

УДК [616.155.32-07:576.314]:616.1-092.9-005.1

Надыров Эльдар Аркадьевич,

к.м.н., доцент кафедры гистологии цитологии и эмбриологии, доцент

кафедры патологической анатомии

УО «Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

Евсеенко Дмитрий Александрович,

ассистент кафедры хирургических болезней №2

УО «Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

Челнокова Ирина Александровна,

Младший научный сотрудник

ГНУ «Институт радиобиологии Национальной академии наук

Беларуси»

г. Гомель, Республика Беларусь

Марковский Владимир Олегович,

Студент лечебного факультета

УО «Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВОГО МОРФОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА
ИССЛЕДОВАНИЯ ИНДЕКСА БЛЕББИНГА ЛИМФОЦИТОВ
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ НА
ФОНЕ ОСТРОЙ КРОВОПОТЕРИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ**

Аннотация: В статье рассматривается феномен иммунного блеббинга клеточной стенки лимфоцитов (ИБЛ) у лабораторных животных. является достоверным морфологическим маркером окислительного стресса. Показано, что мониторинг индекса блеббинга лимфоцитов может позволить контролировать эффективность проводимых лечебных мероприятий.

Ключевые слова: *блеббинг клеточной стенки лимфоцитов, острая кровопотеря.*

Abstract: *The article discusses the phenomenon of immune blebbing of the cell wall of lymphocytes (IBL) in laboratory animals. is a reliable morphological marker of oxidative stress. It has been shown that monitoring the lymphocyte blebbing index can make it possible to monitor the effectiveness of the treatment.*

Key words: *blebbing of the cell wall of lymphocytes, acute blood loss.*

Введение. В настоящее время пациентам с кровотечением различной этиологии оказывается помощь согласно протоколу МЗРБ от 01.06.2017 № 46, который включает в себя различные лабораторные и инструментальные методы исследования, но не дает полного представления о состоянии антиоксидантной системы (АОС), что позволило бы предотвратить развитие окислительного стресса (ОС) и как крайнего варианта синдрома полиорганной недостаточности (СПОН) [1,2].

ОС характеризуется дисбалансом между антиоксидантами и оксидантами в сторону преобладания последних, что приводит к полиэтиологическому повреждению клетки, однако эти изменения значительно отличаются от апоптоза. При апоптозе плазматическая мембрана, как правило, сохраняет свою целостность, и апоптозные тельца могут быть поглощены макрофагами или соседними клетками. Сыворотка крови здоровых лиц характеризуется антиоксидантной активностью (АОА) – среда для физиологического протекания ключевых биологических механизмов поддержания гомеостаза. Изменение АОА на прооксидантную активность (ПОА) сыворотки крови происходит за счет свободнорадикального дисбаланса с высокими концентрациями активных форм кислорода (АФК). АФК (переход АОА на ПОА) → ненасыщенные жирные кислоты → перекисное окисление липидов (ПОЛ) → образование модифицированных белков (кроме того, они окисляют липопротеины низкой плотности сыворотки и другие субстраты) → ОС и как частный случай → иммунный блеббинг лимфоцитов (ИБЛ) [3,4].

Известно, что ОС может привести к блеббингу клеточной стенки лимфоцитов.

Блеббинг – процесс частичной, либо полной дислокации бифосфолипидного слоя клеточной стенки от цитоскелета лимфоцита вследствие взаимодействия с большим количеством АФК [4]. Следует отметить, что интерпретация ИБЛ может помочь оценке АОС и, как следствие, вероятность развития ОС [5].

Цель исследования. Оценить использование нового морфологического метода исследования индекса блеббинга лимфоцитов периферической крови лабораторных животных на фоне острой кровопотери различной степени тяжести.

Материал и методы. Исследование выполнено в научно-исследовательской лаборатории ГНУ «Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси», УО «Гомельский государственный медицинский университет» в соответствии с «Положением о порядке использования лабораторных животных в научно-исследовательских работах и педагогическом процессе Гомельского государственного медицинского института и методах по реализации требований биомедицинской этики» (№54-А от 23.05.2002 г.). Все манипуляции с животными производились под воздействием воздушно-изофлюоранового наркоза [6].

Было выполнено исследование: группа №1 – без острой кровопотери (интактные) животные (n=13) и группа №2 – с острой кровопотерей различной степени тяжести: легкой (n=16), средней (n=17) и тяжелой (n=16). Спустя 24 и 48 часов после перенесенной острой кровопотери определялись показатели красной крови: эритроцитов (Er) и гемоглобина (Hb); высчитан ИБЛ.

Моделирование острой кровопотери у животных производилось по методике, предложенной С.Л. Зыблевым [7]. Тяжесть кровопотери составила для легкой степени – $4,0 \pm 0,5$ мл, (35-40% объема циркулирующей крови (ОЦК)), средней – $5,0 \pm 0,5$ мл, (40-45% ОЦК), тяжелой – $6,0 \pm 0,5$ мл, (45-50% ОЦК).

Определение концентрации глюкозы сыворотки крови проводили на биохимическом анализаторе «Clima MC 15» энзиматическим-колориметрическим и глюкозооксидантным методом соответственно. Показатели красной крови оценивали при помощи гематологического анализатора «SYSMEX XP-300».

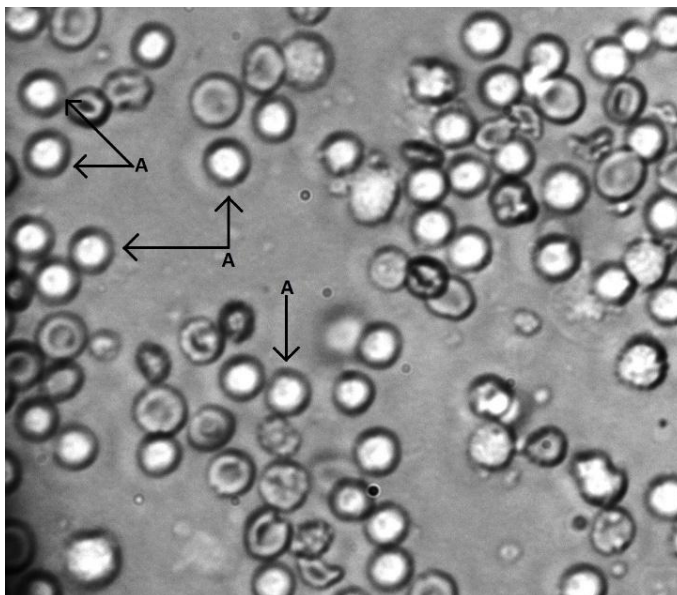
Выделение лимфоцитов проводилось в центрифужную пластиковую пробирку (№1), содержащую антикоагулянт (Vacutte, 5 мл.) вносили 5 мл. венозной периферической крови. Далее в эту пробирку при помощи пипетки-дозатора добавляли Phosphate buffered saline (PBS, pH 7,4) в соотношении 1:1. В пробирку (№2) вносили фиколл-верографин и аккуратно, по стенке пробирки, добавляли содержимое пробирки №1 в соотношении 1:2. Центрифугировали в течение 25 минут со скоростью 3000 оборотов/минута при 400 G. После надосадочное «облако» лимфоцитов при помощи дозаторной пипетки вносили в пробирку (№3) и доводили до объема 10 мл., аккуратно добавляя PBS. Центрифугировали при тех же выставленных параметрах. После центрифугирования удаляли супернатант и полученную взвесь лимфоцитов наносили на чашку Петри в количестве 30-40 мкл. Исследование осуществляли на микроскопе Axio Observer с использованием фазово-контрастного метода. (ГНУ «Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси»).

Статистическая обработка данных производилась с использованием пакета статистических программ «Statistica 12.0». Оценку нормальности распределения числовых данных проводили с использованием критерия Shapiro-Wilk test. Распределение числовых значений отличалось от закона нормального распределения. В этой связи цифровые данные были представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q^1 ; Q^3). Сравнительный анализ между группами проводился с использованием критерия Mann-Whitney U-test. Расчет мощности исследования производился с использованием двустороннего t-критерия.

Результаты исследования.

Микрофотографии (интактных лимфоцитов, клеток на различных этапах блеббинга, апоптоза) представлены на рисунке 1, 2, 3. Морфологическая оценка показателей блеббинга проводилась согласно классификации, предложенной В.В. Мороз [8]. Все лимфоциты оценивались следующим образом:

1. Интактные клетки (клеточная мембрана визуально не изменена);
2. Клетки в состоянии начального блеббинга (малые везикулы на мембране до $1/3$ радиуса клетки);
3. Клетки в состоянии терминального блеббинга (крупные везикулы на мембране более $1/3$ радиуса клетки, либо множество мелких везикул).
4. Апоптоз (некротизированные лимфоциты).



***Рисунок 1. Лимфоциты периферической крови. Увеличение $\times 600$,
фазово-контрастная микроскопия
A - интактные лимфоциты***

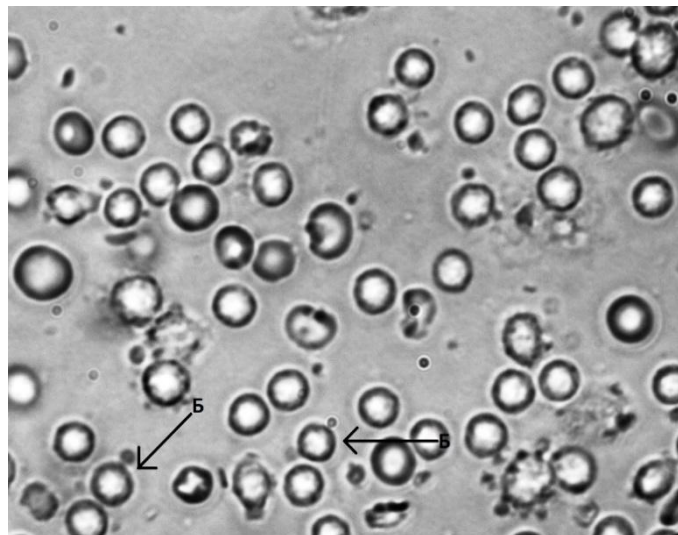


Рисунок 2. Лимфоциты периферической крови. Увеличение ×600, фазово-контрастная микроскопия

Б - лимфоцит в состоянии начального блеббинга;

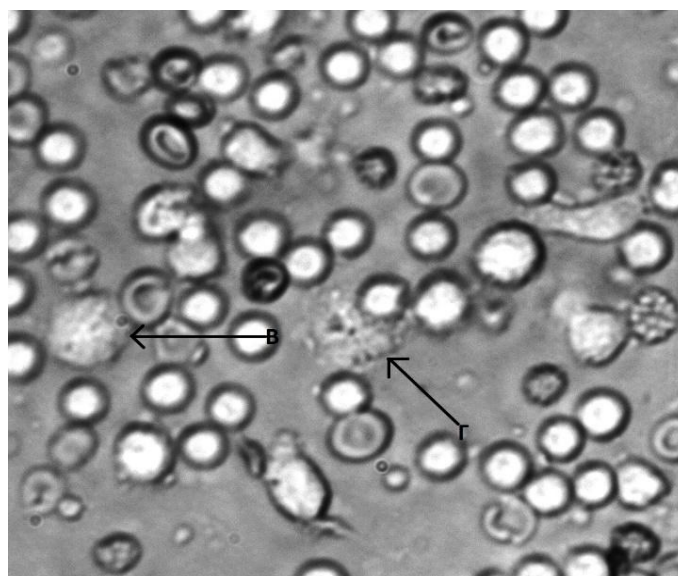


Рисунок 3. Лимфоциты периферической крови. Увеличение ×600, фазово-контрастная микроскопия

В - лимфоцит в состоянии терминального блеббинга; Г – апоптоз.

После чего осуществлялся расчет ИБЛ.

$$ИБЛ = \frac{\text{Терминальный блеббинг лимфоцитов} \times 100}{\sum \text{блеббинг лимфоцитов}} \% \\ \text{(начальный блеббинг + терминальный блеббинг)}$$

В результате исследования получены данные показателей красной крови животных и ИБЛ, которые представлены в таблице.

Таблица – Показатели сыворотки крови лабораторных животных

| Сроки наблюдения | Показатель | | |
|--|------------------------------------|------------------------|--------------------------|
| | Индекс блеббинга лимфоцитов (ИБЛ)% | Ег, $\times 10^{12}/л$ | Нб, г/л |
| Контрольная группа – интактные животные (n=13) | | | |
| | 4,4 [3,3;11,6] | 6,72 [6,9;9,0] | 140,0 [134,0;165,0] |
| Легкая степень тяжести кровопотери (n=16) | | | |
| 24 ч. | 23,5 [11,7;35,7]* | 6,42 [4,1;7,6]* | 122,0 [110,0;126,0]* |
| 48 ч. | 27,8 [15,8;48,0]** | 5,22 [4,0;7,4]** | 110,0 [102,0;127,0]** |
| Средняя степень тяжести кровопотери (n=17) | | | |
| 24 ч. | 43,8 [40,7;67,9]* | 5,34 [3,7;6,0]* | 101,0 [96,0;117,0]* |
| 48 ч. | 46,9 [28,7;75,8]** | 4,14 [3,1;4,7]** | 90,0 [84,0;110,0]** |
| Тяжелая степень тяжести кровопотери (n=16) | | | |
| 24 ч. | 56,8 [29,9;73,6]* | 3,97 [2,5;4,6]* | 81,0 [60,0;85,0]* |
| 48 ч. | 58,8 [24,9;77,9]** | 3,64 [1,8;4,7]** | 65,0 [43,0;74,0]** |

Примечание: * – различия являются статистически значимыми по сравнению с контрольной группой, ** – с 24 часовым периодом.

Анализируя полученные данные видно, что ИБЛ составил 4,2 [3,2;11,4]% у интактных животных. Отмечено, что у животных с моделированием кровотечения ИБЛ имеет тенденцию к увеличению: 23,5 [11,7;35,7]% (24 ч.) и 27,8 [15,8;48,0]% (48 ч.) – легкая степень тяжести; 43,8 [40,7;67,9]% (24 ч.) и 46,9 [28,7;75,8]% (48 ч.) – средняя степень тяжести; 56,8 [29,9;73,6]% и 58,8

[24,9;77,9]% – тяжелая степень тяжести соответственно. При этом все показатели были статистически значимы во всех группах ($p < 0,001$), что свидетельствует о постепенном возрастании АФК (переходом АОС→ПОА) по мере прогрессирования тяжести кровотечения и способствует развитию ОС и как крайнего случая → СПОН.

Острая кровопотеря характеризовалась статистически значимым снижением концентрации эритроцитов и уровня гемоглобина по отношению группы животных №2 с 24 часовым интервалом времени к группе животных №1, для которой уровень эритроцитов и гемоглобина составил соответственно $6,72 [6,9; 9,0] \times 10^{12}/л$ и $140,0 [134,0; 165,0]$ г/л. Так для 24-часового промежутка времени показатели уровня эритроцитов и гемоглобина составили для легкой степени тяжести кровопотери – $6,42 [4,1;7,6]^* \times 10^{12}/л$ и $122,0 [110,0;126,0]^*$ г/л, для средней – $5,34 [3,7;6,0]^* \times 10^{12}/л$ и $101,0 [96,0;117,0]^*$ г/л, для тяжелой – $3,97 [2,5;4,6]^* \times 10^{12}/л$ и $81,0 [60,0;85,0]^*$ г/л. Далее, спустя 48 часов после острой кровопотери, наблюдалось прогрессирование анемического синдрома: уровень эритроцитов и гемоглобина для легкой степени тяжести кровопотери составил $5,22 [4,0;7,4]** \times 10^{12}/л$ и $110,0 [102,0;127,0]**$ г/л, для средней – $4,14 [3,1;4,7]** \times 10^{12}/л$ и $90,0 [84,0;110,0]**$ г/л, для тяжелой – $3,64 [1,8;4,7]** \times 10^{12}/л$ и $65,0 [43,0;74,0]**$ г/л соответственно. Следует отметить, что в сравнении с контролем определялось статистически значимое снижение содержания уровней эритроцитов и гемоглобина, которое определялось как спустя 24 часа ($p < 0,05$), так и спустя 48 часов после острой кровопотери ($p < 0,05$). Спустя 48 часов при всех степенях кровопотери данные показатели были значимы ниже в сравнении с 24 часовым интервалом времени ($p < 0,05$).

Заключение.

Острая кровопотеря влечет за собой наличие прооксидантной активности сыворотки крови, выраженность которой определяется степенью тяжести кровотечения (\downarrow ОЦК). Все это приводит к блеббингу клеточной стенки лимфоцитов, который в свою очередь является интегральным параметром, отражающим действие повреждающих факторов – активных форм кислорода на

клеточную стенку и является достоверным морфологическим маркером окислительного стресса. Мониторинг индекса блеббинга лимфоцитов может позволить контролировать эффективность проводимых лечебных мероприятий.

Список литературы:

1. Применение антиоксидантов при остром гастродуоденальном язвенном кровотечении / С.Л. Зыблев [и др.] // Новости хирургии. – 2014. – №22. – С. 155-163.
2. Дифференцированный подход к коррекции нарушений антиоксидантного статуса лабораторных животных с острой кровопотерей на фоне цирроза печени / Д.А. Евсеенко [и др.] // Хирургия. Восточная Европа. – 2019. – №4. – С. 565-577.
3. Системный мембранодестабилизирующий дистресс-синдром в хирургии: понятие, патогенез, диагностика / А.П. Власов [и др.] // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2019. – №5. – С. 25-30.
4. Активные формы кислорода в физиологии и патологии клетки / Е.В. Пожилова [и др.] // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2015. – №2. – С. 13-22.
5. Блеббинг плазмолеммы лимфоцитов периферической крови как маркер окислительного стресса / Д.А. Евсеенко [и др.] // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. – 2019. – №22. – С. 30-35.
6. Ray, P.D. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling / P.D. Ray [at al.] // Cell Signal. – 2012. – № 24. – P. 981-990.
7. Зыблев СЛ, Дундаров ЗА, Мартемьянова ЛА. Экспериментальная модель геморрагического шока. Проблемы здоровья и экологии. – 2013. - № 1 (35). – С. 109-113.
8. Новые аспекты развития системной воспалительной реакции после аортокоронарного шунтирования / В.В. Мороз // Общая реаниматология. – 2008. – №4. – С.5-11.