

**А.И. Инжутова, А.Б. Салмина, М.М. Петрова, С.В. Михуткина,
В.В. Народова, Д.В. Домрачев**

РЕГИСТРАЦИЯ БЛЕББИНГА ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КАК ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОЦЕНКИ ТЯЖЕСТИ СОСТОЯНИЯ БОЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕННЫМИ ФОРМАМИ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ

ГОУ ВПО Красноярская государственная медицинская академия

Исследовали развитие блеббинга плазматической мембраны лимфоцитов периферической крови методом фазово-контрастной микроскопии у больных гипертонической болезнью, осложненной острым нарушением мозгового кровообращения, в динамике. Установили различия в выраженности блеббинга плазматической мембраны лимфоцитов в зависимости от изменений в системе гемостаза и иммунного ответа

Ключевые слова: блеббинг, апоптоз, гипертоническая болезнь

Артериальная гипертония — патологическое состояние, сопровождающееся ремоделированием сосудов, снижением эластичности сосудистой стенки, изменением реологических свойств крови и полиорганным нарушением кровоснабжения. Одним из механизмов повреждения сосудистой стенки является сочетание клеточной пролиферации и апоптоза, приводящее к уменьшению просвета сосудов, нарушению антитромбогенной активности эндотелия и транскапиллярного обмена и, как следствие, недостаточности кровоснабжения органов [3, 6, 9]. Апоптоз эндотелиоцитов регулируется Fas-опосредованной сигнализацией, что сопровождается ранней инфильтрацией Т-лимфоцитами и макрофагами субэндотелиального слоя. Существенную роль в повреждении эндотелиоцитов играет окислительный стресс [1, 2, 8].

К тому же лейкоцитоз, выявляемый в периферической крови больных с ишемическим инсультом, при отсутствии признаков воспалительного процесса в организме коррелирует с уровнем сосудистого эндотелиального фактора роста, который является митогеном для клеток эндотелия, увеличивает проницаемость сосудов, вызывает хемотаксис моноцитов. Эти изменения отражают сдвиги в иммунном статусе пациентов [5].

Важное значение в регуляции индукции и прогрессии апоптоза эндотелиоцитов имеют механизмы, опосредованные активностью мембранных микрочастиц лейкоцитарного и тромбоцитарного происхождения [7, 9]. Процессами, приводящими

к образованию этих микрочастиц, являются как физиологическая активация клеток, так и интенсивный блеббинг плазматической мембраны, возникающий при окислительном стрессе, апоптозе и некрозе [1, 7, 9]. Развитие блеббинга мембраны представляет собой результат нарушения мембран-цитоскелетных взаимодействий вследствие активации специфических ферментативных реакций, окислительного повреждения белков цитоскелета, развития примембранного энергетического и ионного дисбаланса [1, 2]. Апоптотическому блеббину предшествуют потеря микроворсинок и десмосом, нарушение актин-миозиновых взаимодействий и экстернализация фосфатидилсерина, что в итоге проявляется пузыревидным выпячиванием цитоплазматической мембраны, сопровождается миграцией ядерных и цитоплазматических антигенов в образующиеся блеббы, приобретающие прокоагулянтный и аутоантигенный потенциал [1]. Блеббинг не является специфическим маркером повреждения клеток (разные по природе стимулы приводят к его развитию), однако может являться интегральным параметром, отражающим действие повреждающих факторов на клетки.

Роль мембранной дисфункции в патогенезе гипертонической болезни, острого коронарного синдрома, атеросклероза достаточно хорошо изучена, однако только в последние годы стали накапливаться данные о важной патогенетической роли мембранных микрочастиц, высвободившихся с по-

верхности активно блеббингующих апоптотических клеток, при этих заболеваниях [3, 8]. На развитие блеббинга клеток крови и эндотелиоцитов могут влиять такие факторы, как уровень липопротеидов низкой плотности, свободные радикалы, а к патофизиологическим последствиям высвобождения в кровотоке мембранных микрочастиц следует отнести гиперкоагуляцию, аутоиммунизацию, эндотелиальную дисфункцию [1, 2, 8].

Лимфоциты периферической крови представляют собой доступный объект для изучения процессов мембранной дисфункции в силу того, что они обладают высокой чувствительностью к действию апоптогенных и некрозогенных факторов, являются субстратом иммунного ответа, популяция лимфоцитов обладает динамичностью в связи с относительно непродолжительным пребыванием в системном кровотоке. Таким образом, оценка динамических изменений мембран-цитоскелетных взаимодействий в лимфоцитах периферической крови по регистрации блеббинга цитоплазматической мембраны клеток может являться важным индикатором изменения функциональной активности этих клеток и возможной роли их в качестве источника мембранных микрочастиц, взаимодействующих с клетками эндотелия.

Целью работы явилось изучение возможности регистрации блеббинга плазматической мембраны лимфоцитов периферической крови у пациентов с гипертонической болезнью, осложненной острым нарушением мозгового кровообращения, в качестве экспресс-метода оценки тяжести состояния больных.

Методика

По протоколу исследования с письменного согласия больных проводили забор венозной крови у пациентов обоего пола в возрасте 35-60 лет, находящихся на стационарном лечении в неврологическом отделении по поводу ишемического инсульта, на 1, 7, 19-20 сутки после развития острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК). Всем пациентам проводилась базисная и симпто-

матическая терапия. Пациенты были разделены на 3 группы в зависимости от предшествующей стадии гипертонической болезни до возникновения ОНМК: 1 группа пациентов — III стадия гипертонической болезни (ГБ), согласно критериям ВОЗ (27 пациентов); 2 группа — II стадия ГБ (24 пациента); 3 группа — I стадия ГБ (8 пациентов). У 5 человек в возрасте от 40 до 57 лет ишемический инсульт был подтвержден методом компьютерной томографии, у этих больных гипертонического анамнеза не было. Больные симптоматической артериальной гипертонией, а также больные, имеющие тяжелую сопутствующую патологию (такую, как бронхиальная астма, хроническая почечная недостаточность, системные заболевания соединительной ткани и т.п.), не были включены в группу обследуемых. Контрольную группу составили здоровые люди соответствующего возраста и пола (20 человек). Лимфоциты периферической крови выделяли по стандартной методике на градиенте плотности фиколл-верографин (Pharmacia Chemical, Uppsala, Sweden) $\rho=1,077$ [4]. Выделенные лимфоциты отмывали раствором Хенкса и исследовали методом фазово-контрастной микроскопии. Подсчитывали: 1) интактные клетки (с визуально неизменной плазматической мембраной); 2) клетки в состоянии начального блеббинга (мелкие везикулы на мембране — до 1/3 радиуса клетки); 3) клетки в состоянии терминального блеббинга (крупные пузыри мембраны — более 1/3 радиуса клетки); 4) некротизированные лимфоциты. Для оценки степени выраженности блеббинга в исследуемой фракции лимфоцитов (из расчета на 100 клеток) нами была разработана шкала, представленная в *таблице 1*.

Детекцию апоптоза лимфоцитов периферической крови осуществляли с помощью Annexin V Apoptosis Detection kit (Caltag Laboratories, USA) согласно протоколу производителя.

Иммунный ответ оценивали по развернутому анализу крови по показателям, представленным в *таблице 2*. У всех пациентов оценивали показа-

Таблица 1

Шкала оценки степени блеббинга лимфоцитов периферической крови у пациентов с ОНМК

Идентифицированная категория клеток	Показатель степени выраженности блеббинга в популяции лимфоцитов			
	IV степень	III степень	II степень	I степень
Интактная плазматическая мембрана	10-20% клеток	21-40% клеток	41-60% клеток	>60% клеток
Терминальный блеббинг	>60% клеток	51-60% клеток	31-50% клеток	10-30% клеток

Таблица 2

Шкала оценки степени иммунного ответа у пациентов с ОНМК

Определяемый параметр	Показатель степени выраженности неспецифического иммунного ответа			
	1 степень	2 степень	3 степень	4 степень
Лейкоциты *10 ⁹ /л	N	До 10,0	10,0-12,0	> 12,0
СОЭ мм/час	N	15,0-19,0-муж 20,0-24-жен	20-30-муж 25-30-жен	>30

тели системы гемостаза стандартными методами (ПТИ, ПТВ, фибриноген, АЧТФ, ОФ-тест, антитромбин III, Хагеманзависимый фактор, D-димер, тромбоциты).

Статистический анализ результатов произвели методами вариационной статистики с помощью компьютерной программы статистической обработки данных Statistica 6.0 for Windows.

Показатель достоверности результатов рассчитывали на основе критерия Стьюдента (для количественных показателей). Для всех имеющихся выборок данных проверена гипотеза нормальности распределения (по критерию Колмогорова-Смирнова). Статистически достоверными считали различия при $P < 0,05$.

Результаты

Известно, что в пуле мембранных микрочастиц в периферической крови могут присутствовать микровезикулы различного происхождения (лейкоцитарные, тромбоцитарные и пр.), однако запускаемые ими при взаимодействии с клетками эндотелия механизмы мало зависят от природы микровезикул [7, 9]. Мы оценивали выраженность процесса, предшествующего образованию мембранных микрочастиц, — блеббинга — в лимфоцитах периферической крови. На первые сутки после развития острого нарушения мозгового кровообращения была зарегистрирована максимальная степень выраженности терминального блеббинга лимфоцитов периферической крови у пациентов всех групп. К 19-20 суткам после госпитализации на фоне проводимого лечения (улучшение гемоперфузии головного мозга, нейропротекция, гипотензивная и симптоматическая терапия) интенсивность блеббинга плазматической мембраны лимфоцитов достоверно снизилась (Рис. 1).

В группах пациентов с исходной III и II стадиями гипертонической болезни при поступлении

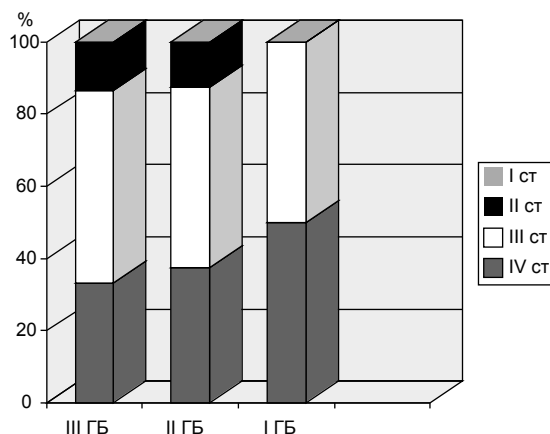


Рис. 1. Относительное количество клеток с регистрируемым блеббингом разной степени выраженности у пациентов с гипертонической болезнью в первые сутки после ОНМК

ГБ — стадия гипертонической болезни;
ст — степень выраженности блеббинга

(1 сутки) преобладали IV и III степени блеббинга, на 19-20 день регистрировалось преобладание II и I степени блеббинга. Однако у пациентов с I стадией артериальной гипертонии наблюдалось равное распределение между IV и III степенями блеббинга плазматической мембраны лимфоцитов в 1 сутки госпитализации, а к 19-20 дню преобладали III и II степени блеббинга. В группе пациентов без предшествующей артериальной гипертонии регистрировалась IV степень блеббинга в 1 сутки после ОНМК, тогда как к 19-20 дню госпитализации у всех пациентов этой группы регистрировалась только II степень блеббинга (Рис. 2). Положительная корреляция между степенью блеббинга, определенной в 1 и на 19-20 дни госпитализации больных с ОНМК, была обнаружена в группах пациентов со II и I стадиями ГБ (Таблица 3).

Апоптоз лимфоцитов периферической крови оценивали по экстернализации фосфатидилсерина. Мы обнаружили, что в 1 сутки госпитализации содержание лимфоцитов, связывающих аннексин, было 16,81% ($p < 0,005$). На 20 сутки госпитализации аннексин-связывающих лимфоцитов было 7,0% ($p < 0,0035$).

Для сравнения, в контрольной группе процент аннексин-позитивных лимфоцитов составил 2,5% ($p < 0,05$).

Для всех пациентов были характерны изменения параметров свертывающей системы крови. При этом по выше перечисленным критериям карты гемостаза в 95% случаев в каждой из выделенных групп регистрировались системная тромбоцитопения, умеренное внутрисосудистое фибринообразование, снижение фибринолиза, активация тромбоцитов, дефицит факторов протромбинового компонента. Оставшиеся 5% были распределены между умеренной гипокоагуляцией, тромбоцитозом, снижением фибринолитичес-

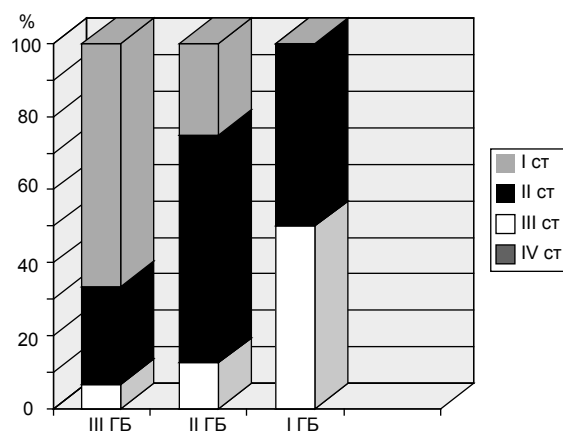


Рис. 2. Относительное количество клеток с регистрируемым блеббингом разной степени выраженности у пациентов с гипертонической болезнью на 19-20 сутки после ОНМК

ГБ — стадия гипертонической болезни;
ст — степень выраженности блеббинга

Таблица 3

Коэффициенты корреляции между измеряемыми параметрами в группах пациентов с ОНМК

Определяемый параметр	Стадия ГБ		
	III	II	I
Степень блеббинга 1 сутки / 20 суток	0,39 (p 0,0005)	0,59 (p 0,001)	1,0 (p 0,018)
Степень иммунного ответа 1 сутки / 20 суток	0,47 (p 0,046)	0,76 (p 0,049)	-1,0 (p 0,018)
Степень блеббинга / степень иммунного ответа 1 сутки	0,62 (p 0,00042)	-0,57 (p 0,018)	-1,0 (p 0,051)
Степень блеббинга / степень иммунного ответа 20 суток	0,62 (p 0,008)	-0,48 (p 0,048)	1,0 (p 0,042)

кой активности, внутрисосудистой активацией тромбоцитов и нормальными показателями системы гемостаза (что составило около 3% в группе пациентов с исходной III и II стадией гипертонической болезни). Вместе с тем необходимо отметить, что в группе пациентов с исходно I стадией гипертонической болезни в 100% случаев сочетались гипертромбинемия и гиперкоагуляция.

Интересно, что наибольшая степень блеббинга регистрировалась в группах пациентов с гиперкоагуляцией и гипертромбинемией, тогда как минимальная степень блеббинга отмечалась в группе пациентов с нормальными показателями гемостаза или гипокоагуляцией в сочетании с гипертромбинемией. При этом наибольший коэффициент корреляции между степенью блеббинга и степенью реактивного ответа соответствовал группе пациентов с нормальными показателями гемостаза или с гипокоагуляцией по результатам оценки коагулограммы (1 сут. $r = 0,67$; 19-20 сут. $r = 0,77$).

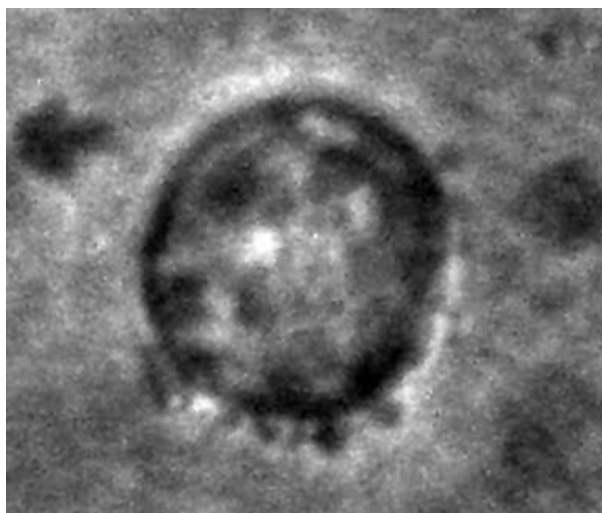


Рис. 3. Блеббинг плазматической мембраны лимфоцита: на снимке зафиксированы выпячивания цитоплазматической мембраны лимфоцита в нижнем полюсе клетки. Увеличение $\times 900$, фазово-контрастная микроскопия

Анализ выраженности иммунного ответа, оцениваемой по развернутому анализу крови, показал следующее распределение: в группе пациентов с III и II стадиями ГБ до поступления в стационар: на 1 сутки госпитализации преобладали 2 и 3 степень иммунного ответа, на 19-20 день — 2 и 1 степень иммунного ответа (соответственно, $r = 0,47$, $p < 0,05$ и $r = 0,76$, $p < 0,05$). Среди пациентов с исходной I стадией ГБ распределение было между 4 и 3 степенью иммунного ответа на 1 сутки госпитализации и между 2 и 3 степенями иммунного ответа на 19-20 суток госпитализации ($r = -1,0$, $p < 0,05$).

Наибольшая степень иммунного ответа определялась в группе пациентов с гиперкоагуляцией и гипертромбинемией, наименьшая соответствовала группе пациентов с нормальными показателями гемостаза.

Коэффициент корреляции степени иммунного ответа был значительно выше в группе пациентов с гиперкоагуляцией ($r = 0,82$).

Сопоставление выраженности иммунного ответа организма и интенсивности блеббинга плазматической мембраны позволило выявить, что в группе пациентов с I стадией гипертонической болезни существует сильная отрицательная связь между этими показателями в остром периоде после ОНМК и сильная положительная связь — к 19-20 суткам. В группе пациентов с II стадией гипертонической болезни наличие отрицательной связи между указанными параметрами не было зарегистрировано (Таблица 3).

В наблюдаемых группах пациентов было 2 случая летального исхода. У обоих пациентов в 1 сутки госпитализации была определена 4 степень блеббинга и иммунного ответа; через 7 дней наблюдения не было отмечено регрессии степени блеббинга и интенсивности иммунного ответа.

Заключение

Мы предполагаем, что основными факторами, инициирующими развитие блеббинга лимфоцитов периферической крови у больных гипертонической болезнью с ОНМК, являются циркуляторная гипоксия и окислительный стресс как важные компоненты патогенеза этого состояния. Признавая блеббинг плазматической мембраны клеток периферической крови интегральным показателем мембранной дисфункции при гипоксии и окислительном стрессе, можно сделать вывод о том, что длительная гипоксия, обусловленная тяжелым течением гипертонической болезни (II, III стадии), сравнительно лучше адаптирует организм пациента к окислительному стрессу (ишемическому поражению) по сравнению с пациентами с I стадией ГБ до развития ОНМК. Вероятно, основное значение в развитии ОНМК у больных с

I стадией гипертонической болезни принадлежит системному нарушению гемостаза по типу гиперкоагуляции и гипертромбинемии, что сопровождается выраженным блеббингом лимфоцитов. У пациентов с III и II стадиями гипертонической болезни преимущественный вклад в развитие ОНМК вносит собственно повышенное артериальное давление и выраженная эндотелиальная дисфункция, что определяет прогрессирование мембранной дисфункции, в том числе в клетках периферической крови.

Таким образом, выраженность степени блеббинга лимфоцитов периферической крови отображает клиническую тяжесть состояния больных с осложненными формами гипертонической болезни (что подтверждается данными общеклинических анализов: по РАК — медленная регрессия лейкоцитоза, ускоренная СОЭ, изменение в карте гемостаза и клинически медленная регрессия постишемической неврологической симптоматики, трудность в подборе гипотензивной терапии для достижения целевого уровня артериального давления), косвенно указывает на наличие эндотелиальной дисфункции и нарушения в системе гемостаза по типу гиперкоагуляции. Так, больные с III степенью блеббинга через 7 дней после поступления в стационар имели клинически более тяжелое течение заболевания по сравнению с пациентами, у которых через 7 дней регистрировалась II степень блеббинга лимфоцитов периферической крови. У этих пациентов сохранялась высокая СОЭ, стойкая неврологическая симптоматика и АД на уровне 160-180 / 90-100 мм рт.ст. В то время как у пациентов со II степенью блеббинга при этом СОЭ снижалась почти до уровня нормы, быстрее регрессировала неврологическая симптоматика, карта гемостаза приближалась к норме, а уровень АД составлял в пределах 130-140 / 80-90 мм рт.ст. на фоне стандартной гипотензивной терапии для той и другой рассматриваемой групп. Также стоит отметить тот факт, что больные со страдающими витальными функциями, находящиеся в реанимационных условиях ПИТ неврологического отделения, также сохраняли высокую степень блеббинга вплоть до перевода в обычную палату неврологического отделения. У таких больных на момент поступления и через неделю пребывания в ПИТ регистрировалась IV-III степень блеббинга. Интересно, что у некоторых пациентов она даже увеличивалась по сравнению с исходной, но имела тенденцию к снижению к 20 дню госпитализации.

На основании наших данных мы считаем, что регистрация степени блеббинга цитоплазматической мембраны лимфоцитов может быть рекомендована в качестве экспресс-метода оценки

выраженности эндотелиальной дисфункции, тяжести состояния и эффективности проводимой терапии у пациентов с осложненными формами гипертонической болезни.

REGISTRATION OF PLASMA MEMBRANE BLEBBING OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES AS AN EXPRESS METHOD FOR ASSESSMENT OF SEVERITY OF STATUS IN PATIENTS WITH HYPERTENSION AND STROKE

A.I. Inzhutova, A.B. Salmina, M.M. Petrova, S.V. Mikhutkina, V.V. Narodova, D.V. Domrachev

Progression of plasma membrane blebbing in peripheral blood lymphocytes obtained from patients with essential hypertension complicated by stroke was studied with phase-contrast microscopy. Intensity of plasma membrane blebbing was found to correlate some changes in blood coagulation and reactive response of an organism.

Литература

1. *Егорова А.Б.* Повреждение цитоскелета и клеточных мембран при апоптозе / А.Б. Егорова, Ю. А. Успенская // Успехи современной биологии. — 2001. — Т. 121. — № 5. — С. 502-510.
2. *Манских В.Н.* Морфологические методы верификации и количественной оценки апоптоза / В.Н. Манских // Бюллетень сибирской медицины. — 2004. — №1. — С. 63.
3. *Суслина З.А. и др.* Артериальная гипертония и инсульт: связь и перспективы профилактики / З.А. Суслина и др. // Атмосфера. Кардиология. — 2001. — № 1. — С. 1-2.
4. *Хейфиц Л.Б.* Разделение форменных элементов крови человека в градиенте плотности верографин-фиколл / Л.Б. Хейфиц, В.А. Абалкин // Лабораторное дело. — 1973. — №10. — С. 579-581.
5. *Чухловина М.Л.* Иммунологические особенности ишемического инсульта у лиц молодого возраста / М.Л. Чухловина, В.И. Гузева, А.В. Меркулова // Юбилейная X конференция неврологов «Нейроиммунология». — С.-Пб., 2001. — Т. 2. — С. 49.
6. *Шнайдер Н.А.* Церебральные осложнения артериальной гипертонии / Н.А. Шнайдер, С.Ю. Никулина. — Красноярск, 2004. — 355 с.
7. *Carmen M.M.* Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function / Martinez M. Carmen, Tesse Angela, Zobairi Fatina. // J. Heart and Circulatory Physiology. — 2005. — N 1004. — P. 288
8. *Masataka Sata* Vascular Endothelial Cells and Smooth Muscle Cells Differ in Expression of Fas and FasL and in Sensitivity to FasL — Induced Cell Death / Masataka Sata, Toshimitsu Suhara, Kenneth Walsh // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2000. — Vol. 20. — P. 309-316.
9. *Richard A. Preston, Wenche Jy, Joaguin J. Jimenez et al.* Effects of Severe Hypertension on Endothelial and Platelet Microparticles // J. Hypertension. — 2003. — Vol. 41. — P. 211.