

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ЛЕГКОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМОЙ

В. Г. Артюхов¹, С. Г. Резван¹, Н. В. Саушкина¹, В. В. Белинский², А. Г. Резван³

¹ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

²БУЗ ВО Воронежская клиническая больница скорой медицинской помощи №1, Минздрава России,

³Центральный клинический госпиталь ФСБ России

Поступила в редакцию 06.07.2016 г.

Аннотация. Изучено влияние легкой черепно-мозговой травмы на структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов крови больных методами сканирующей электронной микроскопии и регистрации осмотических и кислотных эритрограмм. Показано, что при сотрясении головного мозга мембраны эритроцитов крови больных группы №1 характеризуются пониженным барьером проницаемости для H^+ , длительность латентной фазы, характеризующей устойчивость мембран эритроцитов для кислоты, сокращена на 30-60 секунд (контроль 180 с). У группы больных с более высокой стойкостью эритроцитов к воздействию легкой ЧМТ (группа №2) зарегистрировано снижение максимальной скорости гемолиза эритроцитов относительно контроля ($K_{max} < 0.7$ отн. ед.), а у группы больных с низкой стойкостью эритроцитов к воздействию сотрясения мозга – повышение максимальной скорости гемолиза среднестойкой популяции эритроцитов ($K_{max} > 0.7$ отн. ед.), при этом морфологический анализ архитектоники эритроцитов крови больных обеих групп показал, что изменение содержания дискоцитов (обратимые дискоциты и необратимые дискоциты) не превышает 2-3%.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма; эритроцит; проницаемость; архитектура клеток.

Abstract. Studied the effect of mild traumatic brain injury on the structural and functional state of membranes of red blood cells of patients by scanning electron microscopy and registration osmotic and acidic erythrograms. It is shown that after a concussion of the brain membranes of red blood cells of patients №1 groups are characterized by low permeability barrier to H^+ , the duration of the latent phase which characterizes stability of erythrocyte membranes for acids reduced by 30-60 seconds (control 180 s). The group of patients with higher resistance of erythrocytes to the effects of mild traumatic brain injury (№2 group) are registered reduction in the maximum rate of hemolysis of erythrocytes compared to the control ($K_{max} < 0.7$ relative units). A group of patients with low resistance of red blood cells to the effects of a concussion - the maximum increase rate of hemolysis population of red blood cells ($K_{max} > 0.7$ rel. units.), and the morphological analysis of the architectonics of red blood cells in both groups showed that the change in the content discocytes (reversible and irreversible discocytes) does not exceed 2-3%.

Keywords: traumatic brain injury; erythrocyte; permeability; architectonics of cells.

Выяснение и анализ последствий черепно-мозговых травм (ЧМТ), в частности сотрясения головного мозга, являются одной из важнейших проблем современной медицины, интерес к которой неуклонно возрастает во всем мире. Большая часть хронических больных неврологического,

психиатрического, а также соматического профиля страдает теми или иными последствиями черепно-мозговой травмы [1-3]. Показано, что после сотрясения в мозге инициируются нарушения сосудистого и морфологического характера [4]. По данным ряда авторов, вследствие черепно-мозговой травмы различной степени тяжести, запускаются каскадные необратимые морфофункциональные дистрофические и некротические

процессы, которые во многом определяют выраженность моторных и когнитивных нарушений в посттравматическом периоде [5]. Многие из изменений, которые происходят при разных типах ЧМТ, способствуют активации процессов перекисидного окисления липидов мембран нейронов, а также мембран эритроцитов. К числу таких факторов следует отнести, прежде всего, гипоксию мозга, первичную механическую альтерацию мозговых структур, ацидоз, активацию ретикулярной формации, её норадреналиновых, серотонинореактивных структур, гиперкатехолемию, кровоизлияния, как следствие собственно травмы мозга [6, 7].

В настоящее время применяются методы клинической диагностики, такие, как компьютерная томография мозга, которые не позволяют получить полную картину развития травматической болезни при легкой черепно-мозговой травме. Терапия острого периода травмы носит симптоматический характер [8]. Поэтому использование дополнительных диагностических инструментов, таких, как биомаркеры черепно-мозговой травмы, позволит количественно оценивать глубину повреждения мозга [9]. Недавние исследования авторов по данной тематике указывают на нарушение обмена веществ в головном мозге, при этом сложно выделить выраженные изменения в составе плазмы и форменных элементов крови [9, 10]. В результате окислительных процессов, протекающих на мембранах клеток при травмировании мозга, возможны конформационные изменения белков мембран, приводящие к нарушению структурно-функциональных свойств нейронов. Постоянный контакт эритроцитов с нейронами при оксигенации мозга может приводить к воздействию на мембраны эритроцитов продуктов окислительного стресса. Оценка таких нарушений в мозге требует сложнейших методик и длительного времени анализа.

По этой причине целью настоящей работы явилось исследование характера структурно-функциональных изменений в мембранах эритроцитов при развитии травматической болезни мозга с применением методов, позволяющих получить информацию о степени стойкости эритроцитов, вступивших в стадию гемолиза, а также об изменениях их поверхностной архитектоники.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследований служила суспензия эритроцитов, выделенных из крови больных с легкой черепно-мозговой травмой. Для получения

суспензии эритроцитов цельную кровь доноров и больных разводили физиологическим раствором в соотношении 1:10, трижды центрифугировали при 1500 об/мин в течение 15 мин с промежуточным отмыванием от стабилизатора и плазмы 0.85 % раствором NaCl. Полученную суспензию эритроцитов доводили физиологическим раствором до оптической плотности (D), равной 0.8, и затем использовали в экспериментах.

Автоматический метод регистрации осмотических и кислотных эритрограмм.

Принцип метода изучения осмотической и кислотной резистентности эритроцитов заключается в фотометрической регистрации кинетики распада клеток под действием гипоосмотического раствора хлорида натрия или раствора соляной кислоты. Мерой стойкости для каждого эритроцита является время, в течение которого происходит его разрушение. Последовательное вовлечение эритроцитов в процесс гемолиза позволяет построить эритрограмму (рис. 1) – зависимость распада клеток по стойкости во времени $G = f(t)$, где G – доля разрушенных клеток (%).

Гемолиз эритроцитов проводили в термостатируемых кюветах с наружными размерами 20x40x10 мм и рабочим объемом 4 мл. Измерения величины светопропускания проводили при светофилтре, с максимумом пропускания в области 490 нм, т.к. при данной длине волны тестируется не выход гемоглобина в среду инкубирования, а светорассеяние образцов, интенсивность которого прямо пропорционально зависит от объема эритроцита и содержания в среде эритроцитарных клеток, т.е. $G=f(Vl \times N)$, где Vl – объем одного эритроцита, N – количество эритроцитов в среде. Следовательно, выход гемоглобина – явление вторичное и при используемой длине волны (490 нм) практически не влияет на регистрируемый сигнал. Предлагаемый метод позволяет с высокой точностью ($G \pm 1\%$) оценить изменения структурно-функциональных свойств эритроцитов периферической крови.

Взвесь эритроцитов в 0.55% NaCl получали методом половинного разведения маточного раствора клеток крови (0.85% NaCl, $D=0.8$ при $\lambda = 490$ нм) гипоосмотическим раствором 0.25% хлорида натрия с удвоенным содержанием модифицирующего агента. Выбор в качестве рабочей концентрации соли в исследуемом растворе 0.55% NaCl обусловлен необходимостью создания в инкубируемой среде предгемолитического состояния эритроцитов (сфероцитов). Исполь-

зование этого приёма позволяет исследовать кинетические параметры гемолиза эритроцитов, индуцированного воздействием микроколичеств какого-либо гемолитического агента. Кинетику кислотного гемолиза регистрировали после добавления в рабочую кювету, содержащую 5 мл суспензии эритроцитов, 100 мкл 0.1н HCl. Выбор HCl обусловлен стабильностью ее при хранении, а также присутствием обоих ионов (H^+ и Cl^-) в плазме крови.

При проведении гемолиза эритроцитов в одной кювете установка регистрирует интегральную кривую, форма которой отражает во времени суммарное изменение величины светорассеяния в исследуемом растворе (рис. 1). Смещение интегральной кривой гемолиза вправо свидетельствует о повышении устойчивости мембран эритроцитов к воздействию H^+ .

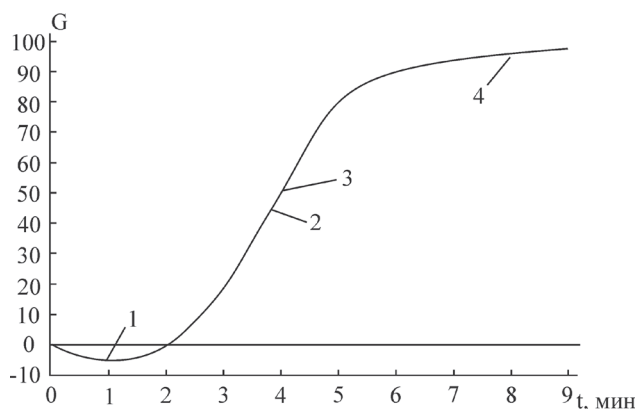


Рис. 1 Интегральная кривая кислотного гемолиза эритроцитов. Обозначения: 1- фаза сферуляции, 2 - максимальная скорость гемолиза, 3 - время 50 % гемолиза, 4 - конечная фаза гемолиза.

Метод сканирующей электронной микроскопии.

Метод сканирующей электронной микроскопии позволяет оценивать поверхностную архитектуру клеток, в нашем случае - устойчивость мембран эритроцитов к механическому воздействию. Контрольные и опытные образцы фиксировали 2.5% раствором глутарового альдегида при 4°C в течение 1 часа. Проводили обезвоживание клеток путем центрифугирования в серии водных растворов этанола восходящей концентрации 30, 50, 70, 90 % и далее - ацетоном. Приготовленную суспензию клеток наносили на алюминиевые подложки и высушивали в термостате при 37°C. Для обеспечения электропроводности объектов их напыляли тонкой пленкой золота. Препараты просматривали на сканирующем электронном микроскопе JSM-6380LU (Япония) при ускоряющем напряжении 20-25 кВ.

Структурно-функциональную характеристику мембран эритроцитов оценивали по классификации, предложенной Г. И. Козинец и соавт. [12]. Для детального анализа изменения поверхностной архитектуры эритроцитов рассчитывался ряд индексов: ИТ – индекс трансформации – количественная оценка соотношения патологических и нормальных форм эритроцитов $ИТ = (ОД\% + НД\%) / Д\%$; ИОТ – индекс обратимой трансформации $ИОТ = ОД\% / Д\%$; ИНОТ – индекс необратимой трансформации: $ИНОТ = НД\% / Д\%$ (Д – дискоциты, НД – необратимые дискоциты, ОД – обратимые дискоциты) [12]. Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакета программ "Excel", на рисунках приводятся средние значения величин $\pm$ доверительный интервал.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами были проведены исследования, посвященные изучению структурно-функциональных свойств эритроцитов крови доноров и 14 больных с диагнозом - легкая черепно-мозговая травма (сотрясение мозга). Больные были разделены на группу с низкой (№1-7) и высокой (№8-14) стойкостью эритроцитов к легкой ЧМТ относительно контроля. С помощью кислотных и осмотических эритрограмм были зарегистрированы следующие параметры: K_{max} (%), $t_{лат}$ (с), G_{max} (%), G_{120} (%). Величина K_{max} (%) (константа максимальной скорости гемолиза) характеризует относительное количество эритроцитов, вступивших в гемолитический процесс; $t_{лат}$ (с) - время, в течение которого протекают процессы перехода эритроцитов в гемолитическую фазу; G_{max} (%) характеризует максимальную долю эритроцитов, вступивших в гемолиз, G_{120} (%) - доля эритроцитов со структурными повреждениями, которые вступили в фазу гемолиза в течение 2 мин, при помещении в гипосмотическую среду.

Анализ результатов, полученных при исследовании осмотической резистентности эритроцитов крови 2-х групп больных, показал, что у 1 группы больных (№1-7) данный параметр G_{120} достигает 11.2% (контроль - 0), а у 2 группы (№8-14) величина гемолиза эритроцитов за 120 с (G_{120}) изменяется в пределах от -0.02 до 2.1%, что свидетельствует о вступлении эритроцитов больных 9, 12, 14 в фазу сферуляции (рис. 2).

При изучении функциональных свойств мембраны эритроцитов крови больных путем регистрации кислотных эритрограмм нами было уста-

новлено, что интегральные кривые кислотного гемолиза больных группы с низкой стойкостью эритроцитов к легкой ЧМТ (№1-7) смещена влево, а группы с высокой стойкостью эритроцитов к легкой ЧМТ (больные №8-14) смещена вправо (рис. 3).

Величина латентной фазы гемолиза эритроцитов (характеризует барьер проницаемости мембран для H^+) для группы больных с высокой стойкостью эритроцитов к легкой ЧМТ $t_{лат} \geq 180$ с (больные №8-14), а для группы больных с низкой стойкостью эритроцитов к легкой ЧМТ $t_{лат} \leq 180$ с (больные №1-7), контроль – 180 с. По величине K_{max} мы судили о структурной однородности эритроцитов, вступивших в фазу гемолиза. Для группы больных с высокой стойкостью эритроцитов к легкой ЧМТ этот параметр в среднем ниже величины контроля (больные №8-14), а для группы больных с низкой стойкостью эритроцитов к легкой ЧМТ – выше контроля (контроль – 0.7 ед.).

О характере изменения состояния молодой популяции эритроцитов мы судили по величине G_{max} . Нами было установлено, что максимальная доля эритроцитов, вступивших в гемолиз у больных 1 группы (№1-7), выше контроля в среднем на 5.5%, а у больных 2 группы (№8-14) ниже контроля в среднем на 6% (контроль 65%) рис. 3, следовательно, в результате проведенной серии исследований эритроцитов крови больных с легкой черепно-мозговой травмой нами выявлено, что при сотрясении в организме больных с низкой резистентностью эритроцитов происходят такие процессы, которые приводят к изменению структурно – функциональных свойств эритроцитов крови. Большей чувствительностью к сотрясению мозга отличаются функциональные свойства эритроцитов ($t_{лат}$, K_{max}), в меньшей степени – структурные свойства (G_{max}). Молодые эритроциты, как и ожидалось, обладают большей стойкостью к гемолизу.

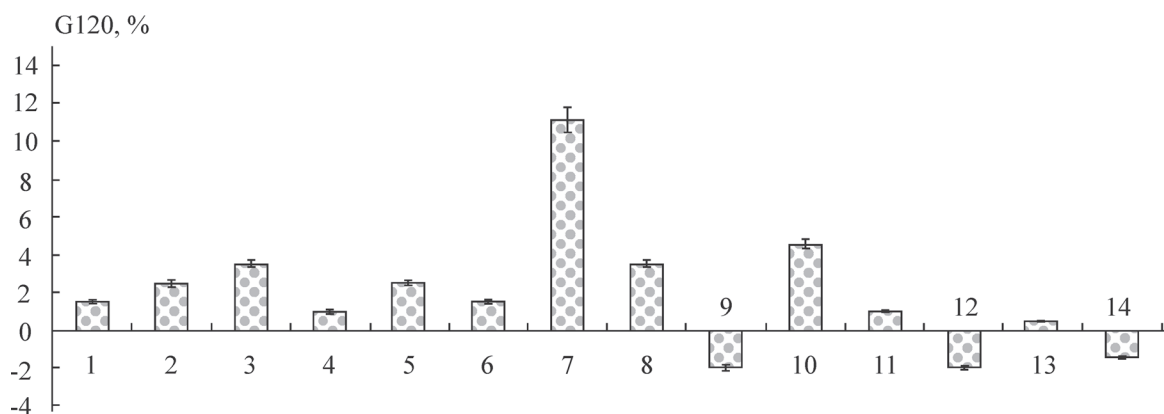


Рис. 2. Гипоосмотический гемолиз эритроцитов крови больных с легкой ЧМТ. 1-14 – больные; группы с низкой (№1-7) и высокой (№8-14) стойкостью эритроцитов к легкой ЧМТ, за ноль принята величина контроля (G_{120}).

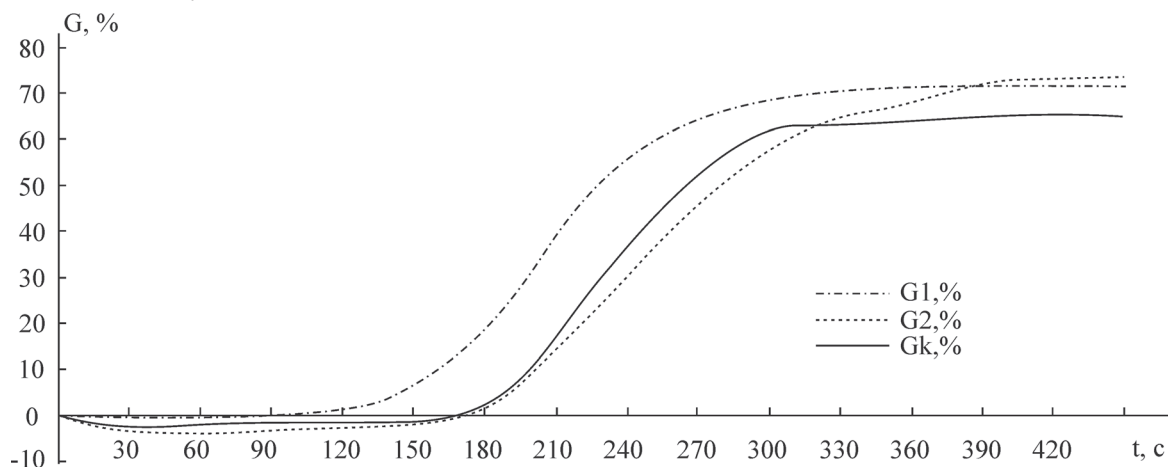


Рис. 3. Кинетика кислотного гемолиза эритроцитов больных с легкой ЧМТ. Группа с низкой стойкостью эритроцитов к легкой ЧМТ, больные №1-7 (G1), группа с высокой стойкостью эритроцитов к легкой ЧМТ, больные №8-14 (G2), G_k – контроль. Интегральная форма.

Изучение цитоархитектоники эритроцитов крови доноров в норме, согласно классификации эритроцитов, предложенной Г.И. Козинец и соавт. [12], показало содержание в контрольном образце 93.6% дискоцитов, 4.5% обратимых дискоцитов (дискоциты с одним выростом, с гребнем, множественными выростами и эритроциты в виде тутовой ягоды), 1.9% необратимых дискоцитов (куполообразные эритроциты, сфероциты с гладкой поверхностью, сфероциты с шипиками на поверхности, эритроциты в виде «спущенного» мяча, дегенеративные формы эритроцитов), что соответствует морфологической картине красных клеток крови здорового человека (рис. 4).

Исследование рельефа поверхности эритроцитов крови больных обеих групп с легкой ЧМТ методом сканирующей электронной микроскопии показало, что количество форменных элементов осталось на уровне контроля (90-93% дискоцитов), рис. 5. Из этого следует, что выявленное изменение процентного содержания дискоцитов не является статистически значимым, что говорит о практически полном сохранении поверхностной архитектуры эритроцитов, а, следовательно, и о циркуляции в крови больных популяции нормальных двояковогнутых дискоцитов. Количественная

оценка изменения соотношения нормальных и патологических форм эритроцитов (легкая ЧМТ) представлена в табл.1.

В результате травмы регистрируется незначительное снижение количества дискоцитов, увеличение числа обратимых и необратимых форм; установлено повышение ИТ и ИНОТ.

Анализ полученных результатов показал, что после легкой ЧМТ (сотрясение) не выявляются изменения архитектуры эритроцитов крови больных обеих групп (рис. 5).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных серий исследований, посвященных изучению структурно-функциональных свойств эритроцитов крови больных с легкой ЧМТ, было установлено следующее:

1. У больных с легкой ЧМТ 1 группы (№1-7) при помещении их эритроцитов в гипосмотическую среду (0.55%) величина осмотической резистентности эритроцитов резко снижена, G_{120} достигает величины 11.2 % (контроль - 0), а также данная группа больных характеризуется пониженным барьером проницаемости мембран эритроцитов для ионов H^+ ; длительность латентной фазы, характеризующей устойчивость мембран

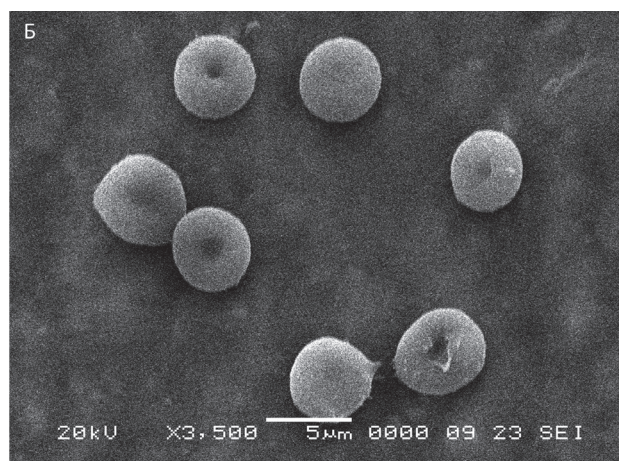
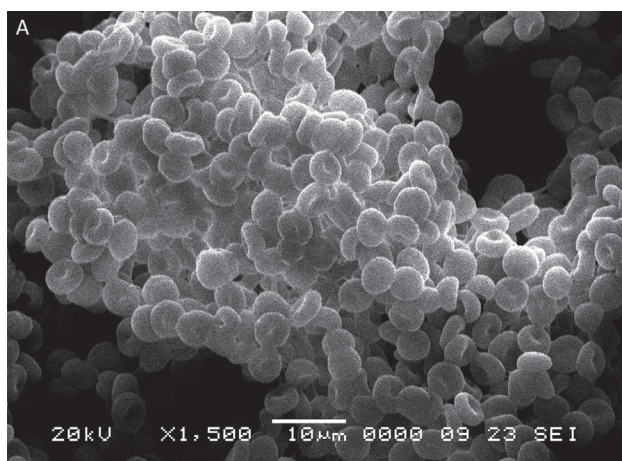


Рис. 4. Электронные микрофотографии эритроцитов контрольного образца. А-увеличение×1.500, Б- увеличение×3.500.

Таблица 1

Цитоархитектоника эритроцитов крови больных с легкой черепно-мозговой травмой

Показатели	Контроль	Легкая ЧМТ (группа №1)	Легкая ЧМТ (группа №2)
Д, %	93.6±1.02	90.5±1.29	91.06±1.39
ОД, %	4.5±0.12	7.2±0.21	5.8±0.28
НД, %	1.9±0.69	2.3±0.115	2.2±0.11
ИТ	0.07±0.003	0.1±0.005	0.09±0.005
ИОТ	0.05±0.002	0.08±0.004	0.06±0.003
ИНОТ	0.02±0.001	0.03±0.002	0.02±0.001

Д – дискоциты, ОД – обратимые дискоциты, НД – необратимые дискоциты, ИТ – индекс трансформации, ИОТ – индекс обратимой трансформации, ИНОТ – индекс необратимой трансформации.

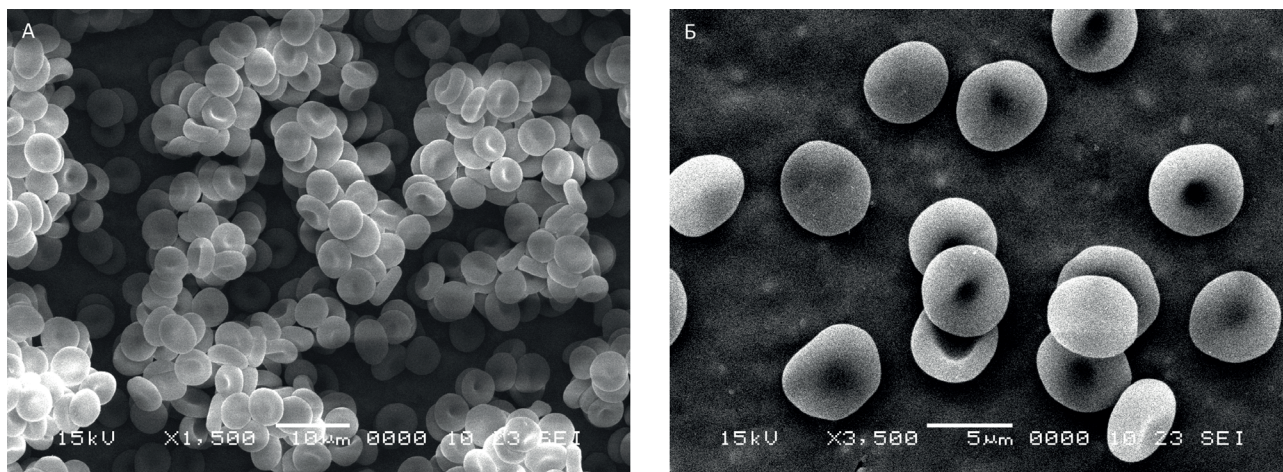


Рис. 5. Электронная микрофотография эритроцитов крови больных с легкой ЧМТ. А - увеличение $\times 1.500$, Б - увеличение $\times 3.500$.

эритроцитов для кислоты, сокращена на 30-60 секунд (контроль 180 с); константа максимальной скорости гемолиза клеток у больных 1 группы (№1-7) выше контроля в среднем на 0.17% (контроль 0.7), что свидетельствует об увеличении количества одновременно вступающих в фазу гемолиза эритроцитов. У больных второй группы (№8-14) наблюдается повышенная кислотная и осмотическая резистентность мембран эритроцитов, так как G_{120} не превышает 2.1% (контроль - 0), барьер проницаемости для ионов H^+ повышен ($t_{лат} \geq 180$ с), а также $K_{max} \leq 0.7$ отн. ед.

2. Морфологический анализ архитектоники эритроцитов крови обеих групп больных с помощью метода сканирующей электронной микроскопии показал, что изменение содержания дискоцитов, ОД, НД при сотрясении мозга не превышает 2-3%. Показано, что эритроциты крови больных морфологически сходны с эритроцитами доноров. Выявлено изменение доли двояковогнутых дискоцитов на 3%, что свидетельствует о кажущейся высокой морфологической устойчивости эритроцитов, однако, при использовании метода эритрограмм обнаружены скрытые структурные нарушения, которые могли бы обусловить высокий уровень гемолитической активности при помещении эритроцитов группы больных №1-7 в гипосмотическую среду.

Обобщая результаты проведенных исследований, можно заключить, что при легкой черепно-мозговой травме в организме больного развиваются такие процессы, которые затрагивают не только морфологические, но и функциональные (проницаемость) свойства мембран эритроцитов. Данные нарушения могут приводить к изменениям гемодинамики, изменению транспортных свойств крови, развитию гипоксического состояния, к

проявлениям которого наиболее чувствителен головной мозг. В целом, применяемые нами методы и подходы в совокупности с другими информативными методами (перекисного окисления липидов, окислительной модификации белков) можно рекомендовать для количественной (вместо симптоматической) оценки глубины повреждения структур мозга при легкой ЧМТ больных пациентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коновалов А.Н. Клиническое руководство по черепно-мозговой травме. Практическое пособие: в 3-х т./ А.Н. Коновалов, Л.Б. Лихтерман, А.А. Потапов. — Москва: Антидор, 2002. — 635 с. — 3 т.
2. A population study of seizures after traumatic brain injury / J.F. Annegers [et al.] // N. Engl Med. — 1998. — Vol. 338. — P. 20-24.
3. Traumatic brain injury in adults / A.G. Kolia [et al.] // Pract Neurol. — 2013. — Vol. 292. — P. 228-235.
4. Карахан В.Б. Травматические поражения центральной нервной системы. Болезни нервной системы / В.Б. Карахан, В.В. Крылов, В.В. Лебедев; под ред. Н.Н. Яхно, Д.Р. Штульмана. — Москва: Медицина, 2001. — 744 с.
5. Клиническая классификация и концептуальные подходы к лечению последствий ЧМТ / Л.Б. Лихтерман [и др.] // Вопр. нейрохирургии. — 1999. — № 3. — С. 3-6.
6. Effects of acute injury characteristics on neurophysical status and vocational outcome following mild traumatic brain injury / R.E. Hanlon [et al.] // Brain Inj. — 1999. — №11. — P. 873-887.
7. Differential working memory load effects after mild traumatic brain injury / T.W. McAllister [et al.] // Neuroimage. — 2001. — №5. — P. 1004-1012.

8. Воскресенская, О.Н. Сотрясение головного мозга: клиника, диагностика, лечение / О.Н. Воскресенская, И.В. Дамулин // Российский медицинский журнал. — 2015. — Т. 21, № 5. — С. 53-56.

9. Red blood cell distribution width and erythrocyte parameters in patients with brain injury after mild head trauma / G. Lippi [et al.] // Emergency Care Journal. — 2013. — №9 (1). — P. 36-38.

10. Современные представления о патогенезе закрытой черепно-мозговой травмы / ред. Е.Г. Педаченко. — Москва: Задруга, 1996. — 282 с.

11. Практикум по биофизике./ В.Г. Артюхов [и др.] — Воронеж: ИПЦ. ВГУ, 2001. — 163 с.

12. Клетки крови: современные технологии исследования / Г.И. Козинец [и др.] — Москва: Триада-Фарм, 2002. — 451 с.

*Воронежский государственный университет
Артюхов В. Г., доктор биол. наук, профессор,
заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии*

Tel .: + 7-473-2208586

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

*Voronezh State University
Artyukhov V. G., Ph.D, Sc.D., Full Professor,
Head of the Dept. of Biophysics and Biotechnology*

Tel .: + 7-473-2208586

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Резван С. Г., кандидат биол. наук, доцент кафедры биофизики и биотехнологии.

Rezvan S. G., Ph.D., Associate Professor, Dept. of Biophysics and Biotechnology

Саушкина Н. В., аспирант кафедры биофизики и биотехнологии.

Тел.: 89515616552

E-mail: sn.biolog@gmail.com

Saushkina N. V., post-graduate student, Dept. of Biophysics and Biotechnology

Tel.: 89515616552

E-mail: sn.biolog@gmail.com

*БУЗ ВО Воронежская клиническая больница
скорой медицинской помощи №1
Белинский В. В., нейрохирург*

*Budget institutions of health Voronezh Clinical
Emergency Hospital №1
Belinskij V. V., neurosurgeon*

*Центральный клинический госпиталь ФСБ
России*

Резван А. Г., кандидат медицинских наук, нейрохирург.

*Central Clinical Hospital of the Federal Security
Service of Russia*

Rezvan A. G., M.D., neurosurgeon.