Структурно-метаболический статус и функциональная активность клеток красной крови при лечении детей, больных сахарным диабетом 1 типа

В.В. Новицкий, М.В. Колосова, Е.Б. Кравец, Е.А. Степовая, Ю.Г. Самойлова

Сибирский государственный медицинский университет (ректор – акад. РАМН В.В. Новицкий), Томск

Сосудистые осложнения сахарного диабета (СД) – одна из основных причин инвалидизации и смертности пациентов, они клинически гетерогенны и этиологически мультифакториальны. Нарушения микроциркуляции при СД включают изменение геометрии сосудистого русла и внутрисосудистого кровотока, что способствует, в свою очередь, снижению регионарного кровотока, дистрофическим изменениям мышечного слоя сосудов, усугубляя проявление диабетических микроангиопатий [1–5]. К микроциркуляторным расстройствам при СД относят микровазодилатацию сосудов, замедление или неравномерность капиллярного кровотока, стаз крови, внутрисосудистую агрегацию форменных элементов, местный отек тканей, повреждение сосудистой стенки, микрокровоизлияния, микротромбозы, микроаневризмы в месте перехода артериальной части в венозную либо в венозной части [6]. Известно, что развитие хронической гипергликемии на фоне инсулиновой недостаточности сопровождается нарушением процессов пролиферации и дифференцировки клеток костного мозга, существенными изменениями структурно-метаболического статуса клеток красной крови и их агрегационной способности. Это наряду с активацией процессов свертывания крови, снижением активности фибринолиза и нарушениями в тромбоцитарном звене гемостаза может стать значимым фактором в формировании диабетических ангиопатий [7–10].

Целью настоящего исследования явилось изучение количественного и качественного состава липидов мембран, микровязкости липидного бислоя эритроцитов периферической крови, особенностей поверхностной архитектоники и агрегационной способности эритроцитов у детей с СД в процессе комплексной терапии.

Объем и методы исследования

Под наблюдением находилось 99 пациентов в возрасте от 5 до 15 лет с СД 1 типа и 40 здоровых детей аналогичного возраста. Среди сосудистых осложнений у детей с СД 1 типа установлены клинические проявления диабетических микроангиопатий (ретинопатия, нефропатия, микроангиопатия нижних конечностей). Детей обследовали в фазу клинико-метаболической декомпенсации без кетоацидоза, в фазу диабетического кетоацидоза, при кетоацидотической коме, при поступлении в стационар на фоне клинико-метаболической субкомпенсации после проведения традиционной терапии. Степень компенсации оценивалаи по уровню гликированного гемоглобина, гликемии натощак и постпрандиальной гликемии. Значения HbA1c (%) от 6,0 до 7,5 расценивались как компенсация углеводного обмена, от 7,5 до 8,0 – как субкомпенсация и более 8,0 – декомпенсация. Уровни гликемии натощак от 5 до 7 ммоль/л и постпрандиальной гликемии ниже 10 ммоль/л являлись критериями компенсации основного заболевания. Определение обратимой агрегации эритроцитов периферической крови проводили фотометрическим способом в микрообъемах крови [11]. Анализировали показатели, характеризующие минимальную U_0(B) и максимальную механическую прочность агрегатов эритроцитов Ud(B), полупериод агрегации τ (с) и амплитуду фотометрического сигнала – А (мм). Расчетным путем устанавливали величину индекса агрегации эритроцитов Ja=Ud/τ, отражающую соотношение агрегационных и дезагрегационных процессов, и интегральный коэффициент агрегации эритроцитов K=U_0xUdxA/τ.

Липидный экстракт мембран эритроцитов получали по методу Folch и соавт. [12]. Содержание общих липидов (ОЛ) в мембранах эритроцитов определяли методом Bloor (1947) и Bragdon (1951) [13]. Определение спектра липидов мембран эритроцитов осуществляли методом тонкослойной хроматографии. Спектр липидов мембран эритроцитов (ОФЛ-общие фосфолипиды, ХС-холестерин, ТГ-триглицериды, ЭХС-эфиры холестерина) оценивали методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Sorbfil» (Россия) в системе гептан:диэтиловый эфир:этилацетат. Содержание фракций фосфолипидов в мембранах эритроцитов (ЛФХ-лизофосфатидилхолин, ФИ-фосфатидилинозиты, СФМ-сфингомиелин, ФХ-фосфатидилхолин, ФС-фосфатидилсерин, ФЭА-фосфатидилэтаноламин, ПГФ-полиглицерофосфаты, ФК-фосфатидные кислоты) определяли в системе хлороформ:метанол:вода на пластинках «Silufol» UV

Таблица 1

Морфологическая характеристика эритроцитов периферической крови (данные сканирующей электронной микроскопии) у больных СД I типа с различными критериями компенсации углеводного обмена (X±m)

Клиническая группа	Дискоциты	Предгемолитические формы	Гемолитические формы	Дегенеративные формы
Здоровые дети	89,07±0,32	8,55±0,24	2,14±0,12	0,24±0,04
Декомпенсация до терапии				
без кетоацидоза	80,17±0,32 p<0,001	12,72±0,27 p<0,001	6,36±0,10 p<0,001	0,75±0,05 p<0,001
с кетоацидозом	79,61±0,42 p<0,001	13,73±0,31 p<0,001	6,03±0,20 p<0,001	0,63±0,04 p<0,001
Декомпенсация после терапии				
без кетоацидоза	82,76±0,29 p<0,001	11,33±0,23 p<0,001	5,13±0,12 p<0,001	0,78±0,07 p<0,001
с кетоацидозом	81,02±0,34 p<0,001	12,76±0,21 p<0,001	5,48±0,16 p<0,001	0,74±0,03 p<0,001

Примечание: p – достоверность различий по сравнению со значениями в группе контроля.

254 (Чехия) [14]. Идентификацию фракций фосфолипидов проводили с использованием стандартов фирмы «Sigma» (США) и качественных реакций. Жирнокислотный спектр фракций липидов крови [15] определяли на газожидкостном хроматографе «Tracor 540» (США). Полученные в результате газожидкостной хроматографии пики отдельных жирных кислот идентифицировали с помощью индивидуальных метиловых эфиров жирных кислот и их стандартных смесей фирмы «Sigma» (США).

Измерение собственной флуоресценции теней эритроцитов и флуоресценции зондов, находящихся в мембранах эритроцитов, проводили на спектрофлуориметре «Hitachi-MPF-4». В качестве флуорофора использовался зонд пирен («Sigma») [16].

Поверхностную архитектонику эритроцитов периферической крови оценивали методом сканирующей электронной микроскопии с изучением образцов, приготовленных по специальной методике [17], в сканирующем электронном микроскопе РЭМ-200 при ускоряющем напряжении 35 кВ, силе тока 0,63А, под углом наклона 35°. Подсчет различных морфологических форм эритроцитов проводили согласно классификации [17]. При выполнении электронограмм использованы электронные микроскопы РЭМ-200 и JEM-2000EX (Япония). Изучение ультратонких срезов эритроцитов проводили методом трансмиссионной микроскопии. Образцы для трансмиссионной микроскопии готовили по методике [18].

Впервые на каждом препарате оценивали состояние межклеточного пространства, неоднородность мембранной поверхности, наличие эндо- и экзовезикул. Для количественной характеристики обнаруженных изменений ультраструктуры эритроцитов периферической крови производили подсчет 1000 клеток от каждого обследованного. Математическую обработку результатов исследования проводили по критерию Стьюдента и непараметрическим критериям.

Результаты и обсуждение

В проведенных нами исследованиях установлено, что развитие СД у детей сопровождается снижением уровня нормальных двояковогнутых дискоцитов, повышением содержания предгемолитических и гемолитических форм клеток красной крови, нарушением ультраструктуры эритроцитов. При этом наиболее выраженные изменения в морфологическом составе клеток красной крови по данным сканирующей электронной микроскопии были выявлены у детей в состоянии кетоацидоза (табл. 1). Достижение периода клинико-метаболической субкомпенсации и проведение комплексной патогенетической терапии не сопровождалось нормализацией показателей, характеризующих поверхностную архитектонику эритроцитов.

Известно, что эхиноцитарная трансформация эритроцитов ведет к усилению их агрегации, образованию патологических агрегатов, нарушению микроциркуляции [17,19,21,26]. Образование же стоматоцитов приводит к нарушению микроциркуляции, а образование эхиноцитов – к ухудшению потока крови в крупных сосудах вследствие повышения вязкости крови [20]. Неизбежным результатом нарушений структуры и метаболизма эритроцитов является изменение их функции, в частности, агрегационных характеристик.

Анализ показателей обратимой агрегации эритроцитов (ОАЭ) периферической крови у детей с СД в фазу декомпенсации без кетоацидоза до начала терапии позволил установить наличие признаков гиперагрегации клеток красной крови. В фазу клинико-метаболической субкомпенсации после проведения комплексной терапии нормализации показателей ОАЭ отмечено не было. Показатели ОАЭ у детей, страдающих СД, в состоянии декомпенсации

Таблица 2

Показатели обратимой агрегации эритроцитов у детей с СД 1 типа в фазу декомпенсации с кетоацидозом с сосудистыми осложнениями в процессе проведения традиционной терапии (X±m)

Клиническая группа	Интегральный показатель (K)	Индекс агрегации (Ja)	Показатель минимальной прочности агрегатов (Uo,B)	Показатель максимальной прочности агрегатов (Ud, B)	Амплитуда фотометрического сигнала (A, мм)	Полупериод агрегации (t, c)
Здоровые дети	579,63±72,65	1,57±0,15	11,98±0,63	55,20±2,49	29,42±1,67	42,88±4,16
Декомпенсация с кетоацидозом до терапии						
без сосудистых осложнений	1633,50±285,16 p<0,01	4,09±0,60 p<0,001	12,32±1,23 p>0,05	88,57±7,09 p<0,001	29,75±1,51 p>0,05	24,38±2,11 p<0,001
с сосудистыми осложнениями	2490,94±553,05 p<0,001	5,09±1,002 p<0,001	15,04±1,40 p<0,05	98,12±7,63 p<0,001	32,66±1,34 p<0,05	29,89±5,48 p<0,01
Декомпенсация с кетоацидозом после терапии						
без сосудистых осложнений	1077,91±352,36 p>0,05	3,02±0,77 p<0,05	10,75±0,93 p>0,05	88,47±10,80 p<0,001	29,12±2,09 p>0,05	35,75±3,53 p>0,05
с сосудистыми осложнениями	3649,72±1895,25 p>0,05	5,53±2,03 p>0,05	14,80±3,11 p>0,05	94,74±18,99 p<0,05	33,78±1,05 p<0,0	28,93±7,32 p>0,05

Примечание: p – достоверность различий по сравнению с соответствующими значениями у здоровых детей.

с кетоацидозом, с признаками диабетических ангиопатий были более выражены (табл. 2).

Нарушение агрегационных характеристик эритроцитов и кислородного обмена, происходящее вследствие изменения состава липидного бислоя мембран эритроцитов, транслокации аминофосфолипидов из внутреннего монослоя во внешний; кластеризации фосфатидилсерина и образования мезофаз фосфатидилэтаноламина под действием ионов Ca^{2+} в сочетании со специфическим взаимодействием последних с экстрацеллюлярной частью молекулы апопротеина III являются конкретными механизмами превращения атромбогенной поверхности в тромбогенную. Изменения реологических характеристик крови в микрососудах играют важную роль в развитии различных видов патологии, в том числе и сахарного диабета. Общими патофизиологическими проявлениями микрореологических нарушений при патологии являются усиление агрегируемости эритроцитов, изменение структурирования потока крови, проявляющееся в изменении соотношения осевого потока кровяных клеток и пристеночного плазматического слоя, нарушение профиля скоростей и ориентации эритроцитов в потоке [21–23].

Проведенными исследованиями установлено, что развитие СД в фазу декомпенсации без кетоацидоза у детей характеризовалось выраженными изменениями количественных и качественных характеристик состава липидов мембран: отмечено снижение количества ОЛ до 2,57±0,11 мг/мл при 3,45±0,07 мг/мл в норме, повышение уровня фракции ТГ (p<0,001). После комплексной традиционной терапии нормализации изучаемых параметров отмечено не было: сохранялось сниженным содержание ОЛ (2,71±0,10 мг/мл; p<0,001) и фракции ФХ (18,18±1,14% при 21,78±0,87% в группе контроля; p<0,05), повышенным – содержание фракций ЛФХ (11,30±1,00% при 8,01±0,69% в норме) и ФИ (10,33±0,84% при 8,08±0,64% в контроле; p<0,05). Необходимо отметить, что течение СД в фазу декомпенсации с кетоацидозом до терапии характеризовалось достоверным снижением ОЛ до 2,69±0,10 мг/мл (p<0,001) и повышением содержания фракции ТРГ до 21,67±1,23% (p<0,001). Изменений состава фосфолипидного спектра в указанный период выявлено не было. Достижение фазы клинико-метаболической субкомпенсации не сопровождалось нормализацией изучаемых параметров.

Установлено, что развитие СД в фазу декомпенсации без кетоацидоза до начала лечения сопровождалось снижением до 10,48±1,73% (p<0,05) содержания полиненасыщенных жирных кислот (линолевой и арахидоновой) при повышении до 65,89±2,98% (p<0,05) количества насыщенных жирных кислот (пальмитиновой и стеариновой) во фракции ФХ. Для фракции ФЭА в данный период наблюдения было характерно снижение содержания полиненасыщенных жирных кислот (рис. 1, 2). В фазу клинико-метаболической субкомпенсации нормализации изучаемых параметров во фракции ФХ не отмечалось. Существенных нарушений жирнокислотного состава фракций ФХ и

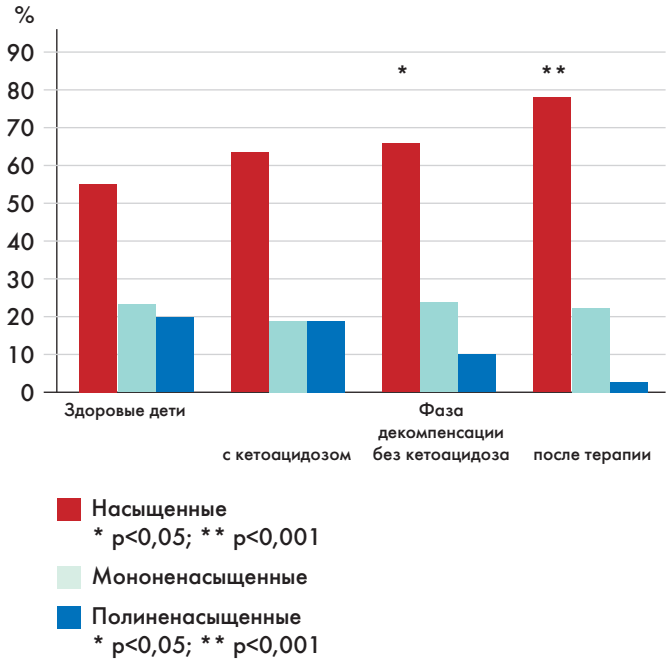


Рис. 1. Жирнокислотный состав мембран эритроцитов (фракция фосфатидилхолина) у здоровых детей и пациентов с СД 1 типа (X±m).

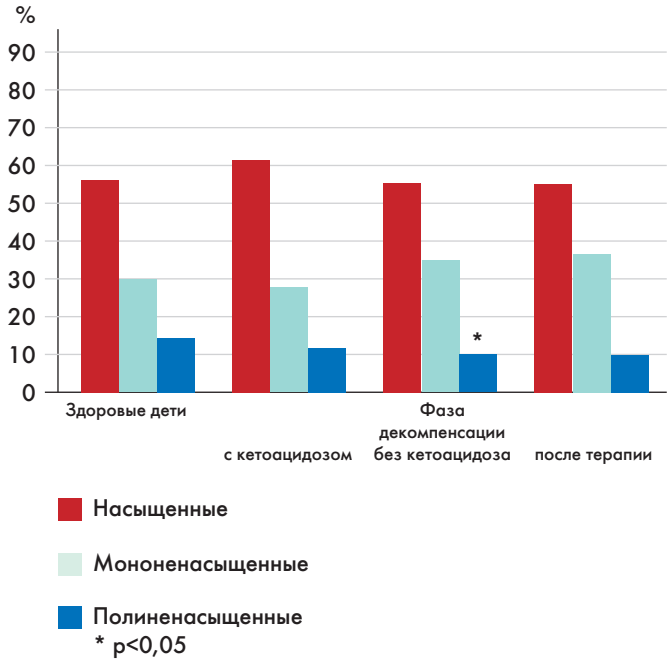


Рис. 2. Жирнокислотный состав мембран эритроцитов (фракция фосфатидилэтаноламина) у здоровых детей и пациентов с СД 1 типа (X±m).

ФЭА при СД в фазу декомпенсации с кетоацидозом отмечено не было. Известно, что изменения количественного и качественного состава липидов и жирнокислотного состава фракций фосфолипидов мембран эритроцитов неизбежно влияют на их микровязкость при СД на разных стадиях патологического процесса [9,24–26].

В нашем исследовании установлено, что соотношение интенсивности флуоресценции липотропного зонда пирен I_{370}/I_{470} при длине волны возбуждения lв=285 нм в мембранах эритроцитов периферической крови в фазу декомпенсациии без кетоацидоза до начала терапии составляло 2,20±0,12 усл. ед. ($p<0,001$) и 1,97±0,09 усл. ед ($p<0,01$), достоверно превышая аналогичные показатели в норме. При lв=340 нм отношения I_{370}/I_{470}, I_{370}/I_{390} достоверно отличались от контрольных параметров. Достижение фазы клинико-метаболической субкомпенсации в данной клинической подгруппе не сопровождалось нормализацией изучаемых характеристик. Отсутствие признаков нормализации показателей микровязкости глубоких слоев мембраны выявлено в фазу декомпенсации с кетоацидозом после комплексной терапии.

Считается, что понижение жидкостности биологических мембран нарушает параметры функционирования Na^+,K^+-АТФазы и рецепторов к инсулину, что может явиться важным патогенетическим звеном в становлении гиперлипопротеидемии, тромбообразования, сахарного диабета [10,26,27]. Наиболее же выраженные изменения биофизических характеристик липидного бислоя происходят вблизи поверхности мембран (местах локализации белков) или в примембранных областях, что согласуется с данными об изменении организации рецепторов инсулина, снижении их активности [9,28,29].

Выводы

1. Течение сахарного диабета 1 типа у детей и подростков характеризуется количественными и качественными изменениями липидного спектра мембран: повышением содержания насыщенных жирных кислот при снижении количества ненасыщенных компонентов во фракциях фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин; повышением микровязкости глубоких и модификацией наружных слоев мембран, нарушением белково-липидных взаимодействий.

2. При сахарном диабете 1 типа у детей и подростков зарегистрированы стойкие нарушения поверхностной архитектоники и ультраструктуры клеток красной крови и усиление их агрегационных параметров.

3. Наиболее выраженные изменения отмечены у пациентов в фазу декоменсации с кетоацидозом, при наличии сосудистых осложнений.

4. Традиционная комплексная терапия не приводит к нормализации изучаемых параметров, что требует поиска дополнительных мер коррекции с целью профилактики формирования и прогрессирования сосудистых осложнений при сахарном диабете 1 типа у детей и подростков.

Литература

1. Голубятникова М.А., Захарченко В.И., Ларионов С.М. Вязкость крови и ее роль в нарушении микроциркуляции у больных сахарным диабетом //Терапевт. архив.-1982.-Т.54, №2.- С.102-106.
2. Ефимов А.С., Плешанов Е.В., Гогина И.Ф. Морфофункциональные изменения эритроцитов при сахарном диабете //Пробл. эндокринологии.-1988.-Т.24,№2.- С.13-15.
3. Зыков Г.А., Суханова С.Г., Ковров К.Н. Диагностика ранних функциональных и морфологических изменений при сахарном диабете// Здравоохранение Туркменистана.-1985.-№9.-С.18-20.
4. Bertram B., Wolf S. Rheologic findings in patients with diabetic retinopathy //Fortschr. Ophtalmol.-1991.-v.88, №4.-p.321-325.
5. Dedov I.I., Gorel`sheva V.A., Romanovskaia G.A., Smirnova O.M. et all. Lipid peroxidation and antioxidant ensimatic defence in patients with newly detected insulin – dependent diabetes mellitus// Probl.Endokrinol. -1992. -V.38. -№6. -p.32-33.
6. Селиверстов Д.В., Гаусман Б.Я., Пучков К.В. Внутрисосудистое лазерное облучение крови и система микроциркуляции у больных с диабетическими ангиопатиями нижних конечностей // Новые достижения лазерной медицины: Тез. докл.-М.;СПб.,1993.- С.528-529.
7. Гемопоэз, гормоны, эволюция / В.В. Новицкий, Ю.А. Козлов, В.С. Лаврова, Н.М. Шевцова – Новосибирск; Наука, 1997.- 432 с.
8. Максимова О.В., Солун М.Н. Особенности липидного состава эритроцитарных мембран у больных сахарным диабетом //Пробл. эндокринологии.-1989.-№2.- С.14-18.
9. Максина А.Г., Микаэлян Н.П., Князев Ю.А. Исследование с помощью спин-меченных жирных кислот структурных изменений в мембранах эритроцитов при сахарном диабете //Биофизика.-1992.-Т.37, вып.2.-С.306-310.
10. Микаэлян Н.П., Князев Ю.А. Состояние цитоплазматических мембран при экспериментальном сахарном диабете. //Сахарный диабет.-1999.-№3.- С.48-51.
11. Тухватулин Р.Т. Фотометрическое исследование обратимой агрегации эритроцитов в микрообъемах крови: Автореф.дис.... канд.биол.наук.- Красноярск, 1987.- 20с.
12. Folch J., Less M., Sloane-Stanley A.G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipid from tissues //J. Biol. Chem.-1957.-v.226.-p.497-509.
13. Биохимические методы исследования в клинике (справочник)/Под ред. А.А. Покровского.-М.:Медицина, 1969.- 652с.
14. Прохорова М.И., Тупякова З.Н. Большой практикум по углеводному и липидному обмену. – Л.,1965.-220с
15. Дунаева А.Н. Определение жирнокислотного спектра фракций липидов крови //Лаб. дело.-1983.-№10.- С.57-59.
16. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран.- М.:Наука,1980.-320с
17. Козинец Г.И., Симоварт Ю.А. Поверхностная архитектоника периферической крови в норме и при некоторых заболеваниях системы крови.-Таллин, 1984.-114с.
18. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих.- М.:Мир,1975.-160с.
19. Bessis M., Mohandas N. Deformability of normal shap-altered pathological red cells //Blood Cells.-1972.-v.1, №2.-p.315-329.
20. Reinhart W.H., Chein S. Red cell reology in stomatocyte-echinocyte transformation: roles of cell geometry and cell shape //Blood.-1986.-v.67, №4.-p.1110-1118.
21. Мчедлишвили Г.И. Реологические свойства крови - важнейший фактор нарушения микроциркуляции при разных видах патологии //Первый Рос. конгр. по патофизиологии: Тез. докл.- М., 1996.- С.277.
22. Мчедлишвили Г.И. Значение проблемы микрореологии крови при патологии// Патол.физиология и эксперим.терапия.-1986.-№2.- С.3-10.
23. Мчедлишвили Г.И., Варазашвили М., Гобеджишвили М. Исследование основных параметров структурного кровотока, определяющих реологические свойства крови в микрососудах // Международная конференция по микроциркуляции. - Материалы 1997.-М.; Ярославль.- 1997.-278с.
24. Watala C. Disorders in the structure and dynamics of blood cell membranes in diabetes mellitus and their relevance to alterations in protein conformation induced by in vitro nonenzymatic glycozylation and acetylation// Annales Academia Medikal Lodzensis. - 1995.- V. 33, №3-4. -p.5-33.
25. Watala C. Diabetes mellitus alters the effect of peptide and protein ligands on membrane fluidity of blood platelets // F.K.Schttauer Verlagsgesellschaft mbH (Stuttgart). -1996. - 75(1). -147-53.
26. Текучесть мембран в биологии: Пер. с англ. /Под ред. Р. Элойа – Киев:Наукова Думка, 1989.- Т.1. Концепция мембранной структуры.-310с
27. Титов В.Н. Сложные липиды кровотока: функциональная роль и диагностическое значение (обзор литературы) //Клин. лаб. диагностика.- 1997.-№12.-с.3-10.
28. Santini M.N., Cametti C., Indovina P.L., Peterson S.W. Membrane electrical proreties associated with insulin receptor downregulation in human erythrocytes //Exp.Hematol.-1994.- v.22(1).-p.40-44.
29. Максина А.Г., Микаэлян Н.П., Дайняк Б.А., Князев Ю.А. Регистрация методом спинового зонда изменений поверхностного потенциала мембран эритроцитов крови больных инсулинозависимым сахарным диабетом //Биофизика.-1994.-Т.39, вып.3.-С.475-478.