

мується на досить високому рівні ще до 30-ї доби, після чого знову ще підвищується. Це свідчить про тривале збереження в обпеченому оці явищ хронічного запалення, яке, як відомо із практики, під впливом різних несприятливих факторів може рецидивувати.

Висновки

Таким чином, як видно із представлених даних, вміст в електроелімінаті білка, амінного азоту і рівень протеолітичної активності залежать від ступеня тяжкості опіку і термінів, що минули після опіку, що узгоджується зі стадійністю перебігу опікового процесу.

Це має, по-перше, важливе теоретичне значення, оскільки за своєю суттю вивчені нами за допомогою ЕЕ біохімічні показники відображають патологічні процеси, що перебігають у тканинах і середовищах ока при його опіковому ураженні і є основою патогенезу клінічних проявів опікового

процесу в оці, які спостерігаються візуально. По-друге, отримані дані мають велике практичне значення, оскільки за вмістом білка й амінного азоту в елімінаті можна судити про ступінь розпаду тканин ока і самих білків на їх складові частини, а за рівнем протеолітичної активності в елімінаті — про рівень протеолізу і запальних процесів у тканинах ока. Дослідження всіх цих компонентів в електроелімінаті в динаміці опікового процесу дозволяє об'єктивно діагностувати ступінь тяжкості опіку, спостерігати за динамікою перебігу в тканинах ока деструктивно-запальних і відновних процесів, тобто визначати стадії опікового процесу, отже, орієнтувати лікаря на проведення відповідних патогенетично спрямованих лікувальних заходів залежно від ступеня тяжкості опіку та його стадій, застосовувати найбільш рекомендовані в той чи інший період опікового процесу медичні препарати

і контролювати ефективність проведення лікування.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Веремеєнко К. Н.* Ферменти протеоліза и их ингибиторы в медицинской практике. — К.: Здоров'я, 1971. — 94 с.
2. *Колб В. Г., Камышников В. С.* Клиническая биохимия. — Минск: Беларусь, 1976. — 83 с.
3. *Пучковская Н. А., Якименко С. А., Непомящая В. М.* Ожоги глаз. — М.: Медицина, 2001. — 272 с.
4. *Черикчи Л. Е.* Электрофорез и электроэлиминация в экспериментальной и клинической офтальмологии: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Одесса, 1971. — 32 с.
5. *Чернух А. М.* Воспаление. — М.: Медицина, 1979. — 447 с.
6. *Чеснокова Н. Б.* Роль протеолитических ферментов и их ингибиторов в патологии роговицы: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.08/Московский НИИ ГБ им. Гельмгольца. — М., 1991. — 34 с.
7. *Якименко С. А., Коломийчук С. Г., Гладуш Т. И.* // Офтальмол. журнал. — 2002. — № 5. — С. 4-10.
8. *Якименко С. А.* // Там же. — 2001. — № 3. — С. 78-81.
9. *Lowry O. H. et al.* // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265-275.

УДК 616-092:616-073-584

Н. В. Кресюн

ОСОБЛИВОСТІ МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ У ХВОРИХ З ПРОСТОЮ ФОРМОЮ ДІАБЕТИЧНОЇ РЕТИНОПАТІЇ

Одеський державний медичний університет

За визначенням експертів ВООЗ, «цукровий діабет (ЦД) — це генетично обумовлене порушення метаболізму, яке у своєму повному клінічному прояві характеризується хронічною гіперглікемією, атеросклеротичним та мікроангіопатичним ураженням судин та нейропатією» [1].

Найчастіше причиною інвалідності та смертності при цьому захворюванні є діабетичні ангіопатії: до 80 % хворих помирає від ураження серцево-судинної системи; 30 % —

втрачають зір через ураження очей. В цілому у хворих на ЦД сліпота спостерігається у 20 разів частіше, ніж у загальній популяції, через те що діабетична ретинопатія є одним із найчастіших і прогностично несприятливих проявів універсальної діабетичної мікроангіопатії. До факторів ризику належать не тільки тривалість захворювання на діабет, а й вік, багаторічна декомпенсація, стійка гіперліпопротеїдемія, артеріальна гіпертензія тощо [2]. Слід зазначити, що

активне формування судинних ушкоджень сітківки відбувається у перші 10 років захворювання, досягаючи максимуму через 20 та 30 років. Причому вже при вперше виявленому ЦД можуть відмічатися порушення мікроциркуляції [3].

Патогенез діабетичних ретинопатій дуже складний. Сьогодні встановлено, що пусковим механізмом є генетичні фактори та діабетичні порушення обміну речовин. Подальше прогресування судинних уражень обумовлене пору-



шенням нейрогуморальної регуляції, гемореології, оксигенації, гіперпродукції контрінсулярних гормонів й автоімунні порушення. При цьому відмічаються різкі зміни картини крові — гіперліпідемія, гіперліпопротеїдемія з підвищеним вмістом ліпопротеїнів низької та наднизької щільності, гіпоальбумінемія, гіперглобулінемія та ін.

Слід припустити, що в першу чергу суттєві зміни виникають у клітинних мембранах, однак досі вони недостатньо вивчені, хоча такі дослідження почали проводитися більше 10 років тому [4; 5]. Зважаючи на викладене вище, **метою нашого дослідження** було вивчення морфофункціонального стану мембран еритроцитів у хворих з простою формою діабетичних ретинопатій.

Матеріали та методи дослідження

Як відомо, мембрана еритроцитів є універсальною моделлю клітинної мембрани і тому може слугувати об'єктивним об'єктом дослідження. Структурну основу будь-якої, у тому числі еритроцитарної мембрани, становить фосфоліпідний бімолекулярний шар із вбудованими молекулами білка, який знаходиться як на поверхні, так і глибоко всередині ліпідного бішару [6]. Саме він виконує у мембрані функцію бар'єра, матриці для маркерних ферментів, рецепторів та інших вбудованих у мембрану білків, глікопротеїдів і гліколіпідів [7; 8].

Для вивчення морфофункціонального стану мембран еритроцитів у хворих з простою формою діабетичних ретинопатій використовували метод їх флуоресцентного зондування [8]. Суть даного методу полягає у тому, що при опроміненні клітинних і субклітинних структур ультрафіолетовим світлом їх молекули поглинають енергію і переходять у збуджений стан. Однак у такому стані їхні молекули

довго існувати не можуть, тому вони швидко повертаються у висхідний не збуджений стан. Перехід із одного стану в інший супроводжується виділенням енергії, флуоресценцією, яку можна зареєструвати відповідними приладами. Оскільки самі ліпіди не флуоресціюють, у бішар мембран вводять певну кількість флуоресцентного зонда (ФЗ). Зонд — це невелика молекула, яка реагує на зміни у мікросоточенні.

Сьогодні відомо близько 40 різних сполук, які застосовуються у якості ФЗ [8]. Вони поділяються на універсальні (реагують на інтегральні зміни у мембрані) і спеціальні (реагують на зміни одного біофізичного параметра мембран). Для більшості ФЗ встановлено глибину їх занурення та орієнтацію у ліпідному бішарі, в якому умовно виділяють чотири зони: полярні головки, гліцеринові залишки, жирнокислотні ланцюги та кінцеві метильні групи [9]. Усі ФЗ мають гідрофобний радикал, а деякі — дипольний момент чи заряджену групу. Виходячи з цього, встановлено, що гідрофобні ФЗ проникають у вуглеводну ділянку фосфоліпідної мембрани, а амфіфільні (які мають гідрофобну і заряджену групи) локалізуються на поверхні межі мембрана — розчинник [10].

У наших дослідженнях використовувались 2 зонди: універсальний — 1-анілінонафталін-8-сульфонат (1,8-АНС), який несе від'ємний заряд, і гідрофобний — N-феніл-1-нафтиламін (1-ФНА).

Молекула АНС, завдяки наявності зарядженої сульфогрупи ($pK_a=1$), не може глибоко занурюватись у ліпідний бішар і розташовується на поверхні так, що одна грань фенольного кільця примикає до гліцеринової ділянки фосфоліпиду, а друга контактує з водою. Молекула ФНА не має сульфогрупи і тому занурюється у

мембрану глибше, ніж зонд АНС, і розташовується на відстані 8\AA від триметиламіногрупи фосфоліпиду.

Враховуючи нестачу електронної густини атома азоту і можливості утворення водневих зв'язків встановлено, що молекула ФНА розташовується у ділянці карбонільних груп фосфоліпідів. Таким чином, флуоресценція ФЗ відображає зміни в різних шарах мембран еритроцитів. Вивчалися такі показники: зміни в'язкості («плинності») фосфоліпідного бішару, температура структурних перебудов, поверхневі заряди, трансмембранний потенціал, концентрація води та інших молекул — «гасників» флуоресценції, акцепторів і донорів енергії збудженого стану та ін.

У наших дослідженнях вивчався стан мембран еритроцитів хворих на ЦД з різними стадіями ретинопатій. Було обстежено 59 хворих віком від 25 до 70 років з діагнозом ЦД, які, залежно від офтальмологічного статусу, були розподілені на 2 групи: 1-ша — хворі без ретинопатій (10 осіб) і 2-га — з ретинопатіями (49 пацієнтів). У свою чергу 49 хворих з ретинопатіями були розділені на 3 підгрупи залежно від стадії захворювання: А — I стадія (17 хворих); Б — II стадія (19 пацієнтів) і В — III стадія (13 осіб). В якості контролю використали 15 здорових донорів. Диференціальне центрифугування крові проводили на центрифугі L5-65 "Beckman" у бакетному роторі SW-40 Ti та градієнтні сахарози.

Виділення мембран еритроцитів проводили автоматичним їх прокачуванням з реєстрацією і контролем на СФ "Uvikor D III-2089 LKB" фірми "Beckman" при довжині хвилі 280 нм з графічною реєстрацією піків переходу середовищ, заміром їх об'ємів. Контроль чистоти виділення мембран еритроцитів проводили за допомогою мікроскопа. Флуо-



ресценцію збуджували та реєстрували за допомогою спектрофлуориметра "Opton" (Німеччина) при довжині хвилі для ФЗ АНС — 360 і 480 нм; для ФНА — 350 і 420 нм, щільна 1,6.

Результати дослідження та їх обговорення

Проведені нами раніше дослідження показали, що ЦД суттєво порушує метаболічні процеси, призводить до тяжкої інтоксикації організму, підсилює катаболічні процеси, автоімунізацію і цілу низку інших порушень, які формують синдромомплекс. Незаперечно, що в основі патогенетичних механізмів розвитку діабетичних ретинопатій знаходиться порушення функції клітинних мембран. Про це свідчить низка досліджень [11; 12]. Підтвердженням є також проведені нами біофізичні дослідження за допомогою ФЗ, морфофункціонального стану мембран еритроцитів у хворих на ЦД ускладнений ретинопатіями різного ступеня вираженості. Враховуючи ті обставини, що мембрани еритроцитів є універсальним об'єктом вивчення стану клітинних мембран організму, з великою часткою вірогідності можна екстраполювати одержані дані на інші мембрани організму [12].

Результати дослідження стану мембран еритроцитів при ЦД за допомогою ФЗ АНС по-

казали, що виникають суттєві зміни функції їх поверхневих шарів, які виражаються значним гасінням флуоресценції як інтегрального показника (F_{mol}) з $1,8 \cdot 10^6$ у контролі до $8,5 \cdot 10^5$ (на 52,8 %). У хворих на ЦД з ретинопатіями цей показник продовжував зменшуватися. Так, при ЦД з ретинопатіями I стадії F_{mol} становив 28,3 % від контролю; при II стадії — 23,9 %, а при III — 11,7 % відповідно (табл. 1).

Зміни інтенсивності флуоресценції є результатом змін питомої кількості центрів зв'язування зонда (N). У хворих на ЦД без ретинопатій цей показник збільшився на 292,3 % (від $1,3 \cdot 10^{-4}$ до $2,5 \cdot 10^{-4}$). У хворих на ЦД з ретинопатіями цей показник продовжував збільшуватися, що свідчить про більш глибокі зміни у мембранах.

При ЦД з ретинопатіями I стадії він збільшився, порівняно з контролем, до 223,1 %; II стадії — 315,4 % і III стадії — 446,1 %. Таким чином, при найтяжчій (III) стадії діабетичної ретинопатії, питоме число центрів зв'язування ФЗ з мембранами еритроцитів збільшилось у 4,5 разу порівняно з контролем і майже у 2,5 разу порівняно з ЦД без ретинопатії.

Відносно до збільшення кількості центрів зв'язування ФЗ АНС змінювалась і константа зв'язування цього зонда з мембранами (K_3). У хво-

рих на ЦД без ретинопатій вона збільшилася більш ніж у 1,5 разу ($2,8 \cdot 10^{-2}$ порівняно з $1,8 \cdot 10^{-2}$ у контролі), що свідчить про розшарування фосфоліпідного бішару і збільшення «доступності» зонда до білкових рецепторів мембран. У хворих на ЦД з ретинопатіями цей показник продовжував погіршуватися. Причому з прогресуванням ретинопатії K_3 збільшувалась. При I стадії ретинопатії вона становила $3,0 \cdot 10^{-2}$; II стадії — $3,7 \cdot 10^{-2}$ і при III — $4,1 \cdot 10^{-2}$ (при $2,8 \cdot 10^{-2}$ у хворих на ЦД без ретинопатії і $1,8 \cdot 10^{-2}$ у контролі). Таким чином, при III (найтяжчій) стадії ретинопатії K_3 ФЗ АНС збільшилась, порівняно з контролем, на 227,8 %.

Відповідно до цього константа дисоціації зонда (K_d) як величина обернена константі зв'язування, вірогідно знижувалась. У хворих на ЦД без ретинопатії вона становила 48,1 % від контролю, а з ретинопатіями — 43,7; 25,9 та 18,0 % відповідно до стадій захворювання.

Аналогічні дослідження проведені з уведенням зонда ФНА. Відповідно до його хімічної структури та функціональних груп він проникає у більш глибокі шари мембран. Тому за змінами показників його взаємодії з мембранами можна судити про порушення функції більш глибоких шарів мембран. Взаємодія зонда ФНА з мембранами підтвердила закономір-

Таблиця 1

Функціональний стан мембран еритроцитів при різних стадіях ретинопатій на фоні цукрового діабету за даними флуоресцентного зондування за допомогою зонда АНС

Групи обстежуваних	K_3		K_d		N		F_{mol}	
	абс., M^{-1}	%	абс., M	%	абс., М/мг білка	%	Абс.	%
Здорові пацієнти (контроль)	$1,8 \cdot 10^{-2}$	100,0	86,5	100,0	$1,3 \cdot 10^{-4}$	100,0	$1,8 \cdot 10^6$	100,0
Хворі на ЦД без ретинопатії	$2,8 \cdot 10^{-2}$	155,5***	41,6	48,1***	$2,5 \cdot 10^{-4}$	192,3***	$8,5 \cdot 10^5$	47,2***
Хворі на ЦД з ретинопатією	$3,0 \cdot 10^{-2}$	166,7***	37,8	43,7***	$2,9 \cdot 10^{-4}$	223,1***	$5,1 \cdot 10^5$	28,3***
		107,1#		90,9#		116,0#		60,0#
II стадія	$3,7 \cdot 10^{-2}$	205,5***	22,4	25,9***	$4,1 \cdot 10^{-4}$	315,4***	$4,3 \cdot 10^5$	23,9***
		132,1##		53,8###		164,0###		50,6###
III стадія	$4,1 \cdot 10^{-2}$	227,8***	15,6	18,0***	$5,8 \cdot 10^{-4}$	446,1***	$2,1 \cdot 10^5$	11,7***
		146,4###		37,5###		232,0###		24,7###

Примітка. У табл. 1 і 2 наводяться значення коефіцієнта кореляції: * — 0,30 — слабкий ступінь; ** — 0,30–0,69 — середній ступінь; *** — 0,70 і більше — високий ступінь; * — порівняно з контролем; # — порівняно з ЦД без ретинопатії.



Функціональний стан мембран еритроцитів при різних стадіях ретинопатій на фоні цукрового діабету за даними флуоресцентного зондування за допомогою зонда ФНА

Групи обстежуваних	K ₃		K _d		N		F _{mol}	
	абс., M ⁻¹	%	абс., M	%	абс., M/мг білка	%	Абс.	%
Здорові пацієнти (контроль)	4,2·10 ⁴	100,0	1,9·10 ⁻⁵	100,0	7,1·10 ⁻⁴	100,0	3,1·10 ⁵	100,0
Хворі на ЦД без ретинопатій	6,4·10 ⁴	152,4***	1,4·10 ⁻⁵	73,7***	4,9·10 ⁻⁴	69,0***	2,3·10 ⁵	74,2***
Хворі на ЦД з ретинопатією								
I стадія	7,1·10 ⁴	169,0*** 111,0#	1,4·10 ⁻⁵	73,7*** 100,0#	4,7·10 ⁻⁴	66,2*** 95,9	2,0·10 ⁵	64,5*** 86,9#
II стадія	7,9·10 ⁴	188,1*** 123,4##	1,2·10 ⁻⁵	63,2** 85,7#	4,5·10 ⁻⁴	63,4*** 91,8#	1,9·10 ⁵	61,3*** 82,6#
III стадія	8,7·10 ²	207,1*** 135,9###	1,1·10 ⁻⁵	57,9*** 78,6#	4,1·10 ⁻⁴	57,7*** 83,7##	1,5·10 ⁵	48,4*** 65,2###

ність, одержану при введенні ФЗ АНС, однак вираженість цих змін була значно меншою.

Сумарна флуоресценція (F_{mol}) із зондом ФНА у глибоких шарах мембран еритроцитів у хворих на ЦД без ретинопатій знижувалася на 25,8 % (від 3,1·10⁵ до 2,3·10⁵) (табл. 2). У хворих на ЦД з ретинопатіями вона так само, як із ФЗ АНС, продовжувала знижуватись до 64,5; 61,3; 48,4 % відповідно до стадій ретинопатії. Одержані дані свідчать про порушення функції більш глибоких шарів мембран.

Показник кількості центрів зв'язування ФНА (N), на відміну від ФЗ АНС, зменшувався. При ЦД без ретинопатій цей показник зменшився до 69,0 %, а з ретинопатіями відповідно до стадій захворювання становив: 66,2; 63,4 і 57,7 %. Отримані діаметрально протилежні дані щодо змін кількості центрів зв'язування пояснюються тим, що у глибоких шарах мембран ще не виникли серйозні конформаційні зміни структур білків, з одного боку, а з другого — у зв'язку зі змінами фосфоліпідного бішару порушень зазнали поверхневі шари, що й було зареєстровано за допомогою ФЗ АНС.

Константа зв'язування ФЗ ФНА (K₃) за спрямованістю і вираженістю не відрізнялась від такої для ФЗ АНС. Відповідно до константи зв'язування змінювалась і константа дисоціації (див. табл. 2). Вона повністю повторювала закономірність, яку було отримано для ФЗ АНС.

Одержані за допомогою ФЗ ФНА дані щодо зміни константи зв'язування і константи дисоціації у глибоких шарах мембран еритроцитів свідчать про те, що в них також відбуваються морфофункціональні зміни.

Таким чином, на підставі вивчення морфофункціонального стану мембран еритроцитів за допомогою ФЗ можна зробити такі **ВИСНОВКИ**:

1. Цукровий діабет кардинально дискоординує метаболічні процеси в організмі і, у першу чергу, ліпідний обмін, призводить до порушення функції клітинних мембран. Ступінь вираженості цих змін корелює зі ступенем тяжкості цукрового діабету.

2. Найбільш суттєві зміни морфофункціонального стану мембран були одержані у хворих, які страждають на III стадію ретинопатії.

3. Одержані результати не тільки розкривають важливі патогенетичні механізми розвитку діабетичних ретинопатій, але й можуть бути критеріями оцінки тяжкості захворювання та ефективності застосованої фармакотерапії.

4. Флуоресцентне зондування мембран еритроцитів можна використовувати як скринінговий метод для виявлення цієї патології на ранніх етапах при масовому обстеженні різних категорій пацієнтів.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Этиологическая* многофакторность диабетической ангиопатии / Л. К. Мошетьова, Э. П. Касаткина,

Г. Ш. Сабурова, Э. А. Очирова и др. // *Офтальмохирургия*. — 2000. — № 4. — С. 72-75.

2. *High cardiovascular disease mortality* in subjects with visual impairment caused by diabetic retinopathy / U. I. Rajala, H. Pajunpaa, P. Koskela, S. Keinanen-Kiukkaanniemi // *Diabetes Care*. — 2000. — N 7. — P. 957-961.

3. *Sorokin E. L., Smoliakova G. P.* Structural and functional disorders of transcapillary metabolism if retina in patients with diabetic retinopathy // *Vestn Oftalmol.* — 1997. — Vol. 113. — N 2. — P. 16-9.

4. *Мазурина Н. К.* Современные данные о пролиферативном процессе при диабетической ретинопатии // *Вестн. офтальмол.* — 1999. — № 2. — С. 37-40.

5. *Миленькая Т., Бессмертная Е.* Диабетическая ретинопатия // *Врач*. — 2000. — № 3. — С. 8-11.

6. *Retinal capillary basement membrane thickening* in a porcine model of diabetes mellitus / D. P. Hainsworth, M. L. Katz, D. A. Sanders et al. // *Comp. Med.* — 2002. — Vol. 52, N 6. — P. 523-529.

7. *Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. — М.: Наука, 1980. — 320 с.

8. *Добрецов Г. Е., Владимиров Ю. А.* Исследование белков и мембран с помощью флуоресцентных зондов // *Успехи биол. и химии*. — 1975. — № 16. — С. 115-134.

9. *Ивков В. Г., Берестовский Г. Н.* Динамическая структура липидного бислоя. — М.: Наука, 1981. — 296 с.

10. *Бергельсон Л. Д.* Мембраны, молекулы, клетки. — М.: Наука, 1982. — 182 с.

11. *Ефимов А. С., Плешанов Е. В., Гогина И. Ф.* Морфофункциональные изменения эритроцитов при сахарном диабете. — 1988. — Т. 34, № 2. — С. 13-16.

12. *Jochmann C., Hammes H. P.* Epidemiology, pathogenesis and therapy of diabetic retinopathy and maculopathy // *Z. Arztl. Fortbild. Qualitatssich.* — 2002. — Vol. 96, N 3. — P. 167-174.

