

*Д. А. Евсеенко, З. А. Дундаров, Д. М. Адамович, Анджум Вакар,
Али Моханнад Абд*

**ИНДЕКС БЛЕББИНГА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ЛИМФОЦИТОВ
В РИСКЕ РАЗВИТИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА
У ПАЦИЕНТОВ С ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ И ОСТРОЙ
КРОВОПОТЕРЕЙ**

Гомельский государственный медицинский университет, Беларусь

Ключевые слова: цирроз, кровотечение, блеббинг клеточной стенки лимфоцитов.

*D. A. Evseenko, Z. A. Dundarov, D. M. Adamovich, Anjum Waqar,
Ali Mohannad Abd*

**LYMPHOCYTE CELL WALL BLEBBING INDEX IN THE RISK
OF OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH CIRRHOSIS
AND ACUTE BLOOD LOSS**

Gomel State Medical University, Republic of Belarus

Keywords: cirrhosis, bleeding, lymphocyte cell wall blebbing.

Актуальность. Процессы свободнорадикального окисления (СРО) в клетке занимают одно из важных мест в поддержании гомеостаза [1]. В ходе биохимических реакций, в основе которых лежит окисление, выделяется энергия, что влияет на энергообеспечение клеточных функций в целом. Возникновение в биологической системе дисбаланса между веществами, ингибирующими окисление, и свободными радикалами приводит к полиэтиологическому повреждению клетки, что потенциально может проявляться изменением антиоксидантной активности (АОА) сыворотки крови на прооксидантную активность (ПОА), что приводит к развитию окислительного стресса (ОС) [2]. Морфологическим проявлением последнего может быть

блеббинг клеточной стенки лимфоцитов, который принято считать потенциально обратимым состоянием [3]. В современной научной литературе можно встретить некоторые патологические процессы, для которых характерен ОС: артериальная гипертензия, дефицит витамина D, панкреатит, инсульт, патология плаценты и другие заболевания [4]. Актуальность исследования заключается в достоверном установлении наличия дисбаланса в антиоксидантном статусе (АОС) пациентов с циррозом печени (ЦП) и тяжелой степенью острой кровопотери (ОК), а также его потенциальном морфологическом проявлении — блеббинге клеточной стенки лимфоцитов.

Таким образом, можно сделать предположение о наличии связи между состоянием АОС организма и блеббингом клеточной стенки лимфоцитов. Регистрацию блеббинга с последующим подсчетом его индекса можно считать ответной реакцией организма на проявления ОС. Это может быть использовано в определении вероятности развития и степени выраженности ОС, а также в оценке результатов клинического лечения: антиоксидантной терапии с целью коррекции нарушений АОС организма у пациентов с ОК и ЦП.

Цель: определить возможность использования индекса блеббинга лимфоцитов (ИБЛ), состояния АОС сыворотки крови для оценки развития ОС у пациентов с ЦП и тяжелой степенью ОК.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования стал 41 пациент с ЦП и ОК тяжелой степени тяжести, находившихся на стационарном лечении в ГУ «Гомельская областная специализированная клиническая больница». Группу сравнения составили 18 здоровых лиц. Исследуемые пациенты и группа здоровых добровольцев были сопоставимы по полу (Fisher exact p, two-tailed p = 0,412), возрасту (Mann–Whitney U-test, p = 0,392), сопутствующей патологии (Fisher exact p, two-tailed p = 0,477). Забор крови осуществлялся в первые сутки поступления пациентов в стационар. Определение АОС сыворотки крови выполняли по методике Т. В. Сироты в модификации А. И. Грицука при помощи спектрофотометра Ultrospec 1100 PRO (ГНУ «Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси»).

Блеббинг (англ. blebbing) — это универсальный биологический феномен, типовой патологический процесс и одно из основных начальных проявлений гибели клетки, заключающийся в дислокации фосфобилипидного слоя клеточной стенки. Он является составной частью системного мембранодестабилизирующего дистресс-синдрома (СМДС), морфологическим проявлением повреждения клеточной стенки, вызванного продуктами реакций СРО. Блеббинг является потенциально обратимым состоянием и по морфологическим проявлениям классифицируется на начальный, терминальный и апоптоз.

Для определения ИБЛ были выделены лимфоциты сыворотки крови здоровых лиц и пациентов с ЦП и тяжелой степенью тяжести ОК.

Исследование осуществляли на микроскопе Axio Observer в режиме фазово-контрастной микроскопии при увеличении микроскопа 600× (ГНУ «Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси»).

Морфологическая оценка показателей блеббинга проводилась согласно классификации, предложенной В. В. Мороз [5]. Все лимфоциты оценивались следующим образом:

- 1) интактные клетки (клеточная мембрана визуально не изменена);
- 2) клетки в состоянии начального блеббинга (малые везикулы на мембране до $\frac{1}{3}$ радиуса клетки);
- 3) клетки в состоянии терминального блеббинга (крупные везикулы на мембране более $\frac{1}{3}$ радиуса клетки, либо множество мелких везикул);
- 4) апоптоз (некротизированные лимфоциты).

Расчет ИБЛ проводили по следующей формуле:

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

Являясь промежуточным этапом в жизнедеятельности клетки блеббинг плазматической мембраны лимфоцитов может иметь следующие исходы:

- сохранение жизнеспособности клетки с последующим восстановлением ее физиологической активности;
- формирование мембранных пузырьков (блебб);
- переход начального блеббинга в терминальный;
- клеточная гибель путем апоптоза и/или некроза.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 13.0 (trial). Нормальность распределения числовых данных оценивалась с помощью Shapiro–Wilk test. Числовые данные представляли в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q_1 ; Q_3). Для сравнительного анализа между исследуемыми группами использовали Mann–Whitney (U-test). Корреляционную зависимость определяли с помощью рангового критерия Tau Kendall.

Результаты. Данные о состоянии АОС и ИБЛ у здоровых лиц, пациентов с ЦП и тяжелой ОК представлены в табл. 1.

Таблица 1

Группа		АОС, %	ИБЛ, %
Здоровые лица (группа № 1)		+64,8 [+41,2; +114,8]	4,2 [3,2; 11,4]
Степень тяжести цирроза печени	А (группа № 2)	-83,05 [-130,9; -53,8] $p_{1,2} < 0,001$	55,4 [29,0; 72,6] $p_{1,2} < 0,001$
	В (группа № 3)	-91,4 [-133,3; -44,8] $p_{1,3} < 0,001$	58,6 [24,8; 77,7] $p_{1,3} < 0,001$
	С (группа № 4)	-115,75 [-140,8; -49,3] $p_{1,4} < 0,001$	66,0 [24,5; 80,0] $p_{1,4} < 0,001$

Как видно из таблицы, у здоровых лиц показатель антиоксидантной активности сыворотки крови составлял +64,8 [+41,2; +114,8] %, что прямо свидетельствовало о полном гомеостазе в ферментативных и неферментативных звеньях системы АОС. Увеличение степени тяжести ЦП отразилось

на изменении выраженности ПОА свойств сыворотки крови: от $-83,05$ $[-130,9; -53,8]$ %, ($p_{1,2} < 0,001$) для пациентов с ЦП класса тяжести «А» до $-115,75$ $[-140,8; -49,3]$ %, ($p_{1,4} < 0,001$) для пациентов с терминальной стадией цирроза. Сыворотка крови пациентов с ЦП и ОК характеризовалась избыточностью и насыщенностью процессами СРО и перекисного окисления липидов (ПОЛ). Следовательно, в ней преобладали процессы окисления: активные формы кислорода, азота, серы вступали в реакции СРО с клеточными стенками, в т. ч. с лимфоцитами, и нарушали их структурную целостность за счет активности процессов ПОЛ, приводя к СМДДС, морфологическим проявлением которого можно считать блеббинг клеточных стенок.

Морфологический показатель ИБЛ характеризовался высокими значениями: от $55,4$ $[29,0; 72,6]$ %, ($p_{1,2} < 0,001$), для пациентов с начальной стадией цирроза, до $66,0$ $[24,5; 80,0]$ %, ($p_{1,4} < 0,001$), для пациентов с циррозом степени тяжести «С» по классификации Чайлд, что прямо указывало на развитие ОС, который может служить триггером развития синдрома полиорганной недостаточности (СПОН).

Для определения информативности показателей АОС и ИБЛ был проведен ROC-анализ с целью оценки вероятности развития ОС у пациентов с ЦП и тяжелой степенью тяжести ОК. В табл. 2 представлены результаты ROC-анализа АОС и ИБЛ у пациентов с тяжелой степенью тяжести ОК и ЦП.

Таблица 2

Степень тяжести цирроза печени	АОС, %	ИБЛ, %
A	1. 100,0 % 2. $p < 0,001$ 3. $\leq -41,6$	1. 100,0 % 2. $p < 0,001$ 3. $> 15,8$
B	1. 100,0 % 2. $p < 0,001$ 3. $\leq -32,1$	1. 100,0 % 2. $p < 0,001$ 3. $> 15,8$
C	1. 100,0 % 2. $p < 0,001$ 3. $\leq -40,2$	1. 100,0 % 2. $p < 0,001$ 3. $> 15,8$

Примечание: 1. Площадь под ROC-кривой. 2. Статистическая значимость. 3. Пороговое значение показателя.

Для оценки сопоставимости данных биохимического метода изучения состояния АОС и морфологического метода оценки состояния феномена блеббинга клеточной стенки лимфоцитов был проведен корреляционный анализ этих показателей. Корреляционное сравнение в группе лиц с ЦП и ОК тяжелой степени тяжести выявило сильную отрицательную связь между показателями ИБЛ и АОС в сыворотке крови ($r = -0,814$; $p < 0,001$).

Исходя из вышеизложенного, использование ИБЛ у пациентов с ЦП и ОК тяжелой степени позволяет определить вероятность развития ОС, спрогнозировать риск возникновения осложнений: СПОН.

Закключение. Таким образом, оценка ИБЛ является надежным морфологическим методом для определения вероятности развития ОС у пациентов

с ЦП и тяжелой степенью тяжести ОК и может быть использована в качестве альтернативы биохимическому методу исследования АОС сыворотки крови. При пороговом значении ИБЛ $> 15,8\%$ у пациентов с ЦП и тяжелой кровопотерей можно установить наличие ОС, что закономерно требует коррекции нарушений АОС на основе лекарственных средств, содержащих в своем составе, например, меглюмина натрия сукцинат (Реамберин) и ацетилцистеин (Флуимуцил).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Cichoż-Lach, H.* Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases / H. Cichoż-Lach, A. Michalak // World Journal Gastroenterology. – 2014. – Vol. 20 (25). – P. 8082–8091.
2. *Зыблев, С. Л.* Антиоксидантная активность крови больных острым гастродуоденальным кровотечением / С. Л. Зыблев, З. А. Дундаров // Хирургия. Восточная Европа. – 2013. № 5 (1). – С. 12–23.
3. *Блеббинг* плазмолеммы лимфоцитов периферической крови как маркер окислительного стресса / Д. А. Евсеенко, З. А. Дундаров, Э. А. Надыров [и др.] // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. – 2019. – № 2 (22). – С. 30–35.
4. *Metabolism* regulation and redox state: insight into the role of superoxide dismutase 1 / S. Damiano, C. Sozio, G. La Rosa [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21 (18). – P. 6606.
5. *Новые* аспекты развития системной воспалительной реакции после аортокоронарного шунтирования / В. В. Мороз, А. Б. Салмина, А. А. Фурсов [и др.] // Общая реаниматология. – 2008. – № 4 (6). – С. 5–8.