

СТРУКТУРНО-МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА

М.Н.Стародубцева, Т.Г.Кузнецова, Н.И.Егоренков, С.Н.Черенкевич

Гомельский государственный медицинский университет

С помощью методов атомно-силовой микроскопии изучены морфология, структура цитоскелета и локальные механические свойства отдельных эритроцитов больных сахарным диабетом 2-го типа и здоровых доноров. Для больных сахарным диабетом были характерны пойкилоцитоз и анизоцитоз, пространственная реорганизация цитоскелета в виде разрежения и сгущения актин-спектриновой сети и изменение локальных механических свойств эритроцитов. Полученные результаты указывают на значительную неоднородность популяции эритроцитов больных, которая обусловлена, вероятнее всего, наличием в ней эритроцитов разных возрастных групп, что может способствовать развитию осложнений сахарного диабета типа ангиопатии.

Ключевые слова: сахарный диабет 2-го типа, эритроциты, цитоскелет, локальные механические свойства, атомно-силовая микроскопия

В патогенезе сахарного диабета (СД) важное место отводят окислительному стрессу клеток и тканей, который проявляется в значительном повышении уровня в них свободных радикалов и ПОЛ, подавляет гликолиз, синтез белков и нуклеиновых кислот, активность ферментов, способствует разобщению процессов окислительного фосфорилирования. При окислительном стрессе скорость образования свободных радикалов превышает скорость их нейтрализации антиокислительной системой организма. Окислительный стресс рассматривается не только как главный механизм развития поздних осложнений СД, но и как фактор, лежащий в основе развития самого СД. Так, у больных СД 2-го типа (СД-2) и их ближайших родственников нарушена система антиокислительной защиты клеток [3,7]. Гипергликемия способствует перепроизводству активных форм кислорода и азота, включая супероксид анион-радикал, монооксид азота и пероксинитрит. Пероксинитрит, являясь продуктом диффузионно контролируемой реакции супероксид анион-радикала и монооксида азота, характеризуется высокой химической активностью по отношению

ко всем биологически важным молекулам и обладает временем жизни, достаточным для диффузии на расстояния, сравнимые с размерами клеток. Предполагают, что пероксинитрит является одним из основных участников развития осложнений СД, в том числе ангиопатий [4,8].

Одним из звеньев развития ангиопатий является нарушение функций эритроцитов. Глюкозотоксическое действие в эритроцитах проявляется в структурных перестройках мембран эритроцитов, нарушении кислородсвязывающей способности гемоглобина, изменении механических свойств мембраны и клетки в целом. В наших предыдущих исследованиях с использованием атомно-силовой микроскопии (АСМ) показано, что воздействие пероксинитрита на эритроциты приводит к изменению структурно-механических свойств мембраны и цитоскелета, а также формы эритроцитов [1,2].

Целью работы являлось выявление методами АСМ особенностей структурно-механического состояния эритроцитов больных СД-2.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Первая группа ($n=15$; средний возраст — 58.3 ± 7.4 года) была сформирована из больных СД-2, наблюдавшихся в Областном клиническом эндокри-

Адрес для корреспонденции: marysta@mail.ru. Стародубцева М.Н.

нологическом диспансере (г. Гомель). Контрольные группы были сформированы из добровольцев старше 50 лет без диагноза СД-2 (2-я группа; $n=6$; средний возраст — 61.0 ± 6.6 года) и добровольцев младше 25 лет (3-я группа; $n=3$).

Забор капиллярной крови больных СД-2 и здоровых доноров проводили тонким капилляром с разрешения самих пациентов. Параллельно измеряли уровень сахара в крови с помощью стационарного биохимического анализатора "BIOSEN-5030". Для проведения АСМ клетки подвергали химической фиксации с помощью 1% глутарового альдегида. Эритроциты отмывали 1 раз в буферном растворе и 2 раза в дистиллированной воде. После этого эритроциты помещали на предметное стекло и высушивали.

АСМ проводили на атомно-силовом микроскопе "NT-206" ("МикроТестМашины") в контактном режиме сканирования с использованием игл типа CSC38 ("MicroMash"). Записывали топографию, карты вертикальных отклонений консоли АСМ и карты латеральных сил поверхности клеток. Для количественной оценки структуры клеточной поверхности был проведен фрактальный анализ карт латеральных сил площадью (0.5×0.5 мкм), вырезанных из карт размером 1.5×1.5 мкм с разрешением 256×256 пикселей. Фрактальную размерность (D_F) рассчитывали с использованием программы "SurfaceXplore 1.3.11" ("МикроТестМашины") методом "площадь—периметр" с делением поверхности на 200 горизонтальных слоев.

Количественную оценку механических свойств участков мембраны проводили с помощью статической силовой спектроскопии [2] на горизонтальных участках клеточной поверхности (выпуклая часть эритроцитов). Для сравнения механических свойств опытных и контрольных образцов использовали значения кажущегося модуля упругости (E) при глубине внедрения зонда приблизительно 10 нм. Данные представлены в виде относительных значений $E' = E/E_0$, где E_0 — выборочное среднее значение кажущегося модуля упругости контрольных образцов (2Д).

Сравнения выборочных характеристик проводили с использованием t критерия Стьюдента для независимых групп и критерия Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для больных СД-2 характерен полиморфизм эритроцитов (пойкilocитоз и анизоцитоз). В крови больных обнаружено 62% нормоцитоз (дискоцитоз) против 72% в крови здоровых доноров. Среди измененных форм наблюдались эритроциты

"с гребнем", сфероциты, планоциты, макроциты и микроциты (рис. 1).

Фиксация эритроцитов глутаровым альдегидом способствовала сохранению трехмерной цитоскелетной структуры клетки. Поверхность высушенной фиксированной клетки проявляла характерную двумерную сетчатую структуру, которая лучше видна на картах латеральных сил. Величины латеральных сил в каждой точке клеточной поверхности (определяемые по торсионным деформациям консоли АСМ) были обусловлены не только особенностями рельефа, но и соотношением системы мембрана—цитоскелет.

Структура цитоскелета эритроцитов больных СД-2 была изменена по сравнению со структурой цитоскелета эритроцитов доноров 2-й и 3-й групп. В эритроцитах больных СД-2 наблюдались структуры, подобные структурам эритроцитов здоровых доноров (рис. 2, а, б), ступенчатость цитоскелетной сети (рис. 2, в) и ее разрежение (рис. 2, г). Для количественной оценки структуры цитоскелета использовали фрактальную размерность карт латеральных сил (таблица).

Первая группа была разделена на 2 подгруппы в связи с выявленной неоднородностью дисперсии D_F внутри группы. Распределение стандартного отклонения D_F больных СД-2 являлось мультимодальным с явным промежуточным минимумом при $SD=0.125$. Это значение стандартного отклонения и было выбрано нами в качестве границы для двух подгрупп. Различия в дисперсии 2-й подгруппы оказались статистически значимыми по сравнению с данными 1-й подгруппы и 2-й и 3-й группами (таблица). В то же время статистически значимых различий в средних значениях D_F для всех исследуемых групп не обнаружено. Уровень сахара в крови больных СД-2 обеих подгрупп был значительно выше уровня сахара в контрольных группах.

Упругие свойства эритроцитов обусловлены, главным образом, упругими свойствами цитоскелета. Изменение структуры цитоскелета ведет к изменению упругих свойств эритроцитов. Распределение кажущихся локальных модулей упругости (E) для эритроцитов больных СД-2 имело тенденцию к увеличению среднего значения в сравнении с распределением E для эритроцитов здоровых доноров (рис. 3). Как и в случае фрактальных размерностей, наблюдались различия в дисперсиях E опытной (СД-2) и контрольной (2Д) групп. Величина E для эритроцитов больных СД-2 сильнее отклонялась от среднего значения в сторону больших и меньших значений по сравнению с E для контрольной группы. Таким образом, для эритроцитов больных

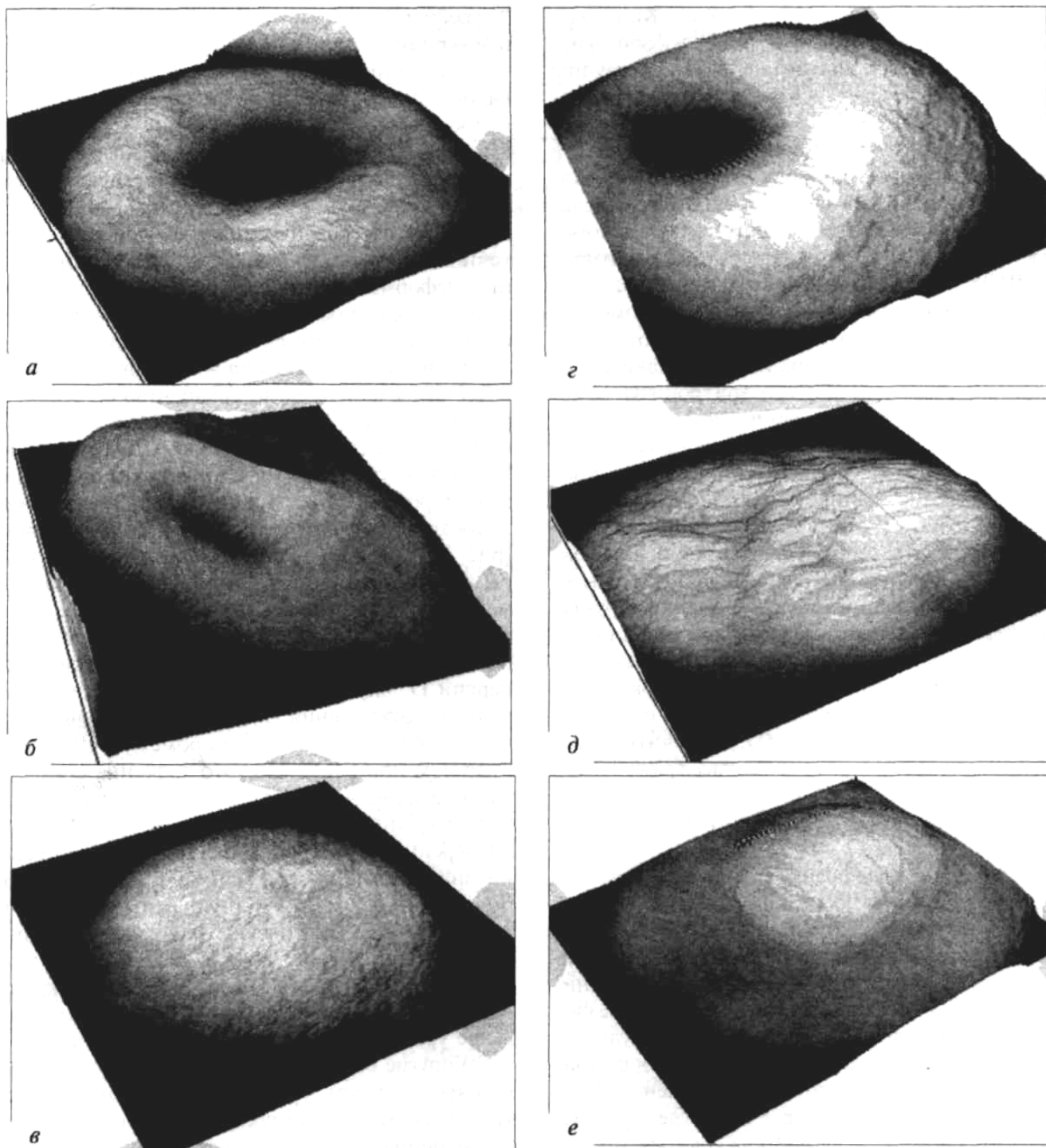


Рис. 1. Топография эритроцитов, встречающихся в крови больных СД-2.

а — дискоцит, размеры изображения 6.9×6.9 мкм; *б* — эритроцит с "ребром" (7.7×6.0 мкм); *в, г* — сфероциты разных стадий (6.7×6.7 мкм и 5.8×5.8 мкм); *д* — планоцит (9.5×9.5 мкм); *е* — мишеневидный эритроцит (6.9×5.8 мкм).

СД-2 характерна существенная неоднородность упругих свойств.

Окислительный стресс, вызванный действием пероксинитрита на эритроциты, приводит к изменению структуры мембранного цитоскелета [1]. При этом цитоскелетная сеть эритроцитов сгущается, что проявляется в увеличении D_f карт латеральных сил участков эритроцитар-

ной мембраны и локальной жесткости эритроцита. Изменения структуры цитоскелета и состава липидного бислоя, обусловленные окислительными процессами, приводят к кренированию эритроцитов.

Изучение морфологии, структурных и механических свойств эритроцитов больных СД-2 показало, что все наблюдаемые изменения не

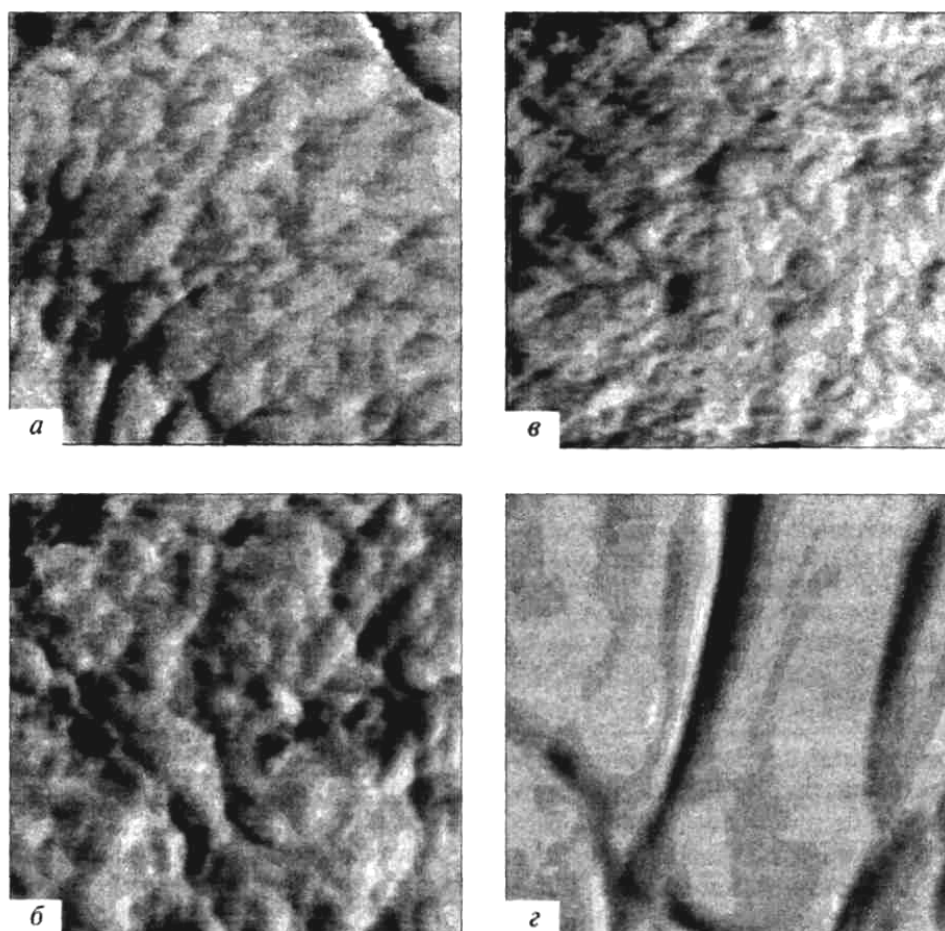


Рис. 2. Карты латеральных сил участков мембран (1×1 мкм) эритроцитов здоровых доноров 2-й группы (а) и больных СД-2 (б-г).

могут быть объяснены с позиции только окислительного стресса. Часть эритроцитов, действительно, имеет нарушенную структуру цитоскелета и проявляет повышенную жесткость, соответствующую их реакции на окислительный стресс. Другая часть эритроцитов больных характеризуется меньшими величинами D_F и кажущихся локальных модулей упругости, чем соответствующие величины у эритроцитов здоровых людей. Считается, что молодые эритроциты являются

менее жесткими, чем старые клетки [5]. С другой стороны, при СД-2 в периферическую кровь выходят в повышенном количестве незрелые формы эритроцитов (ретикулоциты). Они содержат некоторые органеллы (митохондрии, рибосомы, вакуоли и др.) и характеризуются лабильным (перестраивающимся) цитоскелетом [6,10]. Предполагают, что эти внутриклеточные структуры определяют повышенную общую жесткость ретикулоцитов при их фильтрации через узкие

Фрактальная размерность карт латеральных сил для эритроцитов и уровень сахара в крови пациентов ($M \pm m$)

Группа	D_F	SD	Объем выборки (число пациентов)	Уровень сахара в крови, ммоль/л
1-я 1-я подгруппа (SD<0.125)	2.859	0.089*	64 (5)	6.6±1.3*
2-я подгруппа (SD>0.125)	2.854	0.161	259 (10)	8.8±2.3*
2-я	2.848	0.107*	110 (6)	5.0±0.6
3-я	2.837	0.116*	56 (3)	4.6±0.6

Примечание. * $p < 0.005$ по сравнению со 2-й подгруппой 1-й группы (критерий Фишера); * $p < 0.03$ по сравнению со 2-й группой (t критерий Стьюдента для независимых выборок).

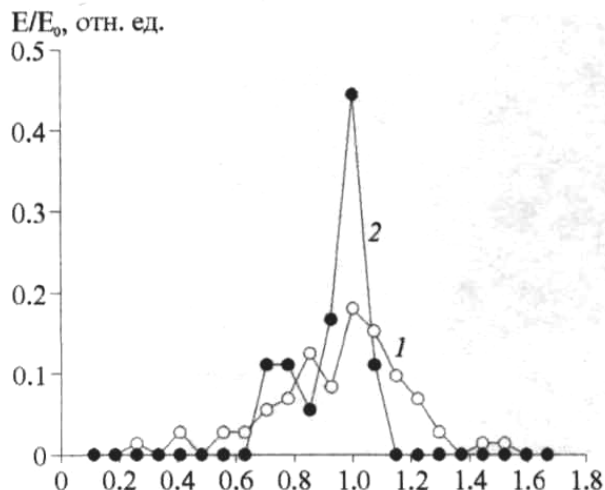


Рис. 3. Распределение относительных модулей упругости (E/E_0) эритроцитов больных (1-я группа; 1) и здоровых доноров (2-я группа; 2). E — значение кажущегося локального модуля упругости эритроцитов; E_0 — выборочное среднее значение кажущегося локального модуля упругости эритроцитов доноров 2-й группы.

поры [9]. К сожалению, нет данных о локальных механических свойствах мембраны этих клеток. Поэтому уширение плотности функции распределения структурно-механических свойств (D_F , E) в популяции эритроцитов больных СД-2 можно объяснить высоким процентным содержанием старых, молодых и незрелых форм эритроцитов. Структурно-функциональная неоднородность эритроцитарной популяции также подтверждается ярко выраженным полиморфизмом эритроцитов.

Таким образом, АСМ отдельных эритроцитов выявила более высокую, чем в контроле, вариабельность их структурно-механических свойств в популяции эритроцитов больных СД-2. Циркуляция в кровеносной системе эритроцитов с неоднородными структурно-механическими свойствами, безусловно, оказывает влияние на состояние сосудистых стенок и может являться одной из причин ангиопатий. Поэтому восстановление нормальных обратных связей эритропоэза является одним из условий успешной профилактики ангиопатий при СД-2.

Работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (грант Б07-043).

ЛИТЕРАТУРА

1. Стародубцева М.Н., Кузнецова Т.Г., Кузнецова Т.А. и др. // Пробл. здоров. экол. 2006. № 6. С. 117-122.
2. Стародубцева М.Н., Кузнецова Т.Г., Черенкевич С.Н. // Бюл. exper. биол. 2007. Т. 143, № 2. С. 222-230.
3. Ahmed F.N., Naqvi F.N., Shafiq F. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2006. Vol. 1084. P. 481-489.
4. Ceriello A. // Diabetes Care. 2003. Vol. 26, N 5. P. 1589-1596.
5. Chen X.Ya., Huang Ya.X., Lia W.J., Yuan Zh.J. // Curr. Appl. Physics. 2007. Vol. 7, Suppl. 1. P. e94-e96.
6. Koury M.J., Koury S.T., Kopsombut P., Bondurant M.C. // Blood. 2005. Vol. 105, N 5. P. 2168-2174.
7. Sathiyapriya V., Selvaraj N., Bobby Z., Agrawal A. // Diabetes Res. Clin. Pract. 2007. Vol. 78, N 2. P. 171-175.
8. Szabo C., Mabley J.G., Moeller S.M. et al. // Mol. Med. 2002. Vol. 8, N 10. P. 571-580.
9. Waugh R.E. // Blood. 1991. Vol. 78, N 11. P. 3037-3042.
10. Waugh R.E., Mantalaris A., Bauserman R.G. et al. // Ibid. 2001. Vol. 97, N 6. P. 1869-1875.

Получено 25.07.07