

© В.А.Жмуров, А.Б.Фролова, Д.Е.Ковальчук, С.А.Швайбович, 2008
УДК 616.61-008.64-036.11+616.155.194]:616.155.1-08:612.111.3

В.А. Жмуров, А.Б. Фролова, Д.Е. Ковальчук, С.А. Швайбович

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С ТЕРМИНАЛЬНОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ И АНЕМИЕЙ: ВЛИЯНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЭРИТРОПОЭТИНА

V.A. Zhmurov, A.B. Frolova, D.E. Kovalchuk, S.A. Shvajbovich

STRUCTURAL-FUNCTIONAL ALTERATIONS OF ERYTHROCYTE MEMBRANES IN PATIENTS WITH THE END-STAGE RENAL FAILURE AND ANEMIA: IMPACT OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN

Кафедра пропедевтики внутренних болезней с курсом лучевой диагностики и лучевой терапии Тюменской государственной медицинской академии, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Анализ влияния препаратов эритропоэтина на состояния липидной фазы мембран эритроцитов у больных с терминальной почечной недостаточностью (ТПН), получающих программный гемодиализ. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** Обследован 31 человек в возрасте 35–40 лет, находящийся на лечении программным бикарбонатным гемодиализом по 12–15 часов в неделю. Все больные страдали анемией тяжелой степени: уровень гемоглобина не превышал 70 г/л. Всем больным определяли липидный профиль мембран эритроцитов: уровень фосфолипидов, холестерина, а также первичных и промежуточных продуктов липопероксидации и альфа-токоферола. В течение года все пациенты получали препарат рчЭПО (Эпокрин) в дозе 2000МЕ подкожно 3 раза в неделю, в сочетании с пероральными препаратами железа, фолиевой кислотой. Контрольные заборы анализов крови проводились в динамике через 1,3,6 и 12 месяцев. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Выявлено, что у всех больных с ТПН и анемией в эритроцитах усилены процессы перекисидации липидов и снижены механизмы антиоксидантной защиты. Через 1 год лечения препаратами рчЭПО, наряду с уменьшением выраженности анемии, в мембранах эритроцитов снижается уровень продуктов липопероксидации, а также отмечается стабилизация липидной фазы мембран эритроцитов и повышение уровня альфа-токоферола. **Заключение.** Применение рчЭПО у диализных больных уменьшает проявление анемии не только за счет влияния на механизмы кроветворения, но также за счет стабилизации липидной фазы мембран эритроцитов.

Ключевые слова: Эритропоэтин, терминальная почечная недостаточность, анемия, липиды мембран.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was an analysis of the influence of erythropoietin preparations on the state of state of the lipid phase of erythrocyte membranes in patients with the terminal chronic renal failure (tCRF) on hemodialysis. **PATIENTS AND METHODS.** Under examination there were 31 subjects aged 35–40 years treated by program bicarbonate hemodialysis, 12–15 hours a week. All the patients had anemia of heavy degree: the hemoglobin level was not higher than 70 g/l. In all the patients the lipid profile of erythrocyte membranes was determined: the level of phospholipids, cholesterol as well as primary and intermediate products of lipid peroxidation and alpha-tocopherol. During a year all patients were given Epocrin in dose 2000 IU subcutaneously three times a week in combination with peroral preparations of iron, folic acid. Control analyses of blood were made in dynamics within 1,3,6 and 12 months. **RESULTS.** It was found that in all patients with tCRF and anemia processes of lipid peroxidation in erythrocytes were intensified and the antioxidant defense mechanisms were weakened. After a year of treatment with rhEPO Epocrin the level of lipid peroxidation products became lower in the erythrocyte membranes along with a decreased degree of anemia. Stabilization of the lipid phase of the erythrocyte membranes was noted and an increased level of alpha-tocopherol. **CONCLUSION.** Administration of Epocrin in dialysis patients was found to reduce manifestations of anemia not only owing to the impact on the mechanisms of hematosis, but also due to stabilization of the lipid phase of the erythrocyte membranes.

Key words: erythropoietin, tCRF, anemia, membrane lipids.

ВВЕДЕНИЕ

Терминальная почечная недостаточность (ТПН) является исходом многих заболеваний почек. Анемия при хронических заболеваниях почек начинает развиваться при уровне клубочковой фильтрации менее 30 мл/мин. При креатинине сыворот-

ки крови от 0,2 до 0,7 ммоль/л анемия встречается у 81% больных с хроническим гломерулонефритом и 93% пациентов с пиелонефритом, а при уровне креатинина более 0,7 ммоль/л она наблюдается у 100% больных [1]. Основными причинами анемии у больных с ТПН являются: острые и хроничес-

кие кровопотери, дефицит железа, интоксикация алюминием, гемолиз эритроцитов, дефицит витаминов группы В и фолиевой кислоты, гипо- и аплазия костного мозга. Роль перечисленных факторов в патогенезе анемии в настоящее время не подвергается сомнениям, но основную причину анемии при почечной недостаточности связывают с относительным дефицитом эндогенного эритропоэтина.

Еще в 1975 г. Y.Yamata и H.Jacob [2] показали, что в эритроцитах больных уремией, несмотря на адекватный гемодиализ, нарушен метаболизм глюкозы, что является одной из причин усиленной продукции СР (свободных радикалов), а М. Тассоне-Gallucci и соавт. выявили в эритроцитах уремиков повышение концентрации малонового диальдегида (МДА) и уменьшение содержания токоферола, являющегося естественным антиоксидантом. Выявленные изменения метаболизма эритроцитов, обусловленные снижением активности пентозофосфатного шунта, сопровождаются накоплением в эритроцитах НАД и снижением НАДФ. Эти отклонения обнаруживаются не только у больных на гемодиализе, но и при сравнительно умеренной азотемии [3].

Одной из важных причин анемии у больных с ТПН, является уменьшение продолжительности жизни эритроцитов под воздействием факторов плазмы, накапливающихся при уремии [4]. Таким веществом является продукт липопероксидации МДА, который рассматривается как возможный уремический токсин [5]. Нарушение механизмов защиты эритроцитов от окислительного повреждения у больных с ТПН способствует повышенному разрушению эритроцитов и может быть одной из причин развития анемии при уремии [6].

Исследование структурно-функционального состояния эритроцитов у больных с ТПН, находящихся на лечении хронического гемодиализом, позволили выявить нарушения структуры мембран эритроцитов [7,8], как следствие – уменьшение стойкости, усиление гемолиза эритроцитов, сокращение срока их жизни.

В то же время патогенез почечной анемии полностью не раскрыт, в частности, нет исследований о влиянии эритропоэтинов на процессы перекисления липидов в мембранах эритроцитов и состояние липидной фазы мембран. Поэтому представляет интерес исследование морфо-функциональных свойств эритроцитов на фоне применения рекомбинантного человеческого эритропоэтина (рчЭПО).

С учетом вышеизложенного, нами были проведены исследования липидной фазы мембран

эритроцитов, а также исследовано влияние рчЭПО на процессы перекисления липидов и липидный профиль мембран у больных с ТПН, находящихся на хроническом гемодиализе.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Под наблюдением находились 31 человек с ТПН и анемией, находящихся на лечении бикарбонатным гемодиализом, аппарат фирмы «Fresenius» 4008S, по 12–15 диализных часов в неделю, диализатор F6, скорость кровотока 250–300 мл/мин. Средняя продолжительность заместительной терапии гемодиализом составила $4,3 \pm 1,3$ года.

Все пациенты страдали хроническим гломерулонефритом и анемией тяжелой степени. Средний возраст пациентов составил $37,53 \pm 2,3$ года. Уровень гемоглобина у всех обследуемых не превышал 70 г/л, количество эритроцитов $2,5 \cdot 10^{12}/л$, гематокрит не выше 23,48%. Все пациенты в течение 1 года получали препарат рчЭПО (Эпокрин – Гос НИИ Особо чистых препаратов, Санкт-Петербург) в дозе 2000 МЕ подкожно 3 раза в неделю в сочетании с пероральными препаратами железа и фолиевой кислотой. Больным были проведены исследования липидного состава мембран эритроцитов:

1. Определение содержания продуктов перекисного окисления липидов в мембранах эритроцитов: первичных – диеновых конъюгатов (ДК) [9], промежуточных – малонового диальдегида (МДА) [10].

2. Исследование уровня основного жирорастворимого антиоксиданта альфа-токоферола в мембранах эритроцитов) [11].

3. Определение содержания основных фракций фосфолипидов (лизофосфатидилхолина-ЛФХ, фосфатидилсерина-ФС, сфингомиелина-СМ, фосфатидилхолина-ФХ, фосфатидилэтаноламина-ФЭ) и холестерина (свободного ХЛ и эфиров ХЛ) в мембранах эритроцитов) [12,13].

Анализ периферической крови проводился на гемоанализаторе Gen S Култер. Определяли уровень эритроцитов, гемоглобина, цветной показатель (ЦП), уровень ретикулоцитов, среднее содержание гемоглобина в эритроцитах (MCH), среднюю концентрацию гемоглобина в эритроцитах (MCHC).

Для определения статистической значимости различных непрерывных величин, в зависимости от параметров распределения, использовался непарный t-критерий Стьюдента или U-критерий Манна-Уитни. Непрерывные переменные представлены в виде $X \pm m$ вне зависимости от использованного критерия. Сравнение показателей до применения эритропоэтинов, через 1, 3, 6 месяцев

Показатели красной крови и липидной фазы мембран эритроцитов у больных с тХПН, получающих гемодиализ и рЧЭПО «Эпокрин» (X+m)

Анализируемый показатель	У здоровых лиц	У больных с тХПН на фоне лечения «Эпокрином»				
		до лечения	через 1 мес.	через 3 мес.	через 6 мес.	через 1 год
Эритроциты, $\cdot 10^{12}/л$	4,85 $\pm$ 0,15	2,59 $\pm$ 0,10	2,93 $\pm$ 0,1*	3,05 $\pm$ 0,07**	3,36 $\pm$ 0,40*	2,96 $\pm$ 0,12*
Гемоглобин г/л	150,0 $\pm$ 5,30	70,48 $\pm$ 2,95	85,09 $\pm$ 2,95*	96 $\pm$ 3,12**	101,43 $\pm$ 19,54*	92,32 $\pm$ 3,97*
ЦП	0,90 $\pm$ 0,10	0,82 $\pm$ 0,01	0,84 $\pm$ 0,01	0,86 $\pm$ 0,01***	0,89 $\pm$ 0,08*	0,86 $\pm$ 0,01*
Ретикулоциты, %	0,7 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,02	0,68 $\pm$ 0,03	0,68 $\pm$ 0,01*	0,70 $\pm$ 0,001***	0,71 $\pm$ 0,001*
Гематокрит %	44,50 $\pm$ 7,1	23,24 $\pm$ 0,77	24,75 $\pm$ 0,77	27,24 $\pm$ 0,63*	29,03 $\pm$ 2,79***	26,54 $\pm$ 1,14*
МСН пг	30,0 $\pm$ 2,5	28,08 $\pm$ 0,46	28,32 $\pm$ 0,46	29,67 $\pm$ 0,69	30,48 $\pm$ 11,48	32,05 $\pm$ 2,06***
МСНС г/л	340,00 $\pm$ 22,30	316,5 $\pm$ 2,88	316,25 $\pm$ 2,88	320,60 $\pm$ 9,83	323,01 $\pm$ 9,83	320,80 $\pm$ 10,32
ДК, мкмоль/л	15,03 $\pm$ 0,08	50,18 $\pm$ 3,80	44,23 $\pm$ 3,66	33,95 $\pm$ 2,83**	28,47 $\pm$ 3,79*	22,89 $\pm$ 3,11
МДА, мкмоль/л	35,96 $\pm$ 0,08	46,50 $\pm$ 4,27	45,81 $\pm$ 3,61	45,15 $\pm$ 1,81	44,23 $\pm$ 1,63	38,66 $\pm$ 1,83***
Альфа-токоферол, мкмоль/л	4,99 $\pm$ 0,45	3,49 $\pm$ 0,64	3,55 $\pm$ 0,01	3,62 $\pm$ 0,02	3,78 $\pm$ 0,02	3,24 $\pm$ 0,05
ЛФХ, ммоль/л	0,45 $\pm$ 0,06	0,56 $\pm$ 0,03	0,51 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,05**	0,45 $\pm$ 0,04	0,45 $\pm$ 0,03
ФС, ммоль/л	0,55 $\pm$ 0,07	0,27 $\pm$ 0,03	0,31 $\pm$ 0,04	0,32 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,02*	0,44 $\pm$ 0,03*
СМ, ммоль/л	0,51 $\pm$ 0,06	0,25 $\pm$ 0,232	0,28 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,03	0,30 $\pm$ 0,03*	0,41 $\pm$ 0,03*
ФХ, ммоль/л	0,53 $\pm$ 0,05	0,29 $\pm$ 0,037	0,36 $\pm$ 0,02**	0,37 $\pm$ 0,03***	0,38 $\pm$ 0,05***	0,42 $\pm$ 0,03*
ФЭА, ммоль/л	0,49 $\pm$ 0,05	0,29 $\pm$ 0,237	0,34 $\pm$ 0,02***	0,37 $\pm$ 0,03***	0,38 $\pm$ 0,04***	0,39 $\pm$ 0,02*
Суммарные фосфолипиды, ммоль/л	2,92 $\pm$ 0,06	2,01 $\pm$ 0,03	2,14 $\pm$ 0,03*	2,23 $\pm$ 0,03*	2,21 $\pm$ 0,03*	2,46 $\pm$ 0,02*
Свободный холестерин, ммоль/л	1,89 $\pm$ 0,08	0,84 $\pm$ 0,13	0,96 $\pm$ 0,06	1,03 $\pm$ 0,03	1,30 $\pm$ 0,08***	1,30 $\pm$ 0,04***
Эфиры холестерина, ммоль/л	1,30 $\pm$ 0,14	0,82 $\pm$ 0,17	0,97 $\pm$ 0,05	1,04 $\pm$ 0,03	1,20 $\pm$ 0,04*	1,19 $\pm$ 0,03***
Общий холестерин, ммоль/л	3,19 $\pm$ 0,11	1,68 $\pm$ 0,15	1,93 $\pm$ 0,05	2,07 $\pm$ 0,03***	2,50 $\pm$ 0,06**	2,49 $\pm$ 0,05*
Коэффициент хл/фл	1,09	0,83	0,90	0,92	1,13	1,01

* $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, и *** $p \leq 0,05$ по сравнению с показателями до лечения.

и 1 год применения эритропоэтинов проводилось с использованием непараметрического критерия Вилкоксона для парных величин.

Различия считались достоверными при двустороннем уровне значимости p менее 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как следует из результатов нашего исследования (таблица), у больных, получающих препарат «Эпокрин», уровни эритроцитов, гемоглобина и гематокрита в периферической крови достоверно повышаются и достигают максимальных значений к 6 месяцам лечения. Относительное содержание ретикулоцитов и среднее содержание гемоглобина в эритроцитах (МСН) также увеличивается, начиная с первого месяца лечения, достигая максимума к концу 1 года терапии. При этом у больных средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах (МСНС) на фоне лечения «Эпокрином» в динамике существенно не изменяется, хотя выявлена тенденция к увеличению указанного показателя к 6-му месяцу лечения.

Таким образом, проведенные исследования показали, что эритропоэтин «Эпокрин» у больных, получающих гемодиализ, оказывает позитивное влияние на основные показатели красной крови. Максимальный гематологический эффект данного препарата отмечается через 6 месяцев лечения.

При исследовании липидной фазы мембран эритроцитов на фоне применения данного препарата обнаружено, что у больных уровень ДК снижается, начиная с первого месяца лечения, и достоверно отличается от показателей до лечения уже через 3 месяца, достигая минимального значения через 1 год. Содержание альфа-токоферола в мембранах эритроцитов характеризуется тенденцией к повышению и достигает максимальных значений через 6 месяцев лечения. Кроме того, у больных в мембранах эритроцитов происходит достоверное снижение уровня ЛФХ. Вследствии увеличения содержания основных классов фосфолипидов у больных, получавших «Эпокрин», существенно увеличивается содержание суммарных фосфолипидов и общего холестерина, начиная с первого месяца лечения с достижением максимума значений к концу года. Указанные изменения приводят к увеличению коэффициента хл/фл, который достигает максимума к 6 месяцам лечения, сохраняясь на высоком уровне и к концу года приближаясь к показателям у здоровых лиц.

Таким образом, применение эритропоэтина «Эпокрин» у гемодиализных больных приводит к нормализации показателей перекисидации липидов, позитивно влияет на уровень антиоксиданта альфа-токоферола, кроме того снижается уровень агрессивных фракций ФЛ-ЛФХ, повышается уровень суммарных ФЛ и общего ХЛ. Указанные положи-

тельные изменения в липидной фазе мембран эритроцитов сохраняются у больных до конца года терапии.

ОБСУЖДЕНИЕ

У больных, получающих лечение гемодиализом, отмечены выраженные признаки оксидативного стресса: контакт крови с искусственной диализной мембраной в ходе процедуры гемодиализа приводит к образованию большого количества активных форм кислорода лейкоцитами. Кроме того, на фоне гемодиализа равновесие между процессами, ведущими к образованию оксидантов и антиоксидантной активностью, смещается в сторону первых [14].

Нами выявлено, что у больных, находящихся на хроническом гемодиализе и страдающих анемией, имеются признаки дестабилизации мембран эритроцитов, угнетения эндогенной системы антиоксидантной защиты – снижение уровня альфа-токоферола, и активации процессов перекисления липидов в виде избыточного накопления продуктов липопероксидации – ДК и МДА.

Выявлено повышение уровня агрессивных фракций фосфолипидов – ЛФХ, снижение уровня фосфолипидов, составляющих внутренний слой мембран – ФС, ФЭА и наружный слой мембран – ФХ, СМ. Отмечено также снижение уровня холестерина, как свободного, так и эфирсвязанного, что в свою очередь может быть объяснено потерей карнитина в диализирующий раствор [15].

Указанные изменения являются неблагоприятными для клеток организма, поскольку первичные продукты липопероксидации являются наиболее токсичными и инициируют каскад окислительных реакций [16]. Встраивание МДА в мембрану эритроцитов изменяет ионную проницаемость мембраны и деформируемость клеток [17].

Следовательно, разрушение фосфолипидного бислоя мембраны и дезинтеграцию энергетического гомеостаза эритроцитов можно считать существенными факторами снижения их жизнеспособности и уменьшения сроков жизни. В результате потери части липидного бислоя и других метаболических нарушений снижается способность эритроцитов противостоять высокому давлению, которому они подвергаются в микроциркуляторном русле, а также ряду других неблагоприятных факторов при ТПН, в частности при процедуре гемодиализа.

Как нами показано, положительный эффект препаратов рчЭПО проявляется не только в уменьшении выраженности анемического синдрома, но и в снижении активности процессов перекисидации

липидов в мембранах эритроцитов, о чем свидетельствует снижение уровня продуктов липопероксидации, повышение уровня альфа-токоферола и фосфолипидов. При этом необходимо отметить, что уменьшение активности процессов перекисидации липидов на фоне применения эритропоэтинов может быть связано с блокированием кальциевых каналов, что приводит к уменьшению концентрации внутриклеточного кальция и, как следствие, снижению активности липопероксидации [18]. Кроме того, уменьшение концентрации внутриклеточного кальция может приводить к снижению активности фосфолипазы А2 [19,20] с последующим уменьшением концентрации лизофосфатидилхолина (ЛФХ), что и показано в наших исследованиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение в составе комплексной терапии у больных с ТПН рчЭПО «Эпокрин» приводит к нормализации показателей красной крови, позитивно влияет на процессы перекисидации липидов и уровень альфа-токоферола, практически восстанавливает липидную структуру мембран эритроцитов. Клинико-гематологический и биохимический эффект данного препарата сохраняется на протяжении 6 месяцев лечения и несколько уменьшается к концу года лечения.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Гуревич КЯ. *Человеческий рекомбинантный эритропоэтин (Эпокрин) в лечении анемии*. Фолиант, Санкт-Петербург, 2001; 15-16
2. Yamata Y, Jacob H. Abnormal red cell metabolism in patients with chronic uremia: nature of defect and its persistence despite adequate hemodialysis. *Blood* 1975; (45): 231-239
3. Taccone-Gallucci M, Giardini O, Neroni C et al. Red blood cell lipid peroxidation in predialysis chronic renal failure. *Clin Nephrol* 1987; (27): 238-241
4. Рябов СИ. Современные подходы к лечению гемодиализом больных с хронической почечной недостаточностью. *Нефрология* 1999; (1): 8-13
5. Гринштейн ЮА, Терещенко ВП, Терещенко ЮА. Нарушение обмена липидов и морфофункциональная нестабильность мембран эритроцитов у больных с терминальной почечной недостаточностью. *Тер арх* 1990; (6): 84-87
6. Eshbach JW. The anemia chronic renal failure: pathophysiology and the effects of recombinant erythropoietin. *Kidney int* 1989; 35(1): 134
7. Румянцев АГ, Морщакова ЕФ, Павлов АД. *Эритропоэтин*. Гэотар-Мед, М., 2002; 6
8. Юданова ЛС, Яковлева ЕВ, Захаров НБ и др. Роль нарушений структурно-функциональных свойств мембран и энергообмена эритроцитов в прогрессировании анемии у больных с терминальной почечной недостаточностью. *Тер арх* 1992; (6): 64
9. Стальная ИД. *Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот. Современные методы в биохимии*. Медицина, М., 1977; 63-64
10. Стальная ИД, Гаришвили ТГ. *Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. Современные методы в биохимии*. Медицина, М., 1977; 67-68

11. Спиричев ВВ, Матунин НИ, *Витамин Е. Экспериментальная витаминология*. Медицина, Л., 1979; 18-57
12. Шталь Э. *Хроматография в тонких слоях*. Пер.с англ. Мир, М., 1965; 508
13. Крылов ВИ, Виноградов АФ, Еремеева СИ. Метод тонкослойной хроматографии липидов мембран эритроцитов. *Лаб Дело* 1975;(4): 205-206
14. Тугушева ФА, Зубина ИМ, Митрофанова ОВ. Оксидативный стресс и хроническая болезнь почек. *Нефрология* 2007; (3): 29-47
15. Шостка ГД, Румянцев АШ, Козлов ВВ и др. Влияние ацетатного и бикарбонатного гемодиализа на метаболизм белков и липидов у больных с хронической почечной недостаточностью. *Тер арх* 1990; (6): 88-92
16. Рудько ИА, Балашова ТС. Перекисное окисление липидов как возможный механизм повреждения эритроцитов у больных с хронической почечной недостаточностью в условиях гемодиализа. *Тер арх* 1992; (6): 66-69
17. Никифорова НВ, Соколовская ИВ, Гончар НА. Оценка процессов липопероксидации у больных с уремией. *Тер арх* 1983;(6):39-41
18. Myssina S, Huber SM, Birca C. Inhibition of Erythrocyte Cation Channels by Erythropoietin. *J Am Nephrol* 2003; (4): 2750
19. Владимиров ЮА Свободнорадикальное окисление липидов и физические свойства липидного слоя биологических мембран. *Биофизика* 1987;(5): 830-844
20. Владимиров ЮА, Арчаков АН. *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах*. Наука, М., 1972; 162-170

Поступила в редакцию 07.11.2007 г.

Принята в печать 19.02.2008 г.