирующей терапии, направленной в конечном итоге на своевременную профилактику и лечение сосудистых осложнений СД2.

Выводы

1. Нарушения структуры мембраны эритроцитов у больных СД2 с дислипидотеинемией характеризуются изменениями липидного состава (увеличением содержания холестерина и его эфиров, лизофосфатидилхолина, фосфатидилсерина при одновременном уменьшении доли фосфатидилхолина), угнетением активности ионтранспортирующего мембранасоциированного энзима Na^+, K^+ -АТФазы.

2. Степень выраженности структурно-функциональных изменений мембраны эритроцитов зависит от длительности основного патологического процесса, тяжести диабетической дислипидотеинемии, уровня метаболической компенсации углеводного обмена.

3. Исследование особенностей липидной дезорганизации мембраны эритроцитов у пациентов с СД2 позволяет разработать новые подходы в использовании комплексной липидокорректирующей терапии.

Литература

1. Дедов И.И., Шестакова М.В. Сахарный диабет и сердечно-сосудистые заболевания: состояние проблемы // Сахарный диабет. – 2002. – №4. – С. 2–6.
2. Дедов И.И., Александрова А.А. Проблемы острого инфаркта миокарда у больных сахарным диабетом: эхо Мюнхена // Сахарный диабет. – 2008. – №1. – С. 4–10.
3. Дедов И.И., Балаболкин М.И., Мамаева Г.Г., Клебанова Е.М., Креминская В.М. Сахарный диабет: ангиопатии и окислительный стресс: Пособие для врачей. – М., 2003. – 86 с.
4. Мкртумян А.М. Роль липотоксичности в нарушении секреции инсулина и развитии инсулинорезистентности // Сб.: β -клетка: секреция инсулина в норме и патологии. – М., 2005. – С. 65–75.
5. Шестакова М.В. Значимость инсулинорезистентности в развитии сахарного диабета типа 2 // Сб.: β -клетка: секреция инсулина в норме и патологии. – М., 2005. – С. 49–50.
6. Knudson P., Eriksson S., Lahdenpera S. et al. Changes in lipolytic enzyme cluster with insulin resistance syndrome // Diabetologia. – 1995. – Vol. 38. – P. 344–350.
7. Lebovitz H.E. Syndrome X: fast or fiction new aspects in diabetes / Eds. P. Lefebvre, E. Standl. – Berlin, N.Y.: Walter de Gruyter, 1992. – P. 23–33.
8. Lupi R., Del Guera S., Fierabracci V. et al. Lipotoxicity in human pancreatic islets and the protective effect of metformin. Kinetics of insulin release in health and type 2 diabetes // Diabetes. – 2002. – Vol. 51, Suppl.1. – P. 134–137.
9. Roger H. Unger, Yan-Ting Zhou. Lipotoxicity of β -cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. Birth, life, and death of β -cells in type 2 diabetes // Diabetes. – 2001. – Vol. 50. – Suppl. 1. – P. 118–121.
10. Новицкий В.В., Степовая Е.А., Гольдберг В.Е., Колосова М.В., Рязанцева Н.В., Корчин В.И. Эритроциты и злокачественные новообразования. – Томск: СТУ, 2000. – 288 с.
11. Broncel M., Chojnowska-Jezierska J., Koter-Michalak M., Franiak I. Erythrocyte fluidity in patients with hyperlipidemia during statins therapy // Pol. Arch. Med. Wewn. – 2005. – V. 113. – P. 531–537.
12. Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J. et al. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes // Archives Biochem Biophys. – 1963. – Vol. 100, №1. – P. 119–130.
13. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley A.G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues // J. Biol. Chem. – 1957. – Vol. 226, Suppl. 1. – P. 497–509.
14. Таранова Н.А., Говорова Л.В. Микрометод определения общих липидов в лимфоцитах и другом биологическом материале // Вопросы медицинской химии. – 1987. – №2. – С. 132–136.
15. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической биохимии. – Минск: «Беларусь», 1982. – 366 с.
16. Финдлей Дж.Б., Эванс У.Г. Биологические мембраны. Методы. – М.: Мир, 1990. – 424 с.
17. Прохорова М.И., Тушикова З.Н. Большой практикум по углеводному и липидному обмену. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1965. – 220 с.
18. Казеннов А.М., Маслова М.Н., Шалабов А.Д. Исследование активности Na^+, K^+ -АТФазы в эритроцитах млекопитающих // Биохимия. – 1984. – №7. – С. 1089–1094.
19. Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология: Пер. с англ. – М.: Изд-во НИИ биомедицинской химии РАМН, 1999. – 372 с.
20. Болдырев А.А., Кяйвяряйнен Е.И., Илюха В.А. Биомембранология: Учебное пособие. – Петрозаводск: Изд-во Кар НЦ РАН, 2006. – 226 с., 78 рис., 12 табл.
21. Adewoye E.O., Akinlade K.S., Olorunsogo O.O. Erythrocyte membrane protein alteration in diabetics // East. Afr. Med. J. – 2001. – Vol. 78, Suppl.8. – P. 438–440.

Кравец Елена Борисовна

д.м.н., профессор, зав. кафедрой эндокринологии и диабетологии с курсом эндокринной хирургии, ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет, Томск

Степовая Елена Алексеевна

д.м.н., профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии, ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет, Томск

E-mail: offis@ssmu.net.ru

Кошечев Татьяна Юрьевна

аспирант каф. эндокринологии и диабетологии, ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет, Томск

Медведева Олеся Дмитриевна

аспирант кафедры биохимии и молекулярной биологии, ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет, Томск

Яковлева Наталья Михайловна

к.м.н., ассистент кафедры эндокринологии и диабетологии, ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет, Томск

Ядмаа Оюунчимэг

аспирант кафедры эндокринологии и диабетологии, ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет, Томск

Ананина Елена Александровна

аспирант кафедры эндокринологии и диабетологии, ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет, Томск