Структурно-функциональные свойства эритроцитарных мембран у женщин с метаболическим синдромом на фоне лечения Сиофором®

(опыт применения лектиновых зондов)

Р.А. Киреев*, Н.А. Курмачева, С.В. Саяпин, О.В. Крутцова

** Государственный университет им. Н.Г. Чернышевского (ректор – член-корр. РАН Д.И. Трубецков), Областной центр планирования семьи и репродукции (главный врач – канд. мед. наук Н.П. Смирнова), Саратов*

Метаболический синдром (МС) у женщин часто сочетается с нарушениями репродуктивной функции, синдромом поликистозных яичников (СПЯ) [2, 11, 13]. Инсулинорезистентность (ИР), гиперинсулинемия (ГИ), дислипидемия, характерные для МС, приводят к развитию у большинства пациентов сахарного диабета типа 2 (СД 2), ранней манифестации сердечно-сосудистых заболеваний, атеросклероза [1, 17]. Механизмы формирования данных патологических состояний у больных МС до конца не расшифрованы, поэтому поиск маркеров их ранних, доклинических стадий, несомненно, является актуальной задачей. Известно, что на ранних этапах метаболических нарушений происходят изменения структурно-функциональных свойств клеточных мембран, а в качестве универсальной модели для их изучения одним из наиболее часто используемых объектов является эритроцит [9]. Методом ЭПР-спектроскопии установлены увеличение микровязкости мембран эритроцитов у женщин при ожирении и глубокие структурные изменения в мембранах клеток при МС и СД 2 [7].

Различие функциональных свойств эритроцитов можно обнаружить при оценке их устойчивости к гемолитику, поскольку распределение эритроцитов по кислотной резистентности отражает возрастной состав их популяции [3, 9].

Для выявления структурных изменений эритроцитарной мембраны в последнее время все чаще используются лектины, которые признаны наиболее информативными молекулярными зондами, позволяющими проводить идентификацию концевых углеводных остатков рецепторов и изучать их динамику в физиологических и патологических условиях.

Лектинами называют белки, способные специфически связывать полисахариды, гликопротеины, гликолипиды и другие углеводсодержащие полимеры, локализованные на клеточных поверхностях. Лектины избирательно и обратимо взаимодействуют с углеводами, не вызывая их химического превращения [6, 8].

В доступных источниках литературы мы нашли лишь отдельные зарубежные публикации, посвященные использованию лектинов в изучении механизмов развития СД 2 и ожирения. С помощью лектиновых зондов у больных СД 2 были установлены гиперсиализация макромолекулы IgA1 [22]; повышение активности ингибитора тирозинкиназы инсулиновых рецепторов PC-1 [20]; снижение титра агглютинации эритроцитов с галактоза-специфичным лектином [18].R.S. Thies и соавт. обнаружили у больных СД 2 и ожирением отсутствие адсорбции лектина зародышей пшеницы (WGA) с инсулиновым рецептором pp 185, что, по их мнению, свидетельствует о нарушении процесса серинфосфорилирования данного рецептора [21].

Использование лектиновых зондов может внести вклад в изучение механизмов развития ИР, а также в разработку методов профилактики МС и его осложнений.

Ключевым звеном в лечении пациентов с МС в настоящее время признано применение препаратов, снижающих ИР и гиперинсулинемию (ГИ), в частности, метформина (Сиофора®). Лечение Сиофором® способствует нормализации менструального цикла, повышению фертильности у женщин с МС в сочетании с СПЯ [4, 15, 19]. Имеются сообщения о значимом снижении перекисного окисления липидов и повышении стабильности эритроцитарных мембран при использовании Сиофора® в терапии МС [5].

Целью настоящей работы было изучение структурно-функциональных свойств и состояния углеводных детерминант мембран эритроцитов с помощью лектиновых зондов у женщин с МС в сравнении с пациентками с гиноидным типом ожирения (ГО), а также на фоне лечения Сиофором®.

Объем и методы исследования

Обследованы 34 женщины с МС и бесплодием вследствие хронической ановуляции (1-я группа) и 32 женщины с ГО и нормальной репродуктивной функцией (2-я группа).

Определялись следующие показатели: масса тела, индекс массы тела (ИМТ), соотношение окружностей талии и бедер (ОТ/ОБ), уровни общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеидов высокой (ХС ЛПВП) и низкой плотности (ХС ЛПНП), уровень гликемии натощак и в ходе стандартного теста толерантности к глюкозе, базальное содержание инсулина (ИРИ) в сыворотке крови.

Ожирение диагностировалось при ИМТ >30, абдоминальное ожирение (АО) регистрировалось при величине ОТ/ОБ >0,85, ГО – при отношении ОТ/ОБ <0,85.

Липидный спектр крови определяли энзиматическими колориметрическими тестами фирмы «Biocon» (Германия). Уровень ХС ЛПНП рассчитывали по формуле Фридвальда и соавт. [12]: ХС ЛПНП (ммоль/л)=ОХС - (ТГ/2,2 + ХС ЛПВП). Оценка атерогенности сыворотки крови проводилась согласно критериям Европейского общества по изучению атеросклероза [23]. Коэффициент атерогенности рассчитывали по формуле ХС ЛПНП/ХС ЛПВП; за норму приняты его значения ниже 3 [10].

Гликемию в капиллярной крови определяли на глюкометре «ONE TOUCH Profile» (ЛайфСкэн, «Джонсон и Джонсон», США). Уровень ИРИ определяли иммуноферментным методом с помощью тест-систем фирмы «DRG» (США) на аппарате «Stat Fax 303 Plus» (США), норма тест-набора составляет 2-25 мЕД/мл. ИР оценивалась по косвенным показателям: уровню базальной инсулинемии и соотношению глюкозы и ИРИ натощак, которое в норме превышает 6 [11, 12].

Кислотную резистентность мембран эритроцитов определяли методом кислотных эритрограмм. Нормальной считается эритрограмма, содержащая 20-25% «пониженностойких» (старых), 55-60% «среднестойких» (зрелых) и 20-25% «повышенностойких» (молодых форм) эритроцитов. Время 100% гемолиза в норме составляет 6-7 мин [3].

Для оценки состояния углеводных детерминант на мембранных структурах у обследуемых женщин эритроциты в дальнейшем инкубировались с PNA (лектином арахиса, Arachis hypogaea) и ConA (лектином семян канавалии мечевидной, Canavalia ensiformis) в предагглютинирующих концентрациях (125 мкг/мл). Лектин PNA проявляет специфичность к олигосахаридному комплексу Gal β1-3GalNac, лектин ConA – к Man-Gluc-Nac-D-glucosamin. У здоровых лиц лектины в предагглютинирующих концентрациях не взаимодействуют с углеводными детерминантами мембран эритроцитов [6].

Дальнейшие исследования включали изучение динамики антропометрических параметров, гликемии и ИРИ, липидного спектра, состояния репродуктивной системы и структурно-функциональных свойств мембран эритроцитов у женщин с МС после 3 месяцев приема Сиофора® в дозе 1000 мг/сут. Терапия Сиофором® сочеталась с назначением гипокалорийной диеты (1200 ккал/сут) и дозированной физической нагрузки.

Результаты исследования обработаны с помощью пакета прикладных программ Med-Stat. Достоверность различий оценивали по критерию t Стьюдента для независимых выборок.

Результаты и их обсуждение

В таблице приведены клинико-лабораторные характеристики обследованных женщин.

Таблица

Клинико-лабораторные характеристики обследованных женщин (M±m)

Показатели	1-я группа, n=34		2-я группа, n=32
	до приема сиофора	на фоне приема сиофора	
Возраст, годы	29±0,98	-	29±1,1
Масса тела, кг	98,4±11,3	90,4±9,2**	93,3±9,1
ИМТ, кг/м²	35,7±3,2	32,6±2,8**	34,4±2,5
ОТ/ОБ	0,89±0,2	0,86±0,3	0,78±0,3*
Гликемия, ммоль/л	4,96±0,5	4,9±0,3	4,39±0,2
ИРИ, мЕд/мл	23,47±2,9	17,65±2,4**	9,62±0,5*
Глюкоза/ИРИ	3,95±0,3	5,0±0,4	8,53±0,7*
ОХС, ммоль/л	6,1±0,29	5,07±0,2**	5,2±0,34*
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,2±0,1	1,1±0,1	1,36±0,1
ХС ЛПНП, ммоль/л	3,4±0,2	3,0±0,2	3,3±0,4
ХС ЛПНП/ХС ЛПВП	3,1±0,3	2,7±0,24	2,6±0,4
ТГ, ммоль/л	1,64±0,2	1,37±0,25	1,0±0,2*

Примечание. * – достоверность различий 2-й группы по отношению к 1-й группе до лечения, ** – достоверность различий у пациенток 1-й группы до и на фоне приема сиофора, p<0,05.

Пациентки обеих групп идентичны по возрасту. Средние показатели массы тела и ИМТ у женщин 1-й группы до лечения были выше, чем у пациенток 2-й группы, но достоверных различий между ними не было. Отношение ОТ/ОБ у женщин 1-й группы было достоверно выше, чем у пациенток 2-й группы.

Средние показатели гликемии натощак у женщин обеих групп были в пределах нормы и не имели достоверных различий, в то же время у 11,8% пациенток с МС было выявлено нарушение толерантности к глюкозе. У 23,5% женщин 1-й группы отмечалось умеренное снижение базальной гликемии (2,9-3,2 ммоль/л), сочетавшееся с ГИ: уровень ИРИ натощак у них составил 41,6-66,5 мЕд/мл. У всех женщин 2-й группы показатели базальной гликемии, результаты стандартного теста толерантности к глюкозе и уровень ИРИ были в пределах нормы.

У женщин с МС уровень ИРИ был достоверно (в 2,4 раза) выше, а отношение глюкоза/ИРИ – достоверно ниже, чем у больных с ГО. У всех пациенток 1-й группы отношение глюкоза/ИРИ было <6 (в среднем 3,95±0,3), что косвенно свидетельствует о наличии ИР. Соотношение глюкозы и ИРИ натощак у женщин 2-й группы было в пределах нормы – 8,53±0,7.

Корреляционный анализ показал наличие прямой взаимосвязи уровня ИРИ с ИМТ у женщин с МС ($r = 0,57$, $p<0,05$). Не установлено корреляционной зависимости между базальной гликемией и ИРИ, однако у пациенток 1-й группы уровень ИРИ отрицательно коррелировал с отношением глюкоза/ИРИ ($r = -0,87$, $p<0,05$). У женщин 2-й группы не выявлено корреляции ИРИ с ИМТ, базальной гликемией и отношением глюкоза/ИРИ.

Пациентки с МС имели достоверно более высокий уровень ОХС, чем женщины с ГО. У больных обеих групп уровни ХС ЛПНП были выше нормы и достоверно не отличались. Содержание ТГ в сыворотке крови у женщин 1-й группы было на 39,0% выше, чем у пациенток 2-й группы ($p<0,05$). Содержание ХС ЛПВП у женщин с МС было на 12,5% ниже, чем у женщин с ГО. Наличие у пациенток 1-й группы более выраженной дислипидемии подтверждалось увеличением коэффициента атерогенности до 3,1±0,3, тогда как у женщин 2-й группы он был в пределах нормы – 2,6±0,4. В целом, дислипидемия выявлена у 38,2% больных МС и у 21,9% пациенток с ГО.

Таким образом, у пациенток с АО установлено наличие ИР в сочетании с дислипидемией и/или нарушением толерантности к глюкозе, а также ГИ в 23,5% случаев, что позволило диагностировать у них наличие МС.

На фоне лечения Сиофором® у женщин с МС масса тела снизилась на 8,1%, ИМТ – на 8,7% ($p<0,05$). Отношение ОТ/ОБ у пациенток после курса лечения Сиофором® уменьшилось и приблизилось к «пороговому» значению 0,85. Базальный уровень ИРИ у пациенток с МС уменьшился на фоне лечения Сиофором® на 24,8% и стал достоверно ниже исходного. Произошло также увеличение отношения глюкоза/ИРИ с 3,95±0,3 до 5,0±0,4, что косвенно указывает на снижение ИР. У всех женщин с предшествовавшим нарушением толерантности к глюкозе показатели базальной и стимулированной гликемии нормализовались. Лечение женщин с МС Сиофором® привело к достоверному снижению и нормализации уровня ОХС. Произошло уменьшение уровня ТГ, снижение содержания ХС ЛПНП. Исходно повышенный коэффициент атерогенности у женщин с МС на фоне лечения Сиофором® нормализовался.

У 44,1% женщин с МС лечение Сиофором® привело к восстановлению овуляторных менструальных циклов, 2 пациентки с первичным бесплодием забеременели в течение первых 2 мес после окончания приема препарата. У 3 женщин беременность наступила через 2-3 мес после отмены Сиофора® на фоне индуцированной кломифеном овуляции.

Таким образом, терапия Сиофором® привела у женщин с МС и бесплодием к повышению коэффициента фертильности на 14,7%.

На рис. 1 представлены эритрограммы женщин 1-й и 2-й групп до и после инкубации с лектинами. До инкубации с лектинами у женщин с МС установлено снижение времени 100% гемолиза до 5,7 мин за счет увеличения количества «пониженностойких» клеток (до 40%). Картина кинетики гемолитическо-

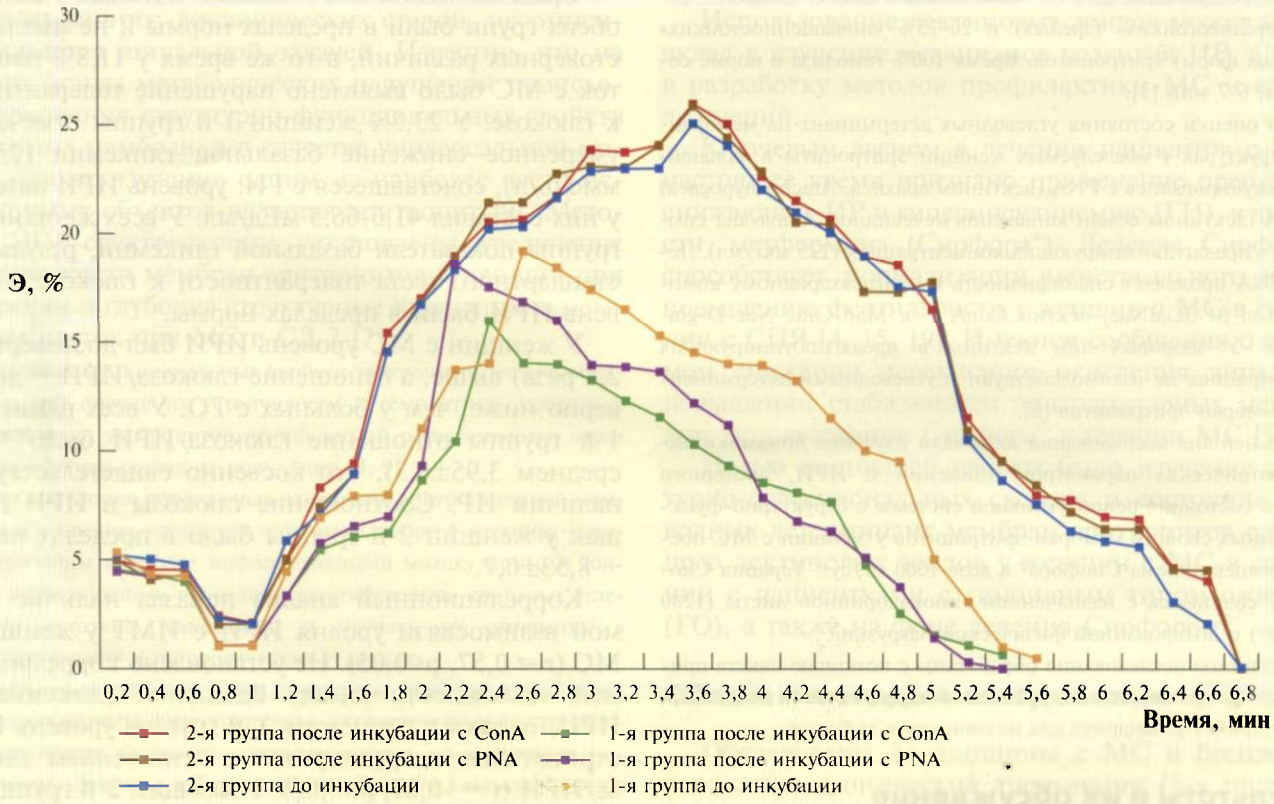


Рис. 1. Эритрограммы женщин с метаболическим синдромом и гиноидным ожирением до и после инкубации эритроцитов с лектинами.

го процесса у пациенток с ГО практически не отличалась от классической, время 100% гемолиза у них было нормальным и составило 7 мин. После инкубации эритроцитов с PNA и Con A у пациенток 1-й группы установлено большее снижение времени 100% гемолиза за счет наличия открытых для связывания углеводных остатков β-галактозы и D-маннозы на мембранах всех групп клеток (старых, зрелых и молодых). У женщин 2-й группы взаимодействия лектинов с углеводными детерминантами эритроцитарных мембран не установлено.

Наличие открытых для связывания с лектинами участков на мембранах эритроцитов у женщин с МС свидетельствует о процессах десиалирования, приводящих к «оголению» углеводных детерминант. Это, в свою очередь, обусловливает возрастание агрегации на поверхности эритроцитов фибриногена, β-липопротеидов, изменение электростатических свойств мембраны, что можно рассматривать как один из факторов риска развития микроциркуляторной гипоксии, атеросклероза, нарушений реологических свойств крови.

На рис. 2 представлены эритрограммы женщин с МС до и через 3 мес от начала приема Сиофора® в сравнении с эритрограммами пациенток с ГО. Лечение Сиофором® привело к значительному улучшению кинетики гемолитического процесса у женщин 1-й группы. Время 100% гемолиза у пациенток с МС нормализовалось и приблизилось к показателям женщин группы сравнения.

Полученные данные свидетельствуют о стабилизации эритроцитарных мембран у женщин с МС на фоне лечения Сиофором®. Терапия, направленная на снижение ИР и ГИ у больных МС, способствует улучшению функциональных свойств клеточных мембран и приводит к замедлению процессов старения клетки.

На рис. 3 представлены эритрограммы женщин с МС после инкубации с лектинами до и на фоне терапии сиофором. Лечение привело к увеличению времени 100% гемолиза за счет нарастания числа «повышенностойких» (на 15%) и «среднестойких» (на 8%) эритроцитов, в то же время количество «пониженностойких» клеток не изменилось. У женщин, принимавших сиофор, лектины не реагировали с углеводными детерминантами молодых эритроцитов, однако сохранялось их взаимодействие с открытыми углеводными компонентами интегральных белков на мембранах зрелых и старых эритроцитов. Подъем правого крыла эритрограммы, что обозначено стрелкой на рисунке, четко отображает данный процесс. Отсутствие взаимодействия лектинов с углеводными детерминантами молодых эритроцитов свидетельствует о нормализации структурно-функциональных

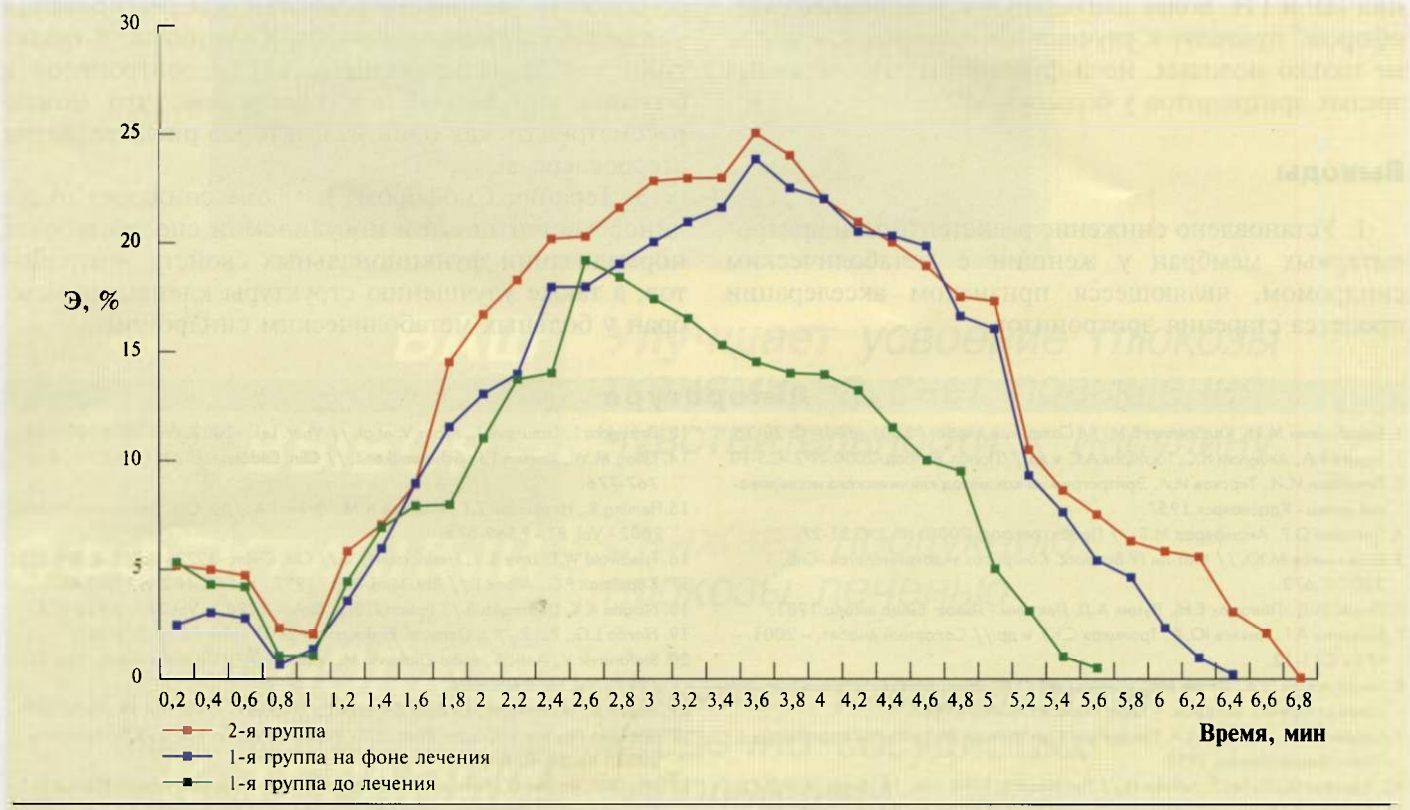


Рис. 2. Эритрограммы женщин с метаболическим синдромом на фоне лечения сиофором в сравнении с эритрограммами пациенток с гиноидным ожирением.

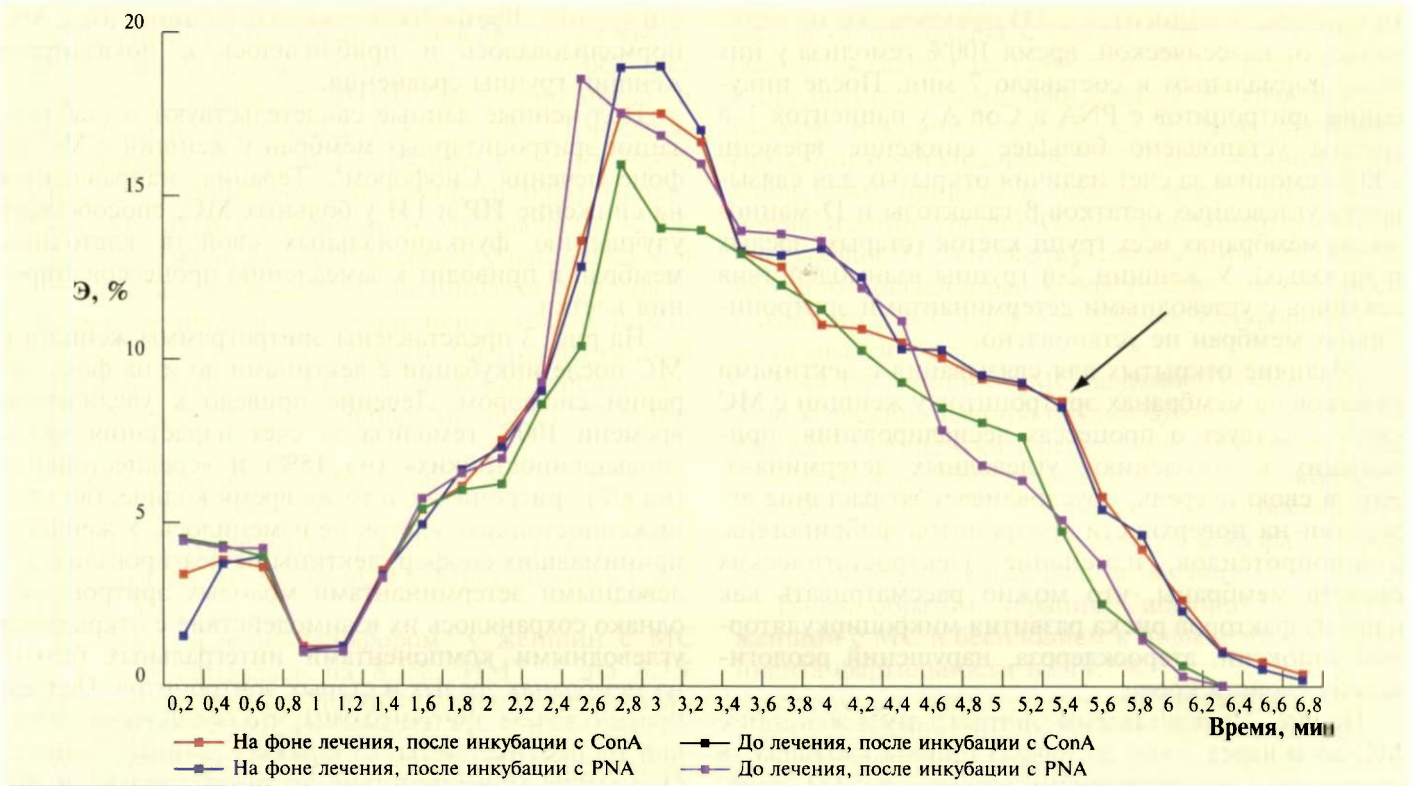


Рис. 3. Эритрограммы женщин с метаболическим синдромом на фоне лечения сиофором после инкубации с лектинами.

свойств данной популяции клеток на фоне снижения ИР и ГИ. Более длительные курсы лечения Сиофором® приведут к улучшению состояния мембран не только молодых, но и функционально-активных зрелых эритроцитов у больных МС.

Выводы

1. Установлено снижение резистентности эритроцитарных мембран у женщин с метаболическим синдромом, являющееся признаком акселерации процесса старения эритроцитов.

2. Использование лектиновых зондов позволило обнаружить увеличение открытых для реагирования углеводных детерминант типа D-манноза, β-галактоза, т.е. десиалирование мембран эритроцитов у больных метаболическим синдромом, что можно рассматривать как один из факторов риска развития атеросклероза.

3. Терапия Сиофором® на фоне снижения инсулинорезистентности и инсулинемии способствовала нормализации функциональных свойств эритроцитов, а также улучшению структуры клеточных мембран у больных метаболическим синдромом.

Литература

1. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М. // Сахарный диабет.- 2001.- №1.- С. 28-36.
2. Бурлев В.А., Аванесян Н.С., Гаспаров А.С. и др. //Пробл. репрод.-2000.-№2.-С.5-10.
3. Гительзон И.И., Терсков И.А. Эритрограммы как метод клинического исследования крови.- Красноярск,1957.
4. Григорян О.Р., Анциферов М.Б. // Пробл. репрод.-2000.-№ 3.-С.21-27.
5. Колесников М.Ю. // Мат-лы IV Всеросс. Конгресса эндокринологов.-Спб, 2001.-С.673.
6. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины.- Львов: Выща школа,1981.
7. Максина А.Г., Князев Ю.А., Троицкая С.Ю. и др.// Сахарный диабет. – 2001. – №1.- С.11-12.
8. Хомутовский О.А., Луцик М.Д., Передерей О.Ф. Электронная гистохимия рецепторов клеточных мембран. – Киев: Наукова думка.-1986.
9. Шашкин А.В., Терсков И.А. Продукция и деструкция эритроцитов в организме – Новосибирск: Наука, 1986.
10. Assmann G., Cullen P., Schulte H.// Eur. Heart J.-1998.-Vol. 19.-Suppl. A.-P.3-11.
11. Avignon A., Baegner C., Mariano-Goulart D. et al.// Int. J. Obesity.-1999.-Vol. 23.-P. 512-517.
12. Caro J. // J. Clin. Endocrinol.-1991.-Vol. 73.-P. 691-696.
13. Dravecka I., Lazurova I., Kraus V. et al. // Vnitr. Lek. -2002. -Vol. 48.-P.192-196.
14. Elting M.W., Korsen T.J., Schoemaker J. // Clin. Endocrinol.-2001.-Vol. 55.- P. 767-776.
15. Fleming R., Hopkinson Z.E., Wallace A.M., Greer I.A. // J. Clin. Endocrinol. Metab.- 2002.- Vol. 87.- P.569-574.
16. Friedwald W.T., Levy R. J., Fredrickson D. S.// Clin. Chem. -1972.- Vol.18.-P. 499-502.
17. Kopelman P.G., Albon L.// Brit. Med. Bull.- 1997.- Vol.53.-№2.-p.322-340.
18. Nagda K.K, Deshmukh B.// Indian J. Exp. Biol. – 1998. – Vol.36. – P.426-428.
19. Nardo L.G., Rai R.// J. Gynecol. Endocrinol.- 2001.- Vol. 15.- P. 373-380.
20. Stefanovic V., Antic S., Mitic-Zlatkovic M., Vlahovic P.// Diabetes Metab. Res. Rev.- 1999.- Vol.15.-P.400-404.
21. Thies R.S., Molina J.M., Ciaraldi T.P. et al. // Diabetes.-1990.-Vol.39.-P.250-259.
22. Vazquez-Moreno L, Candia-Plata M.C., Robles-Burgueno M.R. //Clin. Biochem.- 2001.- Vol.34.-P.35-41.
23. Wood D., Backer G., Faergemann et al. Prevention of Coronary Heart Disease in Clinical Practice (Summary of the recommendation of the Second Joint Task Force of the Joint European and other Societes on Coronary Prevention), 1998.