

Л.Г. Кулешова

Морфологічні зміни еритроцитів людини за умов охолодження

В работе показана чувствительность микроскопического метода прижизненного анализа количественного соотношения форм эритроцитов периферической крови пациентов с вибрационной болезнью при выяснении роли морфологического состояния этих клеток в формировании клинических проявлений данной патологии. Показано, что развитие болезни сопровождается прогрессирующим увеличением в крови больных инвагинированных форм – стоматоцитов. Установлено, что потеря гипотермической устойчивости формы эритроцитов может служить диагностическим тестом степени выраженности патологического процесса. При этом, если скорость накопления (С, % в сутки) предгемолитических форм эритроцитов в условиях гипотермического хранения крови (4°C) находится в интервале $3,5 < C < 5,0$, диагностируется I степень болезни, если же $C > 5$ – II.

ВСТУП

Реологічні властивості крові відіграють важливу роль у патогенезі різних захворювань. Основними характеристиками, що визначають плинність крові в капілярах, є її в'язкість і здатність еритроцитів до деформації. Маючи в нормі унікальну спроможність до краплеподібної здатності, еритроцити проникають через кровеносні судини, які значно менші від їхнього власного розміру, здійснюючи тим самим плинність крові і забезпечуючи її кисневотransпортну функцію [3]. Відношення об'єму до площі, товщини до діаметра, а також двоввігнута форма визначають еластичність і пластичність еритроцитів, що сприяють зміні форми клітин та їх здатності до деформації при циркуляції в кровеносному руслі. При зміні геометричних співвідношень еритроцитів знижується їхня пластичність [4]. Установлено, що сферичній формі еритроцитів, що є передгемолітичною, відповідає мінімальна здатність до деформації [15]. Зрозуміло, що патологічні процеси, в основі яких лежать

аутоімунні розлади, інтоксикації, гіпоксія, порушення клітинного метаболізму, повинні позначатися насамперед на морфологічних і функціональних властивостях еритроцитів.

Відомі методики дослідження морфологічних особливостей еритроцитів при різних патологічних процесах в організмі (фіксація в спиртах, глутаральдегіді, фарбування мазків, скануюча електронна та фазово-контрастна мікроскопія) мають низку істотних недоліків, що унеможлиблює прижиттєву оцінку первісної форми еритроцитів [7, 13].

Проблема вібраційної хвороби залишається актуальною, що пов'язано з широкою розповсюдженістю захворювання, досить поліморфною клінічною симптоматикою із залученням у патологічний процес багатьох органів і систем (периферичний кровообіг, нервова система, опорно-руховий апарат). Основними найбільш характерними ознаками несприятливого впливу вібрації вважаються нейросудинні розлади у верхніх кінцівках [12] із системними порушеннями мікроциркуляції, гемостазу, транспорту, дифузії й утилізації кисню. Існує метод ранньої діагностики вібраційної хвороби

© Л.Г. Кулешова

[10]. Проте він показує лише факт порушення реологічних властивостей крові. У літературі [1, 11] описана роль еритроцитів у розладі мікроциркуляції при вібраційній хворобі. Немає сумніву в необхідності більш детального вивчення морфофункціональних характеристик еритроцитів периферичної крові осіб з вібраційною хворобою для з'ясування значення цих клітин у формуванні клінічних проявів даної патології.

Мета нашої роботи – показати чутливість мікроскопічного методу аналізу стану еритроцитів людини в різні терміни гіпотермічного зберігання крові при оцінці ступеня виразності патологічного процесу, зумовленого вібраційною хворобою.

МЕТОДИКА

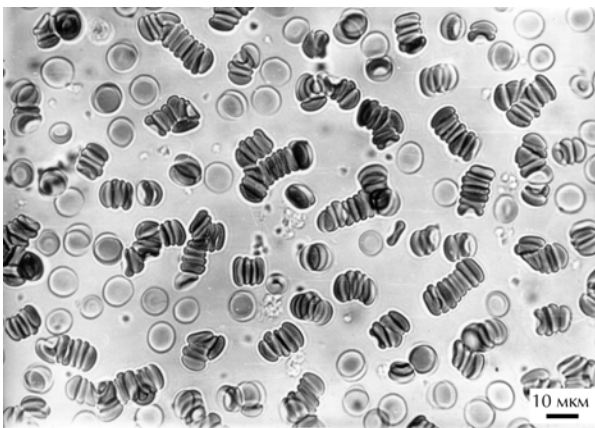
Обстежено 20 пацієнтів з вібраційною хворобою віком від 36 до 56 років, які зазнавали впливу локальної вібрації від 9 до 22 років. Морфологічно досліджували периферичну кров 10 осіб, які страждали на вібраційну хворобу I ступеня тяжкості, 10 осіб – II ступеня. Контролем була кров 5 осіб, які ніколи не піддавалися дії вібрації та були практично здорові.

Дослідження проведені методом світлової мікроскопії на мікроскопі “МБІ-15У” з

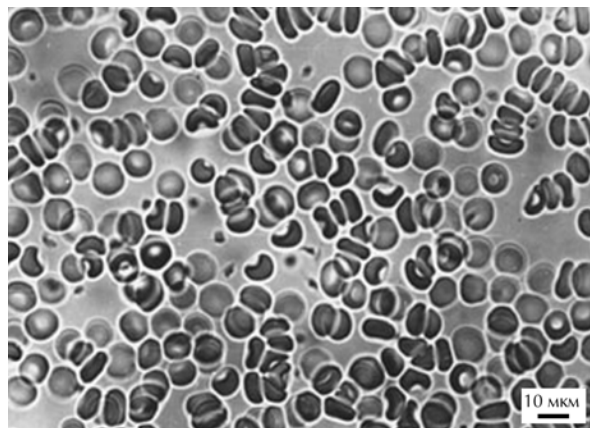
фотографічною реєстрацією морфологічних показників крові. Загальний стан клітин оцінювали досліджуючи краплю, яку вмещували між предметним і покривним скельцями та рівномірно розподіляли тонким шаром. При цьому еритроцити знаходилися в зваженому стані, що дозволяло всебічно фіксувати їхню форму. Ступінь стійкості еритроцитів оцінювали в відсотковому відношенні за допомогою підрахунку нормоцитів і сумарно трансформованих еритроцитів – за мікрознімками у різні терміни гіпотермічного зберігання крові (до 11 діб) при 4 °С [6]. Морфологічну оцінку особливостей форми та поверхневої архітекτονіки еритроцитів проведено за описаною класифікацією [14], статистичну обробку результатів – за стандартною методикою Фішера – Стьюдента для $P=0,95$ [2].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз експериментальних результатів показав, що в морфоеритрограмах крові осіб контрольної групи відзначається формування розгалуженої мережі монетних стовпчиків, еритроцити яких мають дво-ввігнуту форму. Ехіноцитарних форм – до 2,6 % (рис. 1,а).



а



б

Рис.1. Морфоеритрограма крові осіб контрольної групи (а) та пацієнтів з вібраційною хворобою (б)

У морфоеритрограмах пацієнтів з вібраційною хворобою спостерігається помітне зменшення дискоїдних клітин. На I ступені розвитку хвороби в полі зору формуються короткі лінійні стовпчики еритроцитів, що у II ступені агрегації утворюють невеликі конгломерати. Еритроцити в стовпчиках зменшені в поперечному перетині і трохи стовщені, що вказує на їхню трансформацію в роздуті диски. Кількість ехіноцитарних форм у межах норми – до 2,8 %.

У міру розвитку патологічного процесу в морфоеритрограмах хворих на фоні роздутих дисків спостерігається прогресуюче наростання переважно куполоподібних форм – стоматоцитів. У полі зору помітно збільшується кількість сфероехіноцитів – до 4,6 % (рис. 1,б).

Оскільки стоматоцити відносяться до компенсаторно-приспосувальної форми і за певних умов можлива їхня зворотна трансформація в дискоцити [5, 9], ступінь виразності стоматоцитозу у разі вібраційної хвороби нами оцінена при гіпотермічному зберіганні крові. Швидкість накопичення передгемолітичних форм еритроцитів у крові пацієнтів з вібраційною хворобою представлена на рис. 2. Видно, що гіпотермічна стійкість еритроцитів хворих помітно

знижена в порівнянні з контролем, причому чітко помітні I та II ступені тяжкості захворювання. Швидкість накопичення передгемолітичних форм становить: у контролі – 3,5 %, у крові осіб з вібраційною хворобою I ступеня – 4 %, II – 5 % за добу (див. рис. 2).

Таким чином, проведений прижиттєвий мікроскопічний аналіз морфоеритрограм дозволив установити, що патологічний процес у крові пацієнтів з вібраційною хворобою супроводжується стоматоцитозом. Зниження гіпотермічної стійкості форми еритроцитів може бути показником ступеня виразності патологічного процесу.

Як відомо, своєрідністю структури еритроцитарної клітини є наявність єдиної органели – мембрани, а зміна форми еритроцита свідчить про її порушення. Мембрана еритроцита складається з двох взаємозалежних шарів, причому зовнішній протеїновий – менш рухливий [16]. Форма та розміри еритроцита залежать від різниці площ двох шарів бішару [17]. Організація ліпідного бішару, що складається з фосфоліпідів, холестерину та гліколіпідів, прямо чи посередньо впливає на найважливіші функції мембрани. Активність багатьох мембранних білків, ферментів, рецепторів,

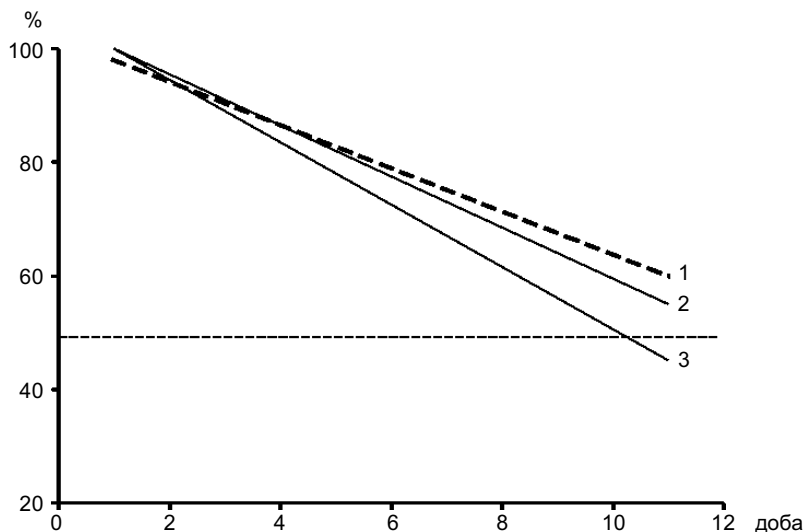


Рис. 2. Швидкість накопичення передгемолітичних форм еритроцитів у крові пацієнтів з вібраційною хворобою: 1 – контроль; 2 – I ступінь; 3 – II ступінь

функціонування іонних каналів регулюються станом їхнього гідрофобного оточення, що забезпечується ліпідами. Перебудова ліпідного бішару мембрани та зміна фазового стану ліпідів є тією первинною ланкою, що призводить або до адаптації, або до ушкодження мембран, отже, до порушення функції клітини. Установлено, що зсув ферментативної рівноваги в мембрані, особливо ферментів енергетичного обміну, супроводжується трансформацією еритроцитів. Так, зниження активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази від 1,5 до 0,5 % призводить до переходу еритроцитів з дисків у сфери. Низька активність цього ферменту від 0,5 до 0,2 % зумовлює появу акантоцитів, кератоцитів і інших нерегулярних форм еритроцитів. Порушення роботи натрієвого насоса викликає зрив компенсації надлишкового внутрішньоклітинного осмотичного тиску, внаслідок чого еритроцити набувають сферичної форми [8, 9]. Оскільки еритроцити відносяться до імунокомпетентних клітин, здатних зв'язувати і видаляти з кровотоку імунні комплекси, зміна контурів клітинної мембрани при трансформації може супроводжуватися втратою доступності мембранних рецепторів, що у свою чергу може бути одним із механізмів порушення імунного гомеостазу хворого.

Таким чином, трансформація еритроцитів свідчить про цілий комплекс взаємозалежних змін як у структурі самої мембрани, так і на її поверхні, наслідком чого є порушення життєво важливих функцій клітини. Виявлення кореляції між специфічністю трансформації еритроцитів при певній патології та станом мембрани вимагає глибокого біохімічного вивчення спектра мембранних фосfolіпідів, їхнього кількісного співвідношення, активності транспортних АТФаз, а також цілої низки біофізичних показників. Кількісний прижиттєвий мікроскопічний аналіз морфоеритрограм периферичної крові хворих за умов впливу

гіпотермії є дуже інформативним при оцінці наявності і ступеня виразності патологічного процесу в організмі.

L.G. Kuleshova

TRANSFORMATION OF ERYTHROCYTES UNDER HYPOTHERMIA CONDITIONS AS A DIAGNOSTIC TEST FOR HUMAN VIBRATION DISEASE

The work illustrates the sensitivity of microscopy method for intravital analysis of quantitative ratio of peripheric blood erythrocyte forms in patients with vibration disease when elucidating the role of morphological state of these cells in the formation of the pathological clinical manifestations. We have examined 61 patients with vibration disease due to the effect of local vibration. It was demonstrated that vibration disease development is accompanied by a progressive increase of erythrocyte invaginated forms: stomatocytes in patient blood. It was established, that a loss of hypothermic resistance of erythrocyte form could serve as a diagnostic test of the pathological process manifestation degree. Therefore, if the accumulation rate (C, % per day) of prehemolytic erythrocyte forms under conditions of blood hypothermic storage (4°C) is within 3.5 < C < 5.0 interval, the Ist stage of the disease is detected while the IInd stage of disease is detected when C > 5.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Алексеева Г.А., Погорелов В.М. Состояние эритроцитов периферической крови при воздействии вибрации // Медицина труда и промышленная экология. – 1995. – № 5. – С. 27–30.
2. Дьяконов В.П. Справочник по алгоритмам и программам на языке Бейсик для персональных ЭВМ. – М.: Наука, 1987. – 240 с.
3. Карабанов Г.Н., Инченко К.С. Деформируемость эритроцитов в клиническом аспекте // Вестн. хирургии им. И.И. Грекова. – 1986. – № 12. – С. 99–102.
4. Клиническая гематология / Под ред. Шт. Берчану. – Бухарест: Мед. изд-во. – 1985. – 1221 с.
5. Крымский Л.Д., Нестайло Г.В., Рыбалов А.Г. Растровая электронная микроскопия сосудов и крови. – М.: Медицина, 1976. – 168 с.
6. Кулешова Л.Г., Загнойко В.И. Сравнительная оценка устойчивости формы эритроцитов гетеротермных животных в условиях гипотермического хранения // Пробл. криобиологии. – 1994. – № 2. – С. 25–28.
7. Лиссовский В.А., Кидалов В.Н., Гуц В.В. Трансформация эритроцитов как диагностический тест в клинической практике // Лаб. дело. – 1985. – № 10. – С. 594–598.
8. Одинокова В.А., Квитко Н.Н., Ольшанский А. Я.

- Морфофункциональные изменения эритроцитарных мембран при некоторых экстремальных состояниях // Сов. медицина. – 1985. – № 10. – С. 20–22.
9. Одинокова В.А., Каликштейн Д.Б., Мороз Л. А., Квитко Н.Н. Эритроциты при некоторых аллергических заболеваниях // Лаб. дело. – 1985. – № 6. – С. 344–347.
 10. Перминов Н.Х., Касьяновский В.Н., Касьяновская В.П. Способ ранней диагностики вибрационной болезни. А.С. №1508160 // Бюл. изобр. – 1989. – №34. – С. 201.
 11. Попов М.П., Зюбан Д.И., Сорокин А.В., Реук В.Д. Изменение агрегационных и физико-химических свойств крови при вибрационной болезни // Гематология и трансфузиология. – 1992. – № 11–12. – С. 28–30.
 12. Суворов Г. А., Артамонова В.Г. Современные аспекты этиологии, патогенеза, клиники и профилактики вибрационной болезни от воздействия локальной вибрации // Вестн. АМН СССР. – 1992. – № 1. – С. 28–32.
 13. Baumler H., Djenev I., Iovtchev S. et al. Polarizability of human red blood cells and conformational state of glycocalyx // Stud. biophys. – 1988. – **125**, № 1. – P. 45–51.
 14. Bessis M. Living Blood Cells and their Ultrastructure. – Berlin, Heidelberg, New-York. – 1973. – 767 p.
 15. Feo C.J., Phyllips W.M. The influence of suspension osmolarity and erythrocyte volume on cells deformability // Nouv. Rev. franc. Hematol. – 1982. – **24**, №5. – P. 295–300.
 16. Nakao M., Miwa S. Red cell membrane // Acta haematol Jap. – 1983. – **46**. – P. 41–42.
 17. Svetina S., Zeka B. Bilayer couple hypothesis of red cell shape transformations and osmotic hemolysis // Biomed. biochim.acta. – 1983. – **42**, № 11–12. – P. 86–90.

*Ин-т проблем кріобіології і кріомедицини НАН
України, Харків*

*Матеріал надійшов до
редакції 04.06.2004*