

СТАН МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ У ХВОРИХ НА ГІПЕРТОНІЧНУ ХВОРОБУ, АСОЦІЙОВАНУ ІЗ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2 ТИПУ

I.V. Ситіна

Харківський національний медичний університет

Кафедра пропедевтики внутрішньої медицини №1, основ біоетики та біобезпеки (зав. - проф. Т.В. Ащеулова)

Реферат

Мета. Вивчення стану мембран еритроцитів у хворих на гіпертонічну хворобу при асоціації із цукровим діабетом 2 типу шляхом визначення їх плинності та мікров'язкості, вмісту холестеролу та загальних фосфоліпідів.

Матеріал і методи. Обстежено 50 хворих на гіпертонічну хворобу асоційовану із цукровим діабетом 2 типу, 46 хворих на гіпертонічну хворобу. Усім обстежуваним проводили забір крові із кубітальної вени, натще, із наступним вивченням певних характеристик мембран еритроцитів, а саме мікров'язкості мембран еритроцитів за допомогою методу латеральної дифузії гідрофобного флуоресцентного зонду - пірену, та вивчали вміст холестеролу та загальних фосфоліпідів мембран еритроцитів.

Результати й обговорення. У групі хворих на гіпертонічну хворобу та цукровий діабет 2 типу, порівняно із групою хворих на гіпертонічну хворобу, було виявлено статистично значуще зменшення коефіцієнта ексимеризації пірену в ділянці білок-ліпідних контактів (0,64 [0,59; 0,7] і 0,93 [0,77; 1,04] - відповідно), та в зоні ліпідного бішару - (0,69 [0,62; 0,78] і 0,95 [0,89; 1,0]). У групі пацієнтів із поєднаною патологією вміст холестерину і фосфоліпідів у мембрані еритроцитів був підвищеним ($p < 0,001$) у порівнянні із групою пацієнтів на гіпертонічну хворобу, в середньому на 44% і 15% відповідно. Співвідношення холестерин/фосфоліпідів характеризувалося також збільшенням показника на 26%. Виявлено позитивні кореляційні зв'язки між мікров'язкостю мембран еритроцитів та рівнем артерійного тиску і тривалістю гіпертонічної хвороби та цукровим діабетом 2 типу ($r=0,3$; $p < 0,05$).

Висновки. У хворих на гіпертонічну хворобу при наявності супровідних глікометаболических порушень та при тривалому її перебігу виявлені зміни свідчать про процеси дезорганізації мембран еритроцитів.

Ключові слова: гіпертонічна хвороба, цукровий діабет 2 типу, холестерол, фосфоліпідів, мембрана еритроцита

Abstract

PECULIARITIES OF STRUCTURAL DISORDERS OF THE ERYTHROCYTE MEMBRANE IN PATIENTS WITH HYPERTENSION ASSOCIATED WITH TYPE 2 DIABETES

I.V. SYTINA

National Medical University in Kharkov

Aim. To study certain characteristics of erythrocyte membranes in patients with hypertensive disease (HD) comorbid with diabetes mellitus (DM) type 2.

Material and Methods. Fifty patients with HD associated

with type 2 diabetes were examined, which formed the study group, and 46 people with HD - the control group. Characteristics of erythrocyte membranes were studied by determining the rate of pyrene excimerization in the area of protein-lipid contacts and a lipid bilayer, and the content of cholesterol, total phospholipids and their ratio.

Results and Discussion. In patients with HD combined with type 2 diabetes there was a statistically significant reduction in the rate of pyrene excimerization in the area of protein-lipid contacts in comparison with the group of patients with HD (0,64 [0,59; 0,7] and 0,93 [0,77; 1,04] - respectively), and a lipid bilayer - (0,69 [0,62; 0,78] and 0,95 [0,89; 1,0]). In the group of patients with combined HD and type 2 diabetes, cholesterol and phospholipids were significantly increased ($p < 0,001$) in comparison with the group of patients with HD, by an average of 44% and 15% respectively, and the ratio of cholesterol/phospholipids increased by 26%. Positive correlation was found between increased erythrocyte membrane microviscosity and level of blood pressure, and the duration of HD and type 2 diabetes ($r=0,3$; $p < 0,05$).

Conclusions. Patients with HD combined with type 2 diabetes, are characterized by the disorganization of the erythrocyte membrane, in the form of the increased microviscosity, accompanied by the increase in the concentration of cholesterol and phospholipids. Also a direct relationship was found between microviscosity of the erythrocyte membrane and the stage of hypertension, as well as the duration of HD and DM type 2.

Key words: hypertensive disease, diabetes mellitus type 2, cholesterol, phospholipids, erythrocyte membrane

Вступ

Гіпертонічна хвороба (ГХ) є важливою медично-соціальною проблемою. Стійке підвищення артерійного тиску (АТ) спричиняє інвалідизацію і важкі серцево-судинні ускладнення аж до фатальних. Смертність від серцево-судинної патології займає провідні позиції у структурі загальної смертності. Незважаючи на прогрес у біології та медицині, не сформувалося єдиного уявлення про патогенез первинної гіпертензії. Однією із гіпотез, які розглядаються у літературних джерелах є мембранна концепція розвитку ГХ. Згідно якою домінуючу роль у розвитку патології відіграє порушення структури та іонотранспортної функції клітинних мембран, пов'язане із накопичен-

ням іонів Ca^{2+} у цитоплазмі та подальшою функціональною адаптацією клітини до кальцієвого перевантаження [1]. Зберігаючи функцію в умовах порушеної мембранної регуляції кальцію, клітина працює у новому режимі клітинно-гормональних відносин, названому "перенастроюванням" або ресетінгом. Внаслідок цього підвищується еферентна активність симпатичної нервової та гіпоталамо-гіпофізно-надниркової систем, змінюється функція інсулярного апарату. Стабілізація АТ на підвищеному рівні виникає у результаті підвищення контрактильної функції гладком'язових клітин судин. Ресетінг системи контролю АТ і судинного тонуусу відбувається під впливом гуморальних систем (ендотелін-NO, ренін-ангіотензин-альдостеронової). Гіпертензія стає незворотною при наступному розвитку ремоделювання серця і судин, артеріолонефросклерозом та інших виявів структурної перебудови (гіпертрофія кори наднирників, нейронів гіпоталамічних нейросекреторних ядер). Порушення функціонування клітинних мембрани тісно пов'язане із їх структурною дезорганізацією, зокрема зі зміною плинності та мікров'язкості, порушенням ліпідного та білкового складу.

Метою роботи було вивчення стану мембран еритроцитів у хворих на гіпертонічну хворобу при асоціації із цукровим діабетом 2 типу шляхом визначення їх плинності та мікров'язкості, вмісту холестеролу та загальних фосфоліпідів.

Матеріал і методи

Основну групу обстежених становили 50 хворих на ГХ, асоційовану із цукровим діабетом (ЦД) 2 типу. У групу порівняння увійшли 46 хворих на ГХ. Групу контролю становили 30 практично здорових осіб. Група хворих із поєднаною патологією становила 30% чоловіків та 70% жінок; середній вік групи - 59,5 [52; 63] років; тривалість ГХ - 11 [5,5; 14] років; тривалість ЦД 2 типу - 5 [3; 6] років. У групі хворих на ГХ середній вік був 61,5 [55; 64] років; 30,4% - чоловіки, 69,6% - жінки; тривалість ГХ - 6 [4; 8] років. Верифікацію діагнозу та визначення ступеню АГ проводили згідно із критеріями Європейського товариства артеріальної гіпертензії (ESH)/Європейським товариством кардіологів (ESC) (2013). Діагноз ЦД 2 типу констатували згідно із критеріями ВООЗ (1999 року, у перегляді 2006 р) [2]. У дослідження

не залучали хворих із симптоматичною артеріальною гіпертензією, ЦД 1 типу, а також із наявністю гострих запальних процесів, онкологічних захворювань, гострого коронарного синдрому, інших ендокринних хвороб, а також із хронічною серцевою недостатністю понад II Б стадії. Усім обстежуваним проводили забір крові із кубітальної вени, натще. Еритроцити відділяли від плазми центрифугуванням стабілізованої гепарином крові протягом 15 хвилин при 3000 g (кінцеве розведення гепарин-цільна кров становило 1:100). Суспензію еритроцитів промивали охолодженим 0,89% розчином NaCl. Мембрани еритроцитів виділяли шляхом гіпоосмотичного гемолізу з наступним осадженням при центрифугуванні 6000 g протягом 10 хвилин. Вимірювання мікров'язкості мембран еритроцитів проводили за допомогою методу латеральної дифузії гідрофобного флуоресцентного зонду - пірену. Метод базується на утворенні ексимерів, тобто активних димерів пірену у ліпідному оточенні. Інкубацію суспензії клітин з піреном проводили при 25°C протягом однієї хвилини при постійному струшуванні. Флюоресценцію пірену вимірювали на спектрофлюориметрі "Hitachi MPF-4A": мікров'язкість ліпідного бішару при довжині хвилі збудження 334 нм, довжині хвилі мономерів - 395 нм, довжині хвилі ексимерів - 470 нм; мікров'язкість білок-ліпідних контактів відповідно при 286/395/470 нм. Оцінку мікров'язкості проводили шляхом обчислення коефіцієнту ексимерізації пірену, який відображає співвідношення інтенсивності флюоресценції ексимерів до інтенсивності флюоресценції мономерів (Fe/Fm) та знаходиться у зворотній залежності від відносної мікров'язкості.

Для дослідження вмісту холестеролу та загальних фосфоліпідів мембрани еритроцитів промивали 0,05 М трис-HCl буфером (pH=7,2), що містив 150 мМ NaCl. Ліпіди екстрагували хлороформ-метаноловою сумішшю за методом М. Кейтса, випаровування екстрактів проводили у тоці сухого азоту. Холестерол визначали фотоелектроколориметричним методом при 560 нм, розрахунок вмісту проводили за калібрувальною кривою. Вміст загальних фосфоліпідів визначали за допомогою високоефективної тонкошарової хроматографії [3].

Статистичний аналіз даних проводили за використанням комп'ютерного пакета приклад-

них програм для обробки статистичної інформації Statistica 6.1 (StatSoft, Inc., США). Первинне статистичне опрацювання кількісних експериментальних даних починали з перевірки припущення про відповідність розподілу отриманих вибірок закону нормального (гаусівського) розподілу, застосовуючи критерії Ліліфора або Шапіро-Віллка. Кількісні ознаки, що мали нормальний розподіл, описували параметричними характеристиками - середнім значенням досліджуваного показника (M) та середнім квадратичним відхиленням (s); у разі відсутності нормального розподілу непараметричними характеристиками - медіаною вибірки (Me) та інтерквартильним розмахом [значеннями 25-го та 75-го процентилів]. Для опису тенденцій змін концентрацій показників розраховували також відсоткові співвідношення. Для порівняння двох нормальних розподілів застосовували t-критерій Стьюдента. Якщо принаймні один з розподілів не був нормальним, то для порівняння незалежних вибірок застосовували ранговий критерій Манна-Вітні. За критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали $p < 0,05$.

Результати й обговорення

У обстежуваних пацієнтів виявлено зміни з боку мікрров'язкості мембран еритроцитів (табл. 1). Так, у групі порівняння спостерігали статистично значуще, щодо контролю, зменшення коефіцієнта ексімеризації пірену: в зоні білок-ліпідних контактів на 27% ($p < 0,001$), в зоні ліпідного бішару - на 12% ($p = 0,045$). Співвідношення інтенсивності флюоресценції ексімерів до інтенсивності флюоресценції мономерів знаходиться в зворотній залежності від відносної мікрров'язкості. Тому, отримані результати свідчать про підвищення мікрров'язкості мембран еритроцитів у цій групі пацієнтів. В основній групі виявлено таку ж динаміку змін, але більш виражену: в зоні білок-ліпідних контактів коефіцієнт ексімеризації знижувався на

49%, порівняно із контролем, а в зоні ліпідного бішару - на 36%. Слід зазначити, що у хворих основної групи коефіцієнт ексімеризації статистично вірогідно ($p < 0,001$) зменшувався і порівняно з хворими групи порівняння: у середньому на 31 і 27%, відповідно, для зони білок-ліпідних контактів та ліпідного бішару.

У мембранах еритроцитів визначали також вміст холестеролу та загальних фосфоліпідів з наступним розрахунком коефіцієнта співвідношення холестерол/фосфоліпідів

У групі хворих на ГХ, порівняно з контрольною групою, спостерігалось статистично значуще підвищення вмісту холестеролу ($p < 0,001$) на 52% і загальних фосфоліпідів ($p = 0,0095$) - на 18%. Така ж, але більш виражена, динаміка змін цих показників характерна і для групи хворих на ГХ, асоційовану з ЦД 2 типу: на 119% для холестеролу і 36% для загальних фосфоліпідів. Слід зазначити, що в основній групі вміст холестеролу та загальних фосфоліпідів було вірогідно підвищеним ($p < 0,001$) порівняно з групою порівняння в середньому відповідно на 44 і 15%.

Співвідношення холестерол/фосфоліпідів у групі порівняння статистично вірогідно ($p = 0,0063$) знижувалося до $(0,89 \pm 0,094)$ порівняно з контролем $(0,67 \pm 0,061)$. У групі хворих на ГХ, на тлі якої діагностувався ЦД 2 типу, навпаки, спостерігалось вірогідне ($p = 0,0034$) підвищення цього співвідношення до $(1,12 \pm 0,09)$, яке залишалося вірогідно підвищеним ($p < 0,001$) на 26% і порівняно з групою пацієнтів, які страждають на ГХ.

При вивченні анамнестичних даних у групі хворих на ГХ асоційовану з ЦД 2 типу, виявлена тенденція до погіршення показників стану мембран еритроцитів в залежності від тривалості ГХ та ЦД 2 типу. При тривалості ГХ понад 10 років коефіцієнт ексімеризації в зоні білок-ліпідних контактів знижувався на 11% порівняно з ГХ, тривалістю до 5 років, і на 8% - з тривалістю (5-10)

Таблиця 1

Коефіцієнт ексімеризації пірену для мембран еритроцитів у хворих на ГХ, асоційованої з ЦД 2 типу (Me [25%; 75%])

Група хворих	Білок-ліпідні контакти	Ліпідний бішар
Основна група (n=50)	0,63 [0,59; 0,69] * $p < 0,001$; ** $p < 0,001$	0,69 [0,64; 0,78] * $p < 0,001$; ** $p < 0,001$
Група порівняння (n=46)	0,91 [0,77; 1,04] * $p < 0,001$	0,95 [0,89; 1,0] * $p = 0,045$
Контроль (n=40)	1,24 [1,01; 1,35]	1,08 [1,03; 1,12]

* - відносно контрольної групи; ** - відносно групи порівняння

Таблиця 2

Вміст холестеролу та загальних фосфоліпідів в мембранах еритроцитів у хворих на ГХ, асоційовану з ЦД 2 типу (ммоль / л, Ме [25%; 75%])

Група хворих	Холестерол, ммоль/л	Фосфоліпід, ммоль/л
Основна група (n=50)	6,32 [5,84; 6,75] *p<0,001; **p<0,001	5,76 [5,34; 6,27] *p<0,001; **p<0,001
Група порівняння (n=46)	4,40 [4,0; 4,86] *p<0,001	5,0 [4,56; 5,18] *p=0,0095
Контроль (n=40)	2,89 [2,60; 3,29]	4,22 [4,01; 4,67]

* - відносно контрольної групи; ** - відносно групи порівняння

років. В зоні ліпідного бішару відзначалося зниження на 5%, проте воно було статистично невірогідним ($p > 0,05$). При аналізі тривалості ЦД 2 типу виявлено більш значні зміни в зоні ліпідного бішару, а саме зниження коефіцієнта ексімеризації на 17% при тривалості ЦД понад 10 років і на 9% до 10 років; в зоні білок-ліпідних контактів - на 6%. Підвищення мікров'язкості ліпідного бішару і плинності у зоні білок-ліпідних контактів супроводжувалося збільшенням концентрації холестеролу в 1,5 і 1,2 рази, загальних фосфоліпідів - в 1,6 і 1,2 рази. При проведенні кореляційного аналізу виявлено позитивні зв'язки між коефіцієнтом ексімеризації в зоні білок-ліпідних контактів і рівнем АТ ($r=0,3$; $p < 0,05$), масою тіла ($r=0,4$; $p < 0,05$), ОТ, ОБ ($r=0,34$; $p < 0,05$), тривалістю ГХ та ЦД 2 типу ($r=0,3$; $p < 0,05$). При вивченні коефіцієнта ексімеризації пірену для ліпідного бішару відзначалися позитивні зв'язку з АТ і масою тіла ($r=0,3$; $p < 0,05$). При вивченні кореляційних матриць виявлено позитивні зв'язки між холестеролом і загальними фосфоліпідами мембран еритроцитів з масою тіла ($r=0,3$; $p < 0,05$) і тривалістю ГХ ($r=0,26$; $p < 0,05$).

Отримані результати демонструють дезорганізацію мембран еритроцитів, а саме порушення плинності у пацієнтів з ГХ у порівнянні з групою осіб з нормальним рівнем АТ, що співвідноситься з даними низки досліджень [4, 5, 6]. Більш виражені зміни при асоціації з ЦД 2 типу, можна пояснити утворенням додаткових шляхів дезорганізації мембран за рахунок глікозилювання білків. Цей процес при хронічній гіперглікемії є одним із джерел активних форм кисню, що викликає окисну модифікацію білків і ліпідів мембран [7, 8]. Механізм інтенсифікації вільнорадикального окислення високими концентраціями глюкози включає активацію ліпооксигеназного шляху, а інгібування активності мембранозв'язаних ферментів відбувається в результаті некова-

лентної взаємодії глюкози з білками-ферментами [9]. Окислювальним стресом можна пояснити і підвищені концентрації холестеролу, загальних фосфоліпідів в структурі мембран, більш виражені при поєднанні ГХ з ЦД 2 типу. Згідно з даними Yamagawa K. et al. [10], крім збільшення вмісту в мембранах фосфоліпідів і холестеролу, при ЦД 2 типу відзначається зниження вмісту токоферолу, зміни жирнокислотного складу фосфоліпідів, активності іонтранспортних систем, утворення "зшивок" між молекулами білків і екстерналізація фосфатидилсерина на зовнішній стороні мембрани.

У хворих на ЦД у фосфоліпідах мембран клітин крові виявляється підвищення вмісту насичених і зниження рівня поліненасичених жирних кислот, що посилює збільшення мікров'язкості ліпідного бішару. Зниження синтезу АТФ, поряд зі зростанням продукції активних форм кисню і активацією пентозофосфатного шунта, при хронічній гіперглікемії призводить до зниження активності АТФ-залежних амінофосфоліпідтрансфераз, що може лежати в основі порушення ліпідної асиметрії бішару плазматичних мембран і екстерналізації фосфатидилсерина на поверхні клітин [11]. Важливу роль у зміні білок-ліпідних взаємодій при ЦД грає і модифікація білків шляхом утворення в їх молекулах поперечних "зшивок", а також індуковане окислювальним стресом неферментативне глікозилювання білків [12].

Подальші дослідження у цій ділянці допоможуть не тільки зрозуміти механізми розвитку коморбідних патологій, та розробити стратегію патогенетично обґрунтованої терапії цих станів.

Висновки

При асоціації гіпертонічної хвороби, з цукровим діабетом 2 типу, порушуються фізико-хімічні та структурно-функціональні властивості мембран еритроцитів, що підтверджується підвищенням вмісту холестеролу та загальних фосфоліпідів на

ті зниження коефіцієнта ексимерізації пірену в зоні білок-ліпідних контактів та ліпідного б'язару. Виявлені позитивні кореляційні зв'язки між мікроб'язкістю мембран еритроцитів і рівнем АТ, є підтвердженням ролі дезорганізації мембран у формуванні ГХ.

Література

1. Postnov Y.V. To the development of the membrane conception of primary hypertension (altered mitochondrial function and energy deficiency). *Kardiologiya* 2000; 10: 4-12. Russian: (Постнов Ю.В. К развитию мембранной концепции патогенеза первичной гипертензии (нарушенная функция митохондрий и энергетический дефицит. *Кардиология* 2000; 10: 4-12)
2. World Health Organization. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: Report of a WHO/IDF consultation. - Geneva: WHO, 2006. - 62 p.
3. Kamyshnikov V. X. A guide to clinical and biochemical studies and laboratory diagnosis / V. X. Kamyshnikov. - Moscow, 2004. - 920 p. Russian (Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. - М.: МЕДпресс-информ, 2004. - 920 с
4. Tsuda K. Membrane fluidity and hypertension. *American Journal of Hypertension* 2003; № 16: 259-261
5. Tsuda K, Kimura K, Nishio I, Masuyama Y. Nitric oxide improves membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension: An electron paramagnetic resonance investigation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Sep 7; 275(3): 946-54
6. Kazushi T. Associations between high-sensitivity c-reactive protein and membrane fluidity of red blood cells in hypertensive elderly men: an electron spin resonance study. *International Journal of Hypertension* Vol.2012 (2012), 5 p. available at: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/292803>
7. Balabolkin M. I. Role of oxidative stress in the pathogenesis of vascular complications of diabetes. *Problems of endocrinology.* 2000; vol.46 (6):29 - 34. Russian (Балаболкин М.И. Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений диабета. *Проблемы эндокринологии* 2000; 46(6): 29-34.
8. Mawatari S, Saito K, Murakami K, Fujino T. Absence of correlation between glycated hemoglobin and lipid composition of erythrocyte membrane in type 2 diabetic patients. *Metabolism.* 2004 Jan;53(1):123-7.
9. Rajeswari P, Natarajan R, Nadler JL, Kumar D, Kalra VK. Glucose induces lipid peroxidation and inactivation of membrane-associated ion-transport enzymes in human erythrocytes in vivo and in vitro. *J Cell Physiol.* 1991 Oct; 149(1): 100-9.
10. Yanagawa K, Takeda H, Egashira T, Matsumiya T, Shibuya T, Takasaki M. Changes in antioxidative mechanisms in elderly patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. Investigation of the redox dynamics of alpha-tocopherol in erythrocyte membranes. *Gerontology.* 2001;47(3):150-7.
11. Banerjee T, Kuypers FA. Reactive oxygen species and phosphatidylserine externalization in murine sickle red cells. *Br J Haematol.* 2004 Feb; 124(3): 391-402.
12. Waczulikova I, Sikurova L, Carsky J, Strbova L, Krahulec B. Decreased fluidity of isolated erythrocyte membranes in type 1 and type 2 diabetes. The effect of resorcylicidene aminoguanidine. *Gen Physiol Biophys.* 2000 Dec;19(4):381-92.