© Коллектив авторов, 1998
УДК 616.61-78:612.111

Е.Д.Суглобова, В.Н.Спиридонов, Ю.А.Борисов, Э.Б.Лебедева, П.В.Гавриленков

БИОФИЗИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ, ПОЛУЧАЮЩИХ ЛЕЧЕНИЕ РЕГУЛЯРНЫМ ГЕМОДИАЛИЗОМ. I. РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ДЕЙСТВИЮ ВНЕШНЕГО КАНАЛОФОРМЕРА

E.D.Suglobova, V.N.Spiridonov, Yu.A.Borisov, E.B.Lebedeva, P.V.Gavrilenkov

BIOPHYSICAL CHARACTERISTICS OF THE ERYTHROCYTE MEMBRANES IN PATIENTS TREATED BY REGULAR HEMODIALYSIS. I. RESISTANCE TO THE EFFECT OF EXTERNAL CHANNEL-FORMER

Научно-исследовательский институт нефрологии, кафедра биохимии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова, Россия

РЕФЕРАТ

С помощью ионометрической методики с использованием калий-селективных электродов мы исследовали резистентность мембран эритроцитов по отношению к действию каналоформера нистатина в следующих группах: 1) 45 пациентов с терминальной ХПН (25 мужчин, 20 женщин, средний возраст 42,4±11,9 года), получающих лечение регулярным гемодиализом; 2) 17 здоровых доноров (7 мужчин, 10 женщин). Для оценки активности K^+-, Na^+-АТФазы мембраны эритроцита в часть проб добавляли уабаин. Изучали резистентность мембран эритроцитов к действию нистатина в условиях ресуспендирования в плазме крови и в многокомпонентном солевом растворе, близком по ионному составу и pH к плазме. Анализ результатов, полученных в ходе экспериментов с эритроцитами здоровых доноров, показал, что у них только в 12% случаев имеет место менее интенсивный выход ионов K+ из эритроцитов в «уабаиновых» пробах (с добавлением нистатина и уабаина) по сравнению с пробами, содержавшими только нистатин , что достоверно отличается от результатов исследования эритроцитов пациентов, получающих лечение регулярным гемодиализом, как до, так и после сеанса гемодиализа (соответственно, 55,6 и 64,4% случаев, $p<0,001$ во всех случаях). В группе пациентов, получающих лечение регулярным гемодиализом, средние значения суммарного выхода калия как до, так и после сеанса гемодиализа в пробах с плазмой были достоверно ниже, чем в пробах с модельным раствором ($p<0,001$). Таким образом, получена существенная разница в состоянии клеточных мембран эритроцитов у пациентов, получающих лечение регулярным гемодиализом, и здоровых доноров.

Ключевые слова: гемодиализ, эритроциты, калий, ионселективные электроды, нистатин.

ABSTRACT

The resistance of erythrocyte membranes to the channel-former nystatin was studied ionometrically using K-selective electrodes in the following groups: (1) 45 patients with terminal chronic renal failure (25 men and 20 women; average age 42.4±11.9 years) under the regular hemodialysis treatment and (2) 17 healthy volunteers (7 men and 10 women).

To evaluate the activity of K^+, Na^+-ATPase of red blood cells, ouabain was introduced into some of the samples. The resistance of erythrocyte membranes to nystatin was studied under conditions of resuspension in plasma and in a multicomponent salt solution having the composition and pH close to those of plasma. It was demonstrated that only in 12% of the cases with erythrocytes of healthy volunteers a less active carrying away of K+ ions from erythrocytes occurs in the experiments with ouabain and nystatin as compared to the experiments with nystatin only. This results differ reliably from those obtained with erythrocytes of the patients under regular hemodialysis treatment both before and after hemodialysis procedure (in 55.6 and 64.4% of the cases, respectively; $p<0.001$ in all cases). In patients under regular hemodialysis the mean values of the total K+ removal both before and after a hemodialysis procedure in the experiments with plasma were statistically lower than in model solutions. Therefore, a significant difference was observed in the status of erythrocyte cell membranes in patients under hemodialysis treatment and that in the control group, and also in the status of erythrocytes in the model solutions and plasma.

Key words: hemodialysis, erytrocytes, potassium, K-selective electrodes, nystatin.

ВВЕДЕНИЕ

Нарастание объема сведений об обменных электролитических процессах и их механизмах привели в середине 80-х годов к резкому увеличению числа исследований, связанных с нарушениями метаболизма электролитов при различной патологии. По данным многочисленных авторов, активность ионотранспортирующих систем в значительной степени меняется у нефрологических больных по сравнению с нормой. Показано, что активность K^+, Cl^--котранспорта возрастает при уремической анемии у больных, получающих лечение перитонеальным диализом [13]. У больных, находящихся на хроническом гемодиализе, наблюдались увеличение входа в клетки и выхода из нее ионов K^+ как в присутствии уабаина, так и без него [10]. Установлены различия в активностях циркуляции Na^+ и K^+ между клетками и внеклеточной средой у пациентов, получающих лечение гемодиализом и перитонеальным диализом [10].

Как правило, в описанных работах в качестве объекта клеточного уровня использовались эритроциты, как наиболее доступный в клинико-лабораторных исследованиях объект для изучения состояния клеточных мембран [5]. Поэтому при изучении электролитного статуса организма человека как в норме, так и при патологии именно мембранные транспортные системы эритроцитов вызывают наибольший интерес исследователей. Уже в 60-х годах описано изменение активности Na^+, K^+-АТФазы эритроцитов и увеличение внутриклеточной активности Na^+ у больных с хронической почечной недостаточностью (ХПН) [23]. Впоследствии был показан дефект Na^+, K^+-насоса при уремии [12, 13, 16]. Зафиксировано также и снижение числа белков-транспортников в эритроцитах больных с уремией, что может являться следствием пониженного синтеза новых насосных единиц на стадии нормоцитов или ускоренного разрушения Na^+, K^+-АТФазы в зрелых эритроцитах. По мнению других исследователей, одной из причин понижения активности ионного транспорта у больных с ХПН может служить присутствие в уремической плазме ингибиторов уабаин-подобного типа [22]. Медленное устранение нарушений в электролитическом равновесии, их сохранение в течение длительного периода (несколько недель), несмотря на удаление уремической среды [16], подтверждает внутриклеточное происхождение таких дефектов. С другой стороны, имеются данные, подтверждающие усиление активного транспорта ионов при диализе, а также подавление уремической плазмой выхода Na^+ из клеток [19], что говорит о связи нарушений активного транспорта с влиянием плазменных ингибирующих факторов. Вероятно, изменения активности Na^+, K^+-АТФазы эритроцитов человека определяются комплексом различных факторов.

Поскольку ионотранспортирующая способность эритроцитарной Na^+, K^+-АТФазы достаточно низка, максимальную насосную функцию этого фермента можно определить, лишь предварительно активировав его. Например, этого можно достичь при повышении внеклеточной концентрации K^+ и понижении внутриклеточной концентрации Na^+. В связи с этим, постоянно повышенная внутриклеточная концентрация Na^+ в эритроцитах уремических больных, приводя к изменению адаптационных свойств мембраны, интенсифицирует работу Na^+, K^+-насоса. Непременным условием увеличения транспортной функции Na^+, K^+-АТФазы является сохранение нативности фермента и свойственного ему белково-липидного окружения. Для этого весьма перспективным оказывается использование специфических каналоформеров.

Большинство известных веществ, формирующих в стеринсодержащих бислойных мембранах ионтранспортирующие каналы, принадлежат к классу антибиотиков. Подробно изучены механизмы действия пептидных антибиотиков грамицидиновой группы A, B, C, D и аламецитина, увеличивающих проницаемость мембран для катионов щелочных металлов. В этих исследованиях сначала на искусственных бислойных мембранах D.C.Tosteson и соавт. [20], а также А.А.Львом, Л.В.Щагиной и соавт. был описан феномен «самоизлечивания» мембран, сопровождающий воздействие каналоформеров, т. е. инактивация каналов при латеральной диффузии или реализации иных механизмов разрушения построенной из молекул антибиотика и холестерина поры [7, 8, 20, 21]. Для нативных эритроцитарных мембран такое же явление впервые описали А.А.Лев, Л.В.Щагина и соавт. [9, 17, 18].

В 1990—1994 гг. некоторые из авторов настоящей работы изучали воздействие каналоформера другой природы — полиенового антибиотика нистатина — на мембраны эритроцитов здоровых доноров. Показано, что и в случае применения нистатина при формировании каналов идет процесс «самоизлечивания», причем, при ресуспендировании клеток в нативной среде — гомологичной плазме крови — он интенсифицируется. Более того, возрастает ионотраспортирующая способность Na^+, K^+-АТФазы как фермента, ответственного за поддержание электролитного градиента — основного маркера целостности клетки [1].

Несколько позднее нами выдвинуто предположение, что критерием оценки функционального состояния клеточных мембран может слу-

жить некоторый общий показатель — «сопротивляемость» или «резистентность» мембраны по отношению к внешнему воздействию каналоформера. Отражением этой резистентности является изменение коцентрации ионов K^+ вне клеток при формировании в мембранах эритроцитов нистатиновых каналов, кинетику которого мы изучали у больных с терминальной стадией ХПН, получающих лечение хроническим гемодиализом.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Определение внеклеточной концентрации ионов K^+ (K_e) проводили ионометрическим методом с помощью установки, представленной на рис. 1.

В качестве датчиков использовали K^+-селективные пленочные электроды (рис. 2).

Их селективность обусловлена структурой мембраны, которая изготовлена из поливинилхлорида, пластификатора дибутилфталата и электродно-активного вещества — ионофора валиномицина. Последний, имея специфическую кольцевую структуру, образует комплексы с ионами K^+ на

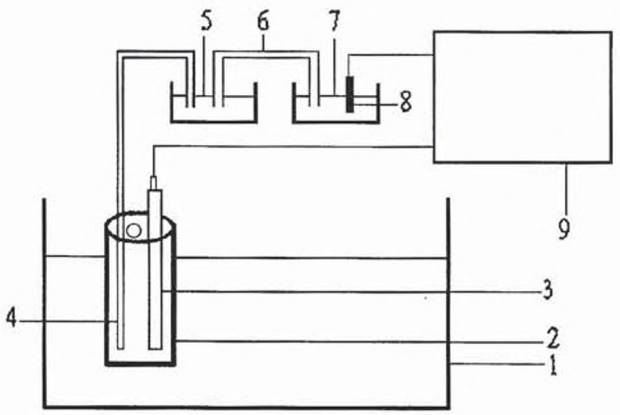

Рис. 1. Схема ионометрической установки для определения внеклеточной концентрации ионов K^+.

1 — рабочая камера жидкостного термостата; 2 — фторопластовая ячейка, содержащая суспензию эритроцитов; 3 — K^+-селективный пленочный электрод; 4 — электролитический мостик, заполненный 1М NH_4NO_3; 5 — раствор 1М NH_4NO_3; 6 — электролитический мостик, заполненный насыщенным раствором KCl; 7 — насыщенный раствор KCl; 8 — электрод сравнения; 9 — иономер.

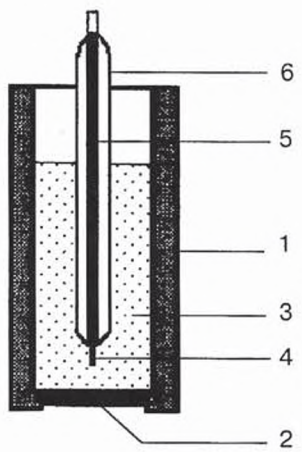

Рис. 2. Устройство K^+-селективного пленочного электрода.

1 — корпус; 2 — мембрана; 3 — 0,1 М раствор KCl; 4 — участок серебряной проволоки, покрытый слоем AgCl; 5 — серебряная проволока; 6 — стеклянная оболочка.

поверхности электродной мембраны. Если при этом концентрация (активность) K^+ на разных поверхностях мембраны оказывается различной в правильно разомкнутом электрохимическом элементе:

$$\mathrm{Ag\,|\,AgCl,\ KCl\ нас.\ ¦\ KCl\ нас.\ мост\ ¦\ NH_4NO_3\ ¦\ Проба\ или\ раствор\ Моргана\ \|\ KCl\ (0{,}1\ M),\ AgCl\ Калий\text{-}селективный\ электрод\ |\ Ag} \quad (1),$$

C_1 C_2

Электродная ионоселективная мембрана

в соответствии с уравнением Нернста, возникает разность потенциалов $\Delta\varphi$:

$$\Delta\varphi = \varphi_0 + \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{C_1}{C_2},$$

где R, T, F — универсальные постоянные; φ_0 — стандартная разность потенциалов (определяется суммой всех стационарных скачков потенциала на границе раздела фаз); C_1 — концентрация иона K^+ во внешнем (по отношению к электроду) исследуемом растворе; C_2 — концентрация иона K^+ во внутреннем растворе ионоселективного электрода.

Если C_2 постоянна, то разность потенциалов элемента (1) будет линейной функцией $\ln C_1$. Для определения C_1 в исследуемой пробе предварительно необходимо откалибровать ионоселективные электроды для получения зависимости $\Delta\varphi$ (мВ) от lnC1. Электроды калибровали при 37 °С, используя четыре калибровочных раствора, составы которых приведены в табл. 1.

Из данных табл. 1 видно, что в каждом последующем калибровочном растворе концентрация ионов калия возрастала в 5 раз, что при переходе от предыдущего к последующему раствору приводило к возрастанию электродного потенциала примерно на 40 мВ. Концентрация остальных компонентов была неизменной («постоянный фон»).

При определении концентрации ионов K^+ в исследуемой пробе решали обратную задачу определения $\ln C_1$ по значению $\Delta\varphi$ (мВ) в соответствии с калибровочным графиком. Результирующую концентрацию ионов K^+ в пробе определяли в гемолизате.

В ряде экспериментов в качестве внеклеточной среды применяли так называемый «раствор Моргана» [3] как аналог плазмы крови по ионному составу. Его использовали, чтобы устранить влияние на эритроциты плазменных белковых компонентов, уменьшающих действие нистатина на клеточные мембраны, в частности, путем частичной сорбции последнего (табл. 2).

Экспериментальные пробы (эритроциты, ресуспендированные в растворе Моргана или в плазме крови; калибровочный раствор) находились во фторпластовых бюксах с навинчивающимися крышками. В крышках имелись отверстия для калий-селективного электрода, электролитического моста и внесения препаратов (нистатин, уабаин). Бюксы помещали в водяной термостат (t=37 °С) и включали шейкер для перемешивания экспериментальной пробы.

Таблица 1

Состав калибровочных растворов

Компонент	Раствор № 1	Раствор № 2	Раствор № 3	Раствор №4
KCl, ммоль	1	5	25	125
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, ммоль	Постоянный фон: 10			
NaCl, ммоль	Постоянный фон: 100			
$NaHCO_3$, ммоль	Постоянный фон: 20			
$CaCl_2$, ммоль	Постоянный фон: 1,5			
$MgCl_2$, ммоль	Постоянный фон: 1,5			
Глюкоза, ммоль	Постоянный фон: 10			
Сахароза, ммоль	Постоянный фон: 27			

Таблица 2

Состав модельного раствора Моргана (pH 7,4)

Компонент	Концентрация, ммоль
NaCl	104
$NaHCO_3$	25
NaH_2PO_4	5
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	3,5
KCl	5
Глюкоза	10
Сахароза	27
$CaCl_2$	1,5
$MgCl_2$	1,5

Получение суспензии эритроцитов. Свежую кровь (взятую до и после сеанса гемодиализа) центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин при 7—8 °С. Дважды отмывали эритроциты от плазмы раствором Моргана центрифугированием в тех же условиях. После отмывки отбирали четыре пробы эритроцитарной взвеси по 1 мл каждая. В три из них добавляли по 0,5 мл раствора Моргана, а в четвертую — 0,5 мл плазмы крови. В каждой пробе определяли гематокрит.

Эффектором Na^+, K^+-АТФазы служил нистатин, а ее блокатором — уабаин. Натриевую соль нистатина (Merck) растворяли в перегнанном диметилформамиде, а уабаин (Fluka) — в бидистиллированной воде (2,5 мг/мл и 14,6 мг/мл растворителя, соответственно). При добавлении 0,04 мл полученных растворов в ячейку с эритроцитарной взвесью конечная концентрация нистатина во внеклеточной среде составляла 0,13 мМ, а уабаина — 1,03 мМ. Целью добавления уабаина являлось выяснение вклада этого фермента в «сопротивляемость» мембраны действию каналоформера и, таким образом, в поддержание электролитного баланса клетки.

Необходимо отметить, что при проведении экспериментов (и на протяжении более длительного времени) мы соблюдали стандартные условия применения ионоселективных датчиков, контактирующих с исследуемыми растворами и биологическими пробами. Это предопределялось высокой константой распределения ионофора и пластификатора, использованных для приготовления электродов, между фазой ионоселективной мембраны и материалом пробы ($K_{распр.} > 10^{5.5}$).

Постоянно контролировалась неизменность следующих характеристик электродов:

1) коэффициента селективности K^+-датчиков по отношению к Na^+-основному «мешающему» иону (составлял примерно 4);

2) углового коэффициента, отражающего скачок потенциала при уменьшении концентрации K^+ в 10 раз (не менее 57 мВ при 37 °С);

3) изменений стандартного потенциала в ходе эксперимента (не превышавшего 4% от абсолютной величины потенциала).

Все использованные реактивы имели квалификацию не ниже «ХЧ».

Контингент больных. Исследуемую группу пациентов составили 45 человек (25 мужчин и 20 женщин), средний возраст 42,4±11,9 года, с диапазоном колебаний от 20 до 65 лет. Больные получали лечение регулярным гемодиализом по поводу хронической почечной недостаточности (ХПН), причиной которой послужили следующие заболевания: хронический гломерулонефрит — 32 случая, хронический пиелонефрит — 2, поликистоз почек — 5, аномалии развития — 4, прочие — 2 случая. Все больные получали стандартный бикарбонатный гемодиализ в режиме 3 в неделю с продолжительностью 4—4,5 ч каждый сеанс. Ионный состав диализирующего раствора: натрий — 130—135 ммоль/л, калий — 2 ммоль/л, хлор — 100—105 ммоль/л, кальций — 1,75 ммоль/л, магний — 0,5 ммоль/л, бикарбонат — 40 ммоль/л. Сеансы диализа проводились на индивидуальных аппаратах «Искусственная почка» производства фирм Althin, B.Broun, Fresenius, Nikissa. Средний срок гемодиализного лечения составил 44,2±7,4 мес с колебаниями от 6 до 200 мес.

Контрольная группа состояла из 17 здоровых доноров (7 мужчин, 10 женщин).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При действии нистатина на мембраны эритроцитов человека, ресуспендированных в растворе Моргана, формируются неселективные гидрофильные каналы со сложным профилем потенциала, по которым перемещаются гидратированные ионы K^+ во внеклеточную среду, а ионы Na^+ — внутрь клеток.

В 1994 г. Ю.А.Борисовым и соавт. было доказано, что распределение нистатина в пробе происходит в течение 3 мин на 96% [3]. Таким образом, кинетическая кривая изменения концентрации ионов K^+ через 3 мин после добав-

ления каналоформера в пробу отражает только результат действия последнего на мембраны эритроцитов. Также было показано, что спонтанный выход ионов K^+ из эритроцитов значительно меньше выхода K+, индуцированного действием нистатина, и не превышает 5% от величины последнего [2].

Следует указать, что в связи с погрешностью, имеющей место в ходе приготовления экспериментальных проб (несмотря на определение гематокрита в каждой из них) и сказывающейся на абсолютном количестве эритроцитов в пробе и значит общей концентрации ионов K^+, мы использовали нормированные величины. Необходимость работы с относительными единицами предопределялась еще и тем, что внутриклеточная концентрация ионов K^+ существенно отличалась у разных индивидуумов.

Анализ результатов, полученных в ходе экспериментов с эритроцитами здоровых доноров, показал, что в подавляющем большинстве случаев (88%) выход K+ из клеток был выше в присутствии уабаина, чем без него (рис. 3, а), и только в 12% случаев наблюдался обратный эффект (рис. 3, б). Таким образом, для эритроцитов здоровых доноров мы выявили разницу в высоте подъема кривой между, с одной стороны, «уабаиновыми» пробами (с добавлением нистатина и уабаина) и пробами, содержавшими только нистатин («безуабаиновыми»), с другой (см. рис. 3, а, б). Следовательно, у большинства здоровых доноров мы наблюдали ожидаемую разницу между «уабаиновыми» и «безуабаиновыми» пробами в высоте подъема кинетических кривых, определявшуюся работой Na^+, K^+-АТФазы. Результаты таких же опытов, но с эритроцитами больных, находящихся на лечении регулярным гемодиализом, существенно отличались от экспериментальных данных, полученных для клеток здоровых доноров. Прежде всего это выражалось в более интенсивном выходе K+ во внеклеточную среду в «безуабаиновых» пробах, чем в присутствии уабаина в 55,6% случаев до сеанса гемодиализа, и в 64,4% случаев — после сеанса. Кинетические кривые отличались и по форме. Вместо обычной «сглаженности», характерной для опытов с эритроцитами здоровых доноров, здесь мы наблюдали резкие скачкообразные колебания в течение первых 10—15 мин после добавления в пробу нистатина (рис. 3, в) и даже иногда обратный ход кривой («инверсию») (рис. 3, г).

Следует подчеркнуть, что в случаях, когда взаимное расположение «уабаиновой» и «безуабаиновой» кинетических кривых в координатах «нормированная концентрация K+ — время» перед сеансом гемодиализа совпадало с наблюдавшимся у здоровых донорови в присутствии уабаина выход K+ из эритроцитов был интенсивнее, чем в «безуабаиновой» пробе, то в 50% случаев

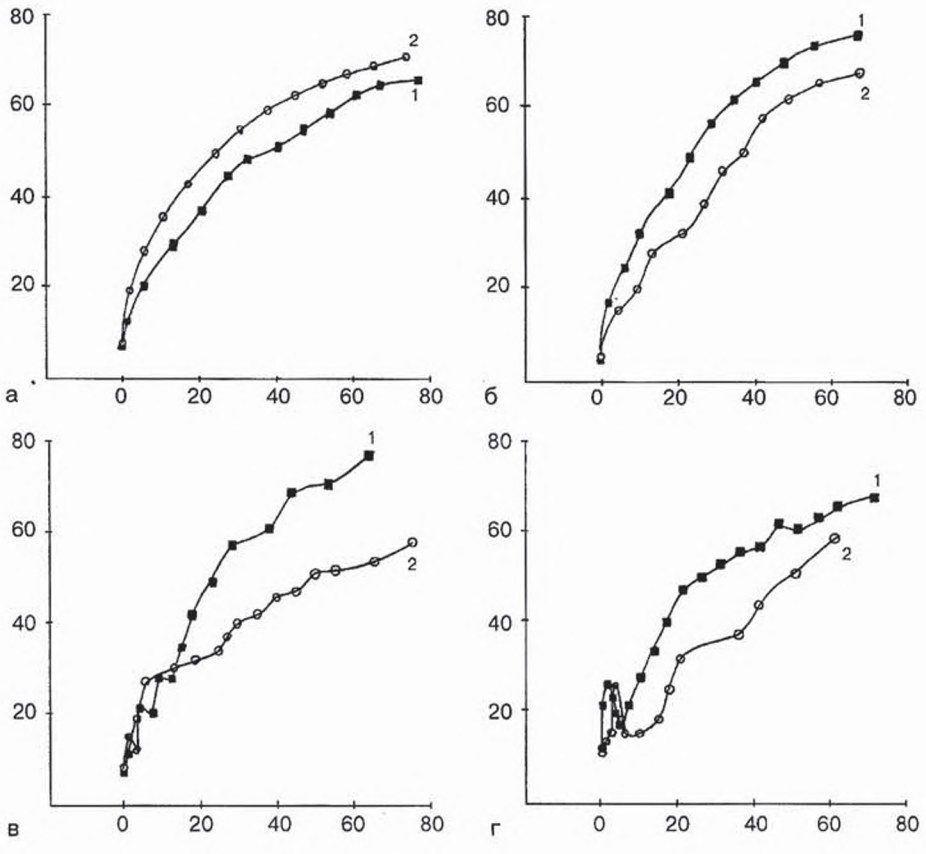

Рис. 3. Кинетические зависимости внеклеточной концентрации ионов K^+ при действии нистатина и уабаина на мембраны эритроцитов, ресуспендированных в растворе Моргана.

1 — проба без уабаина; 2 — проба с уабаином. а — здоровый донор, П-в; б — здоровый донор, К-н; в — больной Ф-в; г — больной Х-к. По оси абсцисс — время (мин, отсчет времени — от момента добавления нистатина в среду); по оси ординат — нормированная концентрация K^+, (%).

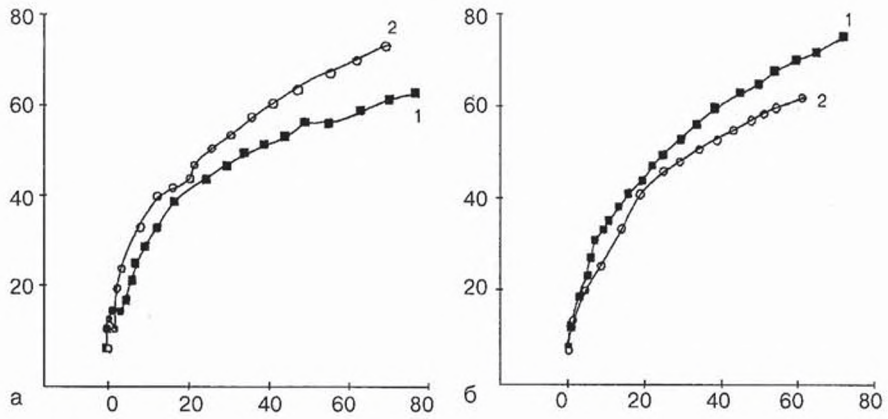

Рис. 4. Кинетические зависимости внеклеточной концентрации ионов K^+ при действии нистатина и уабаина на мембраны эритроцитов, ресуспендированных в растворе Моргана, взятых перед сеансом гемодиализа, и после него (больная, Ф-ва).

а — до сеанса гемодиализа; б — после сеанса гемодиализа. 1 — проба без уабаина; 2 — проба с уабаином. Остальные обозначения те же, что на рис. 3.

(у 10 больных из 20, составлявших эту группу) после процедуры оно менялось на противоположное (рис. 4, а, б).

Для проведения статистической обработки полученных результатов был использован показатель, которому мы дали условное название — «суммарный выход калия». Его рассчитывали как интегральное изменение концентрации K^+ во внеклеточной среде во временном промежутке 25—35 мин с момента добавления в пробу нистатина (рис. 5). Использование нами указанного временного интервала было обусловлено следующими причинами:

1) к 25-й минуте от момента добавления нистатина уже не происходило немонотонных колебаний внеклеточной концентрации ионов K^+;

2) после 45 мин опыта скорость выхода ионов K^+ из эритроцитов приближалась к спонтанной.

С нашей точки зрения, выбранный показатель наиболее четко отражает эффект сопротивления мембран эритроцита каналообразующей активности нистатина, т. е. характеризует их резистентность по отношению к действию внешнего каналоформера.

Особый интерес представляло сравнительное изучение резистентности мембран эритроцитов по отношению к действию каналоформера в условиях ресуспендирования эритроцитов в модельном растворе (раствор Моргана) и в плазме крови пациента, предпринятое для оценки влияния компонентов плазмы на резистентность эритроцитарной мембраны к действию нистатина. Как видно из рис. 6, в группе больных на хроническом гемодиализе изменения концентрации ионов K^+ в пробах с плазмой были менее выраженными. Средние значения суммарного выхода калия как до, так и после сеанса гемодиализа в пробах с плазмой были достоверно ниже (3,07±0,23 против 4,97±0,34), чем в пробах с модельным раствором (2,86±0,18 против 5,11±0,32), соответственно ($p<0,001$).

Выявлено также, что в ходе сеанса гемодиализа в описанной группе больных, находящихся на хроническом гемодиализе, средняя разница суммарного выхода калия в пробах с модельным раствором и плазмой увеличилась на 106,1% ($p<0,001$), а средняя разница между суммарным выходом калия в пробах только с нистатином и «уабаиновых» пробах возросла на 1226,7% ($p<0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Парадоксальный эффект уабаина, наблюдавшийся в пробах, полученных от пациентов, лечившихся хроническим гемодиализом, предположительно обусловлен двумя причинами. Во-первых,

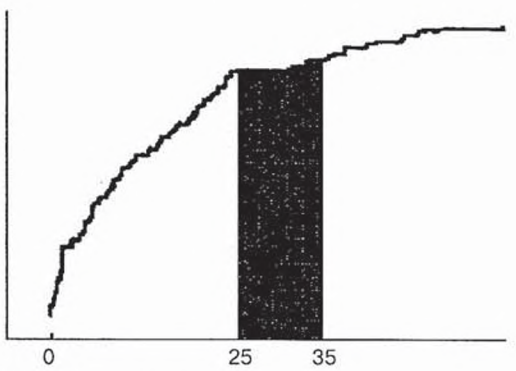

Рис. 5. Определение интегрального показателя выхода ионов K^+ из эритроцитов в интервале 25—35 мин от момента добавления нистатина в пробу.

Обозначения те же, что на рис. 3.

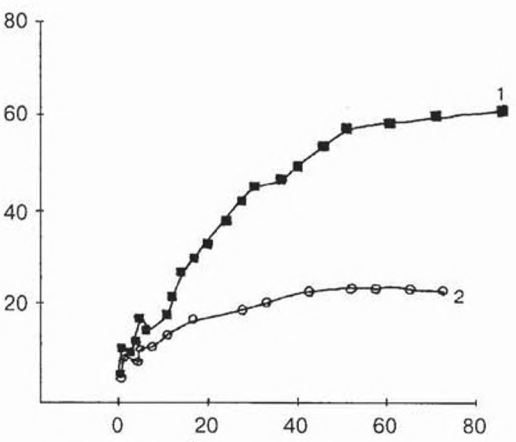

Рис. 6. Сравнительный анализ кинетических зависимостей внеклеточной концентрации ионов K^+ при действии нистатина на мембраны эритроцитов, ресуспендированных в растворе Моргана (1) и в плазме крови (2) (больная Г-ва).

Остальные обозначения те же, что на рис. 3.

мембраны эритроцитов, регулярно проходящих через капилляры диализатора, претерпевали существенные изменения, в ходе которых разрушались или терялись поверхностные мембранные структуры. Иными словами, при постоянном, интенсивном механическом воздействии мембраны «обдирались». Вследствие этого они становились более чувствительными к воздействию внешних факторов, в том числе различных химических (в частности, липофильных) агентов. Во-вторых, молекула уабаина имеет холестеринподобную структуру агликона. Известно, что при увеличении относительного содержания холестерина в мембранах эритроцитов повышается их текучесть [6] и, видимо, происходит интенсификация латеральных сдвигов. Облегчение доступа к билипидному слою позволяло уабаину беспрепятственно встраиваться в гидрофобную часть мембраны и, таким образом, оказывать на мембрану упрочняющее действие, подобно холестерину. В результате холестеринподобный механизм воздействия уабаина на мембрану оказывался превалирующим над его ролью как классического ингибитора Na^+, K^+-насоса. Гидрофильные же части молекул уабаина оставались на внешней поверхности эритроцитарных мембран и участвовали в формировании гидрофильных участков, препятствующих внедрению каналоформера в билипидный слой, и, таким образом, предотвращали образование полупор, из которых строится неселективный канал.

Это объяснение ярко подтвердил сравнительный анализ ряда кинетических кривых, полученных непосредственно перед проведением сеанса гемодиализа и сразу после него (см. рис. 3, в, г; 4, а, б). Именно увеличение резистентности мембраны по отношению к действию нистатина при предварительной экспозиции с уабаином, наблюдаемое здесь, может привести к изменению во взаимном расположении кинетических кривых, характерных для «уабаиновых» и «безуабаиновых» проб.

Что же касается изменения направления хода кривых в сторону уменьшения концентрации K^+ во внеклеточной среде (см. рис. 3, в, г), то его можно отнести на счет дополнительной активации Na^+, K^+-АТФазы при резком повышении внеклеточной концентрации ионов K^+. Для «уабаиновых» проб единственным пока объяснением инверсии может являться включение транспортной функции тех молекул Na^+, K^+-АТФазы, которые не проявляли участие в переносе ионов, пока не облегчался доступ уабаина к гидрофобной части билипидного слоя и не становилось преобладающим его мембраностабилизирующее действие.

Обсуждая средние значения суммарного выхода калия из эритроцитов, ресуспендированных в растворе Моргана и в нативной плазме, следует предположить, что компоненты плазмы (по всей видимости, липидные) уменьшают каналоформерную активность антибиотика. Одновременно в нативной среде повышается ионотранспортирующая способность Na^+, K^+-АТФазы. Несомненно, стабилизирующие функции плазмы по отношению к мембранам клеток и активирующие — по отношению к мембранным ферментативным системам — существенно улучшаются после проведения сеанса гемодиализа. Поскольку кинетика изменения внеклеточной концентрации K^+ в пробах с плазмой крови характеризует прежде всего стабильность системы «клетка—плазма» в целом, возможно, что наряду с увеличением защитной функции плазмы по отношению к каналоформеру в ходе диализа возрастает также и непосредственно насосная функция систем активного транспорта. В свою очередь, интенсификация активного транспорта может определяться как уменьшением концентрации ингибирующих его компонентов плазмы, так и интенсификацией работы Na^+, K^+-АТФазы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящей работы свидетельствуют о существенных изменениях биофизических характеристик мембран эритроцитов у больных, получающих лечение хроническим гемодиализом по сравнению с нормой. Выявлена значительная степень модификации мембран эритроцитов человека в ходе гемодиализа, что выражается в изменениях их барьерной и транспортной функции в отношении одновалентных катионов. Показана высокая степень влияния белково-липидного окружения на эритроцитарные мембраны и значительное улучшение мембранопротекторного эффекта плазмы крови в ходе сеанса гемодиализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Болдырев А.А. Ионные градиенты в жизни клетки // Природа.—1992.—№ 7.—С. 78—83.

2. Борисов Ю.А., Соболева О.Ю., Суглобова Е.Д., Щербак А.И. Ионометрическое изучение потоков Na^+ и K^+ через мембрану эритроцитов человека, модифицированную нистатином // Цитология.—1991.—Т. 33, № 1.—С. 24—31.

3. Борисов Ю.А., Соболева О.Ю., Суглобова Е.Д., Федорович Е.Е. Транспорт ионов Na^+ и K^+ через мембрану эритроцитов человека при формировании в ней нистатиновых каналов: некоторые особенности и анализ процессов // Цитология.—1994.—Т. 36, № 5.—С. 427—437.

4. Борисов Ю.А. Исследование транспорта Na^+ и K^+ через мембрану эритроцитов человека методом ионометрии: Автореф. дис.... канд. мед. наук.—СПб., 1995.

5. Кобаль А.М., Орлов С.Н., Покудин Н.И. и др. Модификация ионтранспортирующих систем эритроцитов человека при хранении // Бюл. экспер. биол.—1990.—Т. 110, № 8.—С. 151—153.

6. Смирнова Н.Н., Сергеева К.М., Маслова М.Н., Флеров М.А. Взаимосвязь структурно-функционального состояния биомембран с парциальными функциями почек при гломерулонефрите у детей и подростков // Нефрология.—1998.—Т. 2, № 1.—С. 47—52.

7. Щагина Л.В., Гринфельдт А.Э., Лев А.А. Сопоставление электрических и изотопных характеристик ионного транспорта через фосфолипидные мембраны // Цитология.—1976.—Т.18, № 2.—С.189—194.

8. Щагина Л.В., Гринфельдт А.Э., Лев А.А. Взаимодействие встречных потоков катионов в грамицидиновых каналах, пронизывающих бислойные липидные мембраны // Докл. АН СССР.— 1978 — Т. 239, № 1.—С. 223—226.

9. Щагина Л.В. Взаимодействие ионных потоков при индуцированном транспорте катионов через модельные и клеточные мембраны: Автореф. дис....докт. биол. наук.—Л., 1989.

10. Brearley C.J., Aronson J.K., Boon N.A., Raine A.E. Effects of haemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis on abnormalities of ion transport in vivo in patients with chronic renal failure // Clin. Sci.—1993.—Vol. 85.—P. 725—731.

11. Cheng J.T., Kahn T., Kaji D. Mechanism of alteration of sodium-potassium pump of erythrocytes from patients with chronic renal failure // J. Clin. Invest.—1984.—Vol. 74.—P. 1811—1820.

12. Corry D.B., Tuck M.L., Brickman A.S. et al. Sodium transport in red blood cells from dialyzed uremic patients // Kidney Int.—1986.—Vol. 29.—P. 1197—1202.

13. De Francheschi L., Olivieri O., Girelli D. et al. Red blood cell cation transports in uraemic anaemia: evidence for an increased K/Cl co-transport activity. Effects of dialysis and erythropoietin treatment // Europ. J. Clin. Invest.—1995.—Vol. 25.—P. 762—768.

14. Furuya U., Tabei K., Asano Y. Enhanced volume-sensitive K+ flux in patients on chronic hemodialysis // Nephron — 1994.—Vol. 68.—P. 71—76.

15. Izumo U., Izumo S., De Luise M., Flier J.S. Erythrocyte Na+,K+-pump in uremia acute correction of a transport defect by hemodialysis // J. Clin. Invest.—1984.—Vol. 74.—P. 581—588.

16. Krezinski J.M., Rorive G. Sodium-lithium counter-transport in red cells // New Engl. J. Med.—1983.—Vol. 309.—P. 987—988.

17. Lev A.A., Schagina L.V., Grinfeldt A.E. Changes of the energy profile of gramicidin A ionic channel dependent on the ratio of cations of different species in the flux passing through the channel // Gen. Physiol. and Biophys.—1988.—Vol. 7.—P. 547—553.

18. Schagina L.V., Blasko K., Grinfeldt A.E. et al. Cholesterol dependent gramicidin A channel inactivation in red blood cell membranes and lipid bilayer membranes // Biochim. Biophys. Acta — 1989.—Vol. 978.—P. 145—150.

19. Sohn H.J., Stokes G.S., Johnston H. An Na^+, K^+-ATPase inhibitor from ultrafiltrate obtained by haemodialysis of patients with uremia // J. Lab. Clin. Med.—1992.—Vol. 120.—P. 267—270.

20. Tosteson D.C. Adragna N., Bize I. et al. Membranes, ions and hypertension // Clin. Sci.—1981.—Vol. 61, № 7.—P. 5—10.

21. Tosteson M.T., Holmes S.J., Rasin M., Tosteson D.C. Melittin lysis of red cells // J. Membr. Biol.—1985.—Vol. 87.—P. 35—44.

22. Weiler E.W., Saldanha L.F., Khalil-Manesh F. et al. Relationship of Na^+,K^+-ATPase inhibitors to blood-pressure regulation on continuous ambulatory peritoneal dialysis and haemodialysis // J. Amer. Soc. Nephr.—1996.—Vol. 7.—P. 454—463.

23. Welt L.G., Sachs J.R., McManus T.J. An ion transport defect in erythrocytes from uremic patients // Trans. Assoc. Amer. Phys.—1964.—Vol. 77.—P. 169—181.

Поступила в редакцию 10.09.98 г.