

Особенности микрореологических свойств эритроцитов при сосудистых осложнениях сахарного диабета типа 1

Е.Б. Кравец, Н.М. Яковлева, Н.В. Рязанцева

ГОУ ВПО «Сибирский Государственный медицинский университет»
(ректор — член-корр. РАМН проф. В.В. Новицкий) Минздрава России, Томск

Сахарный диабет (СД) типа 1 развивается преимущественно в молодом возрасте и в связи с возникновением тяжелых, прежде всего сосудистых, осложнений приводит к ранней инвалидизации пациентов в наиболее активном периоде жизни. Наибольшую угрозу представляют микрососудистые осложнения, во многом обусловленные изменениями микрореологических свойств клеток крови (в том числе эритроцитов). Проведенные в разных странах проспективные исследования (DCCT, UKDPS и др.) доказали ведущую роль постпрандиальной гипергликемии в формировании сосудистых осложнений СД. Однако молекулярные механизмы, определяющие взаимосвязь между нарушенным обменом глюкозы и развитием диабетических ангиопатий, окончательно не ясны. Известно, что состояние хронической гипергликемии на фоне инсулиновой недостаточности приводит к неэнзиматическому гликированию белков, дисрегуляции свободнорадикального окисления, интенсификации фосфолипаз в мембране эритроцитов, что вызывает нарушение структурно-функционального статуса красных кровяных клеток [1, 5, 6]. Повышенная способность эритроцитов к агрегации и уменьшение их деформируемости являются причиной нарастания вязкости крови и затруднения ее продвижения по микроциркуляторному руслу, что может иметь важное значение в развитии сосудистых осложнений.

Целью настоящего исследования явилось определение роли нарушений микрореологических свойств эритроцитов в развитии и прогрессировании сосудистых осложнений СД типа 1.

Объем и методы исследований

Обследовано 42 больных СД типа 1 (20 мужчин и 22 женщины) в возрасте от 20 до 55 лет с различными стадиями сосудистых осложнений. 1-ю группу составили 15 пациентов, имеющих начальную стадию диабетической ретинопатии и/или нефропатии; 2-ю группу — 15 больных со II и III стадиями диабетической ретинопатии и/или диабетической нефропатии. У больных учитывали степень компенсации углеводного обмена: гликемию натощак, постпрандиальную гликемию, уровень гликированного гемоглобина (HbA1c). Согласно «Стандартам сахарного диабета» (Федеральная целевая программа «Сахарный диабет», 2002), хорошим считали показатель HbA1c ниже 7,0%, удовлетворительным — от 7,0 до 7,5%, неудовлетворительным — более 7,5%.

В группу сравнения включены 12 пациентов с СД типа 1, не имеющих сосудистых осложнений. В качестве контрольной группы обследованы 12 практически здоровых лиц с нормальной то-

лерантностью к глюкозе, без наследственной предрасположенности к СД. Все пациенты обследованы в момент госпитализации на фоне проведения интенсифицированной инсулинотерапии.

Материалом исследования являлась капиллярная кровь.

Поверхностную архитектуру эритроцитов оценивали методом сканирующей электронной микроскопии. Образцы периферической крови подвергали двойной фиксации и дегидратации по методике [5]. Препараты изучали в сканирующем электронном микроскопе «РЭМ-200» при ускоряющем напряжении 35 кВ, силе тока 0,63 А, под углом наклона 35°. В каждом препарате подсчитывали 1000 эритроцитов, определяя количественное содержание их морфологических форм по классификации [2, 3].

Микрореологические параметры крови оценивали путем изучения обратимой агрегации эритроцитов с использованием фотометрического способа, основанного на свойстве крови изменять ее оптическую плотность в зависимости от степени агрегированности эритроцитов [8]. Путем измерения интенсивности света, проходящего через пробу крови, и величины механического воздействия, разрушающего агрегаты, определяли такие показатели обратимой агрегации эритроцитов как минимальную (U_0, B) и максимальную (U_d, B) прочность агрегатов красных кровяных клеток, полупериод спонтанной агрегации (τ, c) и амплитуду фотометрического сигнала ($A, мм$), характеризующую количество эритроцитов, принимающих участие в агрегации. На основании измеренных показателей рассчитывали индекс агрегации (Ja) по формуле — $Ja = U_d / \tau$, отражающий соотношение агрегационных и дезагрегационных процессов, а также интегральный коэффициент агрегации эритроцитов (K) по формуле — $K = U_0 \cdot U_d \cdot A / \tau$.

Достоверность различий показателей между сравниваемыми группами устанавливали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни (U-тест).

Результаты и их обсуждение

Клинико-лабораторная характеристика обследованных пациентов представлена в табл. 1. Все пациенты 1-й группы имели СД типа 1 средней степени тяжести. Давность диабета в данной группе составила от 10 до 14 лет, дебют заболевания отмечался в возрасте от 20 до 26 лет, средний уровень HbA1c составил $8,7 \pm 0,5\%$. Все больные 1-й группы были разделены в зависимости от компенсации углеводного обмена на 2 подгруппы: в фазе субкомпенсации — 7 человек (уровень HbA1c $7,3 \pm 0,1\%$) и в фазе декомпенсации — 8 человек (уровень HbA1c $10,1 \pm 0,6\%$, $p < 0,05$). У больных с декомпенсацией углеводного обмена дебют СД типа 1 отмечался в более раннем возрасте (от 16 до 24 лет) и длительность заболевания варьировала от 7 до 13 лет. У пациентов в фазе суб-

компенсации дебют заболевания наступил в возрасте от 20 до 30 лет, длительность заболевания составила от 10 до 18 лет. Анализируя анамнез заболевания, следует отметить, что у больных с начальными проявлениями сосудистых осложнений, находящихся в фазе декомпенсации, самоконтроль за состоянием углеводного обмена был неудовлетворительным.

У всех пациентов с сосудистыми осложнениями II и III стадии был СД типа I тяжелой степени. Давность диабета у пациентов данной группы составила от 19 до 21 года, дебют заболевания наступал в возрасте от 12 до 19 лет, средний уровень HbA1c составил $10,6 \pm 0,8\%$. Больные данной группы также были разделены в зависимости от фазы компенсации углеводного обмена на 2 подгруппы: в фазе субкомпенсации находились 6 человек, в фазе декомпенсации – 9 человек. Как видно из табл. 1, уровень HbA1c в подгруппе пациентов в фазе декомпенсации углеводного обмена был значительно выше ($p < 0,05$), чем в подгруппе больных в фазе субкомпенсации ($12,4 \pm 0,5\%$ и $7,3 \pm 0,1\%$ соответственно). В фазу декомпенсации давность СД составила от 17 до 19 лет, у пациентов с субкомпенсацией углеводного обмена – от 19 до 25 лет. У больных с выраженными стадиями сосудистых осложнений (II и III стадии диабетической ретинопатии и/или нефропатии), находящихся

ся в фазе декомпенсации, клинически определялись признаки передозировки инсулина; самоконтроль за состоянием углеводного обмена у таких пациентов был неудовлетворительным.

У больных СД I, не имеющих сосудистых осложнений, была наименьшая давность заболевания – от 3 до 6 лет. Дебют заболевания в данной группе наступал в наиболее трудоспособном возрасте – от 26 до 32 лет. Все пациенты имели СД I легкой степени и находились в компенсации углеводного обмена (уровень HbA1c $6,3 \pm 0,3\%$).

По данным анамнеза выявлены следующие закономерности в сроках возникновения поздних сосудистых осложнений. У большинства пациентов уже через 7 лет от начала СД была диагностирована I стадия диабетической ретинопатии. Прогрессирование ретинопатии отмечалось в среднем через 15 лет от начала основного заболевания. Сроки возникновения диабетической ретинопатии и ее прогрессирования не зависели от степени компенсации углеводного обмена.

Иные закономерности были определены при анализе сроков возникновения и прогрессирования диабетической нефропатии. Так, дебют I стадии диабетической нефропатии в обеих группах с сосудистыми осложнениями наступал у больных в фазе субкомпенсации углеводного обмена в среднем

Таблица 1

Показатель	Больные СД, не имеющие сосудистых осложнений	Больные СД с I стадией диабетической ретинопатии и/или нефропатии				Больные СД со II и III стадиями диабетической ретинопатии и/или нефропатии	
		HbA1c, %		HbA1c, %		HbA1c, %	
		7,0-7,5	>7,5	7,0-7,5	>7,5	7,0-7,5	>7,5
Стаж СД типа I, лет	4±1	14±4*	10±3*	22±3*	18±1**		
Дебют СД типа I, лет	28±2	25±5	20±4	11±3*	13±3*		
Уровень HbA1c, %	6,3±0,3	7,3±0,1*	10,1±0,6**	7,3±0,1*	12,4±0,5**		
Уровень глюкозы натощак, ммоль/л	6,0±0,5	8,5±0,2*	12,3±0,5**	8,3±0,2*	12,9±0,7**		
Инсулинотерапия, ЕД/масса тела	0,53±0,08	0,61±0,05	0,64±0,05	0,46±0,02*	0,57±0,06		
Общий холестерин сыворотки крови, ммоль/л	4,9±0,4	4,9±0,3	5,1±0,2	5,2±0,3	5,5±0,4		
Триглицериды сыворотки крови, ммоль/л	1,1±0,1	1,5±0,2	1,6±0,1	1,7±0,2	1,8±0,2*		
АД систолическое, мм рт. ст.	111,5±1,5	123,1±3,7*	124,6±2,4*	128,0±3,4*	145,6±7,8**		
АД диастолическое, мм рт. ст.	73,5±1,5	80,0±2,5*	80,6±1,8*	92,0±2,0*	100,6±4,3**		

Примечание. Здесь и в табл. 2:

* $p < 0,05$ по сравнению с показателями у больных СД типа I, не имеющих сосудистых осложнений;

** $p < 0,05$ по сравнению с показателями у больных СД типа I с I стадией сосудистых осложнений с учетом уровня компенсации углеводного обмена;

* $p < 0,05$ при сравнении показателей у больных СД типа I с субкомпенсацией и декомпенсацией углеводного обмена в каждой из групп с осложнениями.

через 15 лет от начала СД, а с декомпенсацией — значительно раньше: уже через 10 лет от начала заболевания. Сроки прогрессирования I стадии диабетической нефропатии у подгруппы пациентов, находящихся в фазе декомпенсации углеводного обмена, были значительно короче и составляли в среднем от 3 до 5 лет, в отличие от подгруппы больных, находящихся в фазе субкомпенсации, у которых они составили от 6 до 8 лет. Более раннему прогрессированию диабетической нефропатии у пациентов с декомпенсацией мог способствовать, наряду с плохим самоконтролем за состоянием углеводного обмена, и более ранний дебют артериальной гипертензии: в среднем через 12 ± 2 лет от начала основного заболевания по сравнению с больными в субкомпенсации, у которых дебют составил 18 ± 4 лет. Из анамнеза также уточнено, что начальные проявления диабетической ретинопатии и нефропатии и их прогрессирование развивались быстрее у лиц, занимающихся тяжелым физическим трудом.

Таким образом, развитие сосудистых осложнений СД I зависит не только от длительности основного заболевания и компенсации углеводного обмена, но и от наличия артериальной гипертензии, проводимого самоконтроля и вида трудовой деятельности.

При электронномикроскопическом исследовании эритроцитов у пациентов с СД I обнаружены изменения формы красных клеток крови, степень выраженности которых зависела от стадии сосудистых осложнений. Известно, что эритроцитарный пул в норме представлен в основном функционально полноценными двояковогнутыми дискоцитами [3, 7]. У здоровых лиц среди малочисленной популяции трансформированных эритроцитов встречались как обратимо измененные переходные формы (эллипсоидные клетки, эритроциты в виде плоского диска, дискоциты с одним выростом, с гребнем и множественными выростами, а также эритроциты в виде тутовой ягоды), так и необратимо измененные предгемолитические (куполообразные, сферические эритроциты, клетки в виде спущенного мяча) и дегенеративные формы эритроцитов. У всех больных СД I выявлено отчетливое нарастание морфологической неоднородности эритроцитарного пула, о чем свидетельствовало достоверное по сравнению с нормой снижение содержания двояковогнутых дискоцитов и увеличение количества переходных, предгемолитических и дегенеративных форм.

В частности, у пациентов с СД I, не имеющих сосудистых осложнений, на фоне сниженного содержания нормальных дискоцитов с гладко-гомогенной поверхностью ($p < 0,001$) количество переходных форм эритроцитов в 1,3 раза, предгемолитических в 2,1 раза и дегенеративных в 1,4 раза превосходило аналогичные показатели у здоровых доноров. У лиц с сосудистыми осложнениями I ста-

дии на фоне уменьшения содержания двояковогнутых дискоцитов отмечалось достоверное ($p < 0,001$) снижение количества переходных форм эритроцитов в 1,3 раза, увеличение необратимо трансформированных предгемолитически измененных форм в 2,3 раза и дегенеративных форм эритроцитов в 1,7 раза. Наиболее выраженные изменения поверхностной архитектоники эритроцитов были обнаружены у больных с выраженными сосудистыми осложнениями. Количество переходных форм эритроцитов в 1,4 раза, предгемолитических в 2,6 раза и дегенеративных в 2 раза превосходило аналогичные показатели у здоровых доноров ($p < 0,001$). Увеличение числа переходных форм клеток отмечалось за счет возрастания доли дискоцитов в виде эллипса, плоского диска и с множественными выростами. Достаточно интересным оказалось отсутствие достоверных различий в процентном содержании морфологических форм в группах пациентов с сосудистыми осложнениями в зависимости от компенсации углеводного обмена (табл. 2).

Нарастание полиморфизма эритроцитарной популяции, появление в крови трансформированных красных клеток не является случайным фактором, а есть отражение нарушений структуры и метаболизма эритроцита [10]. 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. Ранее было показано, что при СД I механизмы трансформации эритроцитов могут быть обусловлены повышением содержания насыщенных жирных кислот при снижении уровня ненасыщенных жирных кислот в фосфолипидных фракциях мембраны эритроцита; возрастанием микровязкости глубоких и модификацией наружных слоев мембраны, нарушением белок-липидных взаимодействий, а также снижением активности Ca^{2+} -АТФазы [4].

Трансформация циркулирующих эритроцитов является признаком ускоренного старения красных кровяных клеток и сопровождается снижением их деформируемости, что играет важную роль в усилении процессов агрегации эритроцитов [9].

Как показало проведенное нами исследование обратимой агрегации эритроцитов, у пациентов, не имеющих сосудистых осложнений, и у больных с начальной стадией диабетических микроангиопатий, находящихся в фазе субкомпенсации углеводного обмена (HbA_{1c} до 7,5 %), не выявлено достоверных различий по сравнению с нормой. У пациентов с I стадией диабетической ретинопатии и/или нефропатии в фазе декомпенсации и у больных со II и III стадиями сосудистых осложнений, находя-

Таблица 2

Морфологическая характеристика эритроцитов периферической крови у больных СД типа 1 (по данным сканирующей электронной микроскопии) ($\bar{X} \pm m$)						
Морфологические формы эритроцитов, %	Здоровые доноры	Больные СД, не имеющие сосудистых осложнений	Больные СД с I стадией диабетической ретинопатии и/или нефропатии		Больные СД 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
Нормальные двояковогнутые дискоциты	87,41±0,39	81,61±0,61*	81,10±0,35*	80,60±0,50*	78,96±0,26**	78,83±0,34**
Обратимо трансформированные эритроциты	9,73±0,25	12,13±0,32*	12,59±0,25*	12,87±0,27*	13,92±0,19**	13,98±0,25**
эллипсы	0,36±0,10	0,88±0,08*	0,96±0,09*	0,93±0,10*	1,14±0,08*	1,11±0,07*
плоские диски	0,41±0,06	0,94±0,10*	0,93±0,13*	1,06±0,11*	1,18±0,11*	1,30±0,04**
дискоциты с выростом	3,74±0,07	4,19±0,11*	4,34±0,20*	4,13±0,12*	4,50±1,81*	4,36±0,15*
дискоциты с гребнем	4,57±0,15	4,78±0,11	4,99±0,07*	5,21±0,23*	5,32±0,18**	5,50±0,18**
дискоциты с множественными выростами	0,50±0,07	1,23±0,05*	1,26±0,05*	1,36±0,08*	1,54±0,07**	1,46±0,03**
эритроциты в виде туповой ягоды	0,16±0,04	0,13±0,02	0,11±0,01	0,19±0,03	0,24±0,02**	0,24±0,03*
Необратимо трансформированные эритроциты	2,47±0,16	5,29±0,21*	5,64±0,13*	5,84±0,23*	6,40±0,11**	6,49±0,11**
куполообразные	0,90±0,12	1,98±0,09*	2,17±0,06*	2,23±0,08*	2,46±0,05**	2,45±0,07**
сферические	1,21±0,07	2,24±0,11*	2,31±0,08*	2,41±0,83*	2,70±0,03**	2,71±0,05**
в виде спущенного мяча	0,36±0,03	1,08±0,04*	1,16±0,05*	1,20±0,12*	1,24±0,07*	1,33±0,05**
Дегенеративные формы	0,39±0,06	0,56±0,04*	0,67±0,04*	0,69±0,07*	0,72±0,05**	0,80±0,07**

$p < 0,05$ по сравнению с показателями у здоровых доноров

щихся в фазе субкомпенсации, отмечалось достоверное ($p < 0,01$) увеличение индекса агрегации эритроцитов, интегрального коэффициента агрегации, снижение полупериода спонтанной агрегации по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров.

Наиболее выраженные изменения показателей обратимой агрегации эритроцитов были выявлены у больных СД I с сосудистыми осложнениями (II и III стадии) в фазе декомпенсации: отмечалось увеличение минимальной прочности агрегатов эритроцитов в 1,8 раза, максимальной прочности агрегатов эритро-

цитов – в 1,4 раза, индекса агрегации эритроцитов – в 4,2 раза, интегрального коэффициента агрегации – в 6,8 раза, а также полупериода спонтанной агрегации в 3 раза по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе ($p < 0,001$).

Усиление агрегации эритроцитов способствует нарушению кровотока и повреждению эндотелия кровеносных сосудов, что может явиться одним из патогенетических звеньев микрососудистых осложнений при СД типа 1. Этот факт следует учитывать при проведении патогенетически оправданной коррекции диабетических ангиопатий.

Литература

1. Балаболкин М.И. // Сахарный диабет – 2002. – № 4. – С.8-16.
2. Ионов Б.В., Чернух А.М. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1981. – Т.92. – №12. – С.749-751.
3. Козинец Г.И., Симоварт Ю.А. Поверхностная архитектура клеток периферической крови в норме и при заболеваниях крови. – Таллин, 1984.
4. Колосова М.В. Общие закономерности и механизмы нарушений периферического звена эритроцитоза при типовых патологических процессах в клинике детских болезней: Дис. д-ра мед. наук – Томск, 1999.
5. Мычка В.Б., Горностаев В.В., Чазова И.Е. // Кардиология. – 2002. – № 4. – С.73-77.
6. Новицкий В.В., Колосова М.В., Кравец Е.Б. и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1999. – Т.128. – № 9. – С. 347-350.
7. Новицкий В.В., Рязанцева., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск, 2004.
8. Тухватулин Р.Т., Шуваева В.Н., Шадрин Н.Х., Левтов В.А. // Физиологический журнал СССР. – 1986. – Т. 72. – №6. – С.775-784.
9. Lominadze D., Dean W.L. // FEBS Letters/ – 2002. – Vol. 517. – № 1-3 – P. 41-44.
10. Zhang Y., Manning L.R., Falcone J. et al. // J.Biol. Chem. – 2003. – Vol.287. – № 41. – P. 39565-39571.