



МЕДИЦИНСКИЕ НАУКИ

НАНОИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ С НАРУШЕННЫМ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫМ СОСТОЯНИЕМ В НОРМЕ И ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА

Т. П. Бондарь, О. И. Запарожцева, Е. А. Мельченко, А. А. Солдатов, А. Б. Эльканова

NANORESEARCH SURFACES OF MEMBRANES OF ERYTHROCYTES WITH BROKEN MORPHOFUNCTIONAL THE STATE IN NORM AND AT THE INSULAR DIABETES 2 TYPES

Bondar T. P., Zaparozhtseva O. I.,
Melchenko E. A., Soldatov A. A., Elkanova A. B.

Biophysical mechanisms of disturbance nanostructural the organisations of erythrocytes in the conditions of a hyperglycaemia are surveyed. It is established that the patients of a insular diabetes 2 types are characterised by lower indicators elongation, high value of indexes of transformation that testifies to disturbance of ability of erythrocytes dynamically to react to changing conditions of medium.

Ключевые слова: nanostructural the organisations of erythrocytes, hyperglycaemia, erythron, elongation, indexes of transformation.

Рассмотрены биофизические механизмы нарушения наноструктурной организации эритроцитов в условиях гипергликемии. Установлено, что больные сахарным диабетом 2 типа характеризуются более низкими показателями элонгации, высокими значениями индексов трансформации, что свидетельствует о нарушении способности эритроцитов динамично реагировать на изменяющиеся условия среды.

Ключевые слова: наноструктурная организация эритроцитов, гипергликемия, эритрон, элонгация, индексы трансформации.

УДК 577.352.3: 616.379-008.64

Эритроцит – один из важнейших носителей информации о процессах, протекающих на уровне тканевых структур организма, т. к. имеет продолжительность жизни около 120 дней, в течение которых находится в циркулирующей крови, проникает во все органы и ткани организма, где непосредственно реагирует с различными стрессорными агентами. При этом зрелые эритроциты не обладают способностью к синтезу белка, а следовательно, и к репарации повреждений клетки после воздействия токсических агентов. Несмотря на то что эритроциты периферической крови являются одной из наиболее приемлемых клеточных моделей организма, их исследование в практической медицине проводится недостаточно полно, что связано с ограниченными возможностями существующих тестов, сложностью современной аппаратуры и отсутствием интегрального подхода к трактовке полученных показателей (Козинец Г. И., Погорелов В. М., 1998).

Эритроцитарная мембрана способна адсорбировать на своей поверхности многие продукты биохимических реакций, выполняя дезинтоксикационную функцию. В то же время контакт клетки с эндотоксическими соединениями приводит к нарушению ее метаболизма, результатом чего является снижение жизнеспособности, изменение количественных характеристик эритроцитов. Мембраны эритроцитов обладают сходным строением и свойствами с мембранами других клеток и биологических структур. Поэтому выявленные изменения в эритроци-



тарных мембранах являются частным проявлением мембранотропных эффектов эндотоксических агентов (Болдырев А. А., Курелла Е. Г., Павлова Т. Н., 1996; Луговская С. А., Морозова В. Т., Почтарь М. Е. и др., 2002).

Эндокринная система играет ключевую роль в поддержании гомеостаза, способствует нормальному функционированию иммунной, кроветворной, нервной систем, обеспечивает регулирование и координацию важнейших процессов жизнедеятельности. Эндокринные железы вырабатывают основные гормоны, которые попадают непосредственно в кровяной поток, вступая во взаимодействие в том числе и с клетками периферической крови – эритроцитами. Наиболее часто встречающаяся патология эндокринной системы – заболевания поджелудочной и щитовидной желез. Так, количество больных сахарным диабетом в развитых странах составляет от 4 до 10% населения, в зависимости от страны проживания, нарушения функции щитовидной железы – у 2%. Среди причин развития клинических осложнений эндокринной патологии особая роль отводится состоянию эритропоэза, снижению способности эритроцитов транспортировать кислород тканям, а также изменению реологических свойств крови и нарушению микроциркуляции в тканях.

Изменения эритроцитов у больных в условиях хронической гипергликемии нельзя рассматривать без учета особенностей влияния инсулина на эритропоэз (Congote L. F., 2005). Установлено, что инсулин стимулирует образование эритроидных колоний независимо от наличия эритропоэтина (Miyagawa S., 2000). Усиление эритропоэза в условиях гипергликемии сопровождается увеличением в крови количества ретикулоцитов и выбросом в кровоток молодых качественно измененных эритроцитов, что указывает на напряжение эритропоэза (Гацура С. В., 2005).

Форма эритроцитов при хронической гипергликемии изменяется в зависимости от степени ее компенсации. Так, морфологические нарушения эритроцитов наблюдаются при обоих типах сахарного диабета, а про-

должительность их жизни уменьшается более чем на 13%. Неферментативное гликирование белков эритроцитарных мембран – один из путей реализации глюкозотоксичности, что приводит к их необратимой структурно-функциональной модификации, а также снижает устойчивость и деформируемость клеток, увеличивает их хрупкость, изменяет агрегацию (Салтыков Б. Б., 2002; Lindmark K., 2002).

Установлено, что нарушения эритроцитов, развивающиеся вследствие абсолютной или относительной инсулиновой недостаточности, значительно затрудняют их функционирование. Таким образом, нарушения морфофункционального состояния эритроцитов в условиях длительной гипергликемии более выражены при развитии ее декомпенсации, что впоследствии ведет к количественным и качественным нарушениям периферического звена эритрона.

Способность эритроцитов к обратимым изменениям размеров и формы названа деформабельностью. Деформабельность эритроцитов может изменяться при различных заболеваниях: бронхиальной астме, сахарном диабете, наследственных аномалиях белков мембран эритроцитов (наследственный эллиптоцитоз) печени, атеросклерозе, гематогенных тромбофилиях, хронической почечной недостаточности, нарушениях перекисного окисления липидов.

В литературе встречаются разрозненные данные по изучению изменения количества и морфологии эритроцитов, строения и состояния их клеточных мембран при гипергликемии. Однако комплексного исследования морфофункционального состояния системы эритрона с изучением наностроения поверхности мембран эритроцитов и выявлением факторов риска развития гипоксических осложнений при сочетанной эндокринной патологии не описано.

Исследование биохимических и патофизиологических механизмов нарушения наноструктурной организации мембран эритроцитов решит проблему ранней диагностики развития гипоксических осложнений при сочетанной эндокринной патологии.



Целью нашего исследования явилось изучение биофизических механизмов нарушения наноструктурной организации эритроцитов в условиях гипергликемии.

Материалы и методы исследования. Всего было обследовано 44 жителя г. Ставрополя, находившихся на стационарном лечении в специализированном эндокринологическом отделении МУЗ «Городская клиническая больница № 3» с установленным клинически и подтвержденным лабораторными методами диагнозом – сахарный диабет (СД) 2 типа. Контрольную группу составили 65 практически здоровых людей, добровольно согласившихся принять участие в обследовании.

Оценка деформации эритроцитов осуществлялась с помощью метода лазерной дифрактометрии, позволяющего получать объективную информацию о свойствах эритроцитов. Нами использовался лазерный дифрактометр Rheodyn-SSD, производство фирмы Myrenne GmbH (Германия). В прибор с помощью шприца вводится образец крови, смешанной с суспензией декстрана (2 мл) 24 Ра*s. На внешнем компьютере запускают программу. Образец равномерно распределяется между двумя дисками диаметром 60 мм, вращающимся стеклянным диском (сверху) и зафиксированным полиметилметакрилатовым диском (снизу). Нижний диск имеет отверстие, через которое образец поступает в измерительную камеру (пространство между дисками), расстояние между дисками = 0,5 мм. Таким образом, прибор моделирует условия, создающиеся внутри сосудистого русла при кровотоке разной скорости. Эластичность эритроцитов измеряется по интенсивности прохождения света, расчет элонгации производится автоматически. Измерение проводится в суспензии эритроцитов при стандартизированной вязкости и изменяющемся давлении от 0,3 до 60 Ра. По результатам строится график, отражающий зависимость изменения элонгации эритроцитов от давления. В пределах значения – 0,3 Ра условия соответствуют венозному кровотоку, 0,6-6 Ра микроциркуляторному руслу, а от 12 до 60 Ра – артериальному.

Для общей оценки процесса трансформации клеток вычисляли морфологический индекс трансформации эритроцитов (ИТ), предложенный В. А. Лисовским и В. Н. Кидаловым (1986) по формуле (1):

$$\text{ИТ} = \frac{\% \text{ОД} + \% \text{НД}}{\% \text{Д}} \quad (1)$$

где % Д – процент дискоцитов, % ОД – процент обратимо деформированных эритроцитов, % НД – процент необратимо деформированных эритроцитов.

Учитывая данные литературы о том, что трансформация эритроцитов может быть обратимой, имеющей адаптивно-приспособительное значение (Бондарь Т. П., 2006; Goriunov A. S., 2006), рассчитывали еще три показателя:

Индекс обратимой трансформации (ИОТр) по формуле (2):

$$\text{ИОТр} = \frac{\% \text{ОД}}{\% \text{Д}} \quad (2)$$

Индекс необратимой трансформации (ИНОТр) по формуле (3):

$$\text{ИНОТр} = \frac{\% \text{НД}}{\% \text{Д}} \quad (3)$$

Индекс обратимости (ИО) по формуле (4):

$$\text{ИО} = \frac{\% \text{ОД}}{\% \text{НД}} \quad (4)$$

Изучение наностроения мембраны эритроцитов периферической крови пациентов, страдающих сахарным диабетом, проводилось при помощи атомно-силового микроскопа «Интегра Прима» в ИТЦКГТ «Нанотехнологии и наноматериалы» Ставропольского государственного университета.

В сканирующих зондовых микроскопах исследование микрорельефа поверхности проводится с помощью специальным образом приготовленных микрозондов. Прибор производит «ощупывание» объекта. Для исследования структуры на основе органических материалов и биологических объектов применяется колебательный (полуконтактный) метод атомно-силовой (сканирующей) микроскопии (АСМ), основанный на регистрации параметров взаимодействия колеб-



лющегося кантилевера с поверхностью (Миронов В. Л., 2005). Подвод образца осуществлялся после предварительного обнаружения эритроцита в оптическом микроскопе при увеличении $40\times 0,65$. Для помещения препарата на предметный столик, с помощью стеклореза выделяли интересующую зону 10×10 мм. Сканирование одного участка проводилось несколько раз в различных режимах с последующей обработкой изображения. Попытка установить молекулярные изменения в топологии мембраны эритроцитов, была предпринята в режиме полуконтактной резонансной атомно-силовой микроскопии, с использованием зонда NSG-20 (Binnig G., Rohrer H., 1982).

Результаты исследования и обсуждение. Метод изучения деформальности эритроцитов проводился в сочетании с проведением общего анализа крови. Достоверных различий эритроцитарных показателей полученных при автоматическом гематологическом анализе в группах не выявлено (таблица 1).

Таблица 1

Морфофункциональные показатели эритроцитов у больных сахарным диабетом 2 типа и практически здоровых обследованных

Показатели, ед. измерения	СД 2 типа, $X \pm m$	Контрольная группа, $X \pm m$
RBC, $10^{12}/l$	$4,5 \pm 0,09$	$4,7 \pm 0,17$
MCV, fl	$83,8 \pm 1,81$	$84,2 \pm 1,38$
RDW%, %	$13,6 \pm 0,34$	$15,0 \pm 0,29$
RDW _a , fl	$52,7 \pm 1,21$	$58,1 \pm 0,91$
HCT, %	$37,7 \pm 1,11$	$38,1 \pm 1,00$
HGB, g/l	$131,7 \pm 3,34$	$134,7 \pm 3,46$
MCH, pg	$28,9 \pm 0,63$	$29,6 \pm 0,57$
MCHC, g/l	$348,2 \pm 3,84$	$350,9 \pm 1,81$

Результаты статистической обработки данных полученных методом дифрактометрии представлены в таблице 2 и рисунке 1.

Таблица 2

Изменение величины элонгации эритроцитов у больных сахарным диабетом 2 типа и практически здоровых обследованных при различных значениях давления ($X \pm m$)

Давление, Pa	СД 2 типа, $X \pm m$	Контрольная группа, $X \pm m$
0,3	$1,5 \pm 0,34^*$	$2,5 \pm 0,28$
0,6	$5,5 \pm 0,57$	$6,4 \pm 0,27$
1,2	$13,5 \pm 0,79$	$14,3 \pm 0,49$
3,0	$25,4 \pm 0,79$	$27,0 \pm 0,50$
6,0	$32,9 \pm 0,75^*$	$34,7 \pm 0,47$
12,0	$38,6 \pm 0,66^{**}$	$40,6 \pm 0,44$
30,0	$42,9 \pm 0,62^{***}$	$45,9 \pm 0,43$
60,0	$43,7 \pm 0,57^{***}$	$47,4 \pm 0,55$

* — достоверность различий $P < 0,05$,
** — достоверность различий $P < 0,02$,
*** — достоверность различий $P < 0,001$.

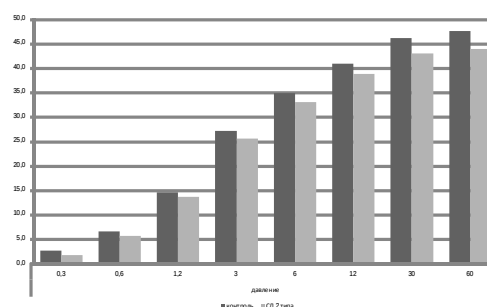


Рисунок 1. Элонгация эритроцитов при различных значениях давления

В группах различия элонгации эритроцитов отмечаются при всех значениях давления, при этом в контрольной группе – повышены, однако достоверность различий отмечается только для 0,3 Pa, 6,0 Pa, 12,0 Pa, 30,0 Pa и 60,0 Pa, что, по-видимому, может быть связано с биохимическими особенностями обмена липидов мембран эритроцитов и сосудистой стенки.

Различия морфологических эритроцитарных показателей в исследуемых группах представлены в таблице 3.



Таблица 3

**Формула эритроцитов и индексы трансформации у больных сахарным диабетом 2 типа
и практически здоровых обследованных ($X \pm m$)**

Показатели	Единицы измерения	СД 2 типа	Контрольная группа
Дискоциты	%	90,8±1,10***	97,3±0,34
Обратимо измененные Эр	%	3,9±0,59***	1,6±0,31
Необратимо измененные Эр	%	5,3±0,58***	1,1±0,17
ИТ	усл.ед.	0,101±0,007***	0,028±0,003
ИОТР	усл.ед.	0,043±0,008***	0,016±0,001
ИНОТр	усл.ед.	0,058±0,006***	0,011±0,001
ИО	усл.ед.	0,74±0,08***	1,46±0,09

*** – достоверность различий $P < 0,001$.

Исследование индексов трансформации эритроцитов в группах показало, что у больных СД 2 типа отмечается достоверное увеличение всех индексов трансформации эритроцитов, за исключением индекса обратимости эритроцитов. Последний был в два раза ниже по сравнению с контрольной группой. Исходя из полученных данных об элонгации и трансформации эритроцитов можно сделать предположение о высоком напряжении механизмов адаптации у больных сахарным диабетом 2 типа, то есть в условиях гипергликемии.

Атомно-силовая микроскопия эритроцитов позволила получить двухмерное и трехмерное изображение мембраны изучаемых клеток. При этом визуально при увеличении в 1000 раз в клеточном составе препаратов, приготовленных для сканирования, были выявлены эритроциты с измененным строением наноповерхности: выступами, выростами и углублениями. На трехмерном изображении поверхности четко выявлялись глобулы, предположительно, являющиеся частью мембранных интегральных и полуинтегральных белков, фрагментов гликокаликса. Было установлено, что у больных СД 2 типа в периферической крови отмечается

повышенное количество эритроцитов, характеризующихся низкой высотой рельефа наноповерхности клеточной мембраны.

Таким образом, проведенные нами исследования демонстрируют биофизические механизмы нарушения наноструктурной организации эритроцитов в условиях гипергликемии. Установлено, что больные СД 2 типа характеризуются более низкими показателями элонгации, высокими значениями индексов трансформации, что свидетельствует о нарушении способности эритроцитов динамично реагировать на изменяющиеся условия среды. Увеличение индекса необратимой трансформации по отношению к индексу обратимой трансформации у больных СД 2 типа свидетельствует о прогрессировании изменений цитоархитектоники эритроцитов по мере усугубления нарушений углеводного обмена. Индекс трансформации, отражающий общее количество измененных форм эритроцитов, а также содержание необратимо измененных эритроцитов, свидетельствуют о том, что мембрана клеток периферического звена эритрона у больных СД 2 типа становится жесткой, что, в свою очередь, не может не отразиться на ее наноструктурной организации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Болдырев А. А., Курелла Е. Г., Павлова Т. Н. *Биологические мембраны*. – М., 1996. – 124 с.
2. Бондарь Т. П., Запарожцева О. И., Косторнова О. С. и др. *Изучение влияния биохимического состава плазмы на размеры и форму эритроцитов при сахарном диабете и ате-*



- росклерозе // Клиническая лабораторная диагностика. – 2006. – №9. – С. 58–59.
3. Гацура С. В., Гацура В. В. Проблемы регуляции кислородтранспортной функции крови в кардиологии. – М.: Компания спутник+, 2005. – 143 с.
 4. Козинец Г. И., Погорелов В. М. Консерватизм биологических процессов – стабильность кроветворения // Клиническая лабораторная диагностика. – 1998. – №12. – С. 21–32.
 5. Лисовский В. А., Кидалов В. Н., Гуц В. В. Трансформация эритроцитов как диагностический тест в клинической практике // Лаб. дело. – 1986. – №10. – С. 594–598.
 6. Луговская С. А., Морозова В. Т., Почтарь М. Е. и др. Лабораторная гематология. – М., 2002. – 120 с.
 7. Миронов В. Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии. – М.: Изд-во «Техносфера», 2005.
 8. Салтыков Б. Б., Пауков В. С. Диабетическая микроангиопатия. – М.: Медицина, 2002. – 238 с.
 9. Binnig G., Rohrer H. Scanning tunneling microscopy // *Helv. Phys. Acta.*, – 1982, – V. 55, – pp. 726–735.
 10. Congote L. F., DiFalco M. R., Gibbs B. F. Thrombospondin 1, produced by endothelial cells under the action of erythropoietin, stimulates thymidine incorporation into erythroid cells and counteracts the inhibitory action of insulin-like growth factor binding protein 3 // *Cytokine*. – 2005. – № 5. – P. 248–253.
 11. Goriunov A. S., Borisova A. G., Rozhkov S. P. Structural changes in the erythrocyte membrane of the rainbow trout *Salmo irideus* in seasonal acclimatization // *Zh Evol Biokhim Fiziol.* – 2006. – Vol. 42. – № 5. – P. 445–449.
 12. Lindmark K., Engstrom K. G. Theoretical and experimental aspects of erythrocyte filterability testing; flow acceleration and systemic resistance // *J Biomech.* – 2002. – № 5. – P. 683–688.
 13. Miyagawa S., Kobayashi M., Konishi N. et al. Insulin and insulin-like growth factor 1 support proliferation of erythroid progenitor cells in bone marrow through the sharing of recep-

tors // *Brit. J. Haematol.* – 2000. – Vol. 109. – №3. – P. 555–562.

Об авторах

Бондарь Татьяна Петровна, ГОУ ВПО «Ставропольский государственный университет», заведующая кафедрой физико-химических основ медицины, лабораторной диагностики и фармакологии МХБФ, доктор медицинских наук, профессор. Сфера научных интересов – изучение особенностей гемопоэза, систем адаптации у здоровых людей и при патологических состояниях в условиях метаболического стресса. Автор более 250 научных работ, из них 2 монографии.
bondar@mail.ru

Запарожцева Оксана Ивановна, ГОУ ВПО «Ставропольский государственный университет», доцент кафедры физико-химических основ медицины, лабораторной диагностики и фармакологии, кандидат биологических наук. Сфера научных интересов – изучение особенностей адаптации системы крови у здоровых людей и при патологических состояниях в условиях метаболического стресса. Автор 52 научных статей.
bondar@mail.ru

Мельченко Евгений Александрович, ГОУ ВПО «Ставропольский государственный университет», старший преподаватель кафедры физико-химических основ медицины, лабораторной диагностики и фармакологии, кандидат медицинских наук, научный сотрудник ИТЦ КП «Нанотехнологии и наноматериалы». Сфера научных интересов – исследование биологических объектов методом зондовой сканирующей микроскопии при патологии. Автор 20 научных статей.
bondar@mail.ru

Солдатов Андрей Андреевич, ГОУ ВПО «Ставропольский государственный университет», студент 6 курса специальности «Медицинская биохимия» МБХФ. Сфера научных интересов – биофизические свойства эритроцитов при эндокринной патологии. Автор 6 научных статей.
bondar@mail.ru

Эльканова Айшат Борисовна, ГОУ ВПО «Ставропольский государственный университет», студентка 6 курса специальности «Медицинская биохимия» МБХФ. Сфера научных интересов – компьютерная цитоморфометрия клеток крови. Автор 5 научных статей.
bondar@mail.ru