

Молекулярные нарушения мембран эритроцитов и тромбоцитов при сосудистых осложнениях сахарного диабета типа 1

Кравец Е.Б., Рязанцева Н.В., Яковлева Н.М., Бутусова В.Н., Чудакова О.М., Сапрыкина Э.В.

Molecular disorders of erythrocyte and platelet membranes in vascular complications of type 1 diabetes mellitus

Kravets Ye.B., Ryazantseva N.V., Yakovleva N.M., Butusova V.N., Choudakova O.M., Saprykina E.V.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Кравец Е.Б., Рязанцева Н.В., Яковлева Н.М. и др.

С целью определения роли нарушений структурно-функциональных свойств мембран эритроцитов и тромбоцитов в механизмах развития и прогрессирования сосудистых осложнений сахарного диабета (СД) типа 1 обследованы 92 больных (48 мужчин и 44 женщины) в возрасте от 18 до 55 лет с различными стадиями диабетической ретинопатии и нефропатии. Полученные результаты свидетельствовали о выраженных структурных и функциональных изменениях мембраны красных клеток крови и тромбоцитов при СД типа 1, имеющих однонаправленный характер нарушений (возрастание микровязкости липидной фазы, угнетение активности Na^+ , K^+ -АТФазы), степень выраженности которых коррелирует со степенью выраженности сосудистых осложнений. Поскольку состояние мембраны определяет реологические свойства клеток крови, в частности их микрореологические особенности, выявление изменений молекулярной организации мембран эритроцитов и тромбоцитов можно рассматривать в качестве патогенетического звена развития диабетических микроангиопатий.

Ключевые слова: сахарный диабет типа 1, диабетические ангиопатии, эритроцит, тромбоцит, мембрана, флуоресцентное зондирование, активность Na^+ , K^+ -АТФазы, агрегация.

The aim of the present study was to establish the role of disturbances of structural-functional properties of erythrocyte and platelet membranes in mechanisms of development and progression of vascular complications of type 1 diabetes. The subjects were 92 patients (48 men and 44 women, aged from 18 to 55) affected by type 1 diabetes in different stages of diabetic retinopathy and diabetic nephropathy. The results have shown the significant structural and functional changes of red blood cells and platelet membranes in type 1 diabetes mellitus. These changes (increase of microviscosity of lipid phase, inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase activity) correlated with the degree of expression of vascular complications. Since the rheologic properties of blood cells, particularly its microrheologic features, are determined by the membrane status, the detection of changes in the molecular organization of erythrocyte and platelet membranes can be consider as a pathogenic link of diabetic microangiopathies.

Key words: type 1 diabetes mellitus, diabetic angiopathy, erythrocyte, platelet, membrane, fluorescent probe, Na^+ , K^+ -ATPase activity, aggregation.

УДК 616.379-008.64:616.1-06

Введение

Сахарный диабет (СД) типа 1 является одной из актуальных медико-социальных проблем во всем мире. Ранняя инвалидизация и летальность больных связаны с наличием сосудистых ослож-

нений, особое место среди которых занимают диабетические микроангиопатии, во многом обусловленные нарушениями реологических свойств крови. Одним из патогенетических звеньев изменений реологического статуса крови является структурно-функциональная дестабилизация ее

клеточных компонентов (эритроцитов, тромбоцитов), возникающая при СД вследствие неэнзиматического гликирования белков, ослабления антиоксидантных систем и усиления перекисного окисления в мембране кровяных клеток [1, 2, 7, 11, 14, 15, 17, 23, 24].

Исследование молекулярной организации мембран эритроцитов и тромбоцитов, направленное на формирование новых представлений о функциональных нарушениях этих клеток крови при СД типа 1, позволяет разработать патогенетически обоснованные способы коррекции нарушений микрореологических свойств клеток крови при развитии диабетических микроангиопатий.

Целью настоящего исследования явилось определение роли нарушений структурно-функциональных свойств мембран эритроцитов и тромбоцитов в механизмах развития и прогрессирования сосудистых осложнений СД типа 1.

Материал и методы

В исследование было включено 92 пациента с СД типа 1 (48 мужчин и 44 женщины) в возрасте от 18 до 55 лет с различными стадиями сосудистых осложнений. Первую группу обследованных составили 30 больных, имевших непролиферативную стадию диабетической ретинопатии и (или) диабетическую нефропатию в стадии микроальбуминурии; вторую группу – 40 пациентов с препролиферативной и пролиферативной стадиями диабетической ретинопатии и (или) диабетической нефропатией в стадии протеинурии или хронической почечной недостаточности. В группу сравнения были включены 22 пациента с СД типа 1 без сосудистых осложнений. У обследованных больных учитывали степень компенсации углеводного обмена путем определения гликемии натощак, постпрандиальной гликемии, гликированного гемоглобина HbA1c. Согласно Национальным стандартам сахарного диабета (федеральная целевая программа «Сахарный диабет», 2002) компенсацию углеводного обмена считали при показателе HbA1c ниже 7,0%, субкомпенсацию – от 7,0 до 7,5% включительно, декомпенсацию – выше 7,5%.

Контрольную группу составили 25 практически здоровых лиц (14 мужчин и 11 женщин), сопоставимых по возрасту, с нормальной толерантностью к глюкозе, без наследственной предрасположенности к СД и без обострения хронических заболеваний.

Все пациенты были обследованы на момент госпитализации на фоне проведения интенсифицированной инсулинотерапии (суточная доза инсулина составляла от 0,6 до 0,7 ЕД на 1 кг массы тела). У всех больных СД типа 1 оценивали структурно-функциональный статус мембраны эритроцитов (спектральные характеристики взаимодействия липотропного зонда пирена с мембраной эритроцитов и активность Na⁺,K⁺-АТФазы); у 62% обследованных лиц исследовали мембраны тромбоцитов флюорофором пиреном, оценивали активность Na⁺,K⁺-АТФазы в мембране тромбоцитов и агрегационную активность кровяных пластинок; у 51% больных оценивали морфологические свойства эритроцитов и их агрегационную активность.

Материалом исследования являлась венозная кровь, стабилизированная гепарином (25 ЕД/мл) или 3,8%-м раствором цитрата натрия (9 : 1), и капиллярная кровь.

Мембраны эритроцитов выделяли путем гипосмотического гемолиза [21]. Выделение тромбоцитов осуществляли по методу К.В. Чурина и соавт. [19].

В мембранной суспензии микробиуретовым методом определяли содержание белка. Проводили флюоресцентное зондирование эритроцитарных и тромбоцитарных мембран флюорофором пиреном («Sigma», США). Взаимодействие мембран с флюоресцентным зондом регистрировали на спектрофлюориметре «Hitachi-MPF-4» (Япония). Микровязкость липидной фазы мембраны эритроцитов и тромбоцитов оценивали по степени эксимеризации пирена, мигрирующего в их гидрофобном компартменте, в среде следующего состава: NaCl – 145 ммоль, трис-HCl – 10 ммоль (pH = 7,4). Раствор пирена (растворитель – этанол) добавляли в кювету с мембранами красных клеток крови и тромбоцитов (содержание белка – 0,3 мг/мл) до конечной концен-

трации 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

$$\lambda_b = 285$$

и 340 нм соответственно, а также I_{370}/I_{390} при $\lambda_b = 340$ нм для оценки полярности окружения молекул пирена [5]. Рассчитывали показатель миграции энергии с триптофановых остатков на пирен [3].

Активность Na^+, K^+ -АТФазы в мембранах эритроцитов и тромбоцитов определяли методом А.М. Казеннова и соавт. [9] по нарастанию содержания неорганического фосфора P_i в инкубационной среде следующего состава, ммоль: $\text{NaCl} - 125$, $\text{KCl} - 25$, $\text{MgCl}_2 - 3$, ЭДТА - 0,5, АТФ - 2, трис- $\text{HCl} - 50$ (рН = 7,4). Инкубацию проводили при температуре 37 °С в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением 20%-й 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) с добавлением 125 ммоль KCl .

Поверхностную архитектуру эритроцитов оценивали методом сканирующей электронной микроскопии. Образцы периферической крови подвергали двойной фиксации и дегидратации по методике Г.И. Козинца, Ю.А. Симоварта [10]. Препараты изучали в сканирующем электронном микроскопе РЭМ-200 (Украина) при ускоряющем напряжении 35 кВ, силе тока 0,63 А, под углом наклона 35°. В каждом препарате подсчитывали 1 000 эритроцитов, определяя количественное содержание их морфологических форм по классификации Г.И. Козинца, Ю.А. Симоварта [10] и Б.В. Ионова, А.М. Чернуха [8].

Особенности обратимой агрегации эритроцитов оценивали с использованием фотометрического способа, основанного на свойстве крови изменять свою оптическую плотность в зависимости от степени агрегированности эритроцитов [18]. Измеряя интенсивность света, проходящего через пробу крови, с одновременной регистраци-

ей величины механического воздействия, разрушающего агрегаты клеток, определяли показатели обратимой агрегации эритроцитов, характеризующие: минимальную механическую прочность агрегатов U_0 , В; максимальную механическую прочность агрегатов U_d , В; полупериод спонтанной агрегации эритроцитов τ , с; амплитуду фотометрического сигнала A , мм, характеризующего количество клеток, участвующих в процессе обратимой агрегации. На основании измеренных показателей рассчитывали индекс агрегации $Ja = U_d/\tau$, усл. ед., характеризующий соотношение агрегационных и дезагрегационных процессов, а также коэффициент агрегации эритроцитов, усл. ед., по формуле $K = U_0 \cdot U_d \cdot A/\tau$.

Агрегационные свойства тромбоцитов оценивали при помощи анализатора агрегации тромбоцитов AMS-600 (Белоруссия). В качестве индуктора агрегации тромбоцитов был использован адреналин. При постановке адреналин-индуцированной агрегации к 0,45 мл богатой тромбоцитами плазмы добавляли 0,05 мл стандартизованного раствора адреналина. Регистрировали показатели: степень агрегации, %, время агрегации, с, и количество тромбоцитов.

Достоверность различий показателей между сравниваемыми группами устанавливали с помощью непараметрического U -критерия Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводили по методу Спирмена. Кластеризацию результатов исследования выполняли по методу К-средних. Критический уровень значимости p при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Анализ клинико-лабораторных показателей обследованных больных СД типа 1 показал, что наибольший стаж заболевания (в среднем $16,9 \pm 1,0$) года) отмечался у пациентов второй клинической группы, имевших II и III стадии диабетической ретинопатии и (или) нефропатии, по сравнению с пациентами, входящими в группу больных с начальными стадиями сосудистых осложнений ($11,3 \pm 1,5$) года, $p < 0,001$), и пациентами, не имевшими диабетических микроангиопатий ($3,1 \pm 0,6$) года, $p < 0,001$). Дебют заболе-

вания во второй клинической группе наступал в более раннем возрасте, в среднем составив $(16,0 \pm 1,7)$ года, по сравнению с больными первой группы $((22,2 \pm 2,0)$ года, $p < 0,01$) и пациентами группы сравнения $((28,1 \pm 1,7)$ года, $p < 0,001$).

У обследованных больных второй клинической группы отмечался более высокий уровень HbA1c $((10,3 \pm 0,5)\%)$ по сравнению со значениями в группе с начальными стадиями сосудистых осложнений $((8,7 \pm 0,4)\%, p < 0,05)$ и в группе больных без диабетических микроангиопатий $((6,4 \pm 0,2)\%, p < 0,001)$.

Больные СД типа 1 с сосудистыми осложнениями в зависимости от фазы компенсации угле-

водного обмена были разделены на две подгруппы (табл. 1). При этом у пациентов с I стадией диабетической ретинопатии и (или) нефропатии, находившихся в фазе декомпенсации углеводного обмена, отмечался меньший стаж заболевания $((9,1 \pm 1,7)$ года) по сравнению с таковым у обследованных в фазу субкомпенсации углеводного обмена $((13,4 \pm 2,4)$ года). У больных со II и III стадиями сосудистых осложнений в фазе декомпенсации средний стаж заболевания также оказался меньше $((15,7 \pm 1,2)$ года), чем у обследованных в фазу субкомпенсации $((18,5 \pm 1,8)$ года). Полученные данные свидетельствовали о более быстром развитии сосудистых осложнений у пациентов с СД типа 1 при длительной декомпенсации и неудовлетворительном самоконтроле за состоянием углеводного обмена.

Таблица 1

Клинико-лабораторная характеристика обследованных больных с СД типа 1 ($X \pm m$)

Показатель	Больные СД				
	без сосудистых осложнений (n = 22)	с I стадией диабетической ретинопатии и (или) нефропатии		со II и III стадиями диабетической ретинопатии и (или) нефропатии	
		HbA1c, %			
		7,0–7,5 (n = 15)	> 7,5 (n = 15)	7,0–7,5 (n = 16)	> 7,5 (n = 24)
Стаж СД типа 1, лет	$3,1 \pm 0,6$	$13,4 \pm 2,4^*$	$9,1 \pm 1,7^*$	$18,5 \pm 1,8^*$	$15,7 \pm 1,2^{\vee}$
Дебют СД типа 1, лет	$28,1 \pm 1,7$	$25,2 \pm 2,9$	$19,3 \pm 2,6^*$	$16,4 \pm 2,6^{\#}$	$15,7 \pm 2,3^*$
Уровень HbA1c, %	$6,4 \pm 0,2$	$7,3 \pm 0,1^*$	$10,0 \pm 0,5^{\#}$	$7,8 \pm 0,3^*$	$12,8 \pm 0,6^{\vee \times}$
Уровень глюкозы натощак, ммоль/л	$6,2 \pm 0,3$	$7,9 \pm 0,2^*$	$11,8 \pm 0,6^{\#}$	$7,9 \pm 0,3^*$	$12,8 \pm 0,4^{\vee \times}$
Инсулинотерапия, ЕД на 1 кг массы тела	$0,57 \pm 0,05$	$0,62 \pm 0,03$	$0,60 \pm 0,04$	$0,64 \pm 0,04$	$0,77 \pm 0,13$
Общий холестерин сыворотки крови, ммоль/л	$4,8 \pm 0,2$	$5,1 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,2$
Триглицериды сыворотки крови, ммоль/л	$1,2 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1^*$	$1,6 \pm 0,1^*$
АД систолическое, мм рт. ст.	$114,8 \pm 1,5$	$125,7 \pm 3,0^*$	$122,9 \pm 3,2^*$	$137,5 \pm 5,2^*$	$153,3 \pm 6,8^{\vee \times}$
АД диастолическое, мм рт. ст.	$73,9 \pm 1,0$	$82,3 \pm 2,3^*$	$81,1 \pm 2,3^*$	$91,6 \pm 3,5^*$	$98,8 \pm 3,0^{\vee}$

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с показателями у больных СД типа 1, не имеющих сосудистых осложнений; # – $p < 0,05$ по сравнению с показателями у больных СД типа 1 с I стадией сосудистых осложнений, находящихся в фазе субкомпенсации углеводного обмена;

\vee $p < 0,05$ по сравнению с показателями у больных СД типа 1 с I стадией сосудистых осложнений, находящихся в фазе декомпенсации углеводного обмена; \times – $p < 0,05$ по сравнению с показателями у больных СД типа 1 со II и III стадиями сосудистых осложнений, находящихся в фазе субкомпенсации углеводного обмена.

Клинико-лабораторные показатели у обследованных пациентов с СД типа 1 при меньших объемах выборки достоверно не отличались от данных, представленных в табл. 1.

Ранее было показано, что при СД типа 1 имеются нарушения поверхностной архитектоники эритроцитов [11, 12], способствующие снижению деформируемости последних и нарушению функ-

циональной способности красных кровяных клеток. При этом у ригидных эритроцитов нарушается не только присущая им газотранспортирующая функция, но и замедляется их продвижение по микроциркуляторному руслу, вследствие чего возникает повышенная адгезия трансформированных эритроцитов на эндотелии, образуются микротромбы, что в конечном итоге приводит к

повышению вязкости крови и нарушению ее реологических свойств.

В ходе электронно-микроскопического исследования у пациентов с СД типа 1 были обнаружены изменения формы красных клеток крови, степень выраженности которых зависела от стадии сосудистых осложнений. У всех больных СД типа 1 выявлено отчетливое нарастание морфологической неоднородности эритроцитарного пула (табл. 2, рисунок), о чем свидетельствовало достоверное по сравнению с нормой снижение содержания двояковогнутых дискоцитов и увеличение количества переходных, предгемолитических и дегенеративных форм эритроцитов. Наиболее выраженные изменения поверхностной архитектуры эритроцитов были обнаружены у больных второй клинической группы, при этом количество переходных форм эритроцитов в 1,4 раза, предгемолитических – в 2,6 раза и дегенеративных – в 2,4 раза превосходило аналогичные показатели у здоровых доноров ($p < 0,001$). Интересным оказалось отсутствие

достоверных различий содержания морфологических форм эритроцитов у пациентов с сосудистыми осложнениями в зависимости от степени компенсации углеводного обмена.

Нарастание полиморфизма эритроцитарной популяции, появление в крови трансформированных красных клеток является не случайным фактором, а отражением нарушений структуры и метаболизма эритроцита [11]. Поддержание оптимальной формы эритроцита в виде двояковогнутого диска, обеспечивающей адекватное участие клетки в газообмене, достигается прежде всего стабильностью состояния катионтранспортных систем клеток и сбалансированностью молекулярной организации белковых и липидных компонентов мембраны эритроцита [22].

Учитывая важную роль структурных свойств плазматических мембран клеток крови в определении их функционального статуса, было проведено флюоресцентное зондирование мембран эритроцитов и тромбоцитов.

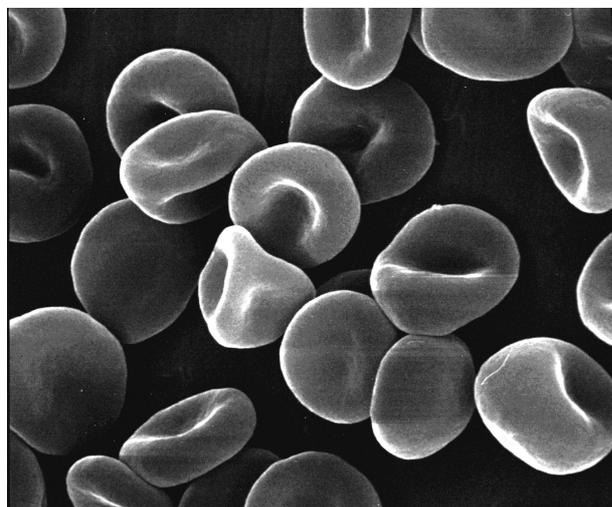
Таблица 2

Морфологическая характеристика эритроцитов периферической крови у больных СД типа 1 (по данным сканирующей электронной микроскопии) ($X \pm m$), %

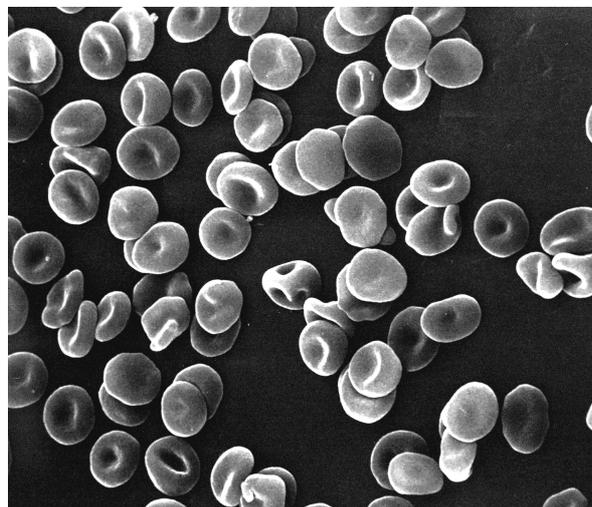
Морфологические формы эритроцитов	Здоровые доноры (n = 12)	Больные СД				
		без сосудистых осложнений (n = 10)	с I стадией диабетической ретинопатии и (или) нефропатии		со II и III стадиями диабетической ретинопатии и (или) нефропатии	
			HbA1c, %			
			7,0–7,5 (n = 8)	> 7,5 (n = 9)	7,0–7,5 (n = 8)	> 7,5 (n = 12)
Нормальные двояковогнутые дискоциты	87,49 ± 0,23	82,10 ± 0,43*	81,10 ± 0,31*	80,71 ± 0,41*	78,96 ± 0,21**	78,83 ± 0,25**v
Обратимо трансформированные эритроциты:						
эллипсы	9,75 ± 0,15	12,13 ± 0,26*	12,58 ± 0,21*	12,86 ± 0,20*	13,96 ± 0,18**	13,99 ± 0,20**v
плоские диски	0,31 ± 0,07	1,01 ± 0,07*	0,96 ± 0,08*	0,97 ± 0,08*	1,14 ± 0,06*	1,10 ± 0,05*
дискоциты с выростом	0,42 ± 0,04	0,98 ± 0,07*	0,93 ± 0,11*	1,07 ± 0,09*	1,18 ± 0,11*	1,28 ± 0,04**v
дискоциты с гребнем	3,75 ± 0,05	4,11 ± 0,09*	4,34 ± 0,17*	4,11 ± 0,09*	4,53 ± 1,11**	4,45 ± 0,12**
дискоциты с множественными выростами	4,68 ± 0,11	4,72 ± 0,09	4,98 ± 0,06	5,12 ± 0,19	5,39 ± 0,13**	5,49 ± 0,13**
эритроциты в виде тутовой ягоды	0,47 ± 0,05	1,21 ± 0,04*	1,26 ± 0,04*	1,32 ± 0,07*	1,51 ± 0,05**	1,45 ± 0,02**
Необратимо трансформированные эритроциты:						
куполообразные	0,17 ± 0,03	0,15 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,23 ± 0,03**	0,22 ± 0,02
сферические	2,43 ± 0,10	5,21 ± 0,18*	5,65 ± 0,11*	5,74 ± 0,21*	6,34 ± 0,08**	6,38 ± 0,09**v
в виде спущенного мяча	0,86 ± 0,07	1,93 ± 0,08*	2,18 ± 0,05**	2,20 ± 0,07**	2,44 ± 0,04**	2,43 ± 0,05**v
	1,22 ± 0,04	2,23 ± 0,09*	2,31 ± 0,07*	2,38 ± 0,07*	2,63 ± 0,06**	2,67 ± 0,05**v
	0,36 ± 0,03	1,05 ± 0,03*	1,16 ± 0,05*	1,17 ± 0,11*	1,28 ± 0,05**	1,30 ± 0,04**
Дегенеративные формы	0,33 ± 0,04	0,56 ± 0,03*	0,68 ± 0,04**	0,69 ± 0,06*	0,74 ± 0,04**	0,79 ± 0,05**

Примечание. Здесь и в табл. 3 и 4: * – $p < 0,05$ по сравнению с показателями у здоровых доноров; * – $p < 0,05$ по сравнению с показателями у больных СД типа 1 без сосудистых осложнений; # – $p < 0,05$ по сравнению с показателями у больных СД

типа 1 с I стадией сосудистых осложнений, находящихся в фазе субкомпенсации углеводного обмена; \checkmark – $p < 0,05$ по сравнению с показателями у больных СД типа 1 с I стадией сосудистых осложнений, находящихся в фазе декомпенсации углеводного обмена; \times – $p < 0,05$ по сравнению с показателями у больных СД типа 1 со II и III стадиями сосудистых осложнений, находящихся в фазе субкомпенсации углеводного обмена.



а



б

Электроннограммы эритроцитов периферической крови у больных сахарным диабетом типа 1 с различными стадиями сосудистых осложнений:

а – с I стадией диабетической ретинопатии и нефропатии (сканирующая электронная микроскопия – ув. 5000); б – с III стадией диабетической ретинопатии и II стадией диабетической нефропатии (сканирующая электронная микроскопия – ув. 2000). Среди двояковогнутых видны дискоциты с одним выростом, с множественными выростами, с гребнем, куполообразные, сферические эритроциты, эритроциты спущенного мяча и дегенеративно измененные клетки

Степень эксимеризации неполярного зонда пирена, диффундирующего в гидрофобном компартменте мембраны, характеризует подвижность углеводородных цепей липидов, что позволяет использовать данный параметр для исследования микровязкостных свойств липидной фазы мембраны [5]. Кроме того, определение степени эксимеризации пирена при $\lambda_{\text{в}} = 340$ и 285 нм дает возможность дифференцированно оценивать молекулярные особенности упорядоченности интегрального липидного бислоя и анулярной липидной фракции соответственно [3]. У пациентов с СД типа 1 второй группы было выявлено значительное снижение (по сравнению с подобными величинами у больных группы сравнения и здоровых лиц ($p < 0,01$)) 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 мембранах эритроцитов и тромбоцитов. Наиболее выраженное снижение средних значений степени эксимеризации

пирена (I_{470}/I_{370}) при $\lambda_{\text{в}} = 285$ и 340 нм по сравнению с аналогичными показателями у здоровых лиц ($p < 0,05$) отмечалось у больных второй группы, находившихся в фазе декомпенсации (при $\lambda_{\text{в}} = 285$ нм на 33% в мембране эритроцитов и на 26% в мембране тромбоцитов, при $\lambda_{\text{в}} = 340$ нм на 26 и 20% в мембранах эритроцитов и тромбоцитов соответственно) (табл. 3). Увеличение микровязкости липидного матрикса мембраны может быть причиной нарушений латеральной диффузии белковых и липидных молекул, трансмембранного флип-флоп-переноса липидов [20]. У пациентов с СД типа 1 без сосудистых осложнений выраженных изменений структуры мембран эритроцитов и тромбоцитов не выявлено.

Результатом структурной модификации липидного компонента клеточных мембран является изменение конформации встроенных в них белков [4, 6]. Активность и свойства транспортных АТФаз плазматических мембран в значительной степени определяются структурными особенностями липидного матрикса, в который погружены молекулы

фермента [13]. Исходя из этих позиций, была проведена оценка активности мембранассоциированного ионтранспортирующего энзима Na^+, K^+ -АТФазы. В мембране эритроцитов выявлено снижение активности Na^+, K^+ -АТФазы у больных СД типа 1, имевших сосудистые осложнения, по сравнению с таковой у лиц контрольной группы. В мембране тромбоцитов угнетение указанной транспортной

АТФазы отмечалось у всех больных. Наиболее выраженное угнетение активности фермента в мембранах клеток крови по сравнению со значением аналогичного показателя у здоровых доноров обнаружено у пациентов второй клинической группы с декомпенсацией углеводного обмена (в 1,5 раза в мембране эритроцитов и в 1,9 раза в мембране тромбоцитов) ($p < 0,001$) (табл. 3).

Таблица 3

Результаты исследования структурных свойств и активности Na^+, K^+ -АТФазы в мембранах эритроцитов и тромбоцитов у больных СД типа 1 ($X \pm m$)

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	
			HbA1c, %			
			7,0–7,5	> 7,5	7,0–7,5	> 7,5
В мембране эритроцитов						
	<i>n</i> = 20	<i>n</i> = 22	<i>n</i> = 15	<i>n</i> = 15	<i>n</i> = 16	<i>n</i> = 24
Параметры флуоресценции, 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**v
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**v
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, мкмоль $\text{P}_i/\text{ч} \cdot \text{мг}$ 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**v

Окончание табл. 3

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	
			HbA1c, %			
			7,0–7,5	> 7,5	7,0–7,5	> 7,5
В мембране тромбоцитов						
	<i>n</i> = 25	<i>n</i> = 12	<i>n</i> = 9	<i>n</i> = 7	<i>n</i> = 14	<i>n</i> = 15
Параметры флуоресценции, усл. ед.						
I_{470}/I_{370} ($\lambda_{в} = 285$ нм)	0,324 ± 0,015	0,314 ± 0,010	0,314 ± 0,011	0,316 ± 0,013	0,248 ± 0,014**#	0,240 ± 0,015**v
I_{470}/I_{370} ($\lambda_{в} = 340$ нм)	0,676 ± 0,023	0,685 ± 0,012	0,648 ± 0,027*	0,664 ± 0,020	0,587 ± 0,020**#	0,540 ± 0,022**v
I_{370}/I_{390} ($\lambda_{в} = 340$ нм)	1,020 ± 0,007	1,024 ± 0,005	1,018 ± 0,005	1,035 ± 0,009	1,033 ± 0,006	1,040 ± 0,006
Величина миграции энергии с триптофана на пирен, %	28,84 ± 1,70	28,28 ± 1,84	26,86 ± 1,89	28,89 ± 3,12	28,67 ± 1,68	27,21 ± 2,61
Na^+, K^+ -АТФаза, мкмоль $\text{P}_i/\text{ч} \cdot \text{мг}$ белка	0,112 ± 0,004	0,099 ± 0,004*	0,090 ± 0,003*	0,090 ± 0,006*	0,067 ± 0,003**v	0,060 ± 0,003**v

Таблица 4

Результаты исследования агрегационной активности эритроцитов и тромбоцитов у больных СД типа 1 ($X \pm m$)

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	
			HbA1c, %			
			7,0–7,5	> 7,5	7,0–7,5	> 7,5
Обратимая агрегация эритроцитов						
	<i>n</i> = 15	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 9	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 12
U ₀ , 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** vx
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** vx
A, 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** vx
Ja, 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** vx
K, усл. ед.	1632,10 ± 110,60	1711,60 ± 213,00	2297,60 ± 350,90*	6314,00 ± 551,2** #	5568,10 ± 487,00** #	12146,00 ± 900,65** vx
Обратимая агрегация тромбоцитов						
	<i>n</i> = 20	<i>n</i> = 12	<i>n</i> = 9	<i>n</i> = 7	<i>n</i> = 14	<i>n</i> = 15
Количество тромбоцитов, тыс./мкл	296,20 ± 9,00	282,40 ± 14,80	301,70 ± 12,90	290,40 ± 12,60	253,90 ± 12,20**	246,90 ± 12,60**
Степень агрегации тромбоцитов, %	82,52 ± 4,35	80,73 ± 2,56	76,84 ± 2,79	70,21 ± 5,94	81,79 ± 4,02	93,17 ± 4,56 ^v
Время агрегации тромбоцитов, мин	8,87 ± 0,16	8,80 ± 0,19	8,96 ± 0,13	8,75 ± 0,26	9,18 ± 0,17	9,02 ± 0,17

Выраженные изменения молекулярной организации мембран эритроцитов и тромбоцитов закономерно приводят к нарушению их функциональных свойств, в частности агрегационной активности [14, 16].

Как показало проведенное исследование обратимой агрегации эритроцитов (табл. 4), наиболее выраженные изменения ее показателей были выявлены у больных СД типа 1 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. Проведенное

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

При исследовании состояния сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза обнаружено снижение количества тромбоцитов у больных СД типа 1 со II и III стадиями сосудистых осложнений, но статистически достоверных изменений агрегационного потенциала тромбоцитов по сравнению с таковыми показателями у здоровых доноров выявлено не было. В связи с получением неоднородных показателей степени агрегации тромбоцитов у пациентов с СД типа 1 был проведен кластерный анализ имеющихся данных с использованием метода К-средних. В состав кластера со средними значениями степени агрегации были включены 27 больных СД типа 1 (средний уровень

показателя степени агрегации составил ($79,04 \pm 0,98\%$). При этом 70% из них находились в стадии компенсации и субкомпенсации углеводного обмена. В кластере с повышенным средним показателем степени агрегации ($(101,83 \pm 1,86\%)$), включающем 17 пациентов с СД типа 1, 59% пациентов находились в фазе декомпенсации углеводного обмена (средний уровень HbA_{1c} составлял $(9,9 \pm 0,8\%)$). У обследованных, входящих в данный кластер, отмечались наибольший стаж заболевания ($(15,5 \pm 1,6)$ года) и наиболее выраженная структурная дестабилизация мембраны тромбоцитов, угнетение активности ионтранспортирующего энзима Na⁺,K⁺-АТФазы, а также снижение общего количества тромбоцитов.

Поскольку состояние мембран эритроцитов и тромбоцитов определяет их микрореологические особенности, обнаруженные изменения молекулярной организации мембраны эритроцитарных и тромбоцитарных клеток можно рассматривать в качестве патогенетического звена развития микроангиопатий при СД типа 1. Этот факт следует учитывать при выборе патогенетически обоснованной терапии диабетических ангиопатий, направленной на стабилизацию структурно-функциональных свойств мембран эритроцитов и тромбоцитов.

Выводы

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

2. У пациентов СД типа 1 нарушения поверхностной архитектоники эритроцитов периферической крови (сокращение численности популяции функционально полноценных двояковогнутых эритроцитов, увеличение количества переходных, гемолитических и дегенеративно измененных форм эритроцитов) коррелируют со степенью выраженности сосудистых осложнений.

3. Структурные и функциональные изменения мембран красных кровяных клеток крови и тромбоцитов у больных СД типа 1 с диабетическими

микроангиопатиями имеют однонаправленный характер нарушений (возрастание микровязкости липидной фазы, угнетение активности ионтранспортирующего энзима Na⁺,K⁺-АТФазы), при этом нарушения микровязкостных характеристик мембран более выражены при декомпенсации углеводного обмена.

4. При СД типа 1 усилена агрегационная способность эритроцитов, нарастающая по мере прогрессирования диабетической нефропатии и (или) ретинопатии; изменения агрегационных характеристик эритроцитов наиболее выражены в фазу декомпенсации. Усиление агрегационной способности тромбоцитов отмечалось у больных СД типа 1 с длительным стажем заболевания.

Литература

1. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. 2-е изд., доп. М.: Ньюдиамед, 2001. 296 с.
2. Болдырев А.А. Введение в биомембранологию. М.: Изд-во МГУ, 1990. 208 с.
3. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980. 320 с.
4. Геннис Р. Биомембраны: молекулярная структура и функции. М.: Мир, 1997. 624 с.
5. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеидов. М.: Наука, 1989. 277 с.
6. Древаль В.И. Изменения липидного и белкового компонентов плазматических мембран при перекисном окислении липидов // Биохимия. 1986. Т. 51. № 9. С. 1562–1569.
7. Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. Казань: Фэн, 2000. 364 с.
8. Ионов Б.В., Чернух А.М. Морфологическая характеристика эритроцитов артериальной и венозной крови крысы по данным сканирующей электронной микроскопии // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. 1981. Т. 92. № 12. С. 749–751.
9. Казеннов А.М., Маслова М.Н., Шалабодов А.Д. Исследование активности Na⁺,K⁺-АТФазы в эритроцитах млекопитающих // Биохимия. 1984. № 7. С. 1089–1094.
10. Козинец Г.И., Симоварт Ю.А. Поверхностная архитектоника клеток периферической крови в норме и при заболеваниях системы крови. Таллин: Валгус, 1984. 116 с.
11. Колосова М.В. Общие закономерности и механизмы нарушений периферического звена эритрона при типовых патологических процессах в клинике детских болезней: Дис. ... д-ра мед. наук. Томск, 1999. 468 с.
12. Кравец Е.Б., Яковлева Н.М., Рязанцева Н.В. Осо-

Кравец Е.Б., Рязанцева Н.В., Яковлева Н.М. и др. Молекулярные нарушения мембран эритроцитов и тромбоцитов...

- бенности микрореологических свойств эритроцитов при сосудистых осложнениях сахарного диабета типа 1 // Сахарный диабет. 2005. № 1. С. 14–17.
13. Мацкевич Ю.А., Казеннов А.М., Маслова М.Н. Активность транспортных АТФаз и некоторые характеристики белково-липидного состава мембран безъядерных эритроцитов ряда млекопитающих // Эволюц. биохимия и физиология. 1994. № 4. С. 497–504.
 14. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2004. 202 с.
 15. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. и др. Атлас. Клинический патоморфоз эритроцита. Томск: Изд-во Том. ун-та; М.: ИД «ГЭОТАР-МЕД», 2003. 208 с.
 16. Петрищев Н.Н., Папаян Л.П. Гемостаз. Физиологические механизмы, принципы диагностики основных форм геморрагических заболеваний. СПб.: Изд-во СПбГМУ, 1999. 117 с.
 17. Тромбоциты (состав, функции, биомедицинское значение) / А.Ш. Бышевский, С.Л. Галян, И.А. Дементьева и др. Тюмень.: Изд-во Тюм. мед. акад., 1996. 244 с.
 18. Тухватулин Р.Т. Адаптивные изменения обратимой агрегации эритроцитов: Дис. ... д-ра биол. наук. Томск, 1996. 214 с.
 19. Чурин К.В., Янушкина Т.С., Кузнецов С.Р. Метод выделения тромбоцитов // Терапевт. арх. 1991. № 6. С. 91–96.
 20. Catania A., Caimi G. The erythrocyte membrane: the interrelations between lipids, proteins and the dynamic properties // Minerva Med. 1992. № 83. P. 187–192.
 21. 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. V. 100. № 1. P. 119–130.
 22. Gimsa J. A possible molecular mechanism governing human erythrocyte shape // Biophys. J. 1998. V. 75. № 1. P. 568–569.
 23. Heude B. Cognitive decline and fatty acid composition of erythrocyte membranes // Amer. J. Clin. Nutrition. 2003. V. 77. № 4. P. 803–808.
 24. Martin-Gallan P., Carrascosa A., Gussinye M., Dominguez C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications // Free Rad. Biol. Med. 2003. V. 34. № 12. P. 1563–1574.

Поступила в редакцию 30.01.2006 г.