

КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ТА ІНТЕНСИВНОСТІ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ ПРИ НЕСПЕЦИФІЧНОМУ ВИРАЗКОВОМУ КОЛІТІ

О.І. Сергієнко

Харківська медична академія післядипломної освіти

Ключові слова: неспецифічний виразковий коліт, еритроцити, перекисне окиснення ліпідів, анемія.

Вільнорадикальне окиснення ліпідів (ВРОЛ) є провідним біохімічним процесом, що визначає функціонально-структурний стан мембран клітин, на рівні яких організм адаптується до патологічного процесу. У літературі приділено увагу впливові продуктів ВРОЛ на проникність клітинних мембран, внаслідок чого порушується іонний обмін між клітиною та міжклітинним простором довкола неї. У молекулярній основі цих порушень — тонкий механізм структурної організації білків та ліпідів клітинних мембран та їхнього цитоскелета. Регуляцію ліпопероксидації здійснює складна система антиоксидантного захисту [2]. Оpubліковано дані, що доводять значення інтенсифікації процесів ВРОЛ у патогенезі неспецифічного виразкового коліту (НВК) [8, 9, 13].

Найважливішими клітинами, від яких залежать реологічні властивості крові, циркуляція в органах та тканинах, є еритроцити. Порушення функціонального стану еритроцитів призводить до тканинної гіпоксії [5]. Вивченню морфологічних та функціональних характеристик еритроцитів у хворих на НВК присвячено поодинокі праці [7, 12]. Між тим дослідження стану еритроцитів при НВК має особливе значення, бо захворювання асоціюється з анемією складного генезу, яка не тільки обтяжує перебіг захворювання, а й супроводжується чинниками, здатними стимулювати окисні процеси. Літературні публікації свідчать про інтенсифікацію ПОЛ при різних типах анемії [5, 6, 10, 11]. Від рівноваги ПОЛ—АОЗ залежить цілісність мембран і резистентність еритроцитів до гемолізу, — одного з патогенетичних механізмів анемії при НВК. Лікування залізодефіцитної анемії передбачає замісну терапію препаратами заліза, яке є одним з головних прооксидантних агентів. Вважають, що оксидативні властивості заліза найбільше реалізуються тоді, коли порушення окисно-антиоксидного гомеостазу вже існують. В експеримен-

тальному дослідженні у щурів з моделлю коліту, створеного за допомогою dextran sulphat sodium, доведено, що введення заліза посилює окисні процеси, в той час як у інтактних тварин таких змін не спостерігалося [6].

Деякі автори зазначають, що результати вивчення окисних процесів, отримані експериментальним шляхом, не можна легко переносити на людей [6]. Тому найдоступнішим є дослідження перебігу окисних процесів у клітинах крові хворих. Взаємовідносини ПОЛ—АОЗ відображають важливі аспекти патогенезу порушень функціонально-морфологічного стану мембран еритроцитів при НВК, що дає підставу для пошуку інформаційних критеріїв оцінки глибини патологічних змін і прогнозування перебігу захворювання саме на клітинно-молекулярному рівні.

Мета дослідження — вивчити морфофункціональний стан та інтенсивність ліпопероксидації мембран еритроцитів при НВК.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Під спостереженням перебувало 46 хворих на НВК. Діагноз верифіковано на підставі клініко-лабораторних та інструментальних методів дослідження. Інтенсивність процесів ліпопероксидації оцінювали за вмістом у еритроцитах продуктів, що активно реагують із тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активних продуктів). Стан системи антиоксидантного захисту оцінювали за активністю ферментів каталази (К), глутатіонпероксидази (ГП), глутатіонредуктази (ГР); активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-ФДГ) — за динамікою рівня НАДФ Н еритроцитів. Для визначення показників ПОЛ та АОЗ застосовували загальноприйняті біохімічні методи [1]. Досліджували морфологію еритроцитів за методом Козинця [3]. За даними гемограми (рівень гемоглобіну, кольоровий показник) анемію визначено у 19 (41,3%) паці-

єнтів. Залежно від наявності анемічного синдрому було складено дві порівнювані за віком та ступенем тяжкості НВК групи хворих: до I групи увійшли 19 осіб без анемії, до II — 19 з анемією. Групу контролю становили 16 здорових осіб. Статистичну обробку результатів дослідження проводили стандартними математичними методами за допомогою програми Microsoft Excel на комп'ютері OEM IBM PC/AT Pentium.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

У всіх обстежених визначено стадію загострення НВК. 94,87% пацієнтів виявляли візуальний домішок крові у калі. Під час аналізу гемограм середній рівень гемоглобіну у хворих із синдромом анемії дорівнював $(99,11 \pm 2,8)$ г/л, кольоровий показник $0,8 \pm 0,01$. У 10 (55,55%) хворих спостерігалася анемія легкого ступеня, у 7 (38,8%) — середнього, у 2 (11,11%) — тяжка (за класифікацією Дворецького, 1994, 2001). У 3 хворих періодично була жовтяниця шкіри, що самостійно зникала; у 2 пацієнтів періоди жовтяниці збігалися з початком прийому сульфасалазину. Дослідження морфологічної картини периферичного мазка крові визначило змішаний характер анемії у 84,2% спостережень.

Мікроцитоз еритроцитів і ознаки гіпохромії встановлено у 89,47% мазків крові, що свідчило про залізодефіцитну анемію у хворих, у 14 (73,6%) пацієнтів цей тип анемії переважав (рис. 1). В 36,84% мазків спостерігалися частини зруйнованих внаслідок гемолізу еритроцитів (рис. 2).

При дослідженні показників ПОЛ у обстежених із стадією загострення НВК спостерігалася вірогідне підвищення вмісту кінцевих продуктів ТБК-активних продуктів в еритроцитах у 1,75 разу. При аналізі показників ГПЛ залежно від наявності синдрому анемії та її ступеня визначено, що у хворих із синдромом анемії спостерігалася виразніше збільшення вмісту продуктів ПОЛ; між ступенем анемії і вмістом ТБК-активних продуктів простежувалася пряма залежність. При легкій та середній формах анемії показники ТБК-активних продуктів перевищували норму в 2,5 разу, а при тяжкій — у 3 рази.

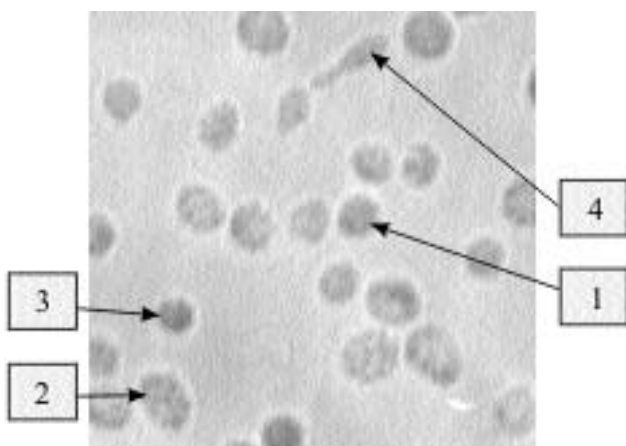


Рис 1. Морфологічна картина крові хворого на НВК: залізодефіцитна анемія. 1 — нормоцит, 2 — овалоцит, 3 — мікроцит, 4 — шизоцит. Зб. 600

Реагування антиоксидантних систем захисту еритроцитів у відповідь на інтенсифікацію продуктів ПОЛ залежало від наявності у хворих на НВК анемічного синдрому, що має важливе патогенетичне і прогностичне значення. У 25% обстежених з НВК в стадії загострення з I групи підвищилася активність каталази в еритроцитах. Посилення ПОЛ супроводжувалося у цьому разі активізацією фермента, що можна вважати компенсаторною реакцією. У пацієнтів II групи в жодному зі спостережень показник каталази не перевищував контрольний, за середньостатистичним значенням показник К у хворих II групи був вірогідно нижчий, ніж у I групі. Зменшення активності К має першорядне значення у порушенні ПОЛ—АОЗ, оскільки К є одним із найважливіших ферментів АОЗ, зокрема запобігає накопиченню і подальшому окисненню пероксиду водню.

Під час вивчення антиоксидантної ферментної системи глутатіону виявлено зміни, що характеризуються пригніченням активності глутатіонзалежних ферментів. Активність ГП у 80% хворих із загостренням НВК I групи і у 100% хворих II групи була нижче від контрольного показника. Середньостатистичне значення ГП у здорових в 2,9 разу перевищувало цей показник у хворих. Значні відмінності активності ГП спостерігалися у пацієнтів з НВК і тяжкою анемією. Наслідком такого значного зниження активності ГП є накопичення найтоксичнішого похідного кисню — гідроксильного радикалу.

Визначення активності ГР свідчило, що цей показник у хворих був меншим ніж у здорових в 1,14 разу. Виходячи з функціонального значення ГР регенерувати відновлений глутатіон з його окисненої форми і підтримувати такий рівень у клітинах, ймовірною наслідком недостатньої активності ГР є зниження рівня відновленого глутатіону в клітинах (таблиця). Аналіз цього показника виявив прямий зв'язок між зниженням активності ферменту й ступенем анемії. Особливо низькими були ГП і ГР у хворих з анемією середнього і тяжкого ступеня, що свідчить про поступове виснаження резер-

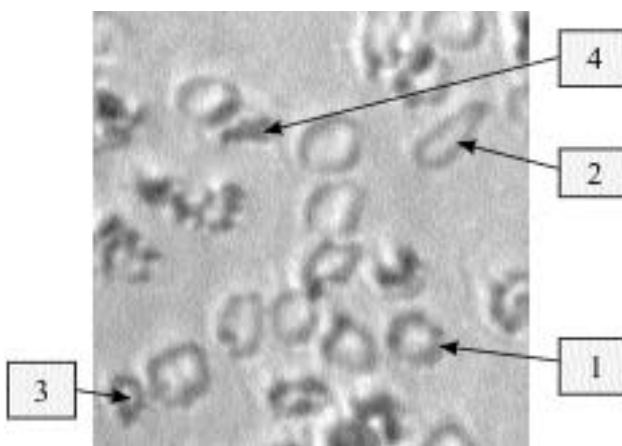


Рис 2. Морфологічна картина крові хворого на НВК: виражена змішана анемія. 1 — нормоцит, 2 — овалоцит, 3 — мікроцит, 4 — шизоцит. Зб. 600

Таблиця. Показники ПОЛ і АОЗ в еритроцитах хворих на НВК в стадії загострення (M±m)

Показник	Контроль (здорові особи; n=16)	Хворі на НВК без синдрому анемії (n=19)	Хворі на НВК з синдромом анемії (n=19)
ТБК-активні продукти ПОЛ, нмоль МДА / мг білка	0,279±0,01	0,477±0,02*	0,501±0,01*
К, мкмоль H ₂ O ₂ / (хв × мг білка)	145,9 ± 17,5	153,89 ± 5,69	132,44±5,19*,**
ГП, нмоль НАДФ Н / (хв × мг білка)	34,04 ± 3,71	17,44 ± 0,99*	13,21±0,71*,**
ГР, нмоль НАДФ Н / (хв × мг білка)	6,94 ± 1,0	6,89±0,49	5,28 ± 0,33*,**
Г-6-ФДГ, нмоль НАДФ Н / (хв × мг білка)	15,86 ± 0,48	13,0 ± 0,37*	11,72±0,29*,**

Примітка. * Розбіжності достовірні при порівнянні з показником контрольної групи; ** з показником I групи (P<0,05).

вних можливостей даного ферментного механізму захисту. Отримані дані збігаються з результатами дослідження антиокиснювальної системи глутатіону у хворих на НВК іншими авторами [8,13]

Показник активності Г-6-ФДГ був менший від контрольного у 1,35 разу. Оскільки Г-6-ФДГ — основний фермент пентозофосфатного шляху, то зменшення його активності призводить до порушення вуглеводного обміну та зниження енергетичного потенціалу клітин. Пентозофосфатний шлях гліколізу є єдиним постачальником активного атому водню, потрібного для відновлення глутатіону: від достатньої кількості НАДФ Н залежить активність глутатіонвідновних ферментів, і зрештою детоксикаційна функція. Не виключено, що брак ферменту частково спадково зумовлений і поглиблюється значною потребою в НАДФ Н в процесі компенсаторних антиокисних реакцій. НАДФ Н як акцептор електронів у пентозофосфатному шляху гліколізу, одночасно відновлюється, перетворюючися на НАДФ H₂, що бере безпосередню участь у відновленні глутатіону, який має важливе значення у збереженні нормальної функції і структури еритроцитів. Відновлений глутатіон запобігає інактивації тіолових ферментів сульфгідрильних груп мембран еритроцитів, здатних до знешкодження пероксиду водню, що накопичується під час метаболізму і, тим самим забезпечує цілісність клітин. У разі дефіциту активності Г-6-ФДГ знижується активність ГП, ГР, які запобігають накопиченню пероксиду водню, спостерігається нестійкість глутатіону до окиснення. Збереження активності ферменту має особливе значення у хворих на НВК: за браку Г-6-ФДГ розвивається підвищена чутливість до сульфасалазину (салофальку), що супроводжується внутрішньоклітинним і внутрішньосудинним гемолізом, який клінічно виявляється гемолітичними кризами і хроніч-

ною гемолітичною анемією [5]. Порушення рівноваги ПОЛ—АОЗ внаслідок збільшення інтенсивності процесів ПОЛ і зменшення активності антиокислювальних ферментів сприяє збільшенню проникності мембран еритроцитів, підвищує загрозу гемолізу. Порушення морфофункціональних властивостей еритроцитів створюють умови для змін реологічних властивостей і плинності крові.

Аналіз результатів дослідження свідчить про прямий зв'язок між порушенням морфофункціонального стану еритроцитів та інтенсивністю ліпопероксидації їхніх мембран. Найвиразніші порушення як морфофункціонального стану еритроцитів, так і інтенсивності процесів ПОЛ визначені у хворих з анемією середнього і тяжкого ступеня. Можна припустити, що пероксиди ліпідів справляють модифікувальний вплив на структурно-функціональний стан еритроцитів при НВК.

Визначення показників ПОЛ—АОЗ у хворих на НВК дає змогу проаналізувати порушення окисно-антиокисного гомеостазу і обґрунтовано призначити антиоксидантну терапію. Завдяки виявленню пацієнтів з низькою активністю Г-6-ФДГ можна встановити групу ризику розвитку гемолітичної анемії. Оскільки за дефіциту активності або браку Г-6-ФДГ спостерігається низька резистентність еритроцитів до окиснення, то зниження цього показника є критерієм для обмеження у призначенні сульфасалазину як засобу базисної терапії.

Загроза посилення оксидативних процесів зужує можливості лікування препаратами заліза хворих на НВК з анемією, тому вивчення стану окисно-антиокисних процесів має практичне значення і потребує урахування при призначенні терапії. Корекція порушень ПОЛ—АОЗ у хворих з синдромом анемії повинна передувати або проводитися поспіль з призначенням залізовмісних препаратів.

ВИСНОВКИ

Характер змін, визначений у системі ВРОЛ—АОЗ еритроцитів вказує на інтенсифікацію процесів ВРОЛ, зниження активності ферментів-антиоксидантного захисту; порушення окиснення глюкози та енергозабезпечення, порушення гомеостазу ПОЛ—АОЗ в еритроцитах. Виявлені зміни обґрунтовують доцільність застосування препаратів, що змінюють систему АОЗ при загостренні НВК, і перспективність дослідження впливу антиоксидантної терапії з метою корекції визначених порушень.

Встановлено, що в 41,3% загострення НВК супроводжується анемією, здебільшого змішаного характеру. Аналіз морфологічних характеристик

еритроцитів визначив характерні зміни їхньої форми і розмірів, що дало змогу встановити тип анемії, який переважає у хворого. Простежено прямий зв'язок між ступенем морфологічних змін, глибиною порушення ПОЛ—АОЗ і ступенем анемії. Виявлення пацієнтів з низькою активністю Г-6-ФДГ визначає групу ризику розвитку гемолітичної анемії; враховуючи окиснювальний вплив сульфасалазину за браку Г-6-ФДГ, дефіцит ферменту слід враховувати при призначенні базисної терапії. У пацієнтів з НВК із залізодефіцитною анемією досліджувати стан окисно-антиоксидантних процесів і коригувати рівновагу ПОЛ—АОЗ потрібно поспіль або перед призначенням пероральних залізовмісних препаратів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма // Метод. рекомендации.— СПб: ИКФ "Фолиант" 2000.— 104 с.
2. Барабой В.А., Сутковой Д.А. Окислительно-антиокислительный гомеостаз в норме и патологии.— К.: Чернобыльинтерформ, 1997.— Ч. 1.— 202 с.
3. Дворецкий Л.И. Гипохромные анемии // Consilium medicum.— 2001.— Т. 3, № 9.— С. 443—450.
4. Козинец Г.И., Макаров В.А. Исследование системы крови в клинической практике.— М.: Триада-Х, 1997.— 480 с.
5. Шифман Ф. Патофизиология крови.— М., СПб, 2000.— 446 с.
6. Aghdassi E., Carrier J., Cullen J. et al. Effect of iron supplementation on oxidante stress and intestinal inflammation in rats with acute colitis // Digestive Diseases and Sciences.— 2001.— Vol. 46, N 5.— P. 1088—1094.
7. Hoime S.A., Duley J.A., Sanderson J. et al. Erythrocyte thiopurine methyl transferase assesment prior to azathioprine use in the ulcerative colitis // Qjm.— 2002.— Vol. 95, N 7.— P. 439—444.

8. Kruidenier L., Verspaget H.W. Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease—Radicals or ridiculous // Alimentary Pharmacology & Therapeutics.— 2002.— Vol. 16.— N 12.— P. 1997—2015.
9. Nieto N, Torres M.I., Fernandez M.I. et al. Experimental ulcer, active colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine // Digestive Diseases and Sciences.— 2000.— Vol. 45, N 9.— P. 1820—1827.
10. Oldenburg B., Koningsberger J.C., van Berge-Henegouwen G.P. et al. Iron and inflammatory bowel disease // Alimentary Pharmacology & Therapeutics.— 2001.— Vol. 15, № 4.— P. 429—438.
11. Reifen R, Matas Z, Zeidel L et al. Iron supplementation may aggravate inflammatory status of colitis in a rat model // Digestive Diseases and Sciences.— 2000.— Vol. 9, N 45.— P. 1820—1827.
12. Van Bodegraven A.A., School M., Baak J.P.A. et al. Hemostatic imbalance in active and quiescent ulcerative colitis // American J. of Gastroenterology.— 2001.— Vol. 96, N 2.— P. 487—493.
13. Yoshikawa T. Oxidative Stress and Digestive Diseases. Karger: Basel—Freiburg—Paris.— 2001.— 182 p.

**КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ И ИНТЕНСИВНОСТИ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ
МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ**

Е.И. Сергиенко

В настоящем исследовании проведена оценка морфофункциональных параметров и показателей перекисного окисления липидов и антиокислительных защитных систем в эритроцитах больных неспецифическим язвенным колитом. Сделан вывод об избыточной липопероксидации и изменении морфологических параметров эритроцитов, которые были наиболее выражены у больных с анемией.

**CLINICAL SIGNIFICANCE OF THE STUDY OF MORPHO-FUNCTIONAL CONDITION AND INTENSITY
OF LIPID PEROXIDATION OF ERYTHROCYTES DURING NONSPECIFIC ULCERATIVE COLITIS**

E.I. Sergienko

In the present study the assessment of morpho-functional parameters, lipid peroxidation and antioxidant protective systems in erythrocytes has been held in patients with nonspecific ulcerative colitis. The conclusion has been made about the excessive lipid peroxidation and changes of erythrocytes morphological parameters which were more pronounced in patients with anemia.