

ПОКАЗАТЕЛИ ТРАНСФОРМАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ДИСПАЗИЕЙ

Супрун С.В., Абдулина Н.О., Пичугина С.В., Чайка М.С., Евсеева Г.П., Козлов В.К.,
Лебедько О.А.

Хабаровский филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, Хабаровск, e-mail: nataha03.96@gmail.com

Цель исследования: изучить и оценить показатели спонтанной и стимулированной токсикантом трансформации эритроцитов как модели состояния клеточных мембран у детей с бронхолегочной дисплазией. В исследование включены 50 детей, разделенных на основную группу (n=35) и группу сравнения (n=15). Пациентам проведена оценка трансформации эритроцитов методом световой микроскопии нативного мазка взвеси цельной крови и при воздействии свинца *in vitro*. Для анализа использовали показатели в виде общего количества дискоцитов, переходных и дегенеративных форм эритроцитов, расчет индекса трансформации и показателя компенсации. Определено число дискоцитов, переходных и дегенеративных форм у детей с бронхолегочной дисплазией и в группе без изучаемой патологии, которое было меньше, чем в ранее опубликованных литературных источниках. Продемонстрированы статистически значимые различия при воздействии свинца на эритроциты в виде снижения количества дискоцитов, увеличения числа переходных форм и индекса трансформации в обеих группах. При этом у детей с бронхолегочной дисплазией выявлены статистически значимое увеличение дегенеративных форм эритроцитов при стимуляции изучаемым токсикантом за счет достоверного преобладания сфероцитов, а также более низкий уровень показателей компенсации трансформации. Из полученных данных следует, что при бронхолегочной дисплазии клеточные мембраны менее устойчивы к воздействию факторов микроокружения. Своевременное определение количественных и качественных мембранных изменений с использованием представленной методики может служить обоснованием коррекции выявленных нарушений.

Ключевые слова: бронхолегочная дисплазия, дети, трансформация эритроцитов.

INDICATORS OF ERYTHROCYTE TRANSFORMATION IN CHILDREN WITH BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA

Suprun S.V., Abdulina N.O., Pichugina S.V., Chajka M.S., Evseeva G.P., Kozlov V.K.,
Lebedko O.A.

Khabarovsk Branch of Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration – Research Institute of Maternity and Childhood Protection, Khabarovsk, e-mail: nataha03.96@gmail.com

The purpose of the study: to study and evaluate the indicators of spontaneous and toxicant-stimulated transformation of red blood cells, as models of the state of cell membranes, in children with bronchopulmonary dysplasia. The study included 50 children, divided into the main group (n=35) and the comparison group (n=15). The patients underwent an assessment of the transformation of red blood cells by light microscopy of a native smear of whole blood suspension and *in vitro* exposure to lead. For the analysis, indicators were used in the form of the total number of discocytes, transitional and degenerative forms of red blood cells, calculation of the transformation index and compensation index. The number of discocytes, transitional and degenerative forms in children with bronchopulmonary dysplasia and in the group without the studied pathology was determined, which was less than in previously published literature sources. Statistically significant differences were demonstrated when lead was applied to red blood cells in the form of a decrease in the number of discocytes, an increase in the number of transitional forms and the transformation index in both groups. At the same time, children with bronchopulmonary dysplasia showed a statistically significant increase in degenerative forms of red blood cells when stimulated with the studied toxicant due to a significant predominance of spherocytes, as well as a lower level of transformation compensation. Based on the data obtained, it follows that with bronchopulmonary dysplasia, cell membranes are less resistant to the effects of microenvironment factors. Timely determination of quantitative and qualitative membrane changes using the presented methodology can be a justification for correcting the identified disorders.

Keywords: bronchopulmonary dysplasia, children, erythrocyte transformation, discocytes.

Введение

Достижения в оказании перинатальной помощи новорожденным с экстремально низкой и очень низкой массой тела, совершенствование подходов терапии и методов респираторной поддержки позволяют выхаживать недоношенных детей, при этом создается когорта пациентов, подверженных развитию хронических заболеваний легких, среди которых лидирует бронхолегочная дисплазия (БЛД), не имеющая тенденции к снижению заболеваемости [1]. БЛД является полиэтиологичным хроническим диффузным интерстициальным заболеванием легких, развивается преимущественно у недоношенных новорожденных в исходе респираторного дистресс-синдрома (РДС) и/или недоразвития легких, характеризуется кислородозависимостью [2, с. 111]. Среди долгосрочных последствий у младенцев, которым требуется искусственная вентиляция легких на 36-й неделе постконцептуального возраста, отмечаются значительно повышенные риски развития детского церебрального паралича, задержка физического развития, снижение успеваемости и низкий коэффициент интеллекта в подростковом возрасте [3]. В зарубежном исследовании продемонстрирована связь повышения риска нарушения психомоторного развития у детей в возрасте 2 и 5 лет и тяжелой БЛД в анамнезе [4]. В настоящее время сохраняется актуальность исследований для уточнения патогенетических механизмов формирования БЛД и поиска подходов минимизации негативных последствий для здоровья детей.

Известно, что эритроцитарные клетки подвергаются трансформационным изменениям при патологических изменениях микроокружения среды [5, 6]. Это позволяет использовать их в качестве модели для описания возможных влияний факторов на другие органы и системы, в том числе бронхолегочного аппарата и эпителия альвеол и бронхов. В норме эритроциты человека – дискоцитарные клетки двояковогнутой формы. По мере функционирования эритроцитов нарушается активность антиоксидантных и энергетических систем, при этом структурные компоненты клеток (белки, липиды и другие составляющие) подвергаются окислительному повреждению, что негативно сказывается на их работе [7]. Существуют 2 пути обратимой деформации клеток – с образованием выростов (эхиноциты) или появлением в эритроците щелевидного просвета (стоматоцит) [6]. Выделяют дегенеративные формы клеток, которые необратимо изменили форму: шизоциты, пойкилоциты, сфероциты [8]. Диагностика трансформационных изменений эритроцитов в практической педиатрии позволяет расширить спектр морфофункциональных характеристик красных клеток крови и оценить адаптационные возможности.

Цель исследования: оценить показатели спонтанной и стимулированной свинцом *in vitro* трансформации эритроцитов как модели состояния клеточных мембран у детей с БЛД.

Материалы и методы исследования. На базе Хабаровского филиала ФГБНУ «ДНЦ ФПД» НИИ ОМид в лаборатории комплексных методов исследований бронхолегочной и перинатальной патологии проведено когортное проспективное обследование 50 детей в возрасте до 4 лет, разделенных на 2 группы: 1-я (основная) группа (n=35) – пациенты с БЛД (недоношенные с новой формой и доношенные с классической формой), 2-я группа – группа сравнения (n=15), состоявшая из доношенных и недоношенных новорожденных без БЛД. Средний возраст детей на момент исследования не имел различий в обеих группах: $23,24 \pm 13,21$ и $18,78 \pm 12,46$ месяца соответственно ($p > 0,05$). При распределении по гендерному признаку в 1-й и 2-й группах отмечено преобладание мальчиков (62,07% и 76,47% соответственно) по сравнению с девочками (37,93% и 23,53%), соотношение девочек/мальчиков составило в основной группе 1:1,6, в группе сравнения – 1:3,2.

Критерии включения в основную группу: установленный диагноз БЛД, возраст детей на момент проведения исследования до 4 лет жизни, подписанное информированное согласие родителя / законного представителя на обследование. В группу сравнения вошли дети, не страдающие БЛД и другими заболеваниями бронхолегочной системы. Критерием исключения из исследования являлось наличие у ребенка декомпенсированной, тяжелой сопутствующей патологии.

Пациентам проведена оценка спонтанной трансформации эритроцитов методом световой микроскопии нативного мазка взвеси цельной крови с применением биологического микроскопа (модель MT5300L, MeijiTechno Co., Япония, регистрационное удостоверение № ФСЗ 2008/03219 от 04.12.2008 г.). Для анализа использовался ряд показателей: количество дискоцитов, переходных (сфероиды, двухямочные, эхиноциты, стоматоциты) и дегенеративных (сфероциты, пщизоциты, пойкилоциты) форм эритроцитов из расчета на 100 клеток. В обеих группах детей для определения чувствительности мембран эритроцитов к воздействию одного из основных токсикантов (свинца) использовались те же пулы эритроидных клеток [9], а также индекс трансформации (ИТ), определяемый как соотношение суммы переходных и дегенеративных форм к дискоцитам, и показатель компенсации трансформации (ПКТ) – соотношение переходных и дегенеративных форм.

Статистическая обработка данных проведена с использованием программ Microsoft Excel 16, STATISTICA 10.0. Количественные показатели оценивали на соответствие нормальному распределению (критерий Шапиро–Уилка). Количественные данные представлены в виде $M \pm SD$ (M – среднее значение количественного признака, SD – стандартное отклонение среднего); при отклонении распределения от нормального – в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей ($LQ1$ – $UQ3$). Различия между зависимыми группами устанавливали при помощи t-критерия Стьюдента при нормальном распределении,

критерия Вилкоксона (количественные) – при ненормальном распределении и Z-критерия (количественные) – для сравнения частот встречаемости категоризированного признака. Уровень значимости межгрупповых различий принимали менее 0,05. Дизайн проводимого исследования одобрен решением Этического комитета Хабаровского филиала ФГБНУ ДНЦ ФПД – НИИ ОМИД.

Результаты исследования и их обсуждение. В ходе проведенного исследования было определено количество дискоцитов, переходных и дегенеративных форм в обеих группах при спонтанной трансформации. У детей с БЛД число дискоцитов составило 62,4%, переходных форм – 36,6% и дегенеративных форм – 1,02%, у детей без изучаемой патологии – 61,4%, 37,6% и 0,95% соответственно. Данные показатели статистически значимо не различались ($p>0,05$). Однако обращает на себя внимание снижение количества дискоцитов в обеих группах относительно литературных данных [10]. Известно, что у практически здоровых детей количество дискоцитов находится в пределах 80%. Около 13% составляет число переходных форм, которые в динамике при прекращении воздействия неблагоприятного фактора способны восстанавливать правильную форму. Доля эритроцитов, подвергшихся необратимым изменениям и утративших свою функциональную значимость, составляет 1,2% и может достигать 21% [11]. Авторами проведена сравнительная оценка показателей трансформации эритроцитов при воздействии свинца как одного из самых токсичных тяжелых металлов (таблица). При анализе показателей основной группы и группы сравнения статистически значимых различий в спектре морфологических форм эритроцитов (дискоцитов, переходных) не выявлено.

Показатели количества морфологических форм эритроцитов при спонтанной трансформации и воздействии свинца в группах

Формы эритроцитов	Основная группа			Группа сравнения		
	Спонтанная трансформация	Свинец	p	Спонтанная трансформация	Свинец	p
Дискоциты	61,87±6,28	58,9±4,73	0,017	61,7±2,68	58,5±4,12	0,005
Переходные формы	37,0±6,53	39,59±4,91	0,040	37,3±2,9	40,2±3,90	0,016
Сфероиды	23,7±3,46	24,5±1,93	0,214	22,9±1,60	24,5±1,94	0,016
Двухямочные	7,48±2,57	8,46±2,87	0,111	8,39±1,51	8,84±1,41	0,457
Эхиноциты	1,4 [0,7; 2,5]	1,55 [0,60; 3,0]	0,149	2,0 [0,5; 2,9]	2,15 [1,50; 3,80]	0,258
Стоматоциты	4,10±1,62	4,48±1,54	0,294	4,25±1,38	4,54±1,27	0,550
Дегенеративные формы	0,60 [0; 1,70]	1,35 [0,60; 2,0]	0,085	0,77 [0,0; 1,60]	0,90 [0,70; 1,40]	0,5

Сравнительная характеристика данных спонтанной и стимулированной свинцом трансформации у детей в 1-й и 2-й группах продемонстрировала статистически значимую разницу: при воздействии токсиканта на эритроциты выявлено снижение количества дискоцитов (в основной группе с 61,87 до 58,9 клетки, $p=0,017$; в группе сравнения с 61,7 до 58,5, $p=0,005$). Определено статистически значимое противоположное влияние свинца на переходные формы эритроцитов у детей в основной группе (повышение с 37,0 до 39,59 клетки) и группе сравнения (с 37,3 до 40,2 клетки) ($p<0,05$). Отмечено, что при воздействии свинца увеличивается количество дегенеративных форм клеток (в 1,5 раза в группе детей с БЛД и в 1,4 раза в группе сравнения, $p>0,05$) с повышением доли сфероцитов с 3,73% до 20,05% в основной группе ($p=0,031$) и с 11,17% до 17,93% в группе сравнения ($p=0,304$) (рис. 1).

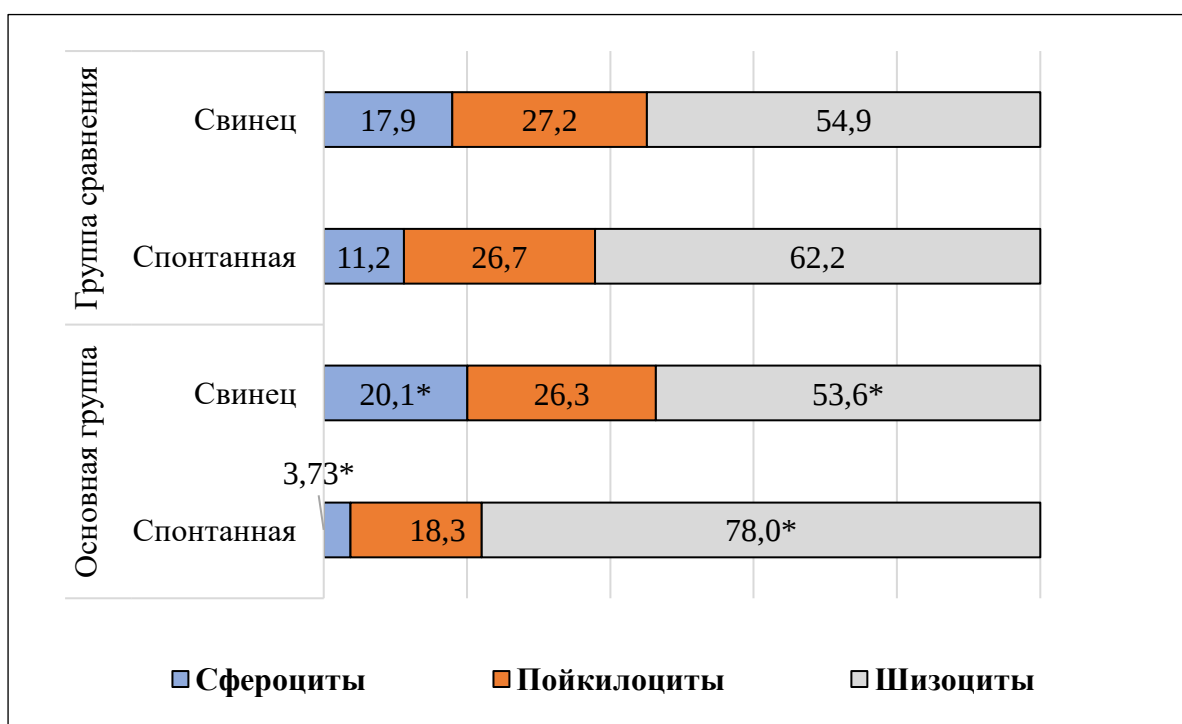


Рис. 1. Сравнительная характеристика изменения доли дегенеративных форм эритроцитов (%) (сфероцитов, пойкилоцитов и шизоцитов) – показателей спонтанной и стимулированной свинцом трансформации у детей 1-й и 2-й групп

Примечание: * – $p<0,05$

Отмечено, что эхиноцитарная трансформация происходит при снижении в клетке АТФ, нарушении состава плазмы или увеличении рН, интоксикациях [12]. Другой путь трансформации – образование стоматоцита – индуцируется снижением рН и влиянием химических агентов [6]. В проведенном авторами исследовании определено преобладание стоматоцитарного варианта трансформации в обеих группах.

Сравнение показателей ИТ при спонтанной трансформации эритроцитов не выявило статистически значимых различий в обеих группах детей ($p > 0,05$). При этом оценка ИТ при спонтанной трансформации и воздействии свинца показала статистически значимое повышение величины при влиянии металла в группе пациентов с БЛД (с 0,61 до 0,69, $p = 0,034$) и у детей без заболевания (с 0,64 до 0,72, $p = 0,007$) (рис. 2).

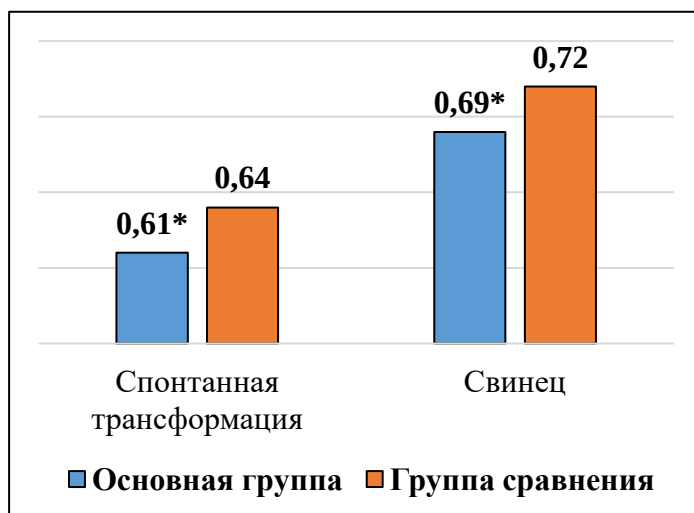


Рис. 2. Показатели индекса трансформации (ИТ) (усл.ед.) при спонтанной и стимулированной свинцом трансформации у детей основной группы и группы сравнения

Примечание: * – $p < 0,05$

При сравнении спонтанных и стимулированных значений в каждой группе отмечалась тенденция к увеличению индекса ПКТ при воздействии свинца (рис. 3).

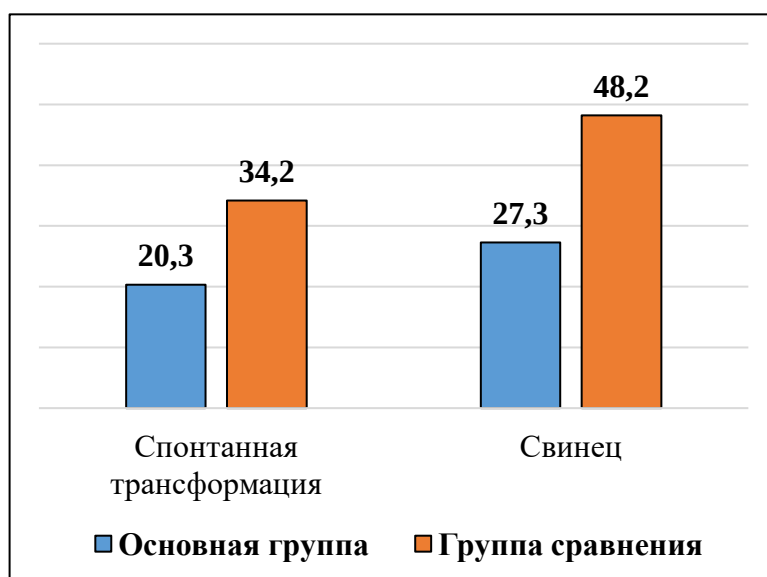


Рис. 3. Значения показателя компенсации трансформации (ПКТ) (усл.ед.) при спонтанной и стимулированной свинцом трансформации у детей основной группы и группы сравнения

Однако у детей с БЛД индекс ПКТ ниже, чем в группе сравнения, как при спонтанной (в 1,7 раза), так и при стимулированной (в 1,8 раза) трансформации эритроцитов. Данный индекс отражает адаптационную возможность клеточной мембраны без разрушения клетки. К примеру, в ранее проведенном в институте исследовании продемонстрированы достоверное снижение ПКТ у детей с бронхиальной астмой в сравнении с относительно здоровыми детьми, а также сильная прямая корреляционная связь между степенью тяжести бронхиальной астмы и ПКТ [11].

Несмотря на информативность оценки морфологии эритроцитов и индексов трансформации и доступность в практическом применении, методика редко используется в исследованиях. Данные показателей актуальны не только в педиатрической практике, но и в других сферах медицины, например у беременных женщин при различном течении инфекционного процесса [13] или у женщин репродуктивного возраста при злокачественных новообразованиях [14].

Заключение. У детей раннего возраста, проживающих в Приамурье, в сравнении с опубликованными литературными данными отмечаются достаточно низкий уровень функционально состоятельных дискоцитов, более высокие показатели переходных (таких как сфероиды, двухямочные, эхиноциты, стоматоциты), дегенеративных (необратимых) форм эритроцитов, как у пациентов с БЛД. Подобные изменения выявлены и в группе сравнения (без БЛД), что может свидетельствовать о морфофизиологической адаптации детей данной возрастной категории к эндо- и экзогенному микроокружению. При воздействии изучаемого токсиканта на эритроциты *in vitro* продемонстрированы статистически значимые различия в виде снижения количества дискоцитов, увеличения общего числа переходных форм и индекса трансформации также в обеих группах. Однако у детей с БЛД выявлены статистически значимое увеличение дегенеративных форм эритроцитов в показателях трансформации, стимулированной свинцом, за счет достоверного (в 5,4 раза) преобладания сфероцитов, а также более низкий уровень ПКТ при спонтанной и стимулированной реакции.

Из полученных данных следует, что при БЛД клеточные мембраны менее устойчивы к воздействию факторов развития патологических состояний. Своевременное определение количественных и качественных мембранных изменений с использованием представленной методики может служить обоснованием коррекции выявленных нарушений.

Список литературы

1. Stoll B.J., Hansen N.I., Bell E.F., Walsh M.C., Carlo W.A., Shankaran S. Trends in care practices, morbidity, and mortality of extremely preterm neonates, 1993-2012 // JAMA. 2015. Vol. 314. Is. 10. P. 1039-1051. DOI: 10.1001/jama.2015.10244.
2. Неонатальная пульмонология / под ред. Д.Ю. Овсянникова. М. 2022. 168 с.
3. DeMauro S.B. Neurodevelopmental outcomes of infants with bronchopulmonary dysplasia // Pediatric Pulmonology. 2021. Vol. 56. Is. 11. P. 3509-3517. DOI: 10.1002/ppul.25381.
4. Katz T.A., Vliegenthart R.J.S., Aarnoudse-Moens C.S.H., Leemhuis A.G., Beuger S., Blok G.J., van Brakel M.J.M., van den Heuvel M.E.N., van Kempen A.A.M.W., Lutterman C., Rijpert M., Schiering I.A., Ran N.C., Visser F., Wilms J., van Kaam A.H., Onland W. Severity of Bronchopulmonary Dysplasia and Neurodevelopmental Outcome at 2 and 5 Years Corrected Age // Journal of Pediatric. 2022. Vol. 243. Is. 2. P.40-46. DOI: 10.1016/j.jpeds.2021.12.018.
5. Баева Е.С., Артюхов В.Г., Бельских М.В. Световая и сканирующая электронная микроскопия в исследовании цитоархитектоники эритроцитов человека: значимость пробоподготовки // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. 2023. №4. С.55-61.
6. Баева Е.С., Тюнина О.И., Плетнева С.А., Дорохов Е.В. К вопросу диагностической значимости физиологической трансформации эритроцитов // Медицинская наука и образование Урала. 2023. №24. С.76-84. DOI: 10.36361/18148999_2023_24_2_76
7. Rogers S., Doctor A. Red blood cell dysfunction in critical illness // Critical Care Clinics. 2020. Vol. 36. Is. 2. P.267-292. DOI: 10.1016/j.ccc.2019.12.008
8. Козинец Г.И., Погорелов В.М. Диагностическая значимость морфологических особенностей эритроцитов в мазках периферической крови // Гематология и трансфузиология. 2005. № 5 С. 13-17.
9. Супрун С.В., Козлов В.К., Пивкина Т.В. Способ определения чувствительности мембран эритроцитов к воздействию тяжелых металлов // Патент РФ №2332668 С1. Патентообладатели: Супрун С.В., Козлов В.К. 2008.
10. Супрун Е.Н., Супрун С.В., Гусева О.Е., Лощенко М.А., Пивкина Т.В., Савицкая Е.А., Ануриев С.В., Осмолкина В.А., Брага С.С. Особенности трансформации эритроцитов у детей, страдающих бронхиальной астмой // Медицинская иммунология. 2017. №19. С. 797-802. DOI: 10.15789/1563-0625-2017-6-797-802.
11. Кузнецова Т.Г., Стародубцева М.Н., Чижик С.А. Трансформация эритроцитов при действии активных форм азота // Морфологические ведомости. 2006. №3-4. С. 33-35.
12. Игнатьев В.В., Кидалов В.Н., Хадарцев А.А., Сясин Н.И. Изменение некоторых физиологических функций в эритроцитах человека и млекопитающих по сравнению с эритроцитами других видов животных // Вестник новых медицинских технологий.

Электронное издание. 2007. №1. С.1-6. <http://www.vnmt.ru/Bulletin/E2007-1/E071.html> (дата обращения: 10.12.2024).

13. Кутепова О.Л., Андриевская И.А. Показатели красной крови и особенности морфологии эритроцитов у беременных с различным течением COVID-19 в третьем триместре беременности // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2024. №92. С.54–62.

DOI: 10.36604/1998-5029-2024-92-54-62

14. Федотова А.Ю., Генинг Т.П., Абакумова Т.В., Долгова Д.Р. Морфология эритроцитов периферической крови при раке яичников // Казанский медицинский журнал. 2019. №5. С. 855-859. DOI: 10.17816/KMJ2019-855