

УДК 616.155.1-055.2:618.2/.4

ИЗМЕНЕНИЕ ОСМОТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ЖЕНЩИН ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ И В РОДАХ

А.В. Крысова¹, А.А. Куншин², В.И. Циркин², С.В. Хлыбова²,
С.Л. Дмитриева², М.Г. Тарлавина³, С.П. Норина³,

1ГОУ ВПО «Вятский государственный гуманитарный университет», г. Киров,

2ГОУ ВПО «Кировская государственная медицинская академия», ³ГЛПУ «Кировская областная клиническая больница»

Циркин Виктор Иванович – e-mail: tsirkin@list.ru

У 104 небеременных женщин, 62 беременных, 10 рожениц и 10 юношей исследовали осмотическую резистентность эритроцитов (ОРЭ) по предложенному авторами методу, основанному на оценке числа негемолизированных эритроцитов, помещенных на 30-, 45-, 60-, 90- и 120 секунд в дистиллированную воду, содержащую 2,5 мМ CaCl₂. Установлено, что ОРЭ, судя по указанным показателям, а также по времени экспозиции, при которой остаются негемолизированными 50% эритроцитов (T₅₀), у небеременных женщин не зависит от фазы менструального цикла (T₅₀=54с) и ниже, чем у юношей (T₅₀=88 с). При беременности ОРЭ возрастает, достигая максимума в III триместре (T₅₀=85), и сохраняется на этом уровне в родах (T₅₀=85). ОРЭ снижено при гестозе (T₅₀=47с) и угрозе прерывания беременности (T₅₀=45с). Все это указывает на возможность использования предложенного метода с целью оценки изменения функционального состояния эритроцитов при беременности и диагностике акушерских осложнений.

Ключевые слова: осмотическая резистентность эритроцитов, менструальный цикл, беременность, угроза преждевременных родов, гестоз.

At 104 nonpregnant and 62 pregnant women, 10 parturients and 10 young men investigated osmotic resistance of erythrocytes (ORE) with the method offered by authors based on an estimation of number undisturbed erythrocytes, placed on 30, 45, 60, 90 and 120 seconds in the distilled water containing 2,5 mm CaCl₂. It is established, that osmotic resistance of erythrocytes, judging by the specified indicators, and also on exposition time at which remain 50% undisturbed erythrocytes (T₅₀), at nonpregnant women does not depend on a phase of menstrual cycle (T₅₀=54c) and more low, than at young men (T₅₀=88). At pregnancy ORE increases, reaching a maximum in III trimester (T₅₀=85), and remains at this level in postpartum (T₅₀=85). ORE is lowered at preeclampsia (T₅₀=47c) and premature labor (T₅₀=45c). It specifies all in possibility of use of the offered method for the purpose of an estimation of change of a functional condition erythrocytes at pregnancy and diagnostics of obstetrical complications.

Key words: osmotic resistance of erythrocytes, menstrual cycle, pregnancy, preeclampsia, premature labor.

Определение осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ) является одним из методов оценки физико-химических свойств эритроцитов [1]. Этот метод используется для изучения патогенеза ряда заболеваний и их диагностики. Показано, что ОРЭ снижается при гемолитической анемии, сердечной недостаточности и возрастает при талассемии, механической желтухе, атеросклерозе [1]. Имеются единичные сведения, указывающие на то, что в I и II триместрах неосложненной беременности ОРЭ возрастает [2, 3], а при осложнении беременности гестозом ОРЭ снижается в 2 раза [2]. Все это указывает на изменение свойств эритроци-

тов при соматической патологии и акушерских осложнениях и необходимость наблюдения за их восстановлением при лечении. Однако трудоемкость определения ОРЭ ограничивает использование этого метода в научных исследованиях в клинической практике. Нами предложен новый метод для оценки состояния ОРЭ [4] (Приоритетная справка № 2009145267/17 (064541) от 7.12.2009 г.). Мы полагаем, что в связи с открытием нового класса белков – аквапоринов, при участии которых осуществляется трансмембранный перенос воды [5, 6], к предложенному нами методу исследования будет проявлен определенный интерес.

В данной работе была поставлена **цель** – апробировать предложенную нами методику оценки ОРЭ и оценить ОРЭ у женщин в зависимости от этапа репродуктивного процесса и наличия акушерских осложнений (гестоз и угроза преждевременных родов).

Материалы и методы

Была исследована ОРЭ у 104 небеременных женщин в возрасте от 18 до 26 лет. Из них 49 находились в фолликулярной фазе цикла (1–14-й дни цикла), а 55 – в лютеиновой фазе (15–28-й дни). Антепонирующий цикл (21–24 дня) имели 9% исследованных, нормопонирующий (25–29 дней) – 58%, а постпонирующий (30–35 дней) – 34%. Кроме того, исследована ОРЭ 33 беременных женщин, у которых кровь брали в I, II или в III триместрах неосложненной беременности (соответственно на 4–11-й, 14–20-й и 27–38-й неделях; в каждом триместре исследовано по 11 женщин). У 10 женщин оценивали ОРЭ во время I периода неосложненных срочных (38–41 нед.) родов. У пациентов отделения патологии беременных анализировали ОРЭ при наличии таких акушерских осложнений, как гестоз легкой степени (17 женщин на 28–40-й неделях беременности) или угроза преждевременных родов (УПР, 12 женщин на 20–36-й неделях беременности). Для сравнительного анализа были исследована ОРЭ у 10 молодых мужчин в возрасте от 18 до 29 лет.

Забор 0,02 мл капиллярной крови проводили микропипеткой гемометра Сали. Этот объем крови добавляли в пробирку, содержащую 0,2 мл 0,9% раствора NaCl, гепарин (1 МЕ /мл) и CaCl₂ (2,5 мМ), и тем самым кровь разводили в 10 раз. Затем 0,02 мл этого разведения помещали в пробирку, содержащую 0,4 мл 3% раствора NaCl (в этом случае конечное разведение крови достигало 200 раз, что позволяло определить исходное содержание эритроцитов в расчете на 1 л крови (абсолютный контроль, принимаемый за 100%). Кроме того, в 5 пробирок, содержащих по 0,2 мл

дистиллированной воды (ДВ) с CaCl₂ (2,5 мМ) вносили по 0,02 мл 10-кратно разведенной крови, т. е. эритроциты подвергали осмотическому гемолизу. Строго через 30, 45, 60, 90 и 120 с соответственно в 1-, 2-, 3-, 4- и 5-ю пробирку добавляли по 0,2 мл 6% раствора NaCl. Тем самым мы останавливали осмотический гемолиз и получали конечное разведение крови, равное 1:200. Во всех случаях подсчет числа эритроцитов проводили визуально с использованием микроскопа типа «Биолам ЛОМО» (Р-11) и «Микромед» (Р-1) в счетной камере Алфёрова-Бюркера с сеткой Горяева в 80 малых квадратах. Число негемолизированных эритроцитов в каждой из 5 пробирок выражали в процентах к абсолютному контролю. На основании этих значений строили кривую, отражающую скорость гемолиза. По ней определяли длительность времени экспозиции в воде, при которой число эритроцитов уменьшалось на 50% от исходного уровня, т. е. показатель T₅₀.

Результаты исследования подвергнуты статистической обработке (M±m); различия оценивали по критерию Стьюдента, считая их достоверными при p<0,05, а при множественных сравнениях использовали критерий Тьюки [7].

Результаты и их обсуждение

Установлено (таблица), что исходно число эритроцитов в 1 л крови у небеременных девушек не зависит от фазы цикла и в среднем составляет 4,13×10¹²/л. Экспозиция эритроцитов небеременных женщин в дистиллированной воде сопровождалась гемолизом, интенсивность которого возрастала по мере увеличения времени экспозиции (рис. 1, панели А и Б; таблица). Так, число эритроцитов, не подвергшихся гемолизу при 30-, 45-, 60-, 90- и 120-секундной экспозиции, у девушек в фолликулярной фазе цикла составило, соответственно, 74,9%, 60,5%, 44,6%, 22,4% и 11,6%, а длительность экспозиции, при которой остается лишь 50% негемолизированных эритроцитов, т. е. T₅₀, составила 55 с. Подобные

ТАБЛИЦА.

Число негемолизированных в дистиллированной воде эритроцитов (в % к контролю) и значение T₅₀ (M±m)

Группа исследуемых	n	Исходное число эритроцитов в 1 л (x10 ¹²)	Время экспозиции в дистиллированной воде, с					T ₅₀ , с
			30	45	60	90	120	
1. Женщины, фолликулярная фаза	49	4,23±0,59	74,9±15,2	60,5±14,8	44,6±13,3	22,4±14,6	11,6±11,2	55±14,7
2. Женщины, лютеиновая фаза	55	4,03±0,62	78,2±15,8	60,9±15,7	47,7±15,8	24,4±15,4	12,5±13,5	57±18,5
3. Все женщины	104	4,13±0,61	76,6±15,6	61,0±15,2	46,2±14,7	23,4±14,9	12,0±12,4	56±16,9
3.1. 1-я выборка	10	4,15±0,63	77,5±10,5	65,0±13,6	43,0±10,7	22,9±11,7	7,6±5,1	59±14,2
3.2. 2-я выборка	10	4,15±0,89	77,8±16,6	63,6±14,4	43,4±16	21,0±11,9	7,7±7,1	54±11,4
3.3. 3-я выборка	10	4,32±0,63	80,7±11,7	64,3±14,1	49,4±12,2	25,7±15,5	15,7±12,2	56±12,6
4. Беременные, I триместр, 4–11 нед.	11	3,52±0,60	75,9±12,7	68,4±11,6	53,2±9,5	42,5±11,6	30,0±13,9	69±22,6
5. Беременные, II триместр 14–20 нед.	11	2,86±0,64(3)	87,7±9,9	75,3±12,8	62,4±13,9	49,0±20,9	36,6±19,9	77±29(3)
6. Беременные, III триместр 27–38 нед.	11	3,35±0,65	83,4±15,6	74,2±15,3	63,5±14,9	47,2±12	34,7±13,9	85±26,9 (3)
7. Роженицы, I период родов 38–41 нед.	10	3,02±0,53(3)	89,6±6,3	79,9±9,5	62,0±10,6	48,0±8,5	37,9±14,2	85±19,4(3)
8. Беременные, гестоз легк.ст. 28–40 нед.	17	3,03±0,63(3)	71,3±12,7	51,6±10,9	39,8±12	25,2±10	11,7±8,6	47±10(6)
9. УПР, 20–36 нед.	12	3,39±0,64	70,9±18,7	51,9±14,4	36,9±11,1	21,7±10,9	9,7±7,1	45±12,1(5,6)
10. Мужчины	10	3,9±0,67	82,6±11,5	74,3±13,2	61,4±11,5	50,3±11,4	33,1±13,9	88±26 (3)

Примечание: цифры в верхнем регистре указывают на то, что различия с соответствующей группой достоверно (p<0,05) по критерию Стьюдента.

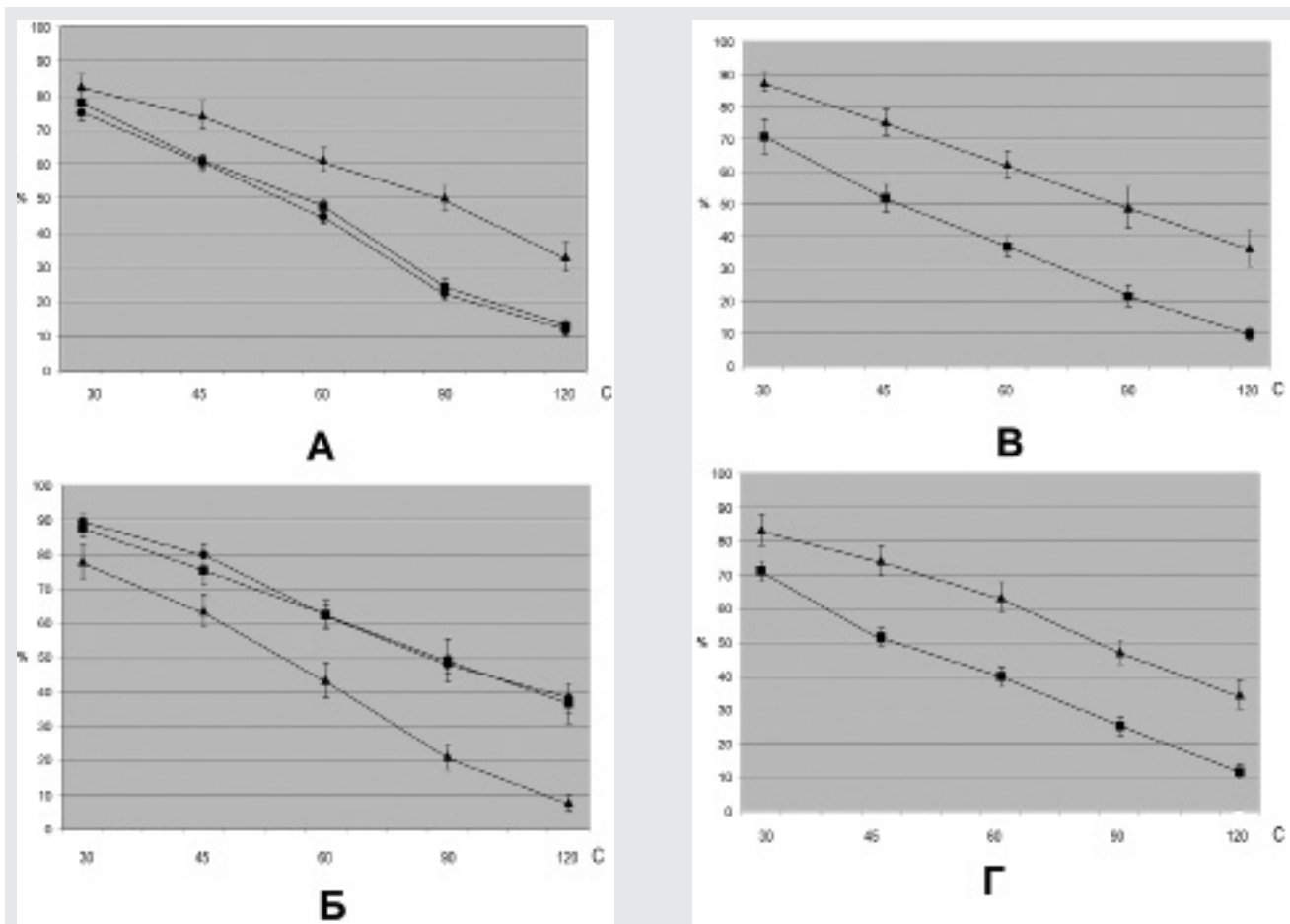


РИС. 1.
Процент негемолизированных эритроцитов при различной длительности их экспозиции в дистиллированной воде. По оси абсцисс – время, с. По оси ординат – проценты.

ПАНЕЛЬ А: – эритроциты мужчин, – эритроциты небеременных женщин, находящихся в фолликулярной фазе цикла, – эритроциты небеременных женщин, находящихся в лютеиновой фазе цикла.

ПАНЕЛЬ Б: – эритроциты небеременных женщин, – эритроциты женщин в родах, – эритроциты беременных женщин во II триместре.

ПАНЕЛЬ В: – эритроциты беременных женщин во II триместре, – эритроциты беременных женщин с УПР.

ПАНЕЛЬ Г: – эритроциты беременных женщин во III триместре, – эритроциты беременных женщин с гестозом.

данные получены при исследовании крови женщин, находящихся в лютеиновой фазе цикла. Все различия между этими группами женщин носили недостоверный характер (таблица). Это позволяет оценивать ОРЭ у молодых женщин независимо от фазы цикла. Поэтому показатели, характеризующие ОРЭ всех 104 небеременных женщин, т. е. женщин группы 3 (таблица), мы предлагаем использовать в качестве нормативных.

Так как группы беременных женщин и рожениц были немногочисленны (в пределах 10–11 исследуемых), для сравнения с этими группами методом случайной выборки из всех 104 небеременных женщин были сформированы три выборки или подгруппы (3.1; 3.2 и 3.3). Показатели, характеризующие ОРЭ эритроцитов в этих подгруппах, представлены в таблице.

У беременных женщин число эритроцитов в 1 л крови было ниже, чем у небеременных, что достоверно выявлено во II триместре ($2,85 \times 10^{12}/л$ против $4,13 \times 10^{12}/л$). Это согласуется с данными литературы о снижении (примерно на 10–12% от уровня, характерного для небеременных) при

беременности числа эритроцитов, которое объясняется гемодилюцией [8, 9]. Наши исследования показали, что при беременности ОРЭ постепенно возрастает, достигая максимума в III триместре, и сохраняется на этом уровне в родах. Об этом свидетельствует характер зависимости числа негемолизированных эритроцитов от длительности экспозиции в ДВ и величина показателя T_{50} . Так, у женщин в III триместре беременности при 30-, 45-, 60-, 90- и 120-секундной экспозиции число эритроцитов составило, соответственно, 83,4%, 74,2%, 63,5%, 47,2% и 34,7% от контроля, а показатель T_{50} составил 85 с. Результаты наших исследований согласуются с данными литературы о повышении ОРЭ при беременности [2, 3].

При исследовании ОРЭ женщин, беременность которых была осложнена легким гестозом, показано существенно снижение ОРЭ (таблица), о чем также свидетельствует и уменьшение значений показателя T_{50} до 47 с. Наши данные подтверждают [2] наблюдение о снижении ОРЭ при гестозе. Нами впервые показано, что у женщин при наличии УПР, как и у женщин с гестозом, ОРЭ существенно ниже, чем у женщин

с неосложненным течением беременности (показатель T_{50} составил 45 с).

У юношей содержание эритроцитов в 1 л достигало $3,90 \times 10^{12}/л$. Это не превышало значений, характерных для небеременных женщин. Однако ОРЭ у них была выше, чем у небеременных женщин (показатель T_{50} составил 88 с), т. е. был таким же, как у беременных в III триместре и у рожениц. Наши данные свидетельствуют о более высоком значении ОРЭ у мужчин по сравнению с женщинами.

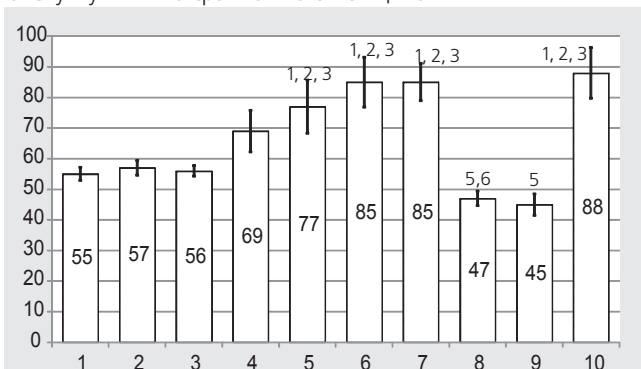


РИС. 2.
Время экспозиции эритроцитов в дистиллированной воде, при которой остаются негемолизированными 50% эритроцитов (T_{50} , с) у небеременных женщин, беременных, рожениц и мужчин.
1 – женщины, фолликулярная фаза; 2 – женщины, лютеиновая фаза; 3 – все небеременные женщины; 4 – женщины I триместр беременности; 5 – женщины II триместр беременности; 6 – женщины III триместр беременности; 7 – роженицы; 8 – беременные женщины с гестозом; 9 – женщины с угрозой преждевременных родов; 10 – мужчины.

Вопрос о природе повышения ОРЭ при беременности, о снижении ОРЭ при наличии акушерских осложнений, а также о более высокой ОРЭ у мужчин по сравнению с небеременными женщинами требует дальнейших исследований. Исходя из малочисленных данных литературы, мы можем предположить, что рост ОРЭ при беременности обусловлен влиянием прогестерона, хорионического гонадотропина и других гормонов плаценты на структуру мембраны и число аквапоринов в эритроцитах. Наиболее вероятно, что эти гормоны снижают синтез аквапоринов в клетках организма, в том числе и в предшественниках эритроцитов и тем самым уменьшают проницаемость мембран для воды. Действительно, в литературе известно, что прогестерон повышает осмотическую устойчивость клеток [10]. Очевидно, что это обстоятельство, с одной стороны, способствует повышению объема плазмы при беременности (вода не идет в эритроциты, в связи с чем снижается гематокрит), а с другой стороны, препятствует выходу воды в ткани. Полагаем, что низкая ОРЭ при гестозе и УПР связана с недостаточностью гормонов (прогестерона) [3],

регулирующих синтез аквапоринов и приводит к отеку тканей, изменению гематокрита при гестозе. Высокая ОРЭ у юношей, скорее всего, является результатом воздействия андрогенов, снижающих синтез аквапоринов.

В целом, предлагаемая нами методика, по-видимому, расширяет перспективы изучения важнейших процессов, связанных с переходом воды из внеклеточного пространства во внутриклеточные, а также для диагностики соматической патологии и ряда акушерских осложнений. В этом нам видится прикладной аспект результатов наших исследований.

Выводы

1. ОРЭ у молодых женщин не зависит от фазы менструального цикла, но она ниже, чем у юношей.
2. ОРЭ при беременности возрастает, достигая максимальных значений в родах.
3. При гестозе и УПР ОРЭ снижена.
4. Метод оценки осмотической резистентности эритроцитов, основанный на определении скорости гемолиза эритроцитов при их экспозиции в дистиллированной воде, может использоваться в клинической практике для диагностики акушерских осложнений и, вероятно, для диагностики соматической патологии. В этом отношении особенно информативным является показатель T_{50} , характеризующий длительность экспозиции эритроцитов в ДВ, при которой еще 50% из них остаются негемолизированными.



ЛИТЕРАТУРА

1. Вебер В.Р., Швецова Т.П. Лабораторные методы исследования. Диагностическое значение: учебное пособие. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. С. 496.
2. Михаленко Е.Т., Василенко Л.В., Зимина И.Л., Воропотвелян П.Н. Лечение доклинических форм поздних токсикозов беременных. Вопросы охраны материнства и детства. 1991. № 12. С. 32–35.
3. Bordin L., Quartesan S., Zen F., Vianello F., Clari G. Band 3 tyr-phosphorylation in human erythrocytes from non-pregnant and pregnant women. Biochim Biophys Acta. 2006. № 5. P. 611–619.
4. Крысова А.В. и соавт. Изменение осмотической резистентности эритроцитов под влиянием адреналина в зависимости от фазы менструального цикла. Тринадцатая Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей «Человек и его здоровье». Санкт-Петербург. 2010. С. 254.
5. Agre P. Nobel Lecture. Aquaporin water channels. J. Biosci Rep. 2004. V. 24. № 3. P. 127–163.
6. Титовец Э.П. Аквапорины человека и животных: фундаментальные и клинические аспекты. Минск: Белорус. наука, 2007. С. 239.
7. Гланс С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. С. 459.
8. Сидорова И.С. Гестоз. М.: Медицина, 2003. С. 415.
9. Шехтман М.М. Руководство по экстрагенитальной патологии у беременных. М.: Триада-Х, 2004. С. 815.
10. DeVenuto F., Wilson S.M. Distribution of progesterone and its effect on human blood during storage. Transfusion. 1976. Mar-Apr. № 16 (2). P. 107–112.