

<https://doi.org/10.38181/2223-2427-2022-4-42-47>

УДК: 616.613-003.7:616-089.168.1-06:616-092.18

© Бережной А.Г., Дунаевская С.С., 2022

## БЛЕББИНГ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ЛИМФОЦИТОВ В ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ УРОЛИТИАЗА

БЕРЕЖНОЙ А.Г.<sup>1,2</sup>, ДУНАЕВСКАЯ С.С.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, Партизана Железняка ул., д. 1, 660022, Красноярск, Российская Федерация

<sup>2</sup> Клиническая больница «РЖД-Медицина» города Красноярск, ул. Ломоносова, д. 47, 660058, Красноярск, Российская Федерация

### Реферат:

Мочекаменная болезнь является актуальной проблемой хирургической урологии, ежегодно на территории Российской Федерации производится порядка 200 тысяч операций. Осложненное течение послеоперационного периода сопровождается изменениями гомеостаза, связанными с активацией иммунитета и дисрегуляцией эндотелиальной системы. В исследовании проведена оценка показателей блеббинга плазматической мембраны лимфоцитов у пациентов с осложненным и неосложненным течением послеоперационного периода уролитиаза. Приняло участие 240 пациентов, которым были проведены эндоскопические и малоинвазивные вмешательства по поводу мочекаменной болезни. Для сравнения и статистической обработки данных были выделены две клинические группы пациентов: I группа (n=130), в этой группе осложнений не было, II группа (n=110) – пациенты с осложненным течением послеоперационного периода. Контрольную группу составили – 25 практически здоровых лиц. Состояние мембраны лимфоцитов оценивали методом фазово-контрастной микроскопии. Максимальная частота изменений плазматической мембраны регистрировалась у пациентов с развившемся в послеоперационном периоде осложнениями и составила 15,92 [13,20; 17,01] при оценке начального блеббинга и 21,93 [17,67; 30,45] для терминального блеббинга. При благоприятном течении послеоперационного периода у пациентов с уролитиазом не происходило статистически значимых изменений в показателях блеббинга плазматической мембраны лимфоцитов.

**Ключевые слова:** уролитиаз; операция; послеоперационный период; лимфоцит; блеббинг.

## BLEBBING OF THE PLASMA MEMBRANE OF LYMPHOCYTES IN THE POSTOPERATIVE PERIOD OF UROLITHIASIS

BEREZHNOY A.G.<sup>1,2</sup>, DUNAEVSKAYA S.S.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University. Partizan Zheleznyak Str., 1, Krasnoyarsk, Russian Federation 660022

<sup>2</sup> Road hospital at the station Krasnoyarsk Russian Railways, Lomonosova Str., 47, Krasnoyarsk, Russian Federation 660058

### Abstract:

Urolithiasis is an urgent problem of surgical urology, about 200 thousand operations are performed annually in the Russian Federation. The complicated course of the postoperative period is accompanied by changes in homeostasis associated with immune activation and dysregulation of the endothelial system. The study evaluated the parameters of lymphocyte plasma membrane blebbing in patients with complicated and uncomplicated postoperative urolithiasis. 240 patients suffering from urolithiasis took part, who underwent surgical treatment. Patients were divided into two clinical groups: I clinical group (n = 130) – patients with a favorable course of the postoperative period of urolithiasis, II clinical group (n = 110) – patients with a complicated course of the postoperative period of urolithiasis. The control group was – 25 practically healthy persons. Lymphocyte membrane status was assessed by phase contrast microscopy. The maximum frequency of plasma membrane changes was recorded in patients with postoperative complications and amounted to 15.92 [13.20; 17.01] when evaluating initial blebbing and 21.93 [17.67; 30.45] for terminal blebbing. With a favorable course of postoperative period, patients with urolithiasis did not have statistically significant changes in the parameters of blebbing of the plasma membrane of lymphocytes.

**Keywords:** urolithiasis; surgery; postoperative period; lymphocyte; blebbing.

### Введение

Мочекаменная болезнь является актуальной проблемой хирургической урологии, ежегодно на территории Российской Федерации производится порядка 200 тысяч операций. Оптимизация существующих методов оперативных вмешательств, внедрение лапароскопических и

лазерных технологий приводит к усовершенствованию методик лечения уролитиаза. Однако, послеоперационные осложнения сохраняются на прежнем уровне и достигают 15% [1-4].

Осложненное течение послеоперационного периода сопровождается изменениями гомеостаза, связанными с

активацией иммунитета и дисрегуляцией эндотелиальной системы. В оценке выраженности иммунной и эндотелиальной дисфункции очень важно учитывать состояние лимфоцитов, и в частности феномен блеббинга плазматической мембраны и наличие мембран высвобожденных микрочастиц в крови, как следствие терминального блеббинга, а также активацию рецепторов клетками, входящими в состав крови и эндотелиоцитами [5,6].

Зачастую блеббинг оценивается как повреждение плазматической мембраны, приводящей к гибели клетки во время процессов некроптоза и апоптоза и является результатом сигналов, происходящих внутриклеточно. Однако, операционный стресс и осложненное течение послеоперационного периода, за счет бактериальных токсинов и биологически активных веществ могут оказывать внешнее повреждение плазматической мембраны. Для предотвращения гибели плазматическая мембрана обладает внутренней способностью к восстановлению, за счет активации кальцием липидной скремблазы. Этот процесс сопровождается увеличением пор мембраны, образованием внеклеточных блебб, с сохранением целостности мембраны и повышением жизнеспособности клеток [7-9].

Адаптивный иммунитет реализуется способностью лимфоцита к перемещению внутри лимфоидных органов и из них, который зависит от функции регуляторных белков цитоскелета. Так белки семейства ERM образуют регулируемую связь между плазматической мембраной и актиновой корой, однако активные производные ERM приводят к нарушению цитоскелетных реакций и дисрегуляции транспорта лимфоцита. Известно, что при отсутствии белков семейства ERM происходит поляризация лимфоцитов, миграция и хемотаксис, таким образом остается спорным вопрос о физиологической роли белков ERM на лимфоцит. В экспериментальных работах на лабораторных мышах было выявлено, что белки ERM оказывают значимое влияние на Т-клетки при выходе из лимфоидных органов; данный процесс управляется сигнальным липидом сфингозин-1-фосфатом. Сфингозин-1-фосфат приводит к другому режиму миграции, отличающемуся от индуцированного белковыми хемокинами. В ходе миграции, индуцированной хемокинами, клетки используют выступы, содержащие актин, сфингозин-1-фосфат, что оказывает влияние на внутриклеточное давление с образованием блебб на мембране, создавая подвижность. Белки ERM играют важную роль в миграции на основе блеббинга плазматической мембраны в ответ на сфингозин-1-фосфат [10].

Таким образом, блеббинг плазматической мембраны лимфоцита – это процесс жизнедеятельности клетки, приводящий к взаимодействию самой мембраны с белками цитоскелета. Дисбаланс взаимодействий между цитоскелетом и окислительными, биохимическими реакциями в мембранах клеток при снижении активности многих ферментов, в том числе протеаз, которые приводят к изменению электролитного баланса плазматической мембраны клетки, приводит к ее пузырению и последующему терминальному блеббину, что является необратимым процессом, высвобождается большое количество биологически активных веществ (микровезикул), имеющих антигенную активность, что приводит к повреждению сосудистой стенки и запуску развития эндотелиальной дисфункции [8, 11].

#### **Цель**

Оценить, в какой фазе блеббинга (начального или терминального) находится плазматическая мембрана лимфоцитов у пациентов с осложненным послеоперационным периодом.

#### **Материалы и методы**

В исследование вошли 240 пациентов, которые проходили лечение в урологическом отделении Клинической больницы ЧУЗ «РЖД-Медицина» г. Красноярск в период с 2017 по 2019 гг. которым были проведены эндоскопические и малоинвазивные вмешательства по поводу мочекаменной болезни. Для сравнения и статистической обработки данных были выделены две клинические группы пациентов: I группа (n=130), в этой группе осложнений не было, II группа (n=110) – пациенты с осложненным течением послеоперационного периода.

В исследовании принимало участие 98 (40,8%) женщин и 142 (59,2%) мужчин. Средний возраст пациентов составил 71 (69; 72) год, для женщин 73 (70; 76) года, для мужчин 67 (65; 70) лет.

Для исследования была создана контрольная группа из 25 человек, по возрасту и полу сопоставимая с исследуемой группой.

В НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России проводилось исследование феномена блеббинга плазматической мембраны лимфоцита по стандартному методу: проводилось центрифугирование крови обследуемого пациента в градиенте плотности с Lympholyte H CL5010 «Cedarlane Laboratories Limited», выделялись лимфоциты, оценивалось состояние мембраны клетки методом фазово-контрастной

микроскопии (микроскоп Olympus BX-41). На рисунке 1 представлен лимфоцит в состоянии терминального блеббинга.

Полученные в ходе статистического анализа данные представлены в виде медианы, 25; 75 перцентилей Me [Q1; Q3], а характер распределения полученных величин оценивался согласно теста Шапиро-Уилка. Многие величины не соответствовали нормальному распределению, для попарного сравнения в группе приходилось применять непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Критическим уровнем, статистической значимости при проверке нулевой гипотезы, считали коэффициент равным 0,05.

### Результаты и обсуждение

В ходе исследования были выявлены лимфоциты с разной степенью выраженности изменений в плазматической мембране, от начального и до терминального блеббинга. Максимальное количество изменений в плазматической мембране лимфоцитов встречалось у пациентов с развившемся в послеоперационном периоде осложнениями и составила 15,92 [13,20; 17,01] при оценке начального блеббинга и 21,93 [17,67; 30,45] для терминального блеббинга. При благоприятном течении послеоперационного периода у пациентов с уролитиазом не происходило статистически значимых изменений в показателях блеббинга плазматической мембраны лимфоцитов (рис. 2).

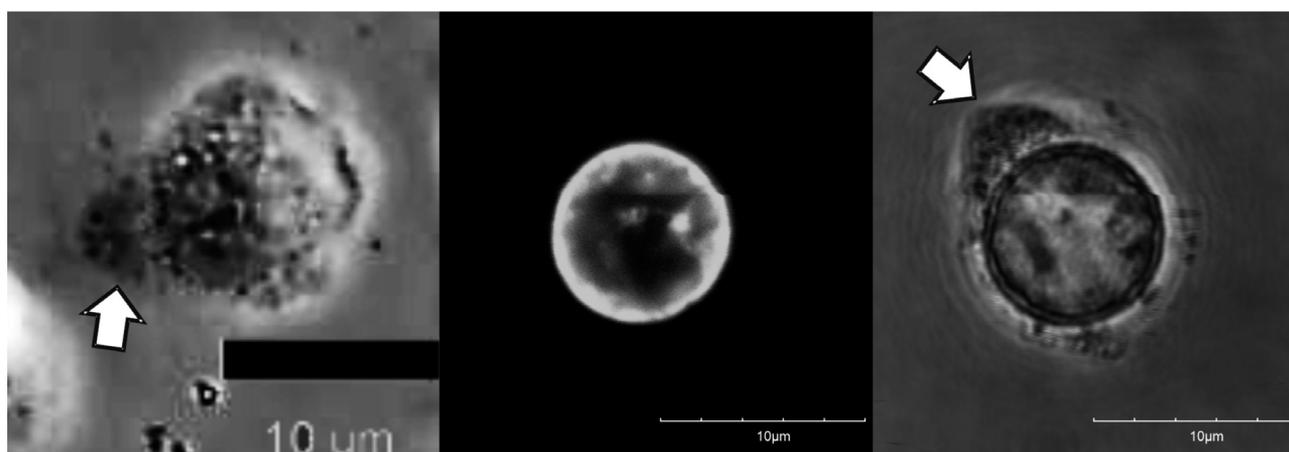


Рис. 1. Лимфоцит крови в состоянии терминального блеббинга (слева – фазово-контрастная микроскопия на флуоресцентном микроскопе, в центре и справа – конфокальная микроскопия)

Fig. 1. The mechanism of formation of spastic pelvic floor paresis in patients with AP. The figure shows: 1-neck of the bladder, stretched by hypertroA blood lymphocyte in a state of terminal blebbing (on the left - phase contrast microscopy on a fluorescent microscope, in the center and on the right - confocal microscopy)

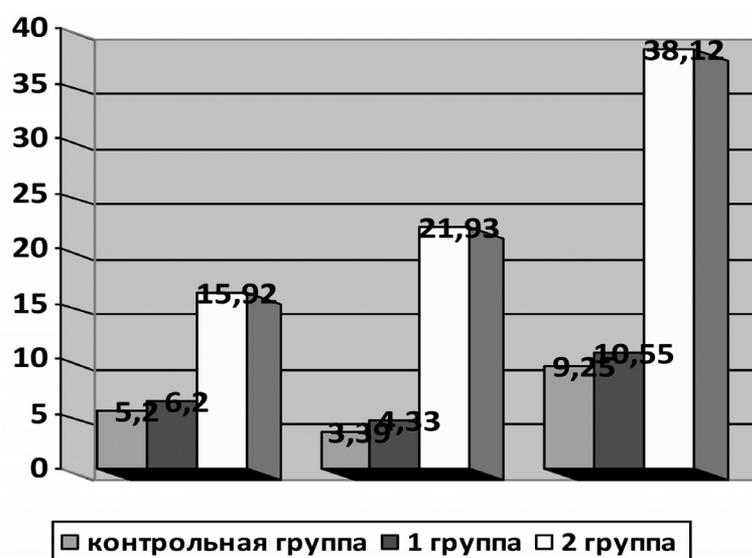


Рис. 2. Показатели состояния плазматической мембраны лимфоцитов у пациентов МКБ  
Fig. 2. Indicators of the state of the plasma membrane of lymphocytes in patients with KSD

Одной из функциональных способностей лимфоцита является миграция. Т-клетки непрерывно циркулируют между кровотоком, органами и тканями организма, данный механизм обеспечивается скелетом актомиозина. Вторым, менее активным механизмом миграции является блеббинг, в основном генерируемый на переднем плане. Таким образом, состояние начального блеббинга является важным механизмом функциональной активности и цитотоксичности лимфоцитов.

Патогенетическое значение феномена блеббинга плазматической мембраны заключается не только в разрушении клетки, но и выходом свободных микрочастиц, по сути, обрывками клеточной мембраны, в межклеточное пространство, которые затем участвуют, в межклеточном взаимодействии инициируя воспалительную реакцию. При обработке полученных данных, было выявлено, что в I клинической группе наличие свободных микрочастиц не отличалось от показателей обследованных пациентов в контрольной группе, а у пациентов II клинической группы составило 1318 [982; 2007] циркулирующих микрочастиц, что значительно превышало аналогичные показатели, чем в контрольной группы (таб. 1).

Развитие стресса сопровождается разрушением плазматической мембраны клетки, также этот процесс вызывают патогены, секретирующие токсины и фосфолипазы и получая доступ к клеткам-хозяевам. В то время иммунная система направлена на уничтожение как патогена, так и патоген-инвазированных клеток. В ходе данного процесса происходит приток внеклеточного Ca<sup>2+</sup>, вызывая повреждение фосфолипидного бислоя и цитоскелета. В дальнейшем запускается процесс блеббинга плазматической мембраны, как раннего маркера гибели клетки. Блеббинг образуется вследствие всплеска цитоплазмы, повышения гидростатического давления и затем формирования грыж плазматической мембраны. Активация

миозина, перестройка цитоскелетных структур, вызванная Ca<sup>2+</sup> – зависимыми или Ca<sup>2+</sup> – независимыми механизмами приводит к блеббингу цитоплазматической мембраны. Несмотря на то, что блеббинг чаще связан с процессами повреждения клеток и апоптозом, он также проявляется в цитокинезе и локомоции клеток. Также известна роль блеббинга в механизме устойчивости к плазмалеммальному повреждению, в качестве так называемой ловушки для поврежденного сегмента мембраны и прилегающего к нему цитозоля. При повреждении плазмалеммы потеря внутриклеточных компонентов будет ограничена зоной блеббинга, запечатанные блебы служат поглотителями потенциально повреждающего Ca<sup>2+</sup> и предотвращают протеолиз и липолиз внутри клетки [6, 8].

Блеббинг плазматической мембраны лимфоцитов, формирование микрочастиц различного клеточного происхождения представляется перспективным направлением для исследования патогенеза развития и прогрессирования воспалительной реакции. Полученные в проведенном исследовании данные согласуются с результатами, опубликованными в научных изданиях. В ходе воспалительной реакции происходит возрастание преапоптотических процессов в лимфоцитах, что может объясняться участием лимфоцитов в реализации механизмов воспаления и иммунного ответа. Под итожив результаты обследования мы наблюдаем тот факт, что для развития процесса обратного блеббинга большое влияние оказывают ранее запущенные механизмы, которые активируют лимфоциты и приводят к местной примембраной электролитной диссинергии протеолитических ферментов клетки. Интенсивность реакции блеббинга плазматической мембраны лимфоцитов можно рассматривать как интегральный показатель активации иммунокомпетентных клеток при развитии воспалительного процесса [9, 11].

Таблица 1.

**Показатели состояния плазматической мембраны лимфоцитов у пациентов с уролитиазом**

Table 1.

**Indicators of the state of the plasma membrane of lymphocytes in patients with urolithiasis**

Показатель	Контрольная группа	I группа (n=130)	II группа (n=110)
Циркулирующие микрочастицы лимфоцитарного происхождения в пересчете на 100 лимфоцитов	386 [200; 453]	412 [350; 588] p = 0,479	1318 [982; 2007] p < 0,001 p' < 0,001

p – различие с группой контроля.

p1 – достоверность различия с показателями группы пациентов с бактериурией, при неинфицированных конкрементах

**Заключение**

Из выше изложенного следует, что в результате физиологических процессов в лимфоците, активируется процесс повышающий давление внутри клетки, что порой приводит к необратимому процессу, с нарушением цитоскелета лимфоцита и «пузырением» мембраны, у пациентов с уролителиазом в послеоперационном периоде.

Установлена зависимость между фазой активности терминального блеббинга плазматической мембраны лимфоцитов и возможными проявлениями осложнений в послеоперационном периоде у пациентов с мочекаменной болезнью. Регистрация интенсивности блеббинга и мембран высвобожденных микрочастиц с индентификацией их субпопуляции является важным критерием в прогнозе развития осложнений послеоперационного периода.

Список литературы/References

1. Акилов Ф.А., Мухтаров Ш.Т., Гиясов Ш.И., Мирхамидов Д.Х., Насиров Ф.Р., Муратова Н.Б. Послеоперационные инфекционно-воспалительные осложнения эндоскопических операций по поводу уролителиаза. *Урология*. 2013;1:89–91. [Akilov F.A., Mukhtarov Sh. T., Giyasov Sh. I., Mirkhamidov D.H., Nasirov F. R., Muratova N. B. Post-operative infectious and inflammatory complications of endoscopic operations for an urolithiaz. *Urologiya =Urology*. 2013;1:89-91 (In Russ.)]
2. Marschang S., Bernardo G. Prevention and control of healthcare associated infection in Europe: a review of patients' perspectives and existing differences. *J Hosp Infect*. 2015;89(4):357–62. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.01.017>
3. Nicolle L.E. Urinary tract in geriatric and institutionalized patients. *Current Opinion in Urology*. 2002;12 (1):51–5. <https://doi.org/10.1097/00042307-200201000-00010>
4. Бережной А.Г., Винник Ю.С., Дунаевская С.С., Антюфриева Д.А. Возможности прогнозирования развития воспалительных осложнений послеоперационного периода у больных с мочекаменной болезнью. *Вестник новых медицинских технологий*. 2019;2:109–113. [Berezhenoy A.G., Vinnik Yu.S., Dunaevskaya S.S., Antyufrieva D.A. Possibilities to predict the development of inflammatory complications of the postoperative period in patients with urolithiasis. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy=Bulletin of new medical technologies*. 2019;2:109–113 (In Russ.)]
5. Каприн А.Д., Дольнов А.А. Особенности иммунитета при мочекаменной болезни. *Вопросы урологии и андрологии*. 2013; 1(2);46-49. [Kaprin A.D., Dolnov A.A. Features of immunity at an urolithic disease. *Voprosy urologii i andrologii = Questions of urology and andrology*. 2013; 1(2);46-49 (In Russ.)]
6. Tixeira R., Phan T.K., Caruso S., Shi B., Atkin-Smith G.K., Nedeva C., Chow J.D.Y., Puthalakath H., Hulett M.D., Herold M.J., Poon I.K.H. ROCK1 but not LIMK1 or PAK2 is a key regulator of apoptotic membrane blebbing and cell disassembly. *Cell Death Differ*. 2020;27(1):102-116. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0342-5>
7. Ермишина В.И., Казеко Н.И., Осколков С.А. Показатели иммунитета при осложненном хроническом пиелонефрите. *Тюменский медицинский журнал*. 2015;3(17):62-65. [Ermishina V.I., Kazeko N.I., Oskolkov S.A. Immunity indicators at the complicated chronic pyelonephritis. *Tyumenskiy meditsinskiy zhurnal =Tyumen medical magazine*. 2015;3(17):62-65 (In Russ.)]
8. Mobarrez F., Fuzzi E., Gunnarsson I., Larsson A., Eketjäll S., Pisetsky D.S., Svenungsson E. Microparticles in the blood of patients with SLE: Size, content of mitochondria and role in circulating immune complexes. *J Autoimmun*. 2019;102:142-149. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.05.003>
9. Obeidy P., Ju L.A., Oehlers S.H., Zulkhernain N.S., Lee Q., Galeano Niño J.L., Kwan R.Y., Tikoo S., Cavanagh L.L., Mrass P., Cook A.J., Jackson S.P., Biro M., Roediger B., Sixt M., Weninger W. Partial loss of actin nucleator actin-related protein 2/3 activity triggers blebbing in primary T lymphocytes. *Immunol Cell Biol*. 2020;98(2):93-113. <https://doi.org/10.1111/imcb.12304>
10. Robertson T.F., Chengappa P., Gomez Atria D., Wu C.F., Avery L., Roy N.H., Maillard I., Petrie R.J., Burkhardt J.K. Lymphocyte egress signal sphingosine-1-phosphate promotes ERM-guided, bleb-based migration. *J Cell Biol*. 2021;220(6):e202007182. <https://doi.org/10.1083/jcb.202007182>
11. Tomiyoshi G., Horita Y., Nishita M., Ohashi K., Mizuno K. Caspase-mediated cleavage and activation of LIM-kinase 1 and its role in apoptotic membrane blebbing. *Genes Cells*. 2004;9(6):591-600. <https://doi.org/10.1111/j.1356-9597.2004.00745.x>

Информация об авторах

**Бережной Александр Григорьевич** – к.м.н., начальник хирургического отделения филиала «Больница № 1» Федеральное Казенное учреждение Медико-санитарная часть №42 Федеральной службы исполнения наказаний России, г. Кемерово, Россия; malashenko\_aa@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0001-5330-070X>

**Дунаевская Светлана Сергеевна** – д.м.н., профессор кафедры общей хирургии им проф. М.И. Гульмана ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, руководитель кабинета координации научно-исследовательской деятельности Клиническая больница «РЖД-Медицина» города Красноярск. Красноярск, Россия; vikto-potapenk@yandex.ru; <http://orcid.org/0000-0003-2820-4737>

Для корреспонденции

**Дунаевская Светлана Сергеевна** – д.м.н., профессор кафедры общей хирургии им проф. М.И. Гульмана ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, руководитель кабинета координации научно-исследовательской деятельности Клиническая больница «РЖД-Медицина» города Красноярск. 660022, г Красноярск, Партизана Железняка, д. 1., Россия. Тел.: 89050873585; vikto-potapenk@yandex.ru; <http://orcid.org/0000-0003-2820-4737>

Information about authors

**Alexandr G. Bereznoy** – Dr. Sci., Professor Department of Urology, Andrology and Sexology, V. F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Head of the Department of Urology Road hospital at the station Krasnoyarsk Russian Railways. Krasnoyarsk, Russia; malashenko\_aa@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0001-5330-070X>

**Дунаевская Светлана Сергеевна** – Dr. Sci., Professor Department of General Surgery, prof. M.I. Gulman V. F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Head of the Research Coordination Office Road hospital at the station Krasnoyarsk Russian Railways; Krasnoyarsk, Russia; vikto-potapenk@yandex.ru; <http://orcid.org/0000-0003-2820-4737>

For correspondence

**Дунаевская Светлана Сергеевна** – Dr. Sci., Professor Department of General Surgery, prof. M.I. Gulman V. F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, 660022, Krasnoyarsk, Partizan Zheleznyak, 1., Russian Federation. Tel.: 89050873585; vikto-potapenk@yandex.ru; <http://orcid.org/0000-0003-2820-4737>

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.