

УДК 616.155.18

СТАН ЦИТОПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ЕРИТРОЦИТІВ У ХВОРИХ НА В-КЛІТИННІ НЕХОДЖКІНСЬКІ ЛІМФОМИ

У.В. ТИМОШЕНКО

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», м. Київ

Здійснено дослідження осмотичної, перекисної резистентностей еритроцитів, проникності еритроцитарних мембран за методом сечовинного гемолізу хворим на В-клітинні неходжкінські лімфоми. Виявлено ознаки деградації та збільшення проникності цитоплазматичної мембрани еритроцитів до гемоглобіну у хворих порівняно зі здоровими особами.

Ключові слова: лімфома, осмотичний лізис, клітинна мембрана, гемоліз.

Вступ. В умовах життєдіяльності людини збільшується забруднення атмосфери, ґрунту, води новими хімічними сполуками, яких у природі раніше не існувало. Такі екзогенні хімічні речовини можуть сприяти генним мутаціям та малігнізації клітин. За даними Міжнародного агентства з дослідження раку деякі речовини, які входять до складу пестицидів (2,3,7,8-тетрахлордибензо-парадіоксин) та медичних засобів (оксид етилену, азатіоприн, циклоспорин) є причиною розвитку неходжкінських лімфом на рівні з такими загальновідомими агентами як радіаційне випромінювання та віруси Епштейна-Барр, гепатиту С, НІV 1 [1].

Поряд із хімічними виробництвами, наземним, водним та авіаційним транспортом одним із найбільших джерел екологічних забруднень вважаються сільськогосподарські підприємства, функціонування яких неможливе без використання широкого спектру отруйних хімічних речовин [2–4]. Останнім часом вимушений постійний контакт з пестицидами (зокрема, інсектицидами, фунгіцидами та гербіцидами), а також постійна антигенна стимуляція

складовими кормів, фармакологічними ветеринарними препаратами та ін. призводить до підвищення ризику захворюваності працівників ферм на неходжкінські лімфоми [5]. Більше того, сільськогосподарські хімікати навіть у гранично допустимих концентраціях у дослідах *in vitro* здатні викликати 100 % гемоліз у результаті мембранної денатурації [6]. Хімічні забруднювачі навколишнього середовища впливають на структурно-функціональні властивості цитоплазматичних мембран (ЦПМ) еритроцитів та інших клітин, внаслідок чого відбувається порушення калієвого обміну і окисного фосфорилування [7–9].

Одним із основних показників функціонального стану ЦПМ є її проникність, яка неоднакова для різних речовин [10]. Найбільший коефіцієнт проникності крізь цитоплазматичний ліпідний бішар має вода (10^{-2} см/с), дещо менший – сечовина, триптофан та глюкоза (10^{-6} – 10^{-8} см/с). Для катіонів коефіцієнт проникності приблизно в 10 раз нижчий, ніж для води (10^{-10} – 10^{-14} см/с) [11, 12]. Тому визначення стійкості еритроцитів до осмотичного лізису має важливе значення для оцінки функціонального стану мембранного апарату при патологічних станах організму.

З метою вивчення функціонального стану ЦПМ еритроцитів для виявлення можливих гемолітичних ускладнень у пацієнтів з В-клітинними неходжкінськими лімфомами (В-НХЛ) нами були досліджені наступні показники: осмотична резистентність еритроцитів (ОРЕ), проникність еритроцитарних мембран за методом сечовинного гемолізу (ПЕМ), перекисна резистентність еритроцитів (ПРЕ).

Матеріали та методи дослідження. В якості біологічного матеріалу для дослідження використовувалася венозна гепаринізована кров. До основної групи дослідження ввійшов матеріал 11 осіб, хворих на В-НХЛ, які не отримували специфічного лікування (первинні). Для контрольної групи відібрана венозна кров донорів крові (28 осіб).

Дослідний матеріал взятий у пацієнтів з В-НХЛ, які зверталися за допомогою до Київського міського гематологічного центру, відділення

цитогенетичної діагностики та лікування онкогематологічних захворювань (зав. – д.м.н. проф. Сівкович С.О.), відділення трансфузіології та інтенсивної терапії (зав. – д.м.н. проф. Старіков А.В.) а також проходили консультаційно-діагностичне обстеження у групі імуногематології (зав. – к.м.н. Павлюк Р.П.). Перераховані підрозділи знаходяться на базі ДУ «ІГТ НАМНУ», м. Київ. Контрольні зразки донорів крові надані Київським міським центром крові, Житомирським обласним центром крові, Комунальним закладом Київської обласної ради «Київський обласний центр крові».

Виконання вимірювань показників ПЕМ проводили керуючись методом Колмакова В. Н., Радченко В. Г. [13]. Використовували 5 робочих розчинів з наступними об'ємними співвідношеннями сечовини до 0,9% розчину NaCl: 45:55, 50:50, 55:45, 60:40, 65:35. Оптичну густину надосадової рідини вимірювали при довжині хвилі 540 нм в кюветі 10 мм. Ступінь гемолізу (ПЕМ) розраховували:

$$\text{ПЕМ, \%} = \frac{E_n}{E_{et}} \times 100,$$

де E_n – оптична густина надосадової рідини в пробірках з робочими розведеннями; E_{et} – оптична густина надосадової рідини в пробірці з еталоном 100 % гемолізу.

На основі середніх значень ($M \pm m$) отриманих показників будували криві зміни ПЕМ для всіх груп спостереження.

Згідно класифікації Колмакова В. Н., Радченко В. Г. розрізняли наступні типи кривої ПЕМ: IV – показники норми, III – різке зниження всіх точок кривої, II – помірне зниження, I – підвищення ПЕМ. Залежно від характеру кривої підвищення ПЕМ виділяли декілька підтипів її зміни: IA – підвищення проникності в верхній частині кривої, IB – тотальне підвищення проникності, IB – підвищення проникності в нижній частині кривої, а також змішаний тип IIА/ІВ – зниження в верхній і підвищення в нижній частині. Вважається, що підтип IB асоціюється з наявністю осередка запалення в організмі. Підтипи IA та IB,

можуть бути пов'язані зі зміною структури білкових компонентів еритроцитарної мембрани [13].

Для оцінки ПРЕ використовували метод Григорович Н.А. та співав.[14]. Оптичну густина надосадової рідини дослідних проб вимірювали при довжині хвилі 540 нм при довжині оптичного шляху 3 мм. Відсоток гемолізу вираховували за формулою:

$$\text{ПРЕ, \%} = \frac{A}{B} \times 100,$$

де А – оптична густина надосадової рідини в дослідній пробі; В – оптична густина надосадової рідини в пробі зі 100% гемолізом.

Визначення ОРЕ здійснювали за методом в модифікації Ідельсона Л.І. [15]. Дослідження проводили у зразках крові відразу після забору і у зразках, інкубованих за температури 37°C протягом 24 годин. Постановку реакції здійснювали у наступних розведеннях NaCl, %: 0,1; 0,2; 0,3; 0,35; 0,4; 0,45; 0,5; 0,55; 0,6; 0,65; 0,7; 0,75; 0,85. Оптичну густина надосадової рідини вимірювали при довжині хвилі 500-560 нм в кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм. Інтенсивність гемолізу виражали у відсотках і обчислювали за формулою:

$$\text{ОРЕ, \%} = \frac{E_1 * 100}{E_x},$$

де E1 – екстинція надосадової рідини в пробірці з 0,1% розчином NaCl; Ex – екстинція дослідної проби; 100 – процент гемолізу в пробірці з 0,1% розчином NaCl.

Під максимальною ОРЕ розуміли розведення, при якому спостерігається руйнування 100% еритроцитів. Мінімальна ОРЕ – таке розведення NaCl при якому гемоліз складає 0%.

Статистичний аналіз отриманих результатів дослідження здійснювали за допомогою пакета статистичних програм StatSoft STATISTICA 10.0.1011. Для оцінки достовірності відмінностей між групами спостереження застосовували метод непараметричної статистики критерій рангів Вальда-Вольфовіца.

Результати та їх обговорення. У результаті дослідження у хворих на В-НХЛ спостерігався I тип кривої ПЕМ, який характеризувався підвищенням усіх точок порівняно з контролем (рис. 1).

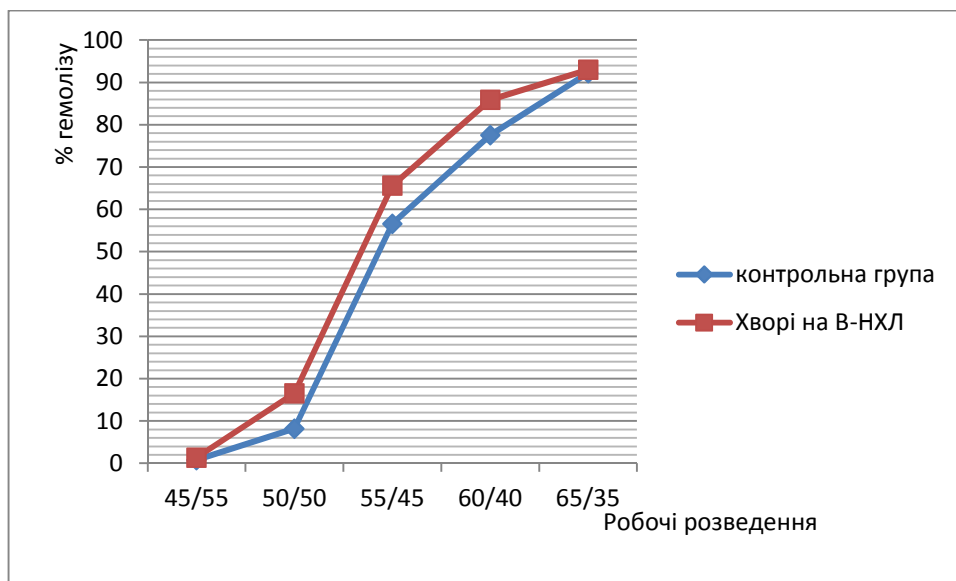


Рис. 1. Тип ПЕМ, характерний для хворих на В-НХЛ.

Для оцінки функціонального стану ЦПМ еритроцитів важливе значення має визначення ПРЕ, оскільки високий рівень ПРЕ вказує на деградацію гліцерофосфоліпідів біліпідного шару мембрани, що призводить до підвищення індексу сферичності еритроцитарної клітини, зменшення еластичності, збільшення осмотичної крихкості та фрагментації ЦПМ. Внаслідок чого відбувається розлад функції проникності клітинної мембрани до гемоглобіну [16]. Так, у пацієнтів з В-НХЛ зафіксоване підвищення показників ПРЕ порівняно з контрольною групою (таблиця 1).

Таблиця 1

Величини ПРЕ у осіб різних груп спостереження, % гемолізу

Групи спостереження	М±m	Абс.
Хворі на В-НХЛ, n = 11	30,36±4,33	12–57
Контрольна група, n = 20	9,45±0,44	0–12 [14]

Практично у всіх осіб, які входили до груп спостереження відсоток гемолізу при постановці методики ПРЕ був вищим за норму. Все ж у деяких

пацієнтів спостерігалися величини ПРЕ в межах норми, однак це поодинокі випадки, кількість яких недостатня для висновків. Так, серед 11 пацієнтів у 1 показник ПРЕ знаходився у межах норми.

Показники ПРЕ при В-НХЛ статистично відрізнялися від показників контрольної групи ($P = 0,000007$), на основі чого можна зробити висновок про те, що у хворих на В-НХЛ мали місце дегенеративні процеси гліцерофосфоліпідів біліпідного шару ЦПМ еритроцитів.

Важливе значення в діагностиці гемолітичних станів має визначення стійкості еритроцитів до осмотичного лізису. ОРЕ залежить від ступеню зрілості клітин, форми, змін складу плазми. Форма еритроциту характеризується співвідношенням між товщиною і діаметром клітини, яке має назву індекс сферичності. Індекс сферичності може значно перевищувати норму при спадкових або набутих структурних аномаліях ЦПМ, що призводить до зниження ОРЕ. Такі еритроцити набувають сферичної форми, яка свідчить про те, що вони вступили в фазу завершення свого життєвого циклу. Осмотично стійкішими (демонструють підвищення рівнів ОРЕ) є менш зрілі еритроцити, які щойно потрапили в кровотік із кісткового мозку, мають пласку дископодібну форму і малий індекс сферичності [12].

Функціональні зміни ЦПМ не завжди можна виявити у свіжозабраному зразку крові. Необхідно проводити додаткове обстеження ОРЕ після інкубації зразку протягом 24 годин за 37°C . У здорових осіб максимальна ОРЕ свіжозабраної крові знаходиться на рівні 0,35–0,40% розчину NaCl, мінімальна ОРЕ – на рівні 0,50–0,55%. Максимальна ОРЕ інкубованої крові в нормі повинна бути на рівні 0,40–0,45% розчину NaCl, мінімальна – 0,60–0,70% [15, 17].

При аналізі ОРЕ у хворих на В-НХЛ найбільший відсоток осіб із відхиленнями від норми показників патологічних змін ЦПМ еритроцитів фіксувався при обстеженні інкубованої крові (таблиця 2). Зокрема, початок гемолізу спостерігався в розведеннях NaCl близьких до фізіологічного, а настання повного гемолізу – на рівнях значно нижчих, ніж в нормі.

Таблиця 2

Частка пацієнтів з В-НХЛ з відмінними від норми показниками ОРЕ

Свіжа кров				Інкубована кров			
Початок гемолізу		Повний гемоліз		Початок гемолізу		Повний гемоліз	
Знижений рівень	Підвищений рівень	Знижений рівень	Підвищений рівень	Знижений рівень	Підвищений рівень	Знижений рівень	Підвищений рівень
8,3	-	-	8,3	25	-	16,7	-

Аналіз даних ОРЕ свідчить про збільшення в кров'яному руслі хворих на В-НХЛ еритроцитів з підвищеним індексом сферичності, тобто «старих». Проте в одному випадку у пацієнта з легкою стадією анемії (Hb = 100 г/л) зафіксовано підвищення рівня максимальної ОРЕ свіжозабраної крові, що може бути наслідком компенсаторного виходу молодих форм еритроцитів з кісткового мозку в кров'яне русло.

У деяких випадках виявити зміни резистентності вдавалося лише застосовуючи методику з режимом інкубування. У трьох пацієнтів відмінні від норми показники ОРЕ фіксувалися лише в інкубованій крові, в той час як показники ОРЕ свіжозабраної крові знаходилися в нормі.

У нормі у свіжозабраній крові початок гемолізу реєструється при концентрації розчину NaCl 0,5%, в інкубованій – при 0,6 %. При даних розведеннях допускається наявність 0–6% та 0–40% відповідно гемолізованих еритроцитів [15]. При обстеженні контрольної групи зафіксовано близько 3% гемолізованих еритроцитів у зразках свіжозабраної крові та близько 12% інкубованої (таблиця 3).

Таблиця 3

Інтенсивність гемолізу ОРЕ у відсотках у зразках крові осіб різних груп спостереження

Групи спостереження	Свіжозабрана кров, на рівні 0,5% р-н NaCl	Інкубована кров, на рівні 0,6% р-н NaCl
	M±m	
Хворі на В-НХЛ, n = 12	8,33±2,94	24,17±6,22
Контрольна група, n = 28	2,71±0,32	11,75±2,03

У хворих середні величини гемолізу у зразках свіжозабраної крові перевищували показники контрольної групи. У інкубованій крові середні показники хворих хоча і не виходили за межі норми, все ж вони були вищими за показники контрольної групи. Однак, достовірної статистичної відмінності показників інтенсивності гемолізу ОРЕ контрольної групи з групою хворих на В-НХЛ не виявлено (таблиця 4).

Таблиця 4

Статистична значимість відмінностей інтенсивності гемолізу ОРЕ за критерієм рангів Вальда-Вольфовіца між групами спостереження

Групи порівняння	Рівень статистичної значимості, Р	
	Свіжозабрана кров	Інкубована кров
Контрольна група / хворі на В-НХЛ	0,251943	0,938893

Незважаючи на статистичну недостовірність відмінностей показників між групами спостереження можна зробити висновок, що у хворих на В-НХЛ все ж можуть мати місце деякі структурні аномалії ЦПМ, які призводять до підвищення індексу сферичності еритроцита.

ВИСНОВКИ

1. У хворих на В-НХЛ виявлено збільшення проникності еритроцитарної мембрани до сечовини порівняно зі здоровими особами.

2. При В-НХЛ спостерігалось підвищення рівня ПРЕ порівняно з контрольною групою, що може бути ознакою деградації фосфоліпідів ЦПМ еритроцитів.

3. Інтенсивність гемолізу ОРЕ у зразках крові хворих на В-НХЛ достовірно не відрізнялась від такої у контрольній групі, хоча була вищою за норму. Це дає підставу вважати, що при В-НХЛ все ж може мати місце підвищення індексу сферичності еритроцитів.

4. Для оцінки функціонального стану ЦПМ еритроцитів ми рекомендуємо використовувати тести на осмотичну та перекисну резистентність еритроцитів а також визначення проникності еритроцитарних мембран за методом сечовинного гемолізу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Preventable exposures associated with human cancers / Cogliano V.J., Baan R., Straif K. [et al.] // *J Natl Cancer Inst.* – 2011. – V. 103, № 24. – P. 1827–1839.
2. Ключко О.М. Обґрунтування теоретичних основ оцінок техногенного ризику вуглеводневих забруднень під час моніторингу екологічного стану довкілля аеропортів / О.М. Ключко // *Вісник інженерної академії України.* – 2014. – № 2. – С. 247–252.
3. Франчук Г.М. Екологія, авіація і космос / Г.М. Франчук, В.М. Ісаєнко – К. : НАУ, 2005. – 456 с.
4. Canadian male farm residents, pesticide safety handling practices, exposure to animals and non-Hodgkin's lymphoma (NHL) / McDuffie H.H., Pahwa P., Spinelli J.J. [et al.] // *Am J Ind Med.* – 2002. – № 2. – P. 54–61.
5. Risk of lymphatic or haematopoietic cancer mortality with occupational exposure to animals or the public / Svec M.A., Ward M.H., Dosemeci M. [et al.] // *Occup Environ Med.* – 2005. – № 62. – P. 726–735.
6. Effects of Roundup[®] pesticide on the stability of human erythrocyte membranes and micronuclei frequency in bone marrow cells of Swiss mice / Rodrigues H. G., Penha-Silva N., Araujo M. F. P. [et al.] // *The open biology journal.* – 2011. – № 4. – P. 54–59.
7. Осмотическая резистентность мембран эритроцитов у крыс с гипер- и гипокальциемией [Электронный ресурс] / [Козаев А.В., Джигоев И.Г., Кабоева Б.Н., Батагов Ф.Э.] // *Современные проблемы науки и образования.* – 2014. – № 4. – Режим доступа к журн.: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=13921>
8. Молдакаримов С.Б. Влияние 1,1-диметилгидразина на состояние мембран эритроцитов человека в условиях *in vitro* / С.Б. Молдакаримов // *Известия НАН РК. Серия биологическая.* – 2006. – № 1. – С. 46–50.

9. Нагорная Н.В. Оксидативный стресс: влияние на организм человека, методы оценки / Нагорная Н.В., Четверик Н.А. // Здоровье ребенка. – 2010. – Т. 23, № 2. – С. 140 – 145.

10. Остапченко Л.І. Біологічні мембрани: Методи дослідження структури та функцій: навчальний посібник / Л.І Остапченко, І.В. Михайлик. – К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2006. – 215 с.

11. Потапенко А.Я. Осмотическая устойчивость эритроцитов : учебное пособие / Потапенко А.Я., Кягова А.А., Тихомиров А.М. – ГОУ ВПО ГРМУ, 2006. – 16 с.

12. Патологическая физиология / [под ред. А.Д. Адо, Л.М. Ишимовой]. – М.: Медицина, 1980 – 520 с.

13. Колмаков В.Н. Значение определения проницаемости эритроцитарных мембран (ПЭМ) в диагностике хронических заболеваний печени / В.Н. Колмаков, В.Г. Радченко // Терапевтический архив. – 1982. – Т. LIV, № 2. – С. 59–62.

14. А. с. 1704083 СССР, МКИ G 01 N 33/50. Способ оценки перекисной резистентности эритроцитов / Н.А. Григорович, А.С. Мавричев, Г.Ю. Бычков, А.А. Лысенко (СССР). – № 4726724/14 ; заявл. 02.08.89 ; опубл. 07.01.92, Бюл. № 1.

15. Руководство к практическим занятиям по клинической лабораторной диагностике / [под ред. М.А. Базарновой, В.Т. Морозовой]. – К.: Выща школа, 1988. – 317 с.

16. Карагезян К.Г. Фосфолипиды-глицериды, перекисная резистентность эритроцитов, уровень в них малонового диальдегида и содержание α -токоферола в плазме крови и эритроцитах крыс с аллоксановым диабетом до и после применения комбинированной антиоксидантотерапии / К.Г. Карагезян, Д.М. Геворкян // Вопросы медицинской химии. – 1989. – Т. 35, № 5. – С. 27–30.

17. Доссе Ж. Иммуногематология; [перевод с французского Ю.И. Лорие]. – Москва : Медгиз. – 1959. – 638 с.

**СОСТОЯНИЕ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ У
БОЛЬНЫХ В-КЛЕТОЧНЫМИ НЕХОДЖКИНСКИМИ ЛИМФОМАМИ**

У.В. ТИМОШЕНКО

ГУ «Институт гематологии и трансфузиологии НАМН Украины», г. Киев

Произведено исследование осмотической, перекисной резистентностей эритроцитов и проницаемости эритроцитарных мембран методом мочевинового гемолиза при В-клеточных неходжкинских лимфомах. У больных по сравнению со здоровыми лицами были выявлены признаки деградации и увеличения проницаемости цитоплазматической мембраны эритроцитов к гемоглобину.

Ключевые слова: лимфома, осмотический лизис, клеточная мембрана, гемолиз.

**THE STATE OF ERYTHROCYTE CELL MEMBRANE IN PATIENTS
WITH B-CELL NON-HODGKIN'S LYMPHOMA**

U.V. TYMOSHENKO

*State institution "Institute of haematology and transfusiology NAMS Ukraine",
Kyiv*

Investigation of urea hemolysis, osmotic and peroxidative resistance of erythrocytes in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma was done. Signs of degradation and increased permeability of erythrocyte membranes to hemoglobin were revealed in patients compared with healthy individuals.

Key words: lymphoma, osmotic lysis, cell membrane, hemolysis.