© Коллектив авторов, 1998
УДК 612.123:616.611-002-036.12

А.И.Куликова, О.В.Митрофанова, В.В.Козлов, С.В.Барановская

ИЗМЕНЕНИЕ ФРАКЦИОННОГО СОСТАВА ФОСФОЛИПИДОВ ЭРИТРОЦИТОВ И ПЛАЗМЫ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ

A.I.Kulikova, O.V.Mitrofanova, V.V.Kozlov, S.V.Baranovskaya

CHANGES IN PHOSPHOLIPID FRACTIONS OF ERYTHROCYTES AND PLASMA IN PATIENTS WITH CHRONIC GLOMERULONEPHRITIS

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

РЕФЕРАТ

Проведено исследование содержания различных фракций фосфолипидов (ФЛ) в эритроцитах и плазме крови 80 больных с хроническим гломерулонефритом с различными клиническими проявлениями заболевания. Установлены однонаправленные сдвиги ФЛ спектра, состоящие в нарастании лизоформ, истощении мембранных ФЛ и некотором повышении ФЛ в плазме крови. Обнаружена взаимосвязь между изменениями в составе ФЛ и клинической формой заболевания, а также лабораторными показателями. Установлено, что развитие отеков по нефритическому типу сопровождается глубокой деструкцией клеточных мембран, тогда как развитие отеков по нефротическому типу не действует на мембраны столь деструктивно. Установлены математические выражения закономерностей, отражающих взаимосвязь содержания отдельных ФЛ мембран эритроцитов с другими показателями липидного обмена, такими как триглицериды и холестерин плазмы крови.Эти закономерности явились основой для построения номограмм, позволяющих оценивать уровень мембранных ФЛ по показателям липидограммы плазмы крови.

Ключевые слова: хронический гломерулонефрит, фосфолипиды, эритроциты, мембраны, плазма крови, нефротический отек, нефритический отек, липидный обмен.

ABSTRACT

The contents of different fractions of phospholipids (PHL) in blood plasma and erythrocytes were investigated in 80 patients with chronic glomerulonephritis (CGN) having various clinical manifestations of the disease. They were found to have similar changes in the PHL spectrum such as greater amount of lysophorms, exhaustion of membrane PHL ans slightly increased plasma PHL. An interconnection was detected between the changes in the PHL composition and the clinical variant of the disease as well as between PHL and laboratory indices. The development of the nephritic type edema was found to be accompanied by a considerable destruction of cell membranes while the development of the nephrotic type adema had no such a destructive influence upon the membranes. A mathematical formula has been obtained which reflects the interconnections between the contents of different PHL in the erythrocyte membranes and other parameters of lipid metabolism such as triglycerides and cholesterol of blood plasma. These relationships were used as a basis for nomograms which allow the level of the membrane PHL to be determined by the indices of the lipidogram of blood plasma.

Key words: chronic glomerulonephritis, phospholipids, erythrocytes, blood plasma, nephrotic edema, nephritic edema, lipid metabolism.

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, нарушения липидного обмена являются характерным признаком хронического гломерулонефрита (ХГН), начиная с доазотемического периода и кончая стадией терминальной почечной недостаточности. Однако до настоящего времени оценка липидных нарушений проводится в основном с точки зрения дислипидемий, т. е. нарушений количественного и качественного состава липопротеидов плазмы крови. Вместе с тем, необходим анализ клеточных липидных структур, так как в патогенезе развития ХГН значительная роль отводится мембранодеструктивным клеточным процессам и участию в них фосфолипидов [2, 3, 5]. Нарушения структу-

ры и функции цитомембран при ГН носят системный характер, затрагивая почечную ткань и периферическую кровь [1, 6], что позволяет использовать мембрану эритроцитов в качестве модели плазматической мембраны [4].

Задачей настоящего исследования явилось изучение количественного и качественного состава фосфолипидов (ФЛ) плазмы крови и эритроцитов у больных с различными клиническими проявлениями ХГН с последующим анализом влияния липидных компонентов сыворотки крови на ФЛ эритроцитарной мембраны, а также выявлением роли нарушений обмена ФЛ в формировании отечного синдрома.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Обследованы 80 больных (44 женщины и 36 мужчин) в возрасте от 16 до 67 лет с различными клиническими вариантами ХГН: с изолированным мочевым синдромом (ИМС), вторичной гипертензией (ВГ), нефротическим синдромом в сочетании с ВГ (НС/ВГ). 70 пациентов находились в доазотемической стадии заболевания и только 10 — с начальными признаками ХПН.

Обследование проводили до начала патогенетической терапии для исключения ее влияния на показатели фосфолипидного спектра крови. Перечень лабораторных исследований включал, помимо традиционных анализов (таких, как анализ мочи, клинический анализ крови, суточная потеря белка с мочой, общий белок и белковые фракции крови, холестерин, фибриноген, мочевина, креатинин), также комплексные функциональные исследования почек с определением показателей почечного гомеостаза. Кроме того, функциональное состояние почек уточнялось с помощью радионуклидных исследований (нефрографии, динамической сцинтиграфии почек).

Экстракцию липидов раздельно в плазме и эритроцитах проводили по методу I.Folch. Дальнейшая разгонка проводилась с помощью двухмерной микротонкослойной хроматографии на силикагеле. Были идентифицированы и количественно определены фракции ФЛ: фосфатидилхолин (ФХ), лизофосфатидилхолин (ЛФХ), сфингомиелин (СФМ), фосфатидилсерин (ФС) и фосфатидилэтаноламин (ФЭА).

Одновременно определялись показатели липидограммы сыворотки крови: общий холестерин (ХС), α-холестерин (α-ХС) и триглицериды (ТГ). Уровень β-холестерина рассчитывали по формуле B.Ritkind.

При статистической обработке данных были использованы общеупотребимые методы параметрического и непараметрического анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 1 представлены результаты изменений ФЛ спектра крови у больных с различными клиническими вариантами ХГН.Из нее следует, что в эритроцитах больных с ХГН имеет место единая направленность сдвигов в содержании ФЛ при всех изученных клинических вариантах течения заболевания: происходит снижение уровня ФХ, локализующегося в наружном слое липидного бислоя, и нарастание ЛФХ, свидетельствующего об активации фосфолипазы А2. Но особенно резко снижается уровень ФС и ФЭА — основных компонентов

Таблица 1

Результаты определения фосфолипидного спектра крови при ИМС, ВГ, НС/ВГ в сравнении с контрольной группой ($\bar{X}$±m)

Фосфолипиды крови ($\times10^{-2}$ г/л)	КГ (n=28)	ИМС (n=20)	ВГ (n=40)	НС/ВГ (n=17)
Эритроциты				
ОФЛ	255,09±2,05	250,28±5,58 >0,05*	219,92±3,51 <0,001	208,42±4,19 <0,001
ЛФХ	3,18±0,35	6,61±0,78 <0,001	6,26±0,54 <0,01	6,76±1,16 <0,001
СФМ	65,30±1,86	67,48±2,66 >0,05	62,74±1,64 >0,05	59,20±1,77 <0,05
ФС	27,13±1,01	20,83±2,48 <0,05	15,66±0,87 <0,001	16,22±1,49 <0,001
ФХ	77,40±0,91	84,12±2,32 <0,01	69,98±1,72 <0,01	66,09±2,75 <,001
ФЭА	80,65±2,09	70,83±2,41 <0,01	64,67±1,46 <0,001	60,24±2,07 <0,001
Плазма				
ОФЛ	208,25±3,56	229,51±8,27 <0,05	265,61±9,08 <0,001	308,85±13,76 <0,001
ЛФХ	11,23±0,81	18,23±1,75 <0,001	17,55±0,85 <0,001	20,14±1,44 <0,001
СФМ	39,09±0,86	47,08±3,04 <0,01	56,23±2,39 <0,001	70,04±3,43 <0,001
ФХ	145,25±2,66	154,29±5,61 >0,05	177,52±6,56 <0,001	203,47±10,58 <0,001
ФЭА	12,47±1,05	9,96±1,14 >0,05	13,28±0,81 >0,05	15,65±1,27 >0,05

* Достоверность отличий от значений в контрольной группе (кг).

внутреннего слоя. Важно отметить, что у больных с ИМС наблюдается адаптационно-компенсаторная перестройка мембран в пределах сохранного общего уровня ФЛ, происходит перераспределение ФЛ между внутренним и наружным слоями таким образом, что уменьшение ФЛ внутреннего слоя как бы компенсируется более высоким содержанием фракций ФХ и СФМ наружного бислоя. Более тяжелые клинические варианты сопровождаются истощением не только внутреннего, но и наружного липидного слоя. При этом удлинение продолжительности ВГ у больных отрицательно сказывается на содержании ФС ($r = -0,35$, $p<0,02$).

В плазме крови при всех анализируемых клинических вариантах ХГН отмечается повышение суммарного содержания ФЛ за счет ЛФХ, СФМ, ФХ. Только содержание ФЭА существенно не изменяется. Указанные изменения ФЛ крови при всех клинических вариантах ХГН сопровождались дислипидемией с гиперхолестеринемией, гипертриглицеридемией и гипо-α-холестеринемией.

В табл. 2 представлены результаты линейного корреляционного анализа ФЛ крови с лабораторными показателями.

Как следует из этой таблицы, основные лабораторные показатели, указывающие на течение ХГН (суточная протеинурия, общий ХС сыворотки крови, альбумин плазмы крови и др.) достоверно коррелируют в первую очередь с ОФЛ как плазмы крови, так и эритроцитов: кроме того, можно отметить ведущую роль изменений ФХ эритроцитов и СФМ плазмы в описанных корреляционных взаимосвязях.

С целью выявления устойчивых сочетаний специфических клинико-лабораторных показателей с плазменными и мембранными ФЛ был проведен факторный анализ (метод главных компонент).

Использование этого анализа позволило установить различное участие ФЛ крови в двух вариантах отечного синдрома (рис. 1). Как следует из этого рисунка, сила факторной нагрузки L одинакова для двух вариантов отечного синдрома (слева и справа от нулевой факторной нагрузки) и составляет величину 0,5 и 0,54 соответственно. Приблизительно также одинаково происходит распределение фактора обострения (0,53 и 0,47 соответственно). Наличие высокой суточной потери белка, гипоальбуминемии, дислипопротеинемии в сочетании с отеками (левая половина диаграммы) свидетельствует о присутствии типичного нефротического синдрома. Как видно из диаграммы, эти изменения происходят параллельно с изменениями ФЭА плазмы и практически не сочетаются с нарушениями в составе ФЛ клеточных мембран. Во втором варианте отечного синдрома ведущими признаками явились: величина систолического давления ($L = 0,36$) и уровень клубочковой фильтрации ($L = 0,34$), что указывает на отечный синдром нефритического типа. Именно этот вариант отечного синдрома сочетается с изменениями

Таблица 2

Корреляционные взаимосвязи важнейших лабораторных показателей с фосфолипидами крови больных с ХГН

Клинико-лабораторные параметры	ФЛ крови	r	p
СПБ	ОФЛэр.	−0,38	<0,05
	ЛФХэр.	+0,47	<0,01
	ФХэр.	−0,50	<0,001
	ОФЛпл.	+0,42	<0,0001
	СФМпл.	+0,45	<0,01
ХС	ОФЛэр.	−0,36	<0,05
	ОФЛпл.	+0,54	<0,0001
	СФМпл.	+0,46	<0,01
	ФЭАпл.	+0,55	<0,0001
Белок плазмы	ОФЛэр.	+0,34	<0,05
	СФМпл.	−0,48	<0,05
Альбумин плазмы	ОФЛэр.	+0,67	<0,001
	ФХэр.	+0,47	<0,05
	ФЭАэр.	+0,71	<0,0001
СОЭ	ОФЛэр.	−0,51	<0,01
	ФХэр.	−0,61	<0,001
Белок эритроцитов	ЛФХэр.	−0,53	<0,0001
	ФХэр.	+0,39	<0,05
Фибриноген	ОФЛпл.	+0,49	<0,05
	СФМпл.	+0,58	<0,05

Примечание. СПБ — суточная потеря белка.

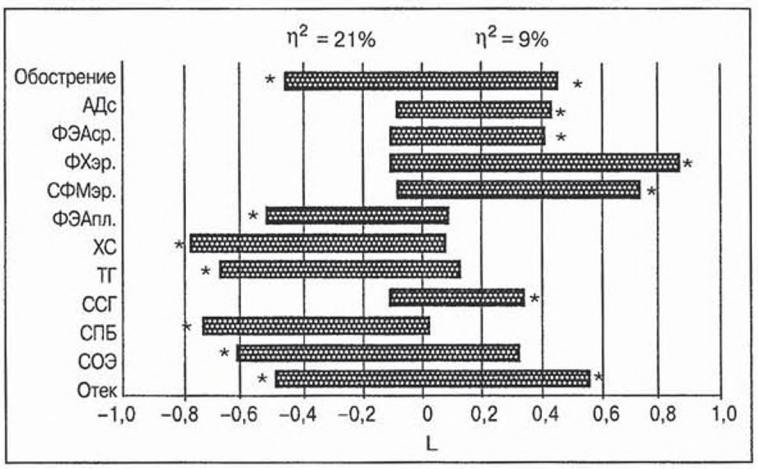

Рис. 1. Характер изменений фосфолипидов крови при отечном синдроме (по результатам факторного анализа).

L — сила факторной нагрузки, звездочки — достоверно значимое участие признака.

мембранных ФЛ: ФЭА (L = 0,42), ФХ (L = 0,84), СФМ (L = 0,74) и демонстрирует, таким образом, дисфункцию фосфолипидного бислоя клеточных мембран.

Таким образом, клинико-лабораторные показатели, свидетельствующие о преобладании нефритического и нефротического синдрома, по-разному сочетаются с изменениями в составе ФЛ: если нефротический отек затрагивает структуру плазменных ФЛ (в основном входящих в состав ЛПОНП, так как основная часть ФЭА находится именно в них), то нефритический отек проявляется на молекулярном уровне как типичная мембраноклеточная патология.

В настоящее время при анализе биологических, физиологических и клинических явлений все более широко используется системный подход, позволяющий рассматривать многочисленные параметры состояния системы в их сложной взаимосвязи, обеспечивающей согласованное функционирование всех ее звеньев. Комплексное исследование липидных параметров плазмы и эритроцитов подтвердило наличие взаимодействия ФЛ внутреннего и наружного

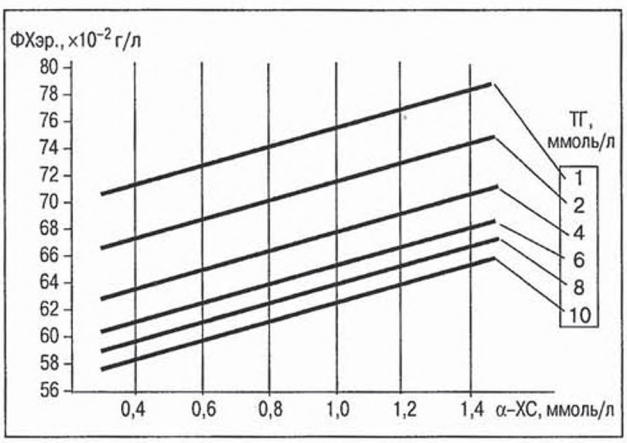

Рис. 2. Номограмма для определения содержания фосфатидилхолина мембран эритроцитов.

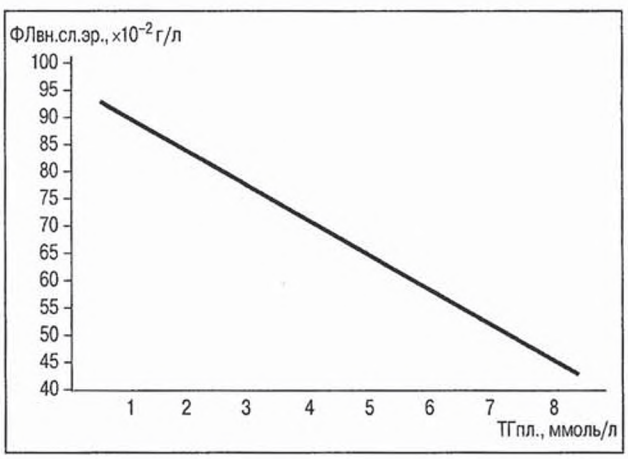

Рис. 3. Номограмма для определения содержания фосфолипидов внутреннего бислоя мембран эритроцитов.

слоев эритроцитарной мембраны с липидными компонентами плазмы крови. Так, уровень ФХ эритроцитов находится в зависимости от концентрации α-ХС и ТГ плазмы. Причем, если между α-ХС и ФХ имеется положительная корреляционная связь ($p<0,001$, $t = 2,61$), то между ТГ и ФХ — отрицательная ($p<0,01$, $t = -3,77$, $R^2 = 0,2$). Поскольку α-ХС отражает уровень ЛПВП в плазме, а ТГ — в основном содержание ЛПОНП, то можно заключить, что между ЛП этих классов и ФХ эритроцитов происходит обмен. С одной стороны, источником ФХ для эритроцитов являются ЛПВП, с другой, деструкция мембран приводит к тому, что фрагменты, содержащие ФХ, могут использоваться в ЛПОНП. Зависимость концентрации ФХ эритроцитов от уровней α-ХС и ТГ представлена следующим математическим выражением:

$$ФХэр. = 68,75 + 6,90 \cdot (\alpha\text{-ХС})^3 - 5,68 \cdot \lg(ТГ);$$
$$R^2 = 0,44; \quad F = 7,09; \quad p<0,002.$$

На основании этого уравнения, составлена номограмма, по которой можно вычислить уровень ФХ эритроцитов в зависимости от концентрации α-ХС и ТГ плазмы (рис. 2). Помимо этого, установлено,что уровень ТГ может быть положен в основу метода расчета суммы концентраций ФС и ФЭА эритроцитарной мембраны, составляющих внутренний липидный слой. Получено соответствующее уравнение линейной регрессии:

$$ФЛвн.сл.эр. = 96,5 - 6,27 \cdot ТГ;$$
$$R^2 = 0,24; \quad F = 20,98; \quad p < 0,001.$$

На основании этого выражения, построена номограмма, используемая для расчета суммы ФС и ФЭА эритроцитов в зависимости от уровня ТГ плазмы крови (рис. 3). Практическая значимость этих расчетов заключается в том, что, исходя из показателей обычной липидограммы, можно рассчитать концентрацию основных ФЛ мембран и, таким образом, получить представление о степени дезинтеграции мембранных структур.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования ФЛ спектра плазмы крови и мембран эритроцитов у больных с ХГН продемонстрировали дестабилизацию клеточных мембран и изменения в липидном (в том числе и фосфолипидном) составе плазмы крови. Как уже указывалось, изменения ФЛ в эритроцитарной мембране у больных с ИМС носят адаптационно-компенсаторный характер. В дальнейшем при присоединении вторичной гипертензии и отеков эти изменения усугубля-

ются и приобретают необратимый характер. Наличие корреляционной взаимосвязи наиболее важных фосфолипидных фракций (ФХ, СФМ) с лабораторными показателями, патогномоничными для ХГН, свидетельствуют о важной роли нарушений обмена ФЛ в патогенезе ХГН.

Использование системного подхода, объединяющего клинико-лабораторное обследование с детальным анализом как различных фракций ФЛ, так и основных липидных показателей, одновременно в плазме крови и эритроцитах, а также проведение глубокого статистического анализа позволило выявить различия в участии отдельных фосфолипидных фракций при формировании отеков по нефритическому и нефротическому типам. Так, развитие отека по нефротическому типу не затрагивает мембранные структуры, тогда как развитие отека по нефритическому типу сочетается с глубокими мембранодеструктивными процессами, т. е. нефритический отек проявляется на молекулярном уровне как типичная мембраноклеточная патология. Важность такого подхода определяется тем, что, по-видимому, и подходы к лечебной коррекции в описанных вариантах должны различаться между собой.Так, истощение мембранных ФЛ при нефритическом типе отеков указывает на необходимость использования эссенциальных ФЛ и других мембраностабилизирующих средств, а существенная значимость легкоокисляемого ФЭА плазмы в патогенезе нефротического отека демонстрирует целесообразность применения антиоксидантной терапии.

Следовательно, определение отдельных фракций ФЛ у больных с ХГН имеет не только теоретическое, но и практическое значение. Однако, учитывая методические трудности при определении ФЛ спектра, нельзя ожидать широкого использования тонкослойной хроматографии в клинико-лабораторной практике. Вместе с тем, как показано в нашей работе, эти трудности можно преодолеть, используя специальные номограммы, в которых, на основании определения обычных показателей липидограммы сыворотки крови, таких как общий ХС, α-холестерин и триглицериды, можно рассчитать уровень наружных и внутренних ФЛ липидного бислоя клеточных мембран.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные результаты об изменениях уровня как общих ФЛ, так и их отдельных фракций в крови больных с ХГН, а также выявление существенных корреляционных взаимосвязей этих сдвигов с ведущими клинико-лабораторными показателями свидетельствуют об участии нарушений фосфолипидного обмена в процессе развития и прогрессирования ХГН. Наши исследования показали важную роль сдвигов уровня мембранных ФЛ в развитии отеков нефритического типа, что позволяет трактовать эти отеки как мембраноклеточную патологию. Выявленная математическая зависимость между показателями стандартной липидограммы крови и количеством ФЛ внутренней и наружной частей липидного бислоя эритроцитарных мембран позволяет количественно оценивать деструкцию клеточных структур у больных с ХГН и проводить терапевтическую коррекцию этих нарушений, способствуя тем самым замедлению прогрессирования ХГН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е.Б.Роль липидов в процессе передачи информации в клетке // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ.—М.: Наука, 1981.—С. 24—25.

2. Бурова В.Я. Ультраструктурные изменения и критерии состояния почечного эпителия при токсическом и иммунном воздействии // Автореф. дис... канд. мед. наук.—1981.

3. Вельтищев Ю.Е. Проблемы мембранной патологии в педиатрии // Вопр. охр. мат.—1981.—№ 4 .—С. 3—9.

4. Вельтищев Ю.Е. Фосфолипазы человека в норме и при патологии // Вопр. мед. химии.—1981.—№ 4.—С. 441—449.

5. Проблемы мембранной патологии в педиатрии / Ред. Ю.Е.Вельтищев, А.И.Клембовский.—М., 1984.—183 с.

6. Sawada S. Plasma phospholipids in terminal renal insufficiency // J. Jap. Soc. Dialysis Ter.—1984.—Vol. 17, № 4.—P. 235—241.