

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ТКАНЕВОЙ ГИПОКСИИ У БОЛЬНЫХ ПНЕВМОНИЕЙ

Усманова С.Р.¹, Шамратова В.Г.¹, Исаева Е.Е.¹

¹ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», Уфа, e-mail: sve-usmanova@mail.ru

Гипоксия является одним из универсальных регуляторов энергетических процессов в нормальных условиях и важной причиной нарушения метаболизма клеток. Как типовой патологический процесс гипоксия сопровождает многие заболевания, в том числе пневмонию, при которой она обусловлена нарушением функции внешнего дыхания (ФВД) [4]. Цель настоящего исследования состояла в оценке диагностической значимости анализа возрастного состава эритроцитов периферического звена крови и определения уровня фетального гемоглобина (FetHb) при пневмонии, а также установление связей изученных параметров с традиционными критериями функционирования кислородтранспортной системы (КТС). В работе установлено, что вентиляционные нарушения ФВД, проявляющиеся в значимом уменьшении величины pO_2 (с 80,5 мм рт.ст. в группе контроля до 67,8 мм рт.ст. в группе больных пневмонией), компенсируются достоверным увеличением содержания FetHb (5,4% против 2,9% в контроле), обладающего повышенным сродством к кислороду и являющегося в силу этого резервным путем преодоления гипоксии. Обнаруженное у больных пневмонией изменение степени кислотной устойчивости эритроцитов служит, очевидно, пусковым механизмом усиления ответа молекулярно-генетического механизма при адаптации организма больных к гипоксии и может рассматриваться наряду с FetHb маркером гипоксического состояния. Ведущая роль указанных механизмов в поддержании кислородного гомеостаза подтверждена результатами факторного анализа.

Ключевые слова: гипоксия, пневмония, функция внешнего дыхания, кислородтранспортная функция крови, HIF-1, фетальный гемоглобин, кислотные эритрограммы, факторный анализ.

ADDITIONAL CRITERION FOR ASSESSING THE DEGREE OF TISSUE HYPOXIA IN PATIENTS WITH PNEUMONIA

Usmanova S.R.¹, Shamratova V.G.¹, Isaeva E.E.¹

¹Bashkir State University, Ufa, e-mail: sve-usmanova@mail.ru

Hypoxia is a universal regulator of energy processes in normal and important cause of metabolic disorders cells. As a typical pathological process hypoxia accompanies many diseases, including pneumonia, in which it is due to a violation of respiratory function (ERF) [4]. The purpose of this study was to assess the diagnostic significance of analyzing the age composition of red blood cells in peripheral blood and managers determine the level of fetal hemoglobin (FetHb) with pneumonia, and establish relationships with the studied parameters of the traditional criteria of functioning oxygen transport system (ITS). The paper found that the ventilation violations ERF, manifested in a significant decrease in pO_2 values (from 80.5 mmHg in the control group to 67.8 mm Hg in patients with pneumonia), offset by a significant increase content FetHb (5.4% vs. 2.9% in controls) having high affinity for oxygen and which is therefore redundant overcome by hypoxia. Found in patients with pneumonia change the degree of acidity is the stability of erythrocytes, obviously, trigger the gain response of molecular genetic mechanism during adaptation to hypoxia and patients can be treated along with FetHb marker of hypoxia. The leading role of these mechanisms in maintaining oxygen homeostasis confirmed by the results of the factor analysis.

Keywords: hypoxia, pneumonia, respiratory function, blood oxygen, HIF-1, fetal hemoglobin, acid erythrograms, factor analysis.

Кислородный гомеостаз организма обеспечивается, как известно, согласованным взаимодействием внешнего дыхания, аппарата кровообращения и кислородтранспортной системы (КТС) крови. Нарушение газового баланса может возникнуть при расстройстве или неполноценном функционировании любого из звеньев этой системы, в силу чего кислородная недостаточность, как типовой патологический процесс, сопровождает многие заболевания.

К числу заболеваний, приводящих к развитию гипоксии, относится пневмония – группа различных по происхождению, патогенезу и морфологическим характеристикам острое локальное инфекционно-воспалительное заболевание легких с преимущественным поражением респираторных отделов легких (альвеол, бронхиол) и внутриальвеолярной экссудацией [4]. При этом воспалительный процесс в бронхолегочной ткани вызывает значительные нарушения вентиляционной способности легких (чаще рестриктивные), что подтверждается данными спирографии.

Гипоксическое состояние, обусловленное неполноценным функционированием системы внешнего дыхания, предопределяет необходимость формирования компенсаторных перестроек, в реализации которых участвуют различные компоненты КТС организма. Важную роль в адаптации организма к дефициту кислорода играют молекулярно-генетические механизмы. В последние десятилетия было показано, что регуляция многих процессов, ответственных за транспорт кислорода осуществляется на транскрипционном уровне и модулируется гипоксия - индуцируемым фактором (hypoxia - inducible factor – HIF-1), который действует как прямой кислородный сенсор [7,8]. Он представляет собой гетеродимерный белок, кислородчувствительная субъединица которого HIF-1 α , содержит пролил-гидроксилазу (ПГ), «определяющую» внутриклеточное содержание кислорода. Эта оксигеназа использует молекулярный кислород в реакциях гидроксирования и поэтому осуществляет прямую связь между наличием молекулярного кислорода и регуляцией HIF-1. При снижении уровня кислорода в клетке происходит инактивация ПГ, что способствует стабилизации HIF-1, его переходу в ядро с последующим образованием транскрипционно-активного комплекса [10].

Мишенями HIF-1 является около 180 генов, экспрессирующих специфические белки, необходимые в условиях сниженного снабжения клеток кислородом. К ним относятся в, частности, ангиотензин- конвертирующий фермент, другие модуляторы сосудистого тонуса, эритропоэтин и другие индукторы эритропоэза. Под его влиянием также усиливается экспрессия гена, контролирующего синтез γ -цепей Hb в эритроблестах и возрастание в крови доли FetHb [7]. Обладая повышенным сродством к кислороду, он вносит существенный вклад в приспособление организма к новым условиям с измененной газовой средой при патологических состояниях, протекающих с гипоксией [3,5].

В этой связи представляет интерес изучение степени участия механизмов, реализующихся через активацию транскрипционного фактора HIF-1 и синтез специфических белков, в адаптации организма к недостатку кислорода при пневмонии. При этом об активизации экспрессии гена фетального гемоглобина можно судить по содержанию FetHb в

периферической крови, а о состоянии эритропоэза – посредством изучения возрастного состава популяции циркулирующих эритроцитов.

Цель исследования: Оценка диагностической значимости анализа популяционного состава эритроцитов периферической крови и определения количества FetHb при пневмонии и выявление вклада этих механизмов в обеспечение адаптации КТС организма к кислородному стрессу, обусловленному патогенезом основного заболевания.

Материалы и методы исследования. Обследована группа военнослужащих (ВС) по призыву (n=30) в возрасте от 18 до 23 лет с рентгенологически установленным диагнозом "внебольничная очаговая пневмония» средней степени тяжести на 3-5 день госпитализации с клиническим и инструментальным подтверждением. Группу сравнения составили военнослужащие в возрасте 18-23 лет (n=34), находящиеся на срочной службе в рядах ВС МО РФ, признанные на момент призыва здоровыми и годными к военной службе.

Спирография проводилась на компьютерно-диагностическом комплексе "Валента" (Санкт-Петербург), определяли статические показатели: частота дыхания, форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ), динамические (объем форсированного выдоха за 1 сек.) (ОФВ₁), индекс Тиффно. Гематологические исследования проводились с помощью анализатора «ADVIA 60» (Германия). В крови определялись следующие показатели: количество эритроцитов (RBC), концентрация Hb, уровень гематокрита (Ht), средний объем эритроцитов (MCV), средняя концентрация Hb в эритроците (MCHC). На аппарате «RAPIDLAB865» (Германия) измерялись pO₂ и pCO₂, кислородная сатурация (satO₂), а также содержание оксигенированного Hb (O₂Hb), FetHb, карбоксигемоглобина (COHb) и метгемоглобина (MetHb), показатели кислотно-основного состояния (КОС) крови: pH крови, содержание бикарбонатов крови (HCO₃), дефицит (избыток) оснований крови (BE). Рассчитывалась кислородная емкость крови (КЕК). Кинетика кислотного гемолиза изучалась по методу И.И Гительсона [1] и дополнялась построением и анализом эритрограмм.

Статистическую обработку результатов проводили, используя t-критерий Стьюдента и метод факторного анализа.

Результаты исследования и их обсуждение. Исследование функции внешнего дыхания у больных с пневмонией показало, что статические и динамические показатели респираторной системы варьируют в пределах возрастной нормы, но имеют значимые различия с контролем. Так, величина ФЖЕЛ снижена у больных на 18,4±1,1%, ОФВ₁ - на 15,2±1,6%, индекс Тиффно - на 14±1,0% соответственно (p≤0,05) (рис.1).

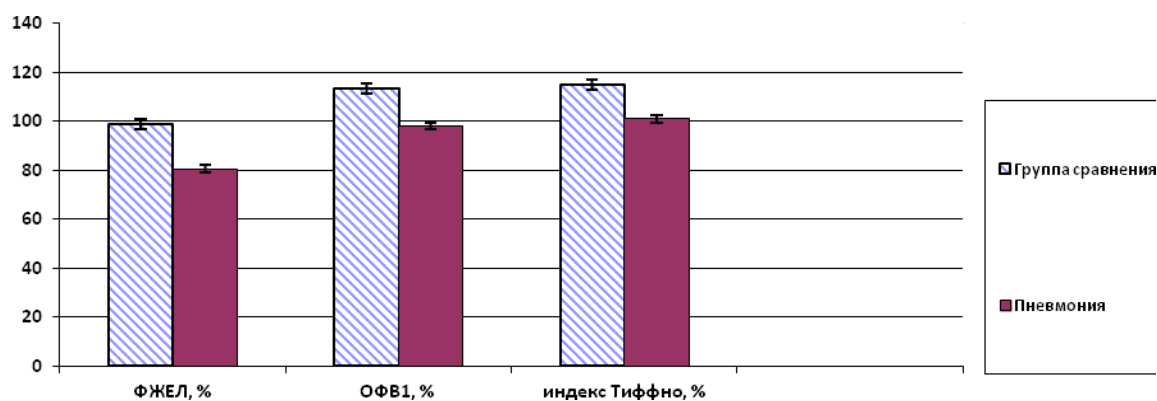


Рис.1. Показатели функции внешнего дыхания в группах обследования (достоверные отличия средних при $p < 0,05$)

Ослабление вентиляционной функции внешнего дыхания подтверждается выраженным уменьшением величины pO_2 (с $82,2 \pm 2,5$ мм рт ст до $65,2 \pm 1,9$ мм рт ст) и pCO_2 (с $42,5 \pm 1,8$ мм рт ст до $38,1 \pm 1,5$ мм рт ст) в крови обследуемых с пневмонией ($p < 0,05$) (рис.2). Вместе с тем, нами выявлено, что кислородная сатурация крови ($satO_2$) достоверно не отличается в группах ВС ($94,8 \pm 0,5\%$ в группе контроля и $93,2 \pm 1,0\%$ в группе больных). Это свидетельствует о развитии компенсации, направленной на поддержание приемлемого уровня насыщения крови O_2 .

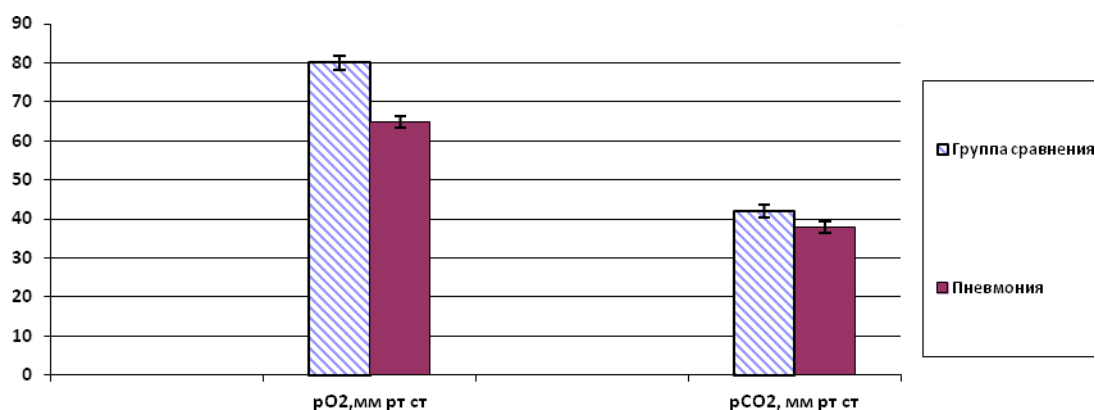


Рис.2. Показатели газового режима крови в группах обследуемых (достоверные отличия средних при $p < 0,05$).

Возникающее вследствие нарушения газового состава крови значимое увеличение pH (с 7,40 до 7,43) ($p < 0,05$) и снижение стандартного бикарбоната (с 1,27 до 0,68 ммоль/л) ($p < 0,05$) можно расценивать как проявление частично компенсированного респираторного алкалоза [2].

Дефицит O_2 , обусловленный уменьшением его поглощения легкими, протекает на фоне достоверного снижения суммарных показателей красной крови (RBC, Hb, Ht) без

изменения уровня индивидуальных характеристик эритроцитов (объема клеток и их насыщенность Hb) (табл.1). Это позволяет предположить, что одной из причин снижения кислородной емкости крови является уменьшение стойкости эритроцитов. Изучение кислотной резистентности эритроцитов выявило у больных пневмонией укорочение общего времени гемолиза, сдвиг максимума эритрограммы влево и увеличение самого максимума, свидетельствуя о резком падении стойкости эритроцитов.

Таблица 1

Показатели красной крови в группах обследованных

Показатели	Группы обследованных военнослужащих	
	Группа сравнения Группа 1	Пневмония Группа 2
Эритроциты, 10^{12} /л	4,98±0,06	4,64 ± 0,09*
Hb, г/л	147,2±1,7	136,1±2,7*
MCV, fl	86,5±0,8	86,4±0,6
MCHC, p/dl	34,1±0,1	33,9±0,2
Ht, %	43,04±0,6	40,2±0,8*
КЕК, мл/л	194 ± 1,5	172,7 ± 1,8*

Обозначения: * - достоверное отличие показателей в группах при $p < 0,05$

При этом доля эритроцитов с пониженной стойкостью оказалась вдвое выше, чем аналогичных форм в группе сравнения, а количество высокостойких клеток при пневмонии, напротив, резко снижается (табл.2).

Таблица 2

Показатели кинетики кислотного гемолиза и процентное содержание эритроцитов по стойкости в группах обследованных

Показатели кинетики гемолиза и структуры популяции эритроцитов по стойкости	Группа Сравнения	Пневмония
Общее время гемолиза, мин	4,97±0,09*	4,38±0,08*
Начало гемолиза, мин	1,97±0,06	1,77±0,07
Продолжительность гемолиза, мин	2,91±0,09	2,51±0,08
Максимум гемолиза, мин	3,25±0,05*	2,70±0,07*
Низкостойкие эритроциты, %	10,0±3,5	7,0±3,0
Эритроциты пониженной стойкости, %	15,5± 4,3 *	32,0± 5,5 *
Среднестойкие эритроциты, %	62,0±6,4	57,0±5,8
Высокостойкие эритроциты, %	12,5 ±3,8 *	4,0± 2,3 *

Обозначения: * - достоверное отличие показателей в группах при $p < 0,05$

Очевидно, опосредованный кислородным голоданием стресс-эритропоэз сопровождается поступлением в циркуляцию функционально неполноценных эритроцитов.

Они подвергаются ускоренной элиминации из сосудистого русла, что и вызывает снижение количественных показателей красной крови (содержание эритроцитов, Hb) с сохранением корпускулярных параметров (MCV, MCHC).

Одновременно при анализе отдельных фракций Hb обнаружено возрастание доли в периферической крови FetHb, (с $2,90 \pm 0,31\%$ в контроле до $5,43 \pm 1,05\%$ у больных) ($p < 0,05$), что можно расценивать как компенсацию КТС на снижение кислородной емкости крови.

Таким образом, изучение популяционного состава эритроцитов и гемоглобинового профиля позволяет допустить, что компенсаторные реакции на дефицит кислорода в клетках реализуются при пневмонии через активизацию гена эритропоэтина и фетального гемоглобина, т.е. осуществляются на транскрипционном уровне. Это заключение в целом согласуется с результатами исследования состояния крови у пациентов с серповидно-клеточной анемией (СКА) [9]. Авторами работы показано, что возрастание доли фетального гемоглобина в периферической крови больных СКА происходит на фоне сохранения среднего объема эритроцитов и ускоренного эритропоэза.

Для проверки высказанного предположения мы изучили структуру взаимосвязей учтенных в исследовании параметров КТС и КОС с помощью факторного анализа (табл.3).

Таблица 3

**Факторные структуры показателей системы транспорта кислорода
в группах сравнения**

	F1		F2		F3	
	контроль.	пневмония	контроль	Пневмония	контроль	пневмония
Эритроциты			0,72	-0,74		
Hb			0,71	-0,74	0,61	
Ht			0,75	-0,73		
MCHC						-0,68
pH			0,60	0,66		
HCO ₃	0,80					-0,67
BE	0,78					-0,78
pCO ₂	0,62			-0,75		
pO ₂		-0,78				
satO ₂		-0,85				
O ₂ Hb		-0,89	0,71			
FetHb		0,86				
Общее время гемолиза				-0,72		
Дисперсия, %	27	27	21	25	14	18

Примечание. Приведены только достоверные нагрузки переменных к фактору

В группе контроля выделено 3 фактора, два из которых являются тривиальными: F1 характеризует КОС, F2 – состояние красной крови. В структуре F2 наблюдается закономерность, описывающая эффект Бора. При нормальном функционировании системы красной крови повышение рН способствует возрастанию степени оксигенации Hb и, наоборот, при тенденции к закислению крови увеличивается отдача кислорода тканям.

В то же время в группе больных пневмонией выделено 2 равноценных по емкости фактора (F1 27% и F2 25%), участвующих в формировании адаптивного ответа на гипоксию. F1 – фактор компенсации кислородной недостаточности на молекулярно-генетическом уровне: высокие отрицательные корреляции к нему имеют pO_2 , $satO_2$, O_2Hb ; положительную – $FetHb$. Снижение pO_2 , вызывающее нарушения гомеостаза и сопровождающееся нарушением функции внешнего дыхания, способствует экспрессии гена $FetHb$ [6].

Другой отличительной чертой структуры взаимосвязей при пневмонии является наличие в факторе красной крови наряду с суммарными характеристиками параметра кислотного гемолиза. Одинаковые знаки этих показателей к F2 подтверждают выводы о связи снижения функциональной активности красной крови с ослаблением устойчивости эритроцитов.

Таким образом, нами продемонстрированы новые возможности традиционного и достаточно известного метода изучения возрастной популяции эритроцитов, предложенной Гительзоном в 1959 год. Параметры кислотного гемолиза имеют большой информативный потенциал для оценки степени тканевой гипоксии, что дает возможность их использования в полной мере и в наши дни наряду с современными достижениями экспериментальной науки. Можно полагать, что при рассматриваемой патологии уменьшение активности красной крови обусловлено снижением устойчивости основной популяции эритроцитов вследствие стресс-эритропоэза. Возникающий при этом кислородный дисбаланс приводит, очевидно, к усилению экспрессии гена фетального гемоглобина, которое проявляется только во время ускоренного эритропоэза [9].

Все вышесказанное позволяет заключить, что уровень $FetHb$ в периферической крови можно использовать как индикатор гипоксического состояния, сопровождающегося снижением уровня доставки O_2 тканям.

Заключение. В проведенном исследовании обнаружено, что при пневмонии функциональная несостоятельность системы кислородного обеспечения организма на уровне внешнего дыхания дополняется эритропоэтическим стрессом, снижающим резервные возможности красной крови. Нарушение кислородного баланса в тканях способствует активации экспрессии гена $FetHb$ и возрастанию в периферической крови доли данной фракции, увеличивающей способность гемоглобина связывать кислород при относительно

низком его содержании в крови. Это свидетельствует о повышении адаптационного потенциала кислородтранспортной системы крови на ранних этапах заболевания и позволяет судить о резервных возможностях, определяющих соответствие снабжения тканей кислородом их функциональной потребности. Уровень FetHb можно использовать как дополнительный критерий для установления степени тканевой гипоксии у больных пневмонией.

Список литературы

1. Гительзон И.И. Эритрограммы как метод клинического исследования крови/ И.И.Гительзон, И.А. Терсков//Красноярск. - Издательство Сибирского отделения Академии Наук СССР.-1959. -300 с.
2. Дементьева И.И. Лабораторная диагностика и клиническая оценка нарушений гомеостаза у больных в критическом состоянии при хирургических вмешательствах и в отделении интенсивной терапии// М. Рош-Москва.-2007. -136 с.
3. Касьянова. Т.Р. Диагностическое значение определения фетального гемоглобина у больных хроническим гепатитом и циррозом печени/ Т.Р.Касьянова, Б.Н.Левитан, Ю.А.Кривенцев, Д.М.Никулина//Фундаментальные исследования.-2011.-№10.-С.505-508.
4. Справочник врача общей практики. /П/ред. Воробьева А.И.//Москва: 2006.-Т.1. - С.338-346.
5. Шамратова В.Г. Оценка функционирования кислородтранспортной системы крови у студентов/В.Г.Шамратова, Ю.К. Крапивко, Е.Е.Исаева//Вестник Башкирского университета.- 2007.-№4.-С.38-40.
6. Bard, H. Hypoxemia and increased fetal hemoglobin synthesis / H. Bard et al.// J. Pediatr. - 1994. - Vol. 124. - P. 941–943.
7. Hsieh M.M. HIF–prolyl hydroxylase inhibition results in endogenous erythropoietin induction, erythrocytosis, and modest fetal hemoglobin expression in rhesus macaques /M.M.Hsieh, N.S.Linde, A.Wynter et. al // Blood.- 2007.- V. 110.- P. 2140–2147.
8. Lando D. Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation/ D.Lando, J.J.Gorman , M.L.Whitelaw, D.J.Peet// Eur J Biochem. - 2003. - V. 270 (5). - P. 781–790.
9. Miller B.A. High fetal hemoglobin production in sickle cell anemia in the eastern province of Saudi Arabia is genetically determined /B.A. Miller, M. Salameh, M. Ahmed, J. Wainscoat, G. Antognetti, S. Orkin, D Weatherall and D.G. Nathan // Blood.- 1986.- 67.- P. 1404-1410.
10. Semensa, G.L. Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease // Respir. Res. - 2000. – № 1 (13). - P. 159-162.

Рецензенты:

Ибрагимов Р.И., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биохимии и биотехнологии
ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», г. Уфа;

Ханов А.М., д.м.н., профессор кафедры онкологии ГБОУ ВПО "Башкирский
государственный медицинский университет", г. Уфа.