

Влияние криоглобулинов на электрофоретическую подвижность эритроцитов при различных заболеваниях

Н.А.Константинова, И.Ю.Куликова, Е.Н.Карандашов

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, кафедра экспериментальной и теоретической физики медико-биологического факультета, Москва (зав. кафедрой — проф. Н.А.Константинова)

Исследовали температурную зависимость электрофоретической подвижности эритроцитов, нагруженных криоглобулинами, выделенными из сыворотки крови больных с различными заболеваниями и с различными формами одного заболевания (системная красная волчанка, хронический гломерулонефрит, атеротромботический и кардиоэмболический варианты инсульта). Эритроциты получали из крови здоровых доноров. Установлено, что криоглобулины существенно изменяют электрофоретическую подвижность эритроцитов. Это изменение может быть разнонаправленным: как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения, — в зависимости от природы заболевания и формы его проявления. Показано, что комплексы криоглобулинов распадаются при повышении температуры. Сделан вывод, что электрофоретический метод оценки криокомплексов является достаточно информативным, в частности, позволяет оценить степень их гетерогенности.

Ключевые слова: криоглобулины, криокомплексы, криопреципитат, электрофоретическая подвижность эритроцитов, системная красная волчанка, хронический гломерулонефрит, атеротромботический инсульт, кардиоэмболический инсульт

Effect of cryoglobulins on electrophoretic mobility of erythrocytes in various diseases

N.A.Konstantinova, I.Yu.Kulikova, E.N.Karandashov

The Russian National Research Medical University named after N.I.Pirogov, Department of Experimental and Theoretical Physics of Medical-Biological Faculty, Moscow (Head of the Department — Prof. N.A.Konstantinova)

The temperature dependence of the electrophoretic mobility of erythrocytes loaded with cryoglobulins, isolated from serum of patients with various diseases and different forms of a disease (systemic lupus erythematosus, chronic glomerulonephritis, atherothrombotic and cardioembolic ischemic stroke options) was investigated. Erythrocytes were obtained from healthy donors' blood. It was established that cryoglobulins significantly changed electrophoretic mobility of erythrocytes. This change may be in different directions: both upward and downward, depending on the nature of the disease and forms of its manifestation. It was shown that cryoglobulins complexes decompose at elevated temperatures. It was concluded that the electrophoretic method for estimating cryocomplexes is quite informative, in particular, to assess the extent of their heterogeneity.

Key words: cryoglobulins, cryocomplexes, cryoprecipitate, electrophoretic mobility of red blood cells, systemic lupus erythematosus, chronic glomerulonephritis, atherothrombotic stroke, cardioembolic stroke

Криоглобулины (КГ) — это иммуноглобулины с аномальной температурной растворимостью, преципитирующие и образующие криокомплексы (КК) при снижении температуры. Криоглобулины обнаруживают в крови при заболеваниях самой различной этиологии: аутоиммунной, лимфопролиферативной, инфекционной и др. [1]. В последние годы показано, что криоглобулины принимают активное участие в процессах сердечно-сосудистых повреждений при инфаркте и инсульте [2, 3].

Для корреспонденции:

Константинова Нелля Александровна, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой экспериментальной и теоретической физики медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (499) 246-8771

Статья поступила 17.04.2012 г., принята к печати 05.06.2012 г.

Существующие в настоящее время экспериментальные данные о физико-химических и биологических свойствах криоглобулинов не имеют однозначной трактовки и не укладываются в существующие концепции.

Вместе с тем установлено, что высокий уровень криоглобулинов в крови даже при нечетко выраженной патологии — это признак скрытых аутоиммунных процессов, протекающих в организме, которые могут при определенных условиях привести к развитию заболевания с тяжелейшими клиническими проявлениями [2, 3]. Именно поэтому дальнейшее изучение структурных и физико-химических свойств криобелков и их комплексов представляется чрезвычайно важным и актуальным.

Цель исследования — изучить влияние криоглобулинов, полученных из сыворотки крови больных с различной патологией, на электрофоретическую подвижность эритроцитов при изменении температуры.

Материалы и методы

В исследование были включены больные системной красной волчанкой (СКВ — 12 человек), хроническим гломерулонефритом (ХГН — 16 человек), а также больные с атеротромботическим инсультом (АТИ — 18 человек) и кардиоэмболическим инсультом (КЭИ — 14 человек). Клиническое обследование больных СКВ и ХГН проводили на базе отделения нефрологии Клиники нефрологии, внутренних и профессиональных заболеваний им. Е.М.Тареева Первого МГМУ им. И.М.Сеченова. Обследование больных с инсультами и забор биологических образцов выполняли на кафедре фундаментальной и клинической неврологии и нейрохирургии РНИМУ им. Н.И.Пирогова.

Криоглобулины выделяли из сыворотки крови больных по стандартной методике [4]. Эритроциты получали из крови здоровых доноров также по стандартной методике.

Для количественной оценки образующегося при различных температурах криопреципитата использовали спектрофотометрический метод А.Е.Каловидорюс в модификации Н.А.Константиновой [5]. Измерения проводили на спектрофотометре «Cary-50» (США) при длине волны 280 нм, в расчетах использовали коэффициент экстинкции 1,4.

Зарядовые характеристики криокомплексов оценивали по изменению электрофоретической подвижности (ЭФП) эритроцитов человека, нагруженных КГ, относительно ЭФП ненагруженных эритроцитов. ЭФП измеряли с помощью цитоферометра «Opton» (Германия) при токе электрофореза 8 мА и температурах 4 и 37 °С [6]. Эритроциты, нагруженные КГ, хранили не более 1 нед после взятия крови в растворе Олсвера с добавлением азида натрия в конечной концентрации 0,1%. Нагрузку эритроцитов КГ проводили путем их инкубации при 4 °С в течение 4 ч при конечной концентрации криобелков в растворе не менее 30 мкг/мл. В каждой пробе регистрировали 50 клеток и определяли среднее значение ЭФП.

Для статистической обработки данных использовали программу «Statsoft Statistica 6.0». Для сравнения полученных значений ЭФП и определения статистически достоверных различий между ними использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Выбор данного критерия был обусловлен невозможностью проверки нормальности распределения вследствие малого объема выборки.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследования ЭФП нагруженных криобелками эритроцитов, проведенные при 4 °С, показали, что характер изменений этого показателя относительно ЭФП ненагруженных эритроцитов зависит от заболевания. Как видно на рис. 1, КГ, выделенные при ХГН в большей степени изменяют ЭФП эритроцитов, чем КГ, выделенные из сыворотки крови больных СКВ. Однако в обоих случаях нагружение эритроцитов КГ

уменьшало их суммарный поверхностный заряд. При нагружении эритроцитов КГ, выделенными из сыворотки крови больных с изучаемыми вариантами ишемического инсульта (АТИ и КЭИ), наблюдался противоположный эффект: ЭФП нагруженных эритроцитов увеличивалась по сравнению с контролем. Это говорит о том, что общий электростатический заряд нагруженных эритроцитов увеличивался.

При увеличении температуры до 37 °С наблюдалось повышение ЭФП эритроцитов, нагруженных КГ, относительно аналогичного показателя, полученного при 4 °С. Это повышение было характерно для всех групп больных, однако его степень была различной. Так, в случае СКВ ЭФП эритроцитов увеличилась в 1,24 раза, в случае ХГН — в 2,28 раза, при АТИ выявлено увеличение в 1,19 раза, при КЭИ — в 1,28 раза.

Полученные результаты свидетельствуют в первую очередь о том, что КГ при исследуемых нами патологиях по своей природе различны. Специфический характер наблюдаемых изменений ЭФП эритроцитов, нагруженных криобелками, определяется главным образом составом, надмолекулярной структурой сформированных при понижении температуры КК, конформационными перестройками, протекающими в КК на поверхности эритроцита. Наблюдаемый рост значений ЭФП нагруженных криобелками эритроцитов при увеличении температуры может быть обусловлен тем, что в процессе распада КК при нагревании отрицательно заряженные компоненты КК остаются на мембране эритроцита, увеличивая его

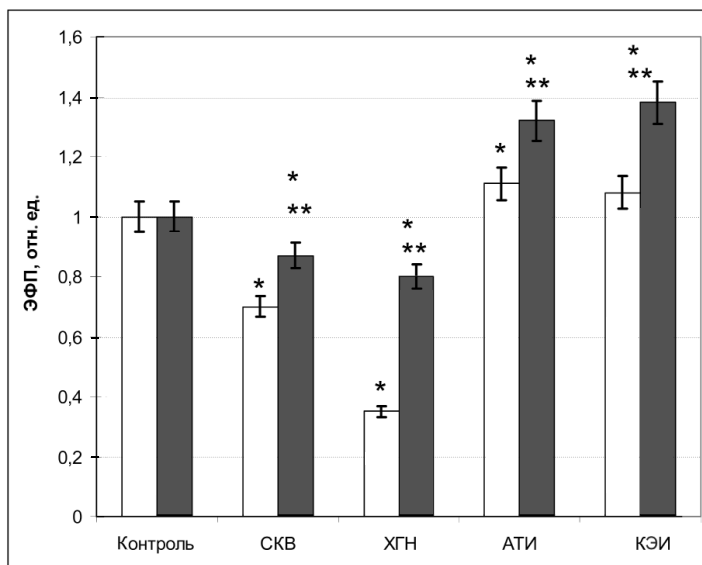


Рис. 1. Зависимость от температуры ЭФП эритроцитов, нагруженных КГ, выделенными из сыворотки крови больных с различными заболеваниями

Светлые столбики — 4 °С, темные — 37 °С. Контроль — ненагруженные эритроциты; СКВ — эритроциты, нагруженные КГ больных системной красной волчанкой, ХГН — хроническим гломерулонефритом, АТИ — атеротромботическим инсультом, КЭИ — кардиоэмболическим инсультом. * — $p < 0,05$ при сравнении с контролем, ** — $p < 0,05$ при сравнении с показателем при 4 °С

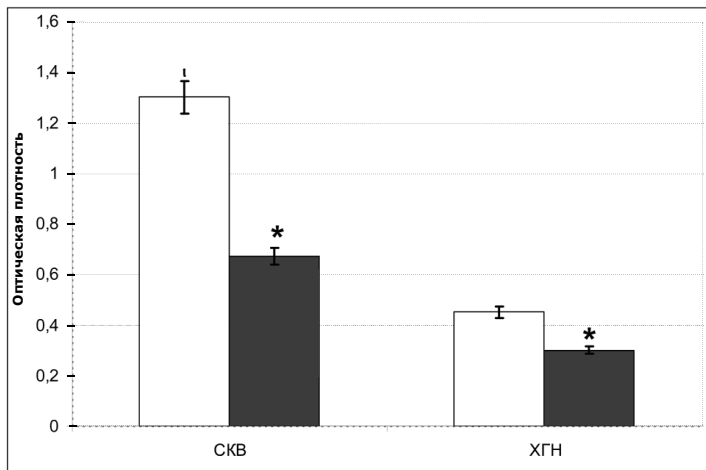


Рис. 2. Зависимость от температуры оптической плотности раствора КГ, выделенных из сыворотки крови больных системной красной волчанкой и хроническим гломерулонефритом
Светлые столбики — 4 °С, темные — 37 °С.

* — $p < 0,05$ при сравнении с показателем при 4 °С

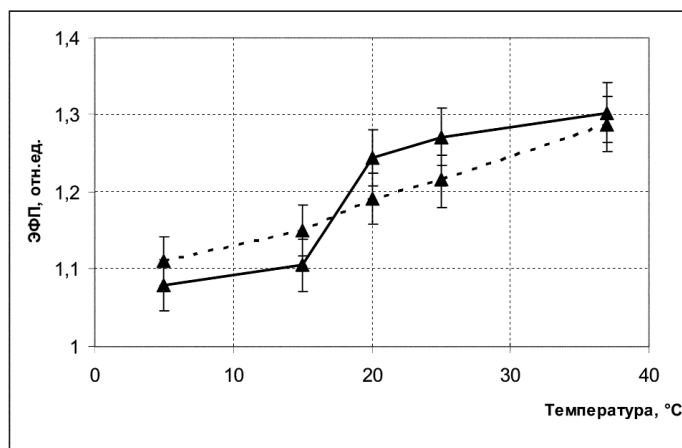


Рис. 3. Зависимость ЭФП эритроцитов, нагруженных КГ, выделенными из сыворотки крови больных с ишемическим инсультом
Сплошная линия — АТИ, прерывистая — КЭИ

отрицательный заряд, а также тем, что суммарный поверхностный заряд КК может перераспределяться за счет конформационных изменений.

Влияние температуры на структуру КК оценивали по изменению оптической плотности раствора КГ, выделенных из крови больных СКВ и ХГН (рис. 2). Увеличение температуры от 4 до 37 °С приводило к двукратному уменьшению оптической плотности раствора КК, которая характеризует размер иммунных комплексов. Таким образом, при повышении температуры КК распадаются. Однако часть компонентов КК может оставаться на мембране эритроцитов, что проявляется изменением их ЭФП.

Результаты исследования температурной зависимости ЭФП эритроцитов, нагруженных КК при 4 °С, выделенными из крови больных АТИ и КЭИ в острой

стадии заболевания, представлены на рис. 3. Видно, что полученные зависимости различаются по своему характеру. Если для АТИ кривая имеет S-образный характер с областью резкого изменения ЭФП в диапазоне температур от 15 до 20 °С, то аналогичная зависимость для КЭИ имеет линейный характер. Следовательно, КК при АТИ и КЭИ имеют различную природу. Кроме того, линейная зависимость от температуры ЭФП эритроцитов, нагруженных КК из крови больных с АТИ, свидетельствует о большей гетерогенности последних по сравнению с КК из крови больных с КЭИ. Таким образом, КК различаются не только в зависимости от патологии, но и в рамках одной патологии при разных формах ее проявления.

Выводы

1. Криоглобулины и их комплексы существенно изменяют ЭФП эритроцитов. Это изменение может быть разнонаправленным: как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения, — в зависимости от природы заболевания и формы его проявления.

2. При повышении температуры криокомплексы, связанные с поверхностью эритроцита, распадаются, но некоторые их компоненты остаются связанными с мембраной эритроцита.

3. Электрофоретический метод оценки криокомплексов является достаточно информативным, позволяет оценить степень их гетерогенности.

Литература

- Chan A.O., Lau J.S., Chan C.H., Shek C.C. Cryoglobulinemia: clinical and perspectives // Hong Kong Med. J. 2008 Feb. V.14 (1). P.55–59.
- Скворцова В.И., Константинова Н.А., Комаров А.Н. и др. Криоглобулинемия в патогенезе острого ишемического инсульта // Инсульт. Приложение к журналу «Неврология и психиатрия им. Н.И.Корсакова». 2004. №3. С.136–139.
- Vital A., Favereaux A., Martin-Dupont P. et al. Anti-myelin-associated glycoprotein antibodies and endoneurial cryoglobulin deposits responsible for a severe neuropathy // Acta Neuropathol (Berl). 2001. V.102. P.409–412.
- Чернохвостова Е.В., Баталова Г.Б. Выявление криоглобулинемии и определение ее типа // Тер. архив. 1977. №8. С.69–76.
- Константинова Н.А. Оценка криоглобулинов в сыворотке крови с учетом циркулирующих иммунных комплексов // Лаб. дело. 1988. №11. С.62–65.
- Константинова Н.А., Куликова И.Ю. Применение цитоферометра для определения зарядовых характеристик криопреципитатов // Мед. физ. 1995. №2. С.96–98.

Информация об авторах:

Куликова Ирина Юрьевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры экспериментальной и теоретической физики медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (499) 246-8771

Карандашов Евгений Николаевич, заведующий лабораторией кафедры экспериментальной и теоретической физики медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (499) 246-8771