Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при сосудистых осложнениях сахарного диабета 1 типа

Е.Б. Кравец, Н.В. Рязанцева, Н.М. Яковлева,
В.Н. Бутусова, Р.Т. Тухватулин, Л.К. Новикова

ГОУ ВПО «Сибирский Государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (ректор – акад. РАМН В.В. Новицкий), Томск

Важнейшую медико-социальную проблему современной диабетологии представляет ранняя инвалидизация и летальность больных сахарным диабетом (СД) 1 типа, причиной которых чаще всего являются диабетические ангиопатии. Патогенез микрососудистых осложнений сопряжен с вовлечением в патологический процесс самой многочисленной клеточной популяции сосудистого русла – красных кровяных клеток. Эритроциты осуществляют не только присущую им специфическую газотранспортирующую функцию, но и принимают участие в регуляции реологических свойств крови [16].

Известно, что особенности молекулярной организации эритроцитарной мембраны определяют такие микрореологические свойства красных клеток крови, как деформируемость и агрегационная способность. В условиях хронической гипергликемии закономерно возникающая дезорганизация структуры мембраны эритроцитов приводит к утрате способности клеток регулировать ионный гомеостаз и окислительный метаболизм, а также к нарушению работы мембрансвязанных энзимов, что в конечном итоге является причиной необратимых нарушений структурно-функционального статуса красных клеток крови [3,7,8,14,15]. Исходя их этого, исследование молекулярной организации мембраны эритроцитов, направленное на формирование новых представлений о функциональных нарушениях этих клеток при СД 1 типа, позволит разработать патогенетически обоснованные способы коррекции нарушений микрореологических свойств клеток крови, обеспечив тем самым поиск путей профилактики и лечения поздних сосудистых осложнений.

Целью настоящего исследования явилось определение роли нарушений структурно-функциональной организации мембраны эритроцитов в механизмах развития и прогрессирования сосудистых осложнений СД 1 типа.

Объект и методы исследований

В исследование было включено 88 пациентов с СД 1 типа (45 мужчин и 43 женщины) в возрасте от 18 до 55 лет с различными стадиями сосудистых осложнений. Первую группу обследованных составили 29 больных, имевших непролиферативную стадию диабетической ретинопатии и/или диабетическую нефропатию в стадии микроальбуминурии; вторую группу – 38 пациентов с препролиферативной и пролиферативной стадиями диабетической ретинопатии и/или диабетической нефропатией в стадии протеинурии или хронической почечной недостаточности. В группу сравнения был включен 21 пациент с СД 1 типа без сосудистых осложнений. При оценке компенсации углеводного обмена учитывали гликемию натощак, постпрандиальную гликемию, уровень гликированного гемоглобина (HbA1c). Данные показатели углеводного обмена проанализированы согласно «Национальным стандартам сахарного диабета» (Федеральная целевая программа «Сахарный диабет», 2002).

Контрольную группу составили 25 практически здоровых лиц (14 мужчин и 11 женщин) аналогичного возраста с нормальной толерантностью к глюкозе, без наследственной предрасположенности к СД и хронических очагов инфекции.

Все пациенты были обследованы на момент госпитализации на фоне проведения интенсифицированной инсулинотерапии (суточная доза инсулина составляла от 0,58 до 0,68 ЕД/кг массы тела). Из них 38 пациентов (43%) обследованы в динамике лечения (через 15 сут после проведения комплексной терапии) препаратами α-липоевой кислоты и сулодексидом: 20 пациентов получали лечение препаратами α-липоевой кислоты в дозе 600 мг/сут внутривенно капельно; 18 больных – лечение по комбинированной схеме (α-липоевая кислота в дозе 600 мг/сут внутривенно капельно и сулодексид в дозе 600 липопротеинлипазных единиц (LSU)/сут внутримышечно).

Материалом исследования являлась венозная кровь, стабилизированная гепарином (25 ЕД/мл). Мембраны эритроцитов выделяли путем гипоосмотического гемолиза [12]. В мембранной суспензии микробиуретовым методом определяли содержание белка. Проводили флюоресцентное зондирование мембран флюорофором пирен («Sigma»). Взаимодействие мембран с флюоресцентным зондом регистрировали на спектрофлюориметре «Hitachi-MPF-4». Микровязкость липидной фазы мембраны эритроцитов оценивали по степени эксимеризации пирена, мигрирующего в их гидрофобном компартменте, в среде следующего состава (ммоль): NaCl – 145, трис-

HCl – 10 (pH 7,4) при длине волны возбуждающего света ($\lambda_в$) 285 и 340 нм. Раствор пирена (растворитель – этанол) добавляли в кювету с мембранами красных клеток крови (содержание белка – 0,3 мг/мл) до конечной концентрации 10 мкмоль, инкубировали в течение 10 мин при постоянном помешивании. Определяли степень эксимеризации пирена в области анулярных и общих липидов, вычисляя отношение интенсивности флюоресценции эксимеров и димеров (I_{470}/I_{370}) при длине волны возбуждающего света ($\lambda_в$) 285 и 340 нм соответственно [10], а также I_{370}/I_{390} при $\lambda_в$=340 нм для оценки полярности окружения молекул пирена [2]. Рассчитывали показатель миграции энергии с триптофановых остатков на пирен по формуле, предложенной [1].

Активность Na^+,K^+-АТФазы в мембране эритроцитов определяли методом [4] по нарастанию содержания неорганического фосфора (Pi) в инкубационной среде следующего состава (ммоль): NaCl – 125, KCl – 25, $MgCl_2$ – 3, ЭДТА – 0,5, АТФ – 2, трис-HCl – 50 (pH 7,4). Инкубацию проводили при 37°C в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением 20% трихлоруксусной кислоты. Активность Na^+,K^+-АТФазы рассчитывали как разницу между активностью АТФазы, измеренной в условиях, описанных выше, и активностью АТФазы, определенной в среде того же состава (но без NaCl) в присутствии 125 ммоль KCl.

Определение показателей обратимой агрегации эритроцитов проводили фотометрическим способом, основанном на свойстве крови изменять свою оптическую плотность в зависимости от степени агрегированности эритроцитов [9]. Измеряя интенсивность света, проходящего через пробу крови, с одновременной регистрацией величины механического воздействия, разрушающего агрегаты клеток, определяли показатели обратимой агрегации эритроцитов, характеризующие U_o – минимальную механическую прочность агрегатов (В); U_d – максимальную механическую прочность агрегатов (В); τ – полупериод спонтанной агрегации эритроцитов (с) и А – амплитуду фотометрического сигнала, характеризующего количество клеток, участвующих в процессе обратимой агрегации (мм). На основании измеренных показателей рассчитывали индекс агрегации ($J_a=U_d/\tau$, усл.ед.), характеризующий соотношение агрегационных и дезагрегационных процессов, а также коэффициент агрегации эритроцитов по формуле: $K=U_o \cdot U_d \cdot A/\tau$, усл.ед.

Достоверность различий показателей между сравниваемыми группами устанавливали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни (U-тест), предварительно проверив гипотезу нормальности распределения (по критерию Колмогорова-Смирнова). Корреляционный анализ проводили по методу Спирмена. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

Анализ клинико-лабораторных показателей обследованных больных СД 1 типа показал, что наибольший стаж заболевания (в среднем 16,9±1,1 лет) отмечался во второй клинической группе пациентов, имевших выраженные (II и III стадии) сосудистые

Таблица 1

Показатели обратимой агрегации эритроцитов у больных СД 1 типа (X±m)

Показатели обратимой агрегации эритроцитов	Здоровые доноры	Больные СД				
		без сосудистых осложнений	с I стадией диабетической ретинопатии и/или нефропатии		со II и III стадиями диабетической ретинопатии и/или нефропатии	
			Hb A1c,%		Hb A1c,%	
			7,0-7,5	>7,5	7,0-7,5	>7,5
	n=15	n=11	n=8	n=9	n=8	n=12
U_o, В	13,50±0,57	11,96±0,54	12,00±0,79	17,50±1,36*+	16,00±0,97	25,21±1,87*+^x
U_d, В	77,57±2,34	76,50±3,65	82,25±2,10	95,67±4,71*+	96,88±4,97*+#	111,17±2,42*+^x
А, мм	46,80±1,32	45,68±2,30	49,00±2,80	55,72±3,03*+	53,44±2,57*	47,88±2,61
τ, с	31,07±1,89	26,46±2,81	24,50±4,64	15,00±1,17*+	15,25±1,37*+#	10,92±0,53*+^x
J_a, усл. ед	2,58±0,13	3,14±0,32	4,04±0,56*	6,55±0,35*+#	6,51±0,30*+#	10,40±0,45*+^x
K, усл.ед	1632,1±110,6	1711,6±213,0	2297,6±350,9+	6313,97±551,2*+#	5568,1±487,0*+#	12146,0±900,65*+^x

Примечание. Здесь и в табл. 2:
*p<0,05 по сравнению с показателями у здоровых доноров;
+p<0,05 по сравнению с показателями у больных СД 1 типа без сосудистых осложнений;
#p<0,05 по сравнению с показателями у больных СД 1 типа первой группы в фазе субкомпенсации углеводного обмена;
^p<0,05 по сравнению с показателями у больных СД 1 типа первой группы в фазе декомпенсации углеводного обмена;
xp<0,05 по сравнению с показателями у больных СД 1 типа второй группы в фазе субкомпенсации углеводного обмена.

осложнения, по сравнению с больными первой группы и пациентами группы сравнения ($p<0,001$). Дебют заболевания во второй клинической группе наступал в более раннем возрасте, в среднем составив 15,7±1,6 года, по сравнению с пациентами, входящими в группу больных с начальными стадиями микроангиопатий ($p<0,01$), и пациентами, не имевшими диабетических сосудистых осложнений ($p<0,001$). У обследованных больных второй клинической группы был установлен более высокий уровень HbA1c – 10,2±0,5% по сравнению со значениями в первой группе ($p<0,05$) и в группе сравнения ($p<0,001$).

Пациенты с сосудистыми осложнениями в зависимости от фазы компенсации СД 1 типа были разделены на 2 подгруппы. При этом у больных с I стадией диабетической ретинопатии и/или нефропатии, находившихся в фазе декомпенсации углеводного обмена, был меньше средний стаж заболевания (9,6±1,8 лет) по сравнению с таковым у больных с субкомпенсацией углеводного обмена (13,4±2,4 лет). У пациентов с II и III стадиями сосудистых осложнений в фазе декомпенсации средний стаж заболевания также оказался меньше (15,7±1,2 года), чем у обследованных в фазу субкомпенсации (18,5±1,8 лет). Полученные данные свидетельствовали о более быстром развитии сосудистых осложнений у больных с длительной декомпенсацией и неудовлетворительным самоконтролем за состоянием углеводного обмена.

У обследованных с СД 1 типа группы сравнения был выявлен наименьший стаж заболевания – от 2 до 4 лет. Все пациенты находились в фазе компенсации и субкомпенсации (уровень HbA1c составлял 6,3±0,2%).

Ранее нами было установлено, что у больных СД 1 типа имеются нарушения поверхностной архитектоники эритроцитов [5], способствующие снижению деформируемости эритроцитов и нарушению функциональной способности красных кровяных клеток. Как показало исследование (табл. 1), наиболее выраженные изменения показателей обратимой агрегации эритроцитов были выявлены у больных СД 1 типа второй группы (со II и III стадиями сосудистых осложнений), находившихся в фазе декомпенсации углеводного обмена. Было обнаружено увеличение минимальной прочности агрегатов эритроцитов в 1,9 раза, максимальной прочности агрегатов эритроцитов – в 1,4 раза, индекса агрегации эритроцитов – в 4,0 раза, интегрального коэффициента агрегации – в 7,4 раза, а также уменьшение полупериода спонтанной агрегации в 2,9 раза по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе ($p<0,001$). Кроме того, выраженные нарушения обратимой агрегации красных кровяных клеток были выявлены у пациентов первой группы с декомпенсацией углеводного обмена и у больных второй группы, находившихся в фазе субкомпенсации. Усиление обратимой агрегации эритроцитов, являющихся самой многочисленной популяцией клеток крови, способствует нарушению кровотока и повреждению эндотелия кровеносных сосудов, что может явиться одним из патогенетических звеньев микрососудистых осложнений при СД 1 типа.

Таблица 2

Результаты исследования структурных свойств и активности Na^+,K^+-АТФазы в мембране эритроцитов у больных СД типа 1 (X±m)

Показатель	Здоровые доноры	Больные СД				
		без сосудистых осложнений	с I стадией диабетической ретинопатии и/или нефропатии		со II и III стадиями диабетической ретинопатии и/или нефропатии	
			Hb A1c,%		Hb A1c,%	
			7,0-7,5	>7,5	7,0-7,5	>7,5
	n=20	n=19	n=14	n=11	n=16	n=21
Параметры флюоресценции, усл.ед. I_{470}/I_{370} ($\lambda_в$=285 нм)	0,357±0,014	0,334±0,019	0,321±0,012	0,284±0,019*	0,256±0,012*+#	0,240±0,015*+^
I_{470}/I_{370} ($\lambda_в$=340 нм)	0,431±0,015	0,399±0,018	0,372±0,018*	0,370±0,022*	0,328±0,011*+#	0,320±0,020*+^
I_{370}/I_{390} ($\lambda_в$=340 нм)	0,948±0,003	0,956±0,004	0,958±0,004*	0,962±0,004	0,965±0,004*	0,960±0,003*
Величина миграции энергии с триптофана на пирен,%	53,44±2,00	53,02±1,77	52,23±2,37	57,51±1,69	52,05±1,87	52,40±1,84
Na^+,K^+-АТФаза мкмольP_i/ч•мг белка	0,060±0,003	0,061±0,005	0,046±0,005+	0,053±0,005	0,042±0,004*+	0,040±0,002*+^

Известно, что гемореологические свойства красных кровяных клеток обусловлены прежде всего особенностями организации их клеточных мембран [11, 13]. Учитывая этот факт, мы провели исследование структурных свойств мембраны эритроцитов с использованием флюоресцентного зондирования. Степень эксимеризации неполярного зонда пирен, диффундирующего в гидрофобном компартменте мембраны, характеризует подвижность углеводородных цепей липидов, что позволяет использовать данный параметр для исследования микровязкостных свойств липидной фазы мембраны [2]. Кроме того, определение степени эксимеризации пирена при $\lambda_в$=340 и $\lambda_в$=285 нм дает возможность дифференцированно оценивать молекулярные особенности упорядоченности интегрального липидного бислоя и анулярной липидной фракции соответственно [1]. У больных СД 1 типа первой группы с субкомпенсацией углеводного обмена (табл. 2) было обнаружено статистически достоверное снижение средних значений I_{470}/I_{370} при $\lambda_в$=340 нм, что указывает на возрастание упорядоченности липидных молекул. У пациентов с СД 1 типа второй группы и у больных первой группы с декомпенсацией углеводного обмена было выявлено значительное снижение (по сравнению с подобными величинами у здоровых лиц) коэффициента эксимеризации пирена при длинах волн возбуждающего света 340 и 285 нм, что указывает на повышение микровязкости как суммарной липидной фазы, так и прибелкового липидного окружения в мембране эритроцитов. Наиболее выраженное снижение средних значений степени эксимеризаци пирена (I_{470}/I_{370}) при $\lambda_в$=285 и $\lambda_в$=340 нм по сравнению с аналогичными показателями у здоровых лиц ($p<0,05$) отмечалось у больных второй группы, находившихся в фазе декомпенсации (на 33% и 26% соответственно). Увеличение микровязкости липидного матрикса мембраны может быть причиной нарушений латеральной диффузии белковых и липидных молекул, трансмембранного флип-флоп-переноса липидов [11].

Определение средних значений показателя I_{370}/I_{390} ($\lambda_в$=340 нм) при исследовании структуры мембраны эритроцитов у больных с сосудистыми осложнениями позволило выявить факт возрастания полярности микроокружения зонда в интегральной липидной фазе эритроцитарной мембраны, что может быть следствием повышения содержания полярных молекул воды в условиях интенсификации перекисного окисления липидов [15]. У пациентов с СД 1 типа без сосудистых осложнений, определяемые параметры достоверно не отличались от таковых у здоровых доноров.

Дезорганизация липидной фазы мембраны эритроцитов может явиться причиной утраты способности клеток регулировать ионный и антиоксидантный гомеостаз, изменения конформации мембранассоциированных транспортных белков [6]. Исходя из этих позиций, нами была проведена оценка активности ионтранспортирующего энзима плазматической мембраны эритроцитов – Na^+,K^+-АТФазы, выявившая значительное ее угнетение у больных СД 1 типа, имевших диабетические микрососудистые осложнения (см. табл. 2), по сравнению с аналогичными показателями у лиц контрольной группы. При этом наиболее выраженное снижение активности энзима было обнаружено у пациентов второй клинической группы (в 1,5 раза по сравнению с показателями у здоровых доноров).

Проведенное нами исследование показало, что усиление процессов агрегации эритроцитов сопровождается изменениями структурно-функционального статуса их мембраны. Данное предположение подтверждается результатами корреляционного анализа между индексом и коэффициентом агрегации эритроцитов и показателями степени эксимеризации пирена (I_{470}/I_{370} при $\lambda_в$=340 нм и $\lambda_в$=285 нм), а также значениями активности Na^+,K^+-АТФазы (коэффициент Спирмена варьировал в пределах от -0,52 до -0,65, $p<0,05$).

Поскольку состояние мембраны эритроцитов определяет их микрореологические особенности, обнаруженные изменения молекулярной организации мембраны эритроцитарных клеток можно рассматривать в качестве патогенетического звена развития микроангиопатий при СД 1 типа. В связи с этим нами проводилась коррекция реологических нарушений крови у пациентов с СД 1 типа, направленная в конечном итоге на замедление прогрессирования поздних осложнений. В качестве препаратов выбора выступали α-липоевая кислота, обладающая антиоксидантной активностью, и сулодексид, содержащий гликозаминогликаны и являющийся низкомолекулярным гепарином. Было выявлено, что в условиях лечения препаратами α-липоевой кислоты возникала тенденция к восстановлению структурных свойств мембраны эритроцитов, о чем свидетельствовало увеличение средних значений степени эксимеризации флуорофора (I_{470}/I_{370}) при $\lambda_в$=285 и $\lambda_в$=340 нм по сравнению с их величинами до лечения (табл. 3). На фоне комбинированной терапии (α-липоевая кислота + сулодексид) отмечалось достоверно значимое повышение средних значений показателя I_{470}/I_{370} при $\lambda_в$=285 и $\lambda_в$=340 нм (по сравнению с аналогичными показателями до лечения, $p<0,05$), а также повышение активности Na^+,K^+-АТФазы до пределов, статистически не отличавшихся от показателей у здоровых лиц. Таким образом, в условиях проводимой терапии отмечался очевидный мембраностабилизирующий эффект, что позволяет рассматривать приведенную схему лечения как патогенетически оправданную терапию, направленную на предупреждение развития поздних сосудистых нарушений.

Таблица 3

Динамика изменений показателей структурно-функционального статуса эритроцитов у больных СД 1 типа на фоне лечения препаратами α-липоевой кислоты и сулодексидом (X±m)

Показатель	Здоровые доноры	Больные СД 1 типа			
		до лечения препаратами α-липоевой кислоты	после лечения препаратами α-липоевой кислоты	до лечения препаратами α-липоевой кислоты в сочетании с сулодексидом	после лечения препаратами α-липоевой кислоты в сочетании с сулодексидом
	n=20	n=20	n=20	n=18	n=18
Параметры флюоресценции, усл.ед.					
I_{470}/I_{370} ($\lambda_в$=285 нм)	0,357±0,014	0,279±0,013*	0,313±0,020*	0,272±0,016*	0,315±0,011*+
I_{470}/I_{370} ($\lambda_в$=340 нм)	0,431±0,015	0,347±0,014*	0,373±0,016*	0,348±0,018*	0,384±0,011*+
I_{370}/I_{390} ($\lambda_в$=340 нм)	0,948±0,003	0,966±0,003*	0,959±0,003*	0,963±0,003*	0,955±0,003
Величина миграции энергии с триптофана на пирен,%	53,44±2,00	54,53±1,60	51,94±1,44	51,42±1,97	52,41±1,72
Na^+K^+-АТФаза, мкмольP_i/ч•мг белка	0,060±0,003	0,042±0,004*	0,052±0,003	0,042±0,003*	0,055±0,002+
Показатель обратимой агрегации эритроцитов					
U_o, В	13,50±0,57	18,38±1,69*	15,42±1,07	19,47±2,07*	15,11±1,53
U_d, В	77,57±2,34	93,29±4,11*	88,50±3,25*	103,83±3,94*	94,29±3,17*
А, мм	46,80±1,32	48,83±2,42	50,04±2,12	52,63±1,98*	52,75±2,06*
τ, с	31,07±1,89	16,08±2,05*	18,25±1,87*	16,53±2,78*	19,11±2,67*
J_a, усл. ед	2,58±0,13	6,67±0,68*	5,37±0,50*	7,74±0,81*	5,71±0,50*
К, усл.ед	1632,1±110,6	6048,6±844,1*	4183,3±506,5*+	8660,0±1376,6*	4553,1±599,63*+

*p<0,05 по сравнению с показателями у здоровых доноров;
+p<0,05 по сравнению с показателями до лечения.

Выводы

1. Выраженность микрососудистых осложнений у больных СД 1 типа определяется стажем заболевания и уровнем компенсации углеводного обмена. Механизмы развития и прогрессирования сосудистых осложнений сопряжены с изменением микрореологических свойств эритроцитов.

2. Нарушения структурно-функциональных свойств мембраны красных клеток крови (возрастание микровязкости липидной фазы, угнетение активности ионтранспортирующего энзима Na^+,K^+-АТФазы) и изменения их агрегационных характеристик наиболее выражены у больных СД 1 типа с декомпенсацией углеводного обмена.

3. Использование в комплексном лечении больных СД 1 типа препаратов, обладающих мембраностабилизирующим эффектом, является патогенетически обоснованным.

4. В условиях комбинированной терапии α-липоевой кислотой и сулодексидом наблюдалась стабилизация микрореологических свойств эритроцитов.

Литература

1. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. - М., 1980.
2. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеидов. - М., 1989.
3. Кагава Я. Биомембраны. - М., 1985.
4. Казеннов А.М., Маслова М.Н., Шалабодов А.Д.//Биохимия. - 1984. - №7. - С.1089-1094.
5. Кравец Е.Б., Яковлева Н.М., Рязанцева Н.В.//Сахарный диабет. - 2005. - №1. - С.14-17.
6. Мацкевич Ю.А., Казеннов А.М., Маслова М.Н.//Эволюционная биохимия и физиология. - 1994 - № 4. - С. 497-504.
7. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. - Томск, 2004.
8. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. и др. Атлас. Клинический патоморфоз эритроцита. - Томск, 2003.
9. Тухватулин Р.Т. Шуваева В.Н., Шадрина Н.Х., Левтов В.А.// Физиологический журнал СССР. - 1986. - Т. 72, №6. - С.775-784
10. Boldyrev A.A., Lopina O.D., Prokopjeva V.D. et al.//Biochem Int. - 1984 - Vol. 8. - P. 851-859.
11. Catania A., Caimi G. //Minerva Med. - 1992 - Vol 83. - P. 187-192.
12. Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J. et al.//Arh. Biochem. Biophys. - 1963 - Vol.100, № 1. - P.119-130.
13. Gimsa J. //Biophys. J. - 1998 - Vol. 75, № 1. - P. 568-569.
14. Heude B. // Amer. J. Clin. Nutrition. - 2003. - Vol. 77, № 4. - P. 803-808.
15. Martin-Gallan P., Carrascosa A., Gussinye M., Dominguez C.//Free Rad. Biol. Med. -2003 - Vol. 34, № 12. - P. 1563-1574.
16. Reinhart W.H.//Schweiz. Med. Wochenchr. - 1995. - Vol. 125, № 9. - P. 387-395.