

## АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ЭРИТРОЦИТОВ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ И ЕГО КОРРЕКЦИИ ЛИПОВОЙ КИСЛОТОЙ

© 2016 г. В.В. Емельянов, Д.В. Леонтьев, А.В. Ищенко, Т.С. Булавинцева,  
Е.А. Саватеева, И.Г. Данилова

Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина,  
620002, Екатеринбург, ул. Мира, 19

E-mail: v.v.emelianov@urfu.ru

Поступила в редакцию 08.06.16 г.

Показано, что перекисное окисление липидов плазмы крови и эритроцитов не является ведущим фактором, определяющим состояние эритроцитарных мембран у крыс с аллоксановым сахарным диабетом. Введение  $\alpha$ -липоевой кислоты при формировании аллоксанового сахарного диабета у крыс, помимо метаболического действия, существенно изменяет морфологию эритроцитов, исследованных методом атомно-силовой микроскопии.

*Ключевые слова:* аллоксановый диабет, гипергликемия, морфология эритроцита, адгезия эритроцитов, перекисное окисление липидов.

Состояние мембран оказывает влияние на такие присущие эритроцитам функции, как транспорт кислорода, регуляция pH, адсорбция на поверхности клетки и транспорт гормонов и других веществ [1,2]. Как правило, изменение структуры мембраны определяет морфологию эритроцитов, которая имеет ключевое значение в его функциональной активности [3]. Деформации эритроцита негативно отражаются на его способности проходить через капиллярную сеть, что приводит к нарушению кровоснабжения тканей. При патологиях как форма, так и диаметр эритроцитов могут изменяться в различных направлениях. Решающим фактором деструктивных изменений мембран эритроцитов признается усиление перекисного окисления липидов и снижение антиокислительной защиты в клетке. Продукты перекисидации, встраиваясь в мембраны, вносят дисбаланс в их состав и вызывают изменения формы, проницаемости, текучести [4,5]. С другой стороны, морфология эритроцитов обусловлена взаимодействием белков цитоскелета с белками мембраны.

Известно, что хроническая гипергликемия и связанные с ней метаболические нарушения воздействуют на мембрану эритроцита [6,7]. Гликирование белков мембраны и цитоскелета

определяет деформируемость мембраны и развитие пойкилоцитоза у больных сахарным диабетом (СД). Морфология эритроцитов необратимо изменяется, снижается устойчивость и деформируемость клеток, изменяется их агрегация и адгезия. Мембраны теряют свою эластичность, в результате чего эритроцит не может изменить форму, проходя по кровеносному капилляру. При этом нарушается микроциркуляция и снижается время жизни эритроцитов. С другой стороны, гипергликемия – основной триггер оксидативного стресса и усиления процессов перекисного окисления липидов у больных СД. Накопление свободных радикалов и продуктов перекисного окисления липидов также дестабилизирует мембраны эритроцитов [8]. Таким образом, морфологическая вариабельность эритроцитов напрямую зависит от сроков и тяжести развития метаболических нарушений при СД.

В связи с вышеизложенным возрастающий интерес представляет исследование структуры и свойств эритроцитов современными методами сканирующей зондовой микроскопии. К числу последних относится и атомно-силовая микроскопия, позволяющая оценить не только форму, размеры клеток, но и биофизические свойства их мембран [9–12].

Поэтому основная цель работы – исследование механизмов, определяющих морфологию

Сокращения: СД – сахарный диабет, ЛК –  $\alpha$ -липоевая кислота.

**Таблица 1.** Биохимические показатели крови крыс при длительности течения аллоксанового сахарного диабета один месяц и его коррекции  $\alpha$ -липоевой кислотой

Группа Показатель	Интактные животные ( <i>n</i> = 10)	Контроль СД ( <i>n</i> = 10)	СД + ЛК ( <i>n</i> = 10)
Глюкоза, ммоль/л	3,80 ± 0,30	20,0 ± 1,29*	7,20 ± 1,51*#
Гликированный гемоглобин, %	2,30 ± 0,10	7,50 ± 0,93*	4,48 ± 0,86*#
Фруктозамин, мкмоль/г белка	9,40 ± 7,57	23,70 ± 2,94*	4,90 ± 0,18#
Малоновый диальдегид, нмоль/г белка	10,10 ± 2,56	9,80 ± 2,54	8,90 ± 4,12
Общий белок, г/л	64,90 ± 2,26	56,40 ± 0,95*	60,0 ± 5,64
Каталаза, мккатал/г гемоглобина	0,41 ± 0,13	0,47 ± 0,049	1,09 ± 0,10
Пероксидаза, мккатал/г гемоглобина	17,30 ± 2,58	12,50 ± 2,09*	18,30 ± 3,70#

Примечание. \* – Статистически значимые различия с интактной группой животных при  $P < 0,05$ , # – статистически значимые различия с группой животных с СД при  $P < 0,05$ .

эритроцитов как фактора сосудистых осложнений на ранних стадиях в динамике развития экспериментального СД, а также оценка возможности их коррекции за счет изменения метаболических показателей крови.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

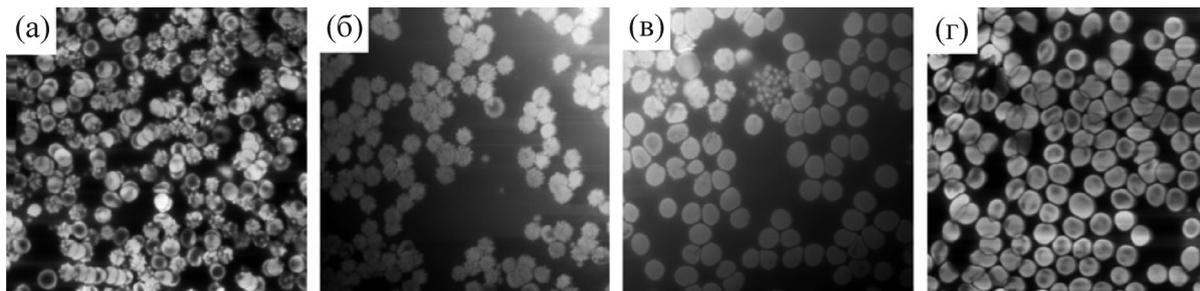
Эксперимент был выполнен на 30 здоровых самцах крыс Вистар массой  $230 \pm 10$  г. Условия содержания и обращение с экспериментальными животными соответствовали рекомендациям международных этических комитетов (Директива Совета ЕС 2010/63/EU; Official Journal of the European Union, 2010). Аллоксановый диабет моделировали путем внутрибрюшинного введения аллоксана трехкратно через день в общей дозе 30 мг/100 г массы тела [13]. Одновременно с индукцией СД начинали введение  $\alpha$ -липоевой кислоты (ЛК) («Октолипен», Россия) в дозе 40 мг/кг массы животного (внутримышечно) с периодичностью три раза в неделю в течение четырех недель. Известно, что в организме ЛК и продукт ее восстановления дигидролипоевая кислота являются антиоксидантами, связывают свободные радикалы, восстанавливают внутриклеточный уровень глутатиона, повышают активность супероксиддисмутазы [8,14]. Все животные были разделены на три группы: первая – интактные здоровые животные ( $n = 10$ ); вторая – животные с аллоксановым диабетом ( $n = 10$ ); третья группа – животные с аллоксановым диабетом, которым вводили ЛК ( $n = 10$ ). Ежедневно в ходе эксперимента отбирали пробы крови для исследования концентрации глюкозы (Novogluk-R, «Вектор-Бест», Россия) и на исследование методом атомно-силовой микроскопии. Морфологию эритроцитов изучали на сканирующем зондовом

микроскопе «Интегра-Максимус» в полуконтактном режиме, с кантилевером марки NSG03 Golden Silicon Probes при частоте колебаний 90 кГц. Препараты готовили на подложках из свежесколотой слюды. Оценивали изменения размеров эритроцита: диаметр (мкм) и высоту (нм), а также параметр, характеризующий вязкость мембраны – адгезию (нН). Производили подсчет содержания (в %) основных форм эритроцитов, встречаемых при пойкилоцитозе СД – нормоцитов, эхиноцитов, сфероцитов, стоматоцитов.

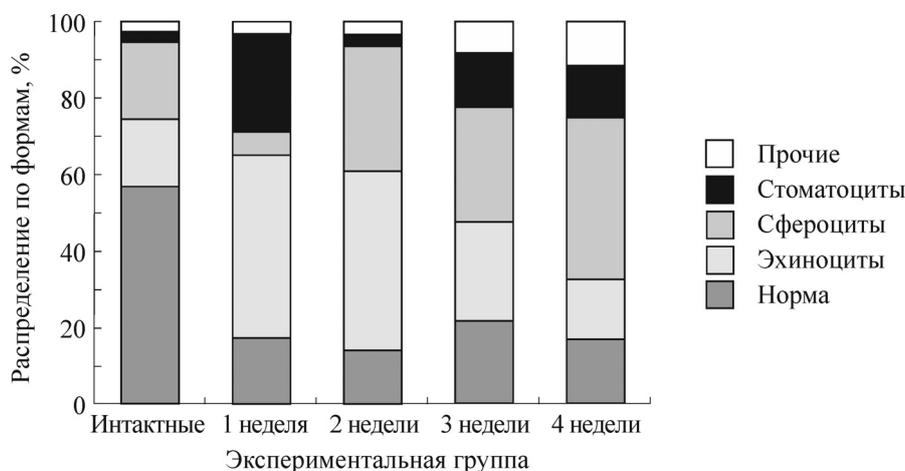
По окончании эксперимента (30 суток) в крови определяли концентрацию гликированного гемоглобина методом колоночной хроматографии наборами «Диабет-тест» («Фосфорсорб», Россия), в плазме крови животных определяли концентрации фруктозамина (по Л.Н. Викторовой и В.К. Городецкому), малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой (по И.Д. Стальной и Т.Г. Гаришвили), в гемолизатах определяли активность антиоксидантных ферментов каталазы (перманганатометрическим методом) и пероксидазы (колориметрическим методом с индигокармином). Статистическую обработку результатов исследования проводили в программном пакете «Biostatistica» с применением критериев Стьюдента, Уилкоксона, Манна–Уитни и  $\chi^2$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На 30-е сутки после введения аллоксана у экспериментальных животных развилась стойкая гипергликемия. Уровень глюкозы и гликированного гемоглобина во второй группе увеличился в 5,3 и 3,3 раза соответственно, что подтверждает развитие аллоксанового сахарного диабета (табл. 1). В результате анализа крови



**Рис. 1.** Изменения структуры эритроцитов в динамике течения аллоксанового диабета. Изображение получено с помощью сканирующего зондового микроскопа «Интегра-Максимус» в полуконтактном режиме; увеличение  $\times 200$ . Показана структура эритроцитов животного через одну (а), две (б), три (в) и четыре (г) недели после введения аллоксана.



**Рис. 2.** Морфологическая характеристика эритроцитов в динамике течения аллоксанового диабета.

животных с СД установлены изменения размеров и форм эритроцитов, которые варьировали в зависимости от длительности гипергликемии. Так, у крыс второй группы с СД (рис. 1) преобладали эритроциты аномальной формы, доля нормоцитов не превышала 25% против 57% у интактных животных ( $\chi^2$ -тест,  $P < 0,05$ ). Если на первой–второй неделе эксперимента в крови крыс с СД преобладали эхиноциты (до 47% против 17% у интактных,  $\chi^2$ -тест,  $P < 0,05$ ), то на третьей–четвертой неделе доминировали сфероциты (до 55% против 20% у интактных животных,  $\chi^2$ -тест,  $P < 0,05$ ) (рис. 2). Эритроциты крыс с СД также имели больший диаметр ( $9,75 \pm 0,20$  против  $8,81 \pm 0,17$  мкм у интактных животных,  $t$ -тест,  $P < 0,05$ ), большую высоту ( $448 \pm 19,6$  против  $377 \pm 26,3$  нм у интактных,  $t$ -тест,  $P < 0,05$ ). Адгезия у крыс с СД также значительно изменялась – от  $60,3 \pm 12,25$  нН на первой неделе эксперимента до  $104,5 \pm 6,73$  нН на четвертой неделе, по срав-

нению с  $90,6 \pm 8,0$  нН у интактных животных,  $t$ -тест,  $P < 0,05$  (табл. 2).

Применение препарата ЛК у крыс третьей группы позволило существенно снизить уровни гипергликемии, HbA1c и малонового диальдегида, повысить активность каталазы и пероксидазы, по сравнению с показателями крыс с СД, критерий Манна–Уитни,  $P < 0,05$  (табл. 1). Однако введение ЛК практически не изменило морфологические характеристики эритроцитов: на протяжении всего эксперимента в препаратах крови преобладали сфероциты (от 29 до 47%,  $t$ -тест,  $P < 0,05$ ) (рис. 3,4), а значения адгезии были выше (от  $93 \pm 14,54$  нН до  $162 \pm 18,16$  нН,  $t$ -тест,  $P < 0,05$ ), чем в контрольной группе и у интактных животных (табл. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, нарушения в структуре эритроцитарной мембраны и связанные с ними изменения морфологии эритроцитов на ранних

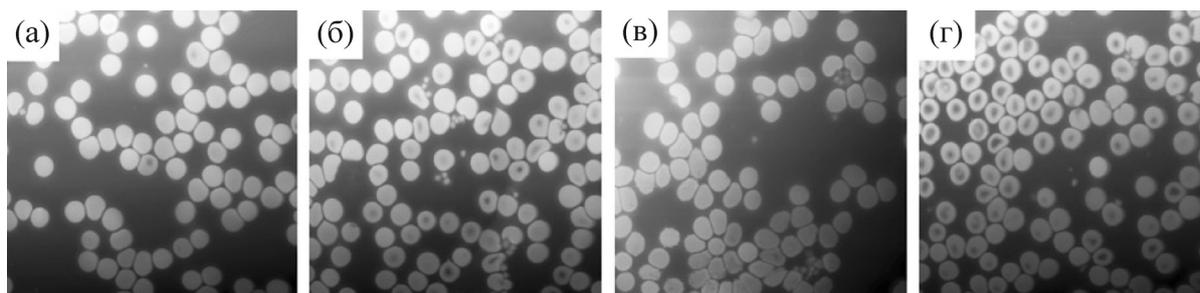
**Таблица 2.** Размеры и адгезия эритроцитов крыс при развитии аллоксанового сахарного диабета и его коррекции  $\alpha$ -липоевой кислотой

Группа	Интактные животные	Контроль СД				СД + ЛК			
		1	2	3	4	1	2	3	4
Неделя	4								
Диаметр, мкм	8,81 ± 0,32	8,96 ± 0,29	8,89 ± 0,24	9,10 ± 0,20	9,75 ± 0,20*	7,86 ± 0,37*#	7,11 ± 0,22*#	8,86 ± 0,26	9,82 ± 0,15*
Высота, нм	377,5 ± 26,3	372,7 ± 32,9	395,3 ± 25,1	436,4 ± 23,1*	448,6 ± 19,6*	416,0 ± 18,3#	436,8 ± 21,2*#	500,2 ± 20,2*#	433,5 ± 30,2*#
Адгезия, нН	90,59 ± 19,01	60,25 ± 12,1*	67,94 ± 9,19*	129,50 ± 18,8*	104,5 ± 6,7*	162,4 ± 18,2*#	149,0 ± 15,4*#	93,3 ± 14,5#	156,8 ± 13,2*#

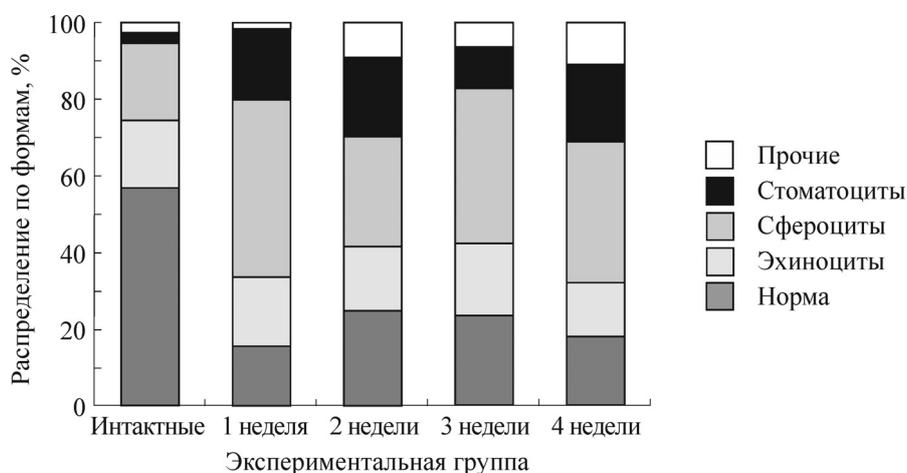
Примечание. \* – Статистически значимые различия с интактной группой животных при  $P < 0,05$ , # – статистически значимые различия с группой животных с СД при  $P < 0,05$ .

стадиях развития сахарного диабета определяются в основном гликированием белков эритроцитарных мембран и цитоскелета, что и приводит к деформируемости эритроцита и появлению аномальных необратимо измененных форм – сфероцитов, которое нарастает с уве-

личением срока гипергликемии. Применение известного антиоксиданта – липоевой кислоты – способствовало уменьшению уровня глюкозы, гликированного гемоглобина и фруктозамина в крови. Характерно, что снижение фруктозамина не связано с уменьшением уровня общего



**Рис. 3.** Изменения структуры эритроцитов в динамике течения аллоксанового диабета на фоне введения  $\alpha$ -липоевой кислоты. Изображение получено с помощью сканирующего зондового микроскопа «Интегра-Максимус» в полуконтактном режиме, увеличение  $\times 200$ . Показана структура эритроцитов животного через одну (а), две (б), три (в) и четыре (г) недели после введения аллоксана.



**Рис. 4.** Морфологическая характеристика эритроцитов в динамике течения аллоксанового диабета на фоне введения  $\alpha$ -липоевой кислоты.

белка в плазме крови (табл. 1). У крыс, леченных ЛК, увеличивалась активность ферментов антиокислительной защиты. Однако, по-видимому, необратимое гликирование белков, происходящее на первых этапах возникновения гипергликемии, является основополагающим фактором в формировании нарушений морфофункциональных характеристик эритроцита. В связи с этим представляют интерес литературные данные об элиминировании из циркуляции эритроцитов, белки и фосфолипиды мембран которых модифицированы метилглиоксалем – промежуточным продуктом гликирования, посредством апоптоза (эриптоза) [15]. Также сообщается о способности ЛК индуцировать эриптоз [16]. Таким образом, индуцированный гипергликемией карбонильный стресс способствует смене популяции циркулирующих эритроцитов. Использование ЛК еще больше ускоряет выведение из кровотока необратимо модифицированных клеток, что, несомненно, способствует улучшению реологических свойств крови.

#### ВЫВОДЫ

Применение атомно-силовой микроскопии позволяет выявить существенные изменения морфологии и биофизических свойств эритроцитов, формирующиеся наряду с метаболическими нарушениями при развитии аллоксанового СД у крыс. Коррекция гипергликемии, гликирования белков и оксидативного стресса вследствие применения ЛК влияет также и на динамику морфологии и биофизических свойств эритроцитов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №16-15-00039).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Т. Г. Бархина, Г. М. Никитина, М. М. Бархина и др., Успехи соврем. естествознания **6**, 64 (2006).
2. Т. Г. Бархина, Г. М. Никитина и А. С. Черных, Успехи соврем. естествознания **1**, 35 (2006).
3. R. Agrawal, T. Smart, J. Nobre-Cardoso et al., Sci. Rep. **6**, 15873 (2016).
4. J. G. Mohanty, E. Nagababu, and J. M. Rifkind, Front. Physiol. **5**, 84 (2014).
5. И. Ф. Гетте, И. Г. Данилова и В. К. Кротов, Вестн. Уральской мед. академ. науки **3**, 22 (2009).
6. E. Nagababu, A. V. Scott, D. J. Johnson, et al., Transfusion **56** (5), 1101 (2016).
7. O. Bashiru Shola, and F. Olatunde Olugbenga, Anemia 2015, 848921 (2015).
8. М. И. Балаболкин, Е. М. Клебанова и В. М. Креминская, *Лечение сахарного диабета и его осложнений* (Медицина, М., 2005).
9. F. A. Carvalho and N. C. Santos, Life **64** (6), 465 (2012).
10. I. Dulińska, M. Targosz, W. Strojny, et al., J. Biochem. Biophys. Methods **66**, 1 (2006).
11. A. Makhro, C. Achilli, A. Ciana, et al., Blood Rev. **27**, 91 (2013).
12. Ю. М. Ефремов, Д. В. Багров, Е. В. Дубровин и др., Биофизика **56** (2), 288 (2011).
13. И. Г. Данилова, И. Ф. Гетте и Т. С. Булавинцева, Патент на изобретение № 2534411, 27.11.2014, Бюлл. №33.
14. В. А. Барабой, Укр. биохим. журн. **77** (3), 20 (2005).
15. J. P. Nicolay, J. Schneider, O. M. Niemoeller, et al., Cell. Physiol. Biochem. **18**, 223 (2006).
16. S. K. Bhavsar, D. Bobbala, N. T. Xuan, et al., Cell. Physiol. Biochem. **26** (6), 859 (2010).

## Atomic Force Microscopy Imaging of Red Blood Cells and Metabolic Disorders in Experimental Diabetes Mellitus and Its Correction with Lipoic Acid

V.V. Emelianov, D.V. Leontev, A.V. Ishchenko, T.S. Bulavintseva,  
E.A. Savateeva, and I.G. Danilova

*Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin,  
ul. Mira 19, Yekaterinburg, 620002 Russia*

Peroxidation of the lipids in the blood plasma and erythrocytes is not responsible for the state of erythrocyte membranes in rats with alloxan-induced diabetes mellitus. Administration of  $\alpha$ -lipoic acid for development of alloxan diabetes in rats leads to metabolic activity in the blood and essential change in morphology of erythrocytes investigated with atomic force microscopy.

*Key words: alloxan diabetes, hyperglycemia, morphology of red blood cell, erythrocyte adhesion, lipid peroxidation*