

УДК 612.111: 616.24

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ РАЗЛИЧНОЙ ФОРМЫ И СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

Муравлёва Л. Е., Молотов-Лучанский В. Б., Ключев Д. А., Чайковская Н. А., Колесникова Е. А.

Карагандинский государственный медицинский университет (100008 Караганда, ул. Гоголя, 40), email: muravlev@inbox.ru; vilen53@mail.ru

Проведено исследование осмотической резистентности и сорбционной емкости эритроцитов у больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ). Больные были разделены на 5 групп. В первую группу вошли 27 больных ХОБЛ смешанного типа, средней тяжести. Во вторую группу вошли 25 больных ХОБЛ смешанного типа, тяжелой степени. Третью группу составили 24 больных ХОБЛ бронхитического типа, средней степени тяжести. В четвертую группу вошли 27 больных ХОБЛ бронхитического типа, тяжелой степени. В пятую группу отобраны 12 больных ХОБЛ крайней степени тяжести. Установлено, что изменения гипоосмотических эритрограмм у больных ХОБЛ зависели от клинической формы и тяжести болезни. У больных ХОБЛ наблюдалось увеличение сорбционной емкости эритроцитов, а также изменение коэффициента Q, который характеризует степень связывания метиленового синего с эритроцитами и диффузию красителя вовнутрь клеток.

Ключевые слова: ХОБЛ, эритроциты, физико-химические свойства.

PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF RED BLOOD CELLS AT PATIENTS WITH DIFFERENT CLINICAL FORMS AND SEVERITY OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Muravlyova L. E., Molotov-Luchanskiy V. B., Klyuyev D. A., Chaikovskaya N. A., Kolesnikova E. A.

Karaganda State Medical University, The Republic of Kazakhstan, Karaganda, Gogol street, 40, muravlev@inbox.ru; vilen53@mail.ru

The study of the osmotic resistance and sorption capacity of red blood cells at patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) was done. There were 5 groups of patients. The 1 group (n = 27) included patients with COPD moderate severity, mixed clinical form (emphysematous and bronchial). The 2 group (n = 25) consisted of patients with COPD, severe, also mixed forms. Group 3 (n = 24) included COPD patients, moderate, bronchial form. Group 4 (n = 27) represented patients with COPD, severe, also bronchial form. Group 5 (n = 12) represented patients with very severe bronchial form of COPD. It was observed that the alterations of hypoosmotic erythrograms at patients with COPD depended on clinical form and severity of the disease. At COPD patients an increase of the sorption capacity of erythrocytes and change in the coefficient Q, which characterize the binding of methylene blue with red blood cells and diffusion of the dye inside the cells were observed.

Keywords: COPD, erythrocytes, physico-chemical properties.

Введение

Среди молекулярно-клеточных событий, определяющих особенности течения и прогрессирования хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), одно из ключевых мест занимают изменения эритроцитов. У больных ХОБЛ наблюдается компенсаторный эритроцитоз, полицитемия, повышение вязкости крови на фоне расстройств газообмена, что часто сочетается с изменением морфологии эритроцитов (появление эхиноцитов, каплевидных, мишеневидных клеток, овалоцитов, сфероцитов на фоне снижения количества дискоцитов). Отмечается также снижение деформируемости эритроцитов и изменение их

агрегационной способности [4]. Нашими собственными исследованиями показано изменение сорбционной емкости эритроцитов крови больных с ХОБЛ [7].

Вместе с тем анализ данных литературы показал недостаточную изученность состояния физико-химических свойств эритроцитов крови больных ХОБЛ различных клинических форм и степеней тяжести.

Целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ) и сорбционной емкости эритроцитов (СЭЭ) крови больных с ХОБЛ в зависимости от преобладающего клинического варианта, формы и степени тяжести.

Материалы и методы исследования

Было сформировано 5 групп пациентов. За основу распределения больных по группам взят принцип наличия или преобладания обструктивного или рестриктивного варианта клинических проявлений ХОБЛ. В частности, при превалировании синдрома обструкции с кашлем и/или свистящими и низкотембровыми хрипами как в анамнезе, так и при настоящем обследовании, мы определяли бронхитическую клиническую форму ХОБЛ. Преобладание одышки «пыхтящего» характера, значительное снижение эластичности грудной клетки, бочкообразный её вид, коробочный перкуторный звук позволяли нам определить эмфизематозную форму ХОБЛ. Сочетание этих клинических симптомов расценивалось нами как смешанная форма хронической обструктивной болезни легких. Кроме того, принимался во внимание превалирующий обструктивный или рестриктивный тип нарушения легочной вентиляции, определенный спирографически. Несмотря на то, что в настоящее время данные клинические варианты не рассматриваются как обязательные в практической медицине для постановки диагноза ХОБЛ, в нашем исследовании мы считаем принципиальным такое распределение по группам, поскольку нас интересовали, прежде всего, универсальные механизмы становления и прогрессирования необратимых изменений в бронхолегочной системе. Для определения стадий, или степеней тяжести, ХОБЛ мы использовали так называемую спирометрическую классификацию, включающую согласно GOLD-2006 четыре стадии: стадия I – легкая; стадия II – среднетяжелая; стадия III – тяжелая; стадия IV – крайне тяжелая

В первую группу вошли 27 больных ХОБЛ смешанного типа, средней тяжести. Во вторую группу вошли 25 больных ХОБЛ смешанного типа, тяжелой степени. Третью группу составили 24 больных ХОБЛ бронхитического типа, средней степени тяжести. В четвертую группу вошли 27 больных ХОБЛ бронхитического типа, тяжелой степени. В пятую группу отобраны 12 больных ХОБЛ крайней степени тяжести. В данном случае мы не стали отличать эмфизематозный и бронхитический варианты, так как крайне тяжелая степень

ХОБЛ у обследованных пациентов фактически нивелировала клинические симптомы. Все пациенты обследовались в стационаре во время прохождения планового лечения. В качестве контрольных использованы показатели крови 15 практически здоровых лиц (первичных доноров). У всех пациентов и первичных доноров было получено информированное согласие на участие в исследовании.

Забор крови проводили в утренние часы натощак. Кровь стабилизировали гепарином. Эритроциты отделяли от плазмы центрифугированием, трижды промывали охлажденным физиологическим раствором с последующим центрифугированием.

ОРЭ определяли по методу [3] и выражали в %. Под осмотической резистентностью эритроцитов понимают их устойчивость по отношению к гипотоническим растворам NaCl. ОРЭ зависит от формы и степени зрелости эритроцитов, а также от изменения состава плазмы.

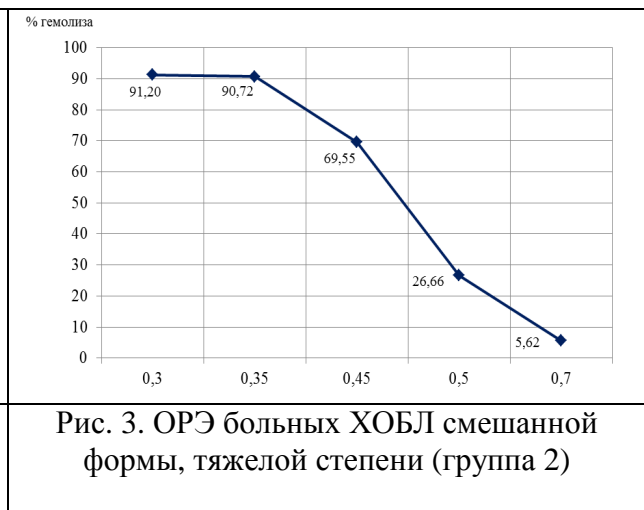
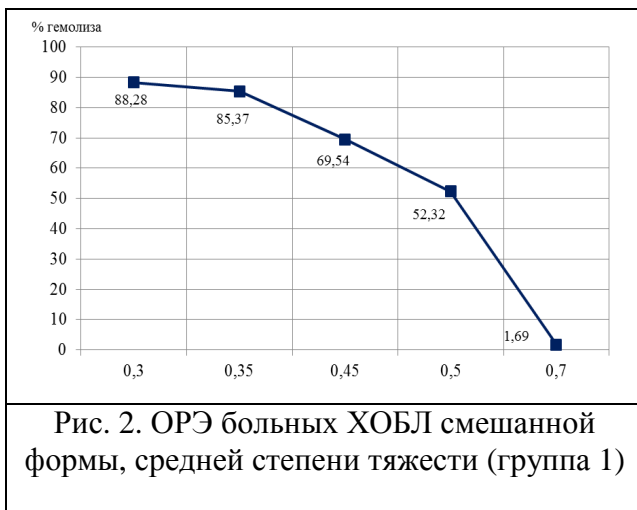
СЕЭ определяли, применяя краситель – метиленовый синий [2]. Единицы измерения – %. Также определяли количество метиленового синего, связавшегося с клетками (Cb), количество красителя, оставшегося в растворе (Cbs), что позволило рассчитать коэффициент распределения метиленового синего между клеткой и средой (Q) [5]. Значение коэффициента Q определяли по формуле: $Q = Cb / Cbs = (Vc/Vэ)(Do-Dk)/Dk$, где Do и Dk – значения оптической плотности раствора метиленового синего до и после инкубации с эритроцитами [5].

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета прикладных программ STATISTICA версия 7.0 с учетом вычислительных методов, рекомендуемых для биологии и медицины. Статистические методы исследования включали в себя: расчет медианы и моды, среднего квадратичного отклонения. Для определения достоверности полученных показателей использовался F-тест Фишера.

Результаты исследования и их обсуждение

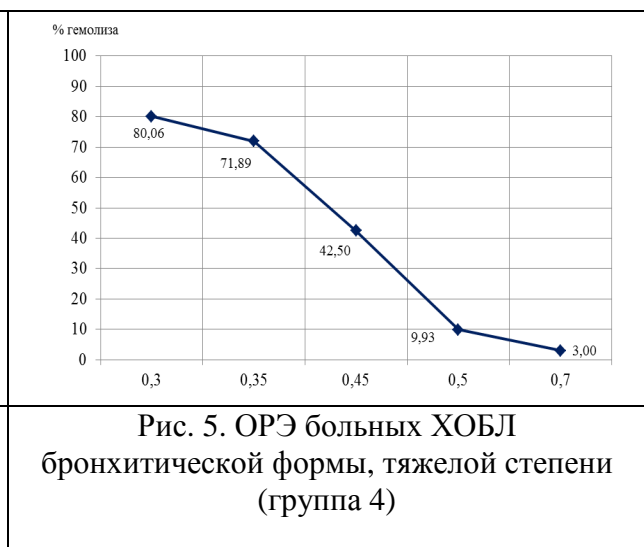
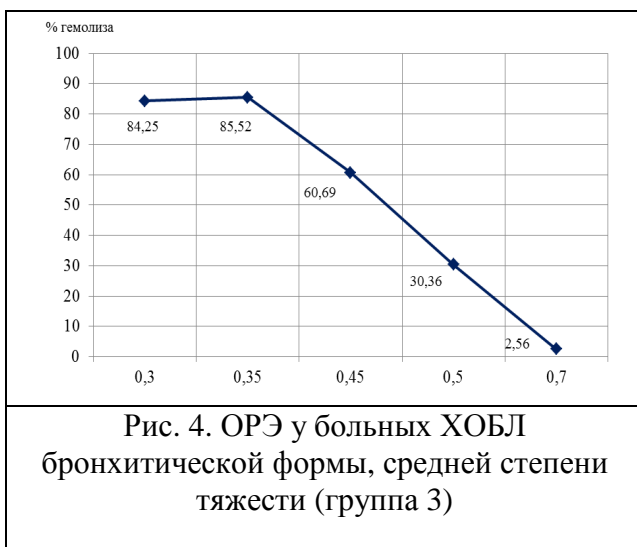
Результаты исследования ОРЭ крови больных ХОБЛ различных клинических форм и степеней тяжести приведены на рисунках 1–6.

Анализ результатов, представленных на рисунках 1 и 2, позволил выявить следующие закономерности. У больных ХОБЛ смешанной формы средней степени тяжести прослеживаются разнонаправленные изменения ОРЭ: увеличение процента эритроцитов, вовлеченных в гемолиз при инкубации в 0,3 % и 0,5 % растворах NaCl по сравнению с таковым контроля. В то же время снизился процент эритроцитов, вовлеченных в гемолиз при инкубации в 0,45 % растворе NaCl.

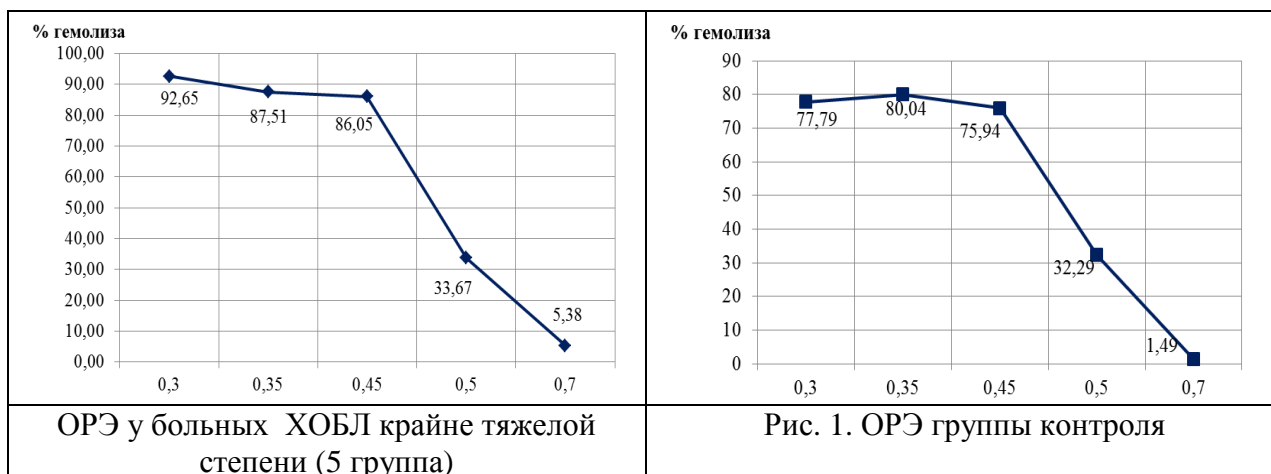


У больных 2 группы наблюдалось увеличение процента эритроцитов, вступающих в гемолиз при инкубации в 0,3 % и 0,35 % растворах NaCl, относительно контроля. В то же время снизился процент эритроцитов, вовлеченных в гемолиз при инкубации в 0,45 % и 0,5 % растворах NaCl.

У больных 1 и 2 групп зафиксировано увеличение процента эритроцитов, вовлеченных в гемолиз при инкубации в 0,7 % растворе NaCl, причем это отличие было достоверным относительно контроля ($p < 0.05$).



У больных ХОБЛ бронхитической формы (3 и 4 группы) при инкубации эритроцитов в 0,3 % растворе NaCl наблюдалось увеличение процента эритроцитов, вовлеченных в гемолиз относительно такового контроля. При инкубации в 0,45% растворе NaCl наблюдалось уменьшение процента эритроцитов, вовлеченных в гемолиз, относительно такового контроля. Значимое снижение ОРЭ отмечено при инкубации эритроцитов крови больных 4 группы при инкубации в 0,5 % растворе NaCl ($p < 0.05$).



У больных ХОБЛ крайне тяжелой степени (5 группа) наблюдается увеличение процента эритроцитов, вовлеченных в гемолиз при инкубации в 0,3 %, 0,35 %, 0,45 % и 0,7 % растворах NaCl, причем в последнем случае зафиксированы достоверные отличия от контроля ($p < 0.05$).

Как следует из полученных данных, выраженные изменения интегральных гипоосмотических эритрограмм в сравнении с контрольными показателями наблюдаются у всех больных ХОБЛ. Также обращает на себя внимание, что независимо от клинического варианта ХОБЛ тяжелая степень заболевания сопровождается резким снижением процента эритроцитов, вовлеченных в гемолиз при инкубации при 0,5 %. Но подобное явление не наблюдается при крайне тяжелой степени ХОБЛ.

Изменение ОРЭ у больных ХОБЛ может быть обусловлено появлением в популяции эритроцитов клеток с различной устойчивостью к гипоосмотической среде. Также вероятна активация эритроптоза, что, по нашему мнению, документируется увеличением процента эритроцитов, вовлеченных в гемолиз при инкубации в 0,7 % NaCl.

Результаты исследования распределения метиленового синего (коэффициент Q) и СЕЭ крови больных 1–5 групп представлены в таблице 1.

Таблица 1. СЕЭ/ коэффициент Q крови больных ХОБЛ различной клинической формы и степени тяжести ($X \pm m$)

Группы	СЕЭ,%	Q
ХОБЛ смешанной формы, средней степени тяжести, (группа 1)	61,65 ± 9,19 ^{#*}	0,94 ± 0,17 [#]
ХОБЛ смешанной формы, тяжелой степени (группа 2)	56,26 ± 10,26 ^{*#}	1,07 ± 0,17 ^{*#}
ХОБЛ бронхитической формы, средней степени тяжести (группа 3)	44,14 ± 18,33 ^{*#}	1,03 ± 0,25
ХОБЛ бронхитической формы, тяжелой степени (группа 4)	57,04 ± 18,09 ^{*#}	1,08 ± 0,4 ^{*#}
ХОБЛ крайне тяжелой степени (группа 5)	80,53 ± 20,89 [*]	0,72 ± 0,19

Контроль	36,2±1,4	0,78 ±0,19
----------	----------	------------

Из данных таблицы 1 следует, что у больных ХОБЛ смешанной и бронхитической формы зафиксировано увеличение СЕЭ по сравнению с контролем контроля. При сопоставлении результатов больных с одинаковой клинической формой ХОБЛ, но отличающихся степенью её тяжести, выявлена незначительная тенденция к увеличению СЕЭ при повышении степени тяжести ХОБЛ. У больных с крайне тяжелой степенью ХОБЛ показатель СЕЭ достоверно превышал контрольный и показатели 1–4 групп.

Увеличение СЕЭ рассматривают как индикатор повреждения мембран и клеточной дезорганизации [1]. При ХОБЛ в качестве основной причины повреждения мембран эритроцитов можно рассматривать окислительный стресс, что хорошо согласуется с ранее полученными данными [8,9].

Расчет коэффициента Q показал, что у больных 1–4 групп этот показатель возрастал по сравнению с контролем (соответственно, на 20,5 %, 37 %, 32 % и 38,5 %), тогда как у больных 5 группы, наоборот, незначительно снижался. Обращает на себя внимание тренд повышения коэффициента Q у больных ХОБЛ при нарастании степени её тяжести независимо от клинической формы.

Коэффициент Q характеризует степень связывания метиленового синего с эритроцитами и диффузию красителя вовнутрь клеток [5]. Исходя из этих представлений, наши результаты свидетельствуют об уменьшении диффузии красителя вовнутрь клеток, хотя этот факт можно также объяснить за счет изменения редуктазной активности, что приводит к образованию лейкоформы метиленового синего [6].

Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о выраженных нарушениях физико-химических свойств эритроцитов крови больных ХОБЛ. При этом нарастание неустойчивости физического статуса эритроцитов в гипотонической среде напрямую зависит от степени тяжести ХОБЛ и не зависит от клинического варианта заболевания. Диффузия цветового маркера сорбционной емкости увеличивается по мере нарастания тяжести ХОБЛ, но в пределах градаций от средней до тяжелой степени. Крайняя степень тяжести ХОБЛ характеризуется парадоксальными изменениями физических свойств эритроцитов. Они демонстрируют обратное движение – к восстановлению осмотической резистентности эритроцитов и возможному приостановлению апоптозной активности. Очевидно, это временное явление мобилизации внутренних клеточных резервов, которое может быть предвестником их истощения, что требует тщательного детального изучения данного феномена.

Список литературы

1. Веснина Н. В. Физико-химические особенности мембран эритроцитов у жителей Среднего Приобья / Н. В. Веснина, Л. М. Леонова, Э. А. Кашуба и др. // Медицинская наука и образование Урала. – 2008. – № 1. – С. 72-73.
2. Копытова Т. В. Исследование сорбционной емкости мембран эритроцитов для оценки характера эндогенной интоксикации при дерматозах // Клиническая лабораторная диагностика.– 2006. – № 1. – С 18-19.
3. Структурные свойства эритроцитов и состояние их антиоксидантной защиты у новорожденных после перенесенной гипоксии / С. Г. Резван и др. // Вопросы современной педиатрии. – 2008. – Т. 8, № 1. – С. 270-271.
4. Цыбжитова Э. Б., Сарычева Т. Г. Морфометрическая характеристика эритроцитов периферической крови больных хронической обструктивной болезнью легких при лазерном облучении крови // II Московская региональная научно-практическая конференция (с международным участием) «Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты». – М., 2009. – С. 94-95.
5. Gavrilov V. B., Kravchenko O. N., Konev S. V. Accumulation of methylene blue by erythrocytes and determination of its maximum sensitivity to cell damage // Biofizika. – 1999. – 44(5): 904-909].
6. May J. M, Qu Z. C., Cobb C. E. Reduction and uptake of methylene blue by human erythrocytes. Am J Physiol Cell Physiol. – 2004; 286(6): C1390-8.
7. Metabolic status of erythrocytes at patients with chronic obstructive pulmonary disease / L. E. Muravlyova, V. B. Molotov-Luchanskiy, D. A. Kluyev et al. // Archiv Euromedica. – 2013. – 1. – P. 44–46.
8. Muravlyuyova L. E., Molotov-Luchanskiy V. B., Kluyev V. B., Kolesnikova E. A., Demidchik L. A. The Protein Carbonyl Derivatives in Blood of Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease // European Researcher. – 2012. – Vol.(30). – № 9-3. – P. 1585 – 1588.
9. Muravlyuyova L. E., Molotov-Luchanskiy V. B., Kluyev V. B., Bakenova R. A., Kolesnikova E. A., Demidchik L. A. The carbonyl content in blood proteins in patients with chronic obstructive lung disease //Free Radical Biology and Medicine. – 2012. – V. 53. – Issue S1. – S.229.

Рецензенты:

Койчубеков Б.К., д.б.н., заведующий кафедрой медицинской биофизики и информатики Карагандинского государственного медицинского университета, г. Караганда.

Джангозина Д.М., д.м.н., профессор кафедры фармацевтических дисциплин Казахстанского университета «Болашак», г. Караганда.