

© Ю.А.Борисов, Э.Б.Лебедева, В.Н.Спиридонов, Е.Д.Суглобова, 2007  
УДК 616.61-008.64-036.12-085.38:612.014

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

## РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ВНЕШНЕМУ ДЕЙСТВИЮ КАНАЛОФОРМЕРА КАК ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН ПАЦИЕНТОВ ГЕМОДИАЛИЗА

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

## RESISTANCE TO EXTERNAL ACTION OF A CHANNEL FORMER AS A CHARACTERISTIC OF CELL MEMBRANES OF HEMODIALYSIS PATIENTS

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

### РЕФЕРАТ

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Целью настоящего исследования явилась разработка нового теста, позволяющего оценить состояние билипидного слоя эритроцитарных мембран у пациентов, получающих лечение регулярным гемодиализом в различных внешних условиях и при влиянии на мембраны различных эффекторов на фоне воздействия каналоформера. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** Обследовали группу из 147 человек (78 мужчин и 69 женщин, средний возраст –  $43,9 \pm 1,4$  года), получавших заместительную терапию регулярным гемодиализом. Контрольной группой служили добровольцы. Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования. Полученный осадок эритроцитов отмывали от плазмы и переносили в ячейки, содержащие либо модельный солевой раствор, либо аутологичную плазму. В качестве провокатора трансмембранных потоков  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  использовали нистатин ( $3,0 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ). Эффекторами эритроцитарной мембраны в экспериментах служили убаин ( $5,60 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ), эритропоэтин и мембраноактивные компоненты аутологичной плазмы крови. В качестве лизирующего агента использовали сапонин. Определение внеклеточной концентрации  $\text{K}^+$  производили методом ионометрии с использованием ионоселективных электродов и ионоселективные полевые транзисторы с фотополимеризуемыми полиуретановыми мембранами. Для оценки резистентности эритроцитов к внешнему действию каналоформера применяли новый показатель – «интегральный нормированный выход  $\text{K}^+$ », который рассчитывали для разных временных промежутков после внесения нистатина. При определении данного показателя вычисляли площадь области диаграммы, расположенной под кривой зависимости нормированной концентрации  $\text{K}^+$  во времени. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Выявлены значимые различия интегрального нормированного выхода  $\text{K}^+$  для эритроцитов здоровых доноров и больных с ХПН, получающих лечение регулярным гемодиализом при инкубации клеток во внеклеточной среде различного состава и при воздействии различных по своей природе эффекторов. Показано наличие иного механизма взаимодействия убаина с плазматической мембраной помимо классического ингибирования  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы, приводящего к парадоксальному мембраностабилизирующему эффекту, наблюдаемому для эритроцитов пациентов гемодиализа. Установлено дестабилизирующее действие эритропоэтина при непосредственном его влиянии на эритроциты. Выявлен сильный мембранопротекторный эффект компонентов аутологичной плазмы, характерный как для эритроцитов здоровых доноров, так и для клеток пациентов гемодиализа. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Интегральный нормированный выход  $\text{K}^+$  является достаточно информативным клинико-лабораторным показателем и может с успехом применяться для оценки качества плазматических мембран у больных, получающих заместительную терапию хроническим гемодиализом.

**Ключевые слова:** регулярный гемодиализ, плазма крови, эритроцит, мембраны, каналоформеры, калий, эритропоэтин, ионометрия.

### ABSTRACT

**THE AIM** of the investigation was to develop a new test allowing assessment of the bilipid layer of erythrocyte membranes in patients on regular hemodialysis in different environmental conditions and under the influence of different effectors on the membranes against the background of the action of a channel former. **PATIENTS AND METHODS.** Under examination there were 147 patients (78 men and 69 women, mean age  $43.9 \pm 1.4$  years) treated by substitution therapy with regular hemodialysis. The control group consisted of volunteers. The erythrocytes were separated from plasma by centrifugation. The sediment was washed from plasma and transferred into wells containing either model saline or autologous plasma. Nistatin ( $3.0 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ) was used as a promoter of transmembrane currents of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ . Uabain ( $5.60 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ), erythropoietin and membrane active components of autologous blood plasma were taken as effectors of the erythrocyte membrane in experiments. Saponin was used as a lysing agent. Extracellular concentration of  $\text{K}^+$  was determined by the method of ion-metry using ion-selective electrodes and ion-selective field transistors with photopolymerisable polyurethane membranes. The resistance of erythrocytes to an external action of the channel former was assessed by a new index – “the integral normalized outcome of  $\text{K}^+$ ” which was calculated for different time intervals after administration of nistatin. When determining this index the diagram area under the curve of dependence of the normalized  $\text{K}^+$  concentration in time was calculated. **RESULTS.** Considerable differences of the integral normalized outcome of  $\text{K}^+$  were detected for the erythrocytes of healthy donors and patients with CRF treated by regular hemodialysis during the incubation of cells in the extracellular medium of different composition and exposed to effectors of different nature. Another mechanism of the interaction of uabain with plasma membrane was shown in addition to classical inhibition of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase resulting in a paradoxical membrane-stabilizing effect observed in erythrocytes of hemodialysis patients. A destabilizing effect of erythropoietin

was established under its direct influence on erythrocytes. A strong membrane-protecting effect of the components of autologous plasma was found characteristic of both the erythrocytes of healthy donors and the cells of hemodialysis patients. **CONCLUSION.** The integral normalized outcome of  $K^+$  is a sufficiently informative clinico-laboratory index and can be successfully used for the assessment of plasma membrane quality in patients treated by substitution therapy with regular hemodialysis.

**Key words:** hemodialysis, blood plasma, erythrocyte, membranes, channel formers, potassium, erythropoietine, ionometry.

## ВВЕДЕНИЕ

Известен целый класс веществ, обозначаемых термином «каналоформеры», которые при встраивании в бислой плазматической мембраны способны образовывать неселективные поры или каналы (понятие «каналы» может включать в себя как собственно поры, так и селективные каналы). К их числу относятся как неполярные, так и амфифильные молекулы, характеризующиеся эффективным взаимодействием с мембранами. При этом амфифильные молекулы, обладая четко выраженными полярными и неполярными частями, в больших концентрациях могут действовать как детергенты и разрушать бислой [1]. При детальном анализе закономерностей формирования гидрофильных структур под действием порообразующих гемолизинов показано, что коллоидно-осмотический механизм процесса способствует формированию в плазматической мембране водонаполненных пор небольшого размера, протекающему достаточно мягко с сохранением целостности мембраны [2, 3].

При моделировании процессов трансмембранного переноса веществ в большинстве случаев используют искусственные фосфолипидные бислои, которые являются очень удобными и простыми экспериментальными объектами, однако в отношении проницаемости для одних и тех же веществ они кардинально отличаются от нативных мембран. Выявление таких различий, зафиксированных еще несколько десятилетий назад, привело к расширению представлений о механизмах функционирования ионных каналов, как селективных, так и неселективных [4, 5]. К настоящему времени вопросы о возможностях моделирования канальной проницаемости, в основном, решены [6–10]. Одним из наиболее интересных достижений здесь является расшифровка последовательности действия воротного («gating») механизма работы мембран-

ных транспортных туннелей. На примере ионных каналов, сформированных в бислойных липидных мембранах антибиотиком сирингомицином Е (циклический липодепептид, продуцируемый фитопатогенными бактериями), подробно рассмотрена зависимость проводимости канала (в данном случае – анионная) от концентрации электролита в окружающей среде [11]. Широкому обсуждению подверглась и многоуровневая организация зон проводимости – вариабельность их состояния при различных количествах переносимых ионов. Подобная кластерность характерна и для многих каналов клеточных мембран [12], и часто рассматривается как результат кооперативного конформационного открывания сразу нескольких проводящих единиц [13]. Кроме того, показано существование некоего «абсолютно непроводящего» состояния системы, и тем самым подтвержден феномен инактивации, обозначенный для сирингомициновых каналов [в 14] и характерный не только для билипидных модельных мембран, но и для эритроцитарных [15, 16]. Результаты последующих экспериментов показали, что в воротном механизме принимают участие заряженные группы мембранообразующих липидов, при этом вклад их дипольных моментов достаточно существен [17–19].

Значительно раньше (в середине 70-х годов прошлого века) началось изучение процесса модификации мембран другими каналоформерами – грамицидином и двумя полиеновыми антибиотиками – амфотерицином В и нистатином (рис.1).

Модель канала, образованного гидрофобным пептидом грамицидином А, состоит из двух молекул антибиотика в положении «голова к голове». Проводимость такого катион-селективного канала достаточно велика ( $\approx 30 \text{ нСм/1 канал}$ ). И хотя, например, размеры анионов  $\text{Cl}^-$  достаточно малы, что позволяет им пройти через такую пору, но из-

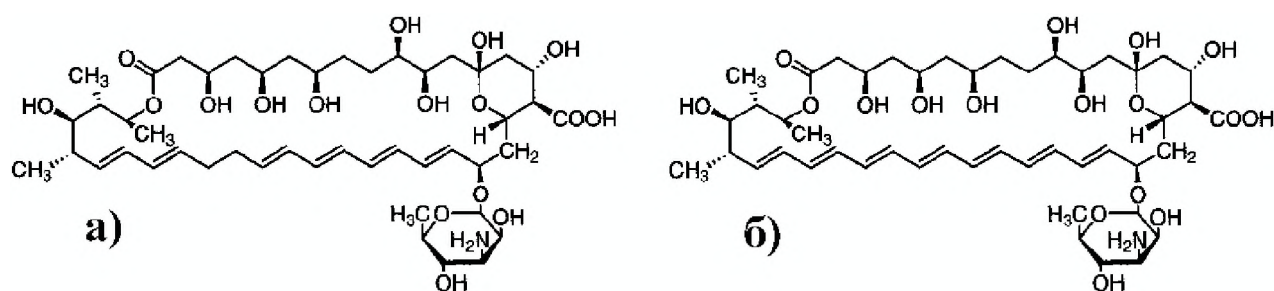


Рис.1. Строение нистатина (а) и амфотерицина В (б).

за электростатического отталкивания анионов и диполей, образуемых карбонильными группами и формирующих ворота канала, их транспорт не осуществляется [20]. Поскольку диаметр грамицидинового канала составляет всего 4 ангстрема, через него происходит лишь однорядная диффузия ионов [21] и, кроме того, транспортируемый катион должен быть частично дегидратированным. Сам по себе процесс открывания/закрывания грамицидинового канала реализуется в результате ассоциации мономеров, образующих димер, или, возможно, через создание некоего конгломерата димеров и, наконец, их диссоциации. Время жизни димера составляет в среднем от 10 мс до 10 с и зависит от липидного состава мембраны.

В середине 80-х годов D.C. Tosteson [22] высказана идея о процессе инактивации грамицидинового канала во времени. Согласно этому представлению, для канала, кроме циклического процесса открывания/закрывания, характерен еще и механизм полного прекращения его функционирования как транспортной единицы. Изначально существование такого процесса стабилизации мембраны (repairing the membrane или self-treatment) рассматривалось только в рамках бислойных моделей, но несколько позднее уменьшение проводимости канала во времени было выявлено и для эритроцитарных мембран, модифицированных грамицидином А [23–25]. При этом показано, что при уменьшении содержания холестерина в мембранах красных кровяных клеток скорость инактивации значительно снижается. Однако связать этот эффект с конденсирующим влиянием последнего на липидный бислой не удалось. Замена же самого холестерина на аналогично действующие 7-дегидрохолестерин или эргостерин приводило к блокированию каналаформерной активности грамицидина. Поэтому одной из наиболее вероятных причин существования self-treatment'a в настоящее время считают латеральную диффузию фосфолипидов, подобно тому как это наблюдается при затекании гидрофильной поры.

Несколько менее подробно изучено поведение каналов, формируемых в холестеринсодержащих мембранах представителями другой группы каналоформеров – полиеновыми антибиотиками амфотерицином В и нистатином. Диаметр формируемой ими гидрофильной поры составляет примерно 8 ангстрем. Форма такого канала предполагает наличие двух цилиндрических полупор, каждая из которых собрана из 8–10 молекул полиена, чередующихся с молекулами холестерина. Гидроксилированные части молекул обращены внутрь, наружная поверхность цилиндра неполярна. Таким образом, в

целом структура амфифильна [26]. В серии работ отечественных авторов показано, что амфотерициновые и нистатиновые каналы неселективны, а степень модификации мембраны (охарактеризованная как степень изменения ее проницаемости) в значительной мере зависит от концентрации антибиотика по обе стороны бислоя. В случае «двустороннего» воздействия полиенов скорость модификации значительно возрастает, поскольку в этих условиях полупоры, собираемые в монослоях, гораздо быстрее объединяются в проводящие каналы [27–31]. В силу некоторых различий в строении молекул амфотерицина В и нистатина (см. рис. 1) – у последнего в негидроксилированном участке цепи отсутствует одна из двойных связей, существуют различия и в проводимости формируемых ими каналов: одинаковая проводимость мембраны достигается только в случае, когда концентрация нистатина в 5 раз превышает таковую для амфотерицина В [32].

Несколько позднее Х.М. Касумов и О.К. Малафриев указывали на снижение проводимости амфотерициновых каналов во времени, происходящее, по их мнению, из-за «распада проводящего комплекса до непроводящих мономерных единиц антибиотиков и дефектных структур в мембране» [33]. Однако в последующие годы это направление исследований не было форсировано.

В 90-х годах прошлого века авторами настоящей работы было предпринято изучение особенностей функционирования мембран эритроцитов, ресуспендированных в солевых средах и в нативной плазме при их модификации нистатином [34, 35]. В ходе этих исследований была продемонстрирована зависимость интенсивности утечки ионов от концентрации антибиотика в пробе. Инактивация формируемых неселективных гидрофильных каналов рассматривалась и ранее, но только лишь в контексте функционирования систем активного транспорта ионов как один из механизмов сопротивления холестеринсодержащей мембраны агрессии каналоформера. В настоящее время стало очевидным, что определение резистентности эритроцитарной мембраны по отношению к внешнему воздействию каналоформера может быть использовано как диагностический тест для оценки состояния билипидного слоя мембран у больных с терминальной стадией ХПН, получающих лечение регулярным гемодиализом.

Представляемые исследования – результат многолетней работы. Их основной целью явилось применение интегрального электролитного показателя, определенного в ходе экспериментов, в качестве клинко-лабораторной характеристики состояния клеточных мембран пациентов гемодиализа.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

### ГРУППЫ ПАЦИЕНТОВ

При изучении резистентности эритроцитов по отношению к внешнему воздействию каналоформера обследовали группу из 147 человек (78 мужчин и 69 женщин, средний возраст –  $43,9 \pm 1,4$  года), получавших заместительную терапию регулярным гемодиализом. Контрольной группой служили добровольцы (12 мужчин и 12 женщин, средний возраст –  $42,3 \pm 1,3$  года). По возрастному и половому составу исследуемая и контрольная группы достоверно не отличались друг от друга ( $t = 1,09$ ;  $\chi^2 = 0,001$  соответственно).

В исследуемой группе у 121 человека в качестве основной патологии был диагностирован хронический гломерулонефрит, у 3 человек – первичный хронический пиелонефрит, у 12 человек – диабетический нефросклероз, у 5 – поликистоз и вторичный пиелонефрит, и у 4 человек – прочие заболевания почек.

Сеансы стандартного бикарбонатного гемодиализа выполнялись с применением аппаратов «искусственная почка» производства Fresenius мод. 4008B и 4008H, Braun HD-Secura Ver He A, Hospal Integra и Bellco Formula 2000 с применением полисульфоновых полиметилметакрилатных диализаторов и диализаторов с мембраной из синтетически модифицированной целлюлозы площадью  $1,3\text{--}1,8$  м<sup>2</sup>. Скорость потока крови составляла в среднем 300 мл/мин, диализирующего раствора – 500 мл/мин. Сеансы проводились 3 раза в неделю по 4 – 4,5 часа. Количество полученных сеансов колебалось от 3 до 2580 и составляло в среднем  $560,5 \pm 49,4$ .

При изучении влияния аутологичной плазмы на резистентность мембран эритроцитов при действии на них нистатина из указанного контингента больных выделили группу из 114 человек (57 мужчин и 57 женщин, средний возраст –  $44,3 \pm 1,5$  лет). В указанной группе у 103 пациентов в качестве основного заболевания был диагностирован хронический гломерулонефрит, у 8 – диабетический нефросклероз, у двоих – первичный хронический пиелонефрит, и у одного – поликистоз почек.

У 40 больных (24 мужчины и 16 женщин, средний возраст –  $42,2 \pm 2,1$  года) исследовалось влияние эритропоэтина на выход калия из эритроцитов при внешнем действии каналоформера. Из них у 38 человек был установлен хронический гломерулонефрит, у одного больного – поликистоз почек и вторичный пиелонефрит, и еще у одного – прочие заболевания. В данной группе количество полученных сеансов гемодиализа составило в среднем  $323,5 \pm 59,0$ .

## ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕЙ ПРОБЫ

Эритроциты из свежей гепаринизированной крови пациентов гемодиализа (взятой до и после сеанса) и здоровых доноров отделяли от плазмы путем центрифугирования (3000 об/мин, 4°C, центрифуга PC-6) в течение 10 мин. Полученный осадок эритроцитов дважды отмывали от плазмы раствором Моргана [36] при центрифугировании в прежних условиях. По 1 мл полученной эритроцитарной массы переносили в ячейки и добавляли либо 0,5 мл раствора Моргана, либо 0,5 мл аутологичной плазмы, в зависимости от условий эксперимента.

В качестве провокатора трансмембранных потоков  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  использовали нистатин – каналоформер, антибиотик полиенового ряда. 0,04 мл его раствора в перегнанном диметилформамиде концентрацией 5 мг/мл ( $3,0 \cdot 10^{-4}$  М) вносили в ячейку для индуцирования интенсивного выхода внутриклеточного  $\text{K}^+$  во внешнюю среду по сформированным каналам. Концентрация нистатина в пробе, таким образом, составляла 0,222 мг/мл внеклеточной жидкости. Указанная концентрация была подобрана с учетом результатов описанных экспериментов [34]. Поскольку скорость изменения внеклеточной концентрации  $\text{K}^+$  сильно зависит от количества организованных в эритроцитарной мембране каналов и, следовательно, от концентрации каналоформера в пробе, именно такое содержание антибиотика явилось оптимальным для полной регистрации кинетической зависимости. Продолжительность эксперимента в этих условиях составляла примерно 1 ч от момента внесения нистатина в пробу.

Эффекторами эритроцитарной мембраны в экспериментах служили следующие вещества:

1. Уабаин – специфический ингибитор  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы. 0,04 мл его раствора в деионизированной воде (14,6 мг/мл деионизированной воды) добавляли в ячейку за 10 мин до внесения туда раствора нистатина. В «безуабаиновые» ячейки при этом вносили 0,04 мл деионизированной воды.

2. Рекормон – рекомбинантный человеческий эритропоэтин, пептид с молекулярной массой 34 кДа. Препарат производства Boehringer Mannheim во флаконах емк. 0,5 мл; одна терапевтическая доза – 2000 IU или 36,6 мг чистого вещества. В экспериментах в ячейку вносили 0,04 мл его готового раствора, что соответствовало 160 IU. Таким образом, конечная концентрация препарата в ячейке в 24 раза превышала таковую, достигаемую в плазме крови при его однократном внутривенном введении. Уровень содержания эритропоэтина в рабочей пробе выбирали с тем расчетом, чтобы его концентрация имела такой же порядок, что и содержание остальных эффекторов, т.е. чтобы количество его молекул и мо-

лекул других агентов, взаимодействующих с одной клеткой, было примерно одинаковым.

3. Мембраноактивные компоненты, входящие в состав аутологичной плазмы крови.

В качестве ячеек применялись фторопластовые бюксы с внутренним диаметром 12 мм, в пластиковых крышках которых закреплялись либо ионселективные электроды (диаметр корпусов 4мм), либо ионселективные полевые транзисторы (ИСПТ) (пластина толщиной 0,8мм), и электролитические мостики [37]. Растворы эффекторов вносили в ячейку через специальные отверстия. Туда же вносили раствор сапонина, что вызывало достаточно быстрый лизис эритроцитов; для обеспечения тотального лизиса эритроцитов применяли также замораживание-оттаивание ячеек.

Ячейки помещали в жидкостной термостат 1ТЖ-003, снабженный шейкером; все определения, как и предварительные калибровки датчиков, производили при 37°C.

Определение э.д.с. выстраиваемых рабочих гальванических элементов производили на иономере И-130 (в случае использования в качестве датчиков ионселективных электродов) и на специальном устройстве, разработанном в Барселонском институте микроэлектроники (в случае применения ИСПТ).

Квалификация всех использованных реактивов была не ниже «ХЧ».

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕЛИЧИНЫ ИНТЕГРАЛЬНОГО НОРМИРОВАННОГО ВЫХОДА КАЛИЯ

На рис. 2 приведены кинетические зависимости изменения внеклеточной концентрации  $K^+$  при действии нистатина на эритроциты больных с ХПН, получающих терапию регулярным гемодиализом. Результаты представлены в прямых координатах «время – нормированная концентрация  $K^+$  во внеклеточной среде» ( $C_{\text{норм } K^+} = f(t)$ ). Необходимо отметить, что взаимное расположение концентрационных кривых оказалось весьма разнообразным и зависе-

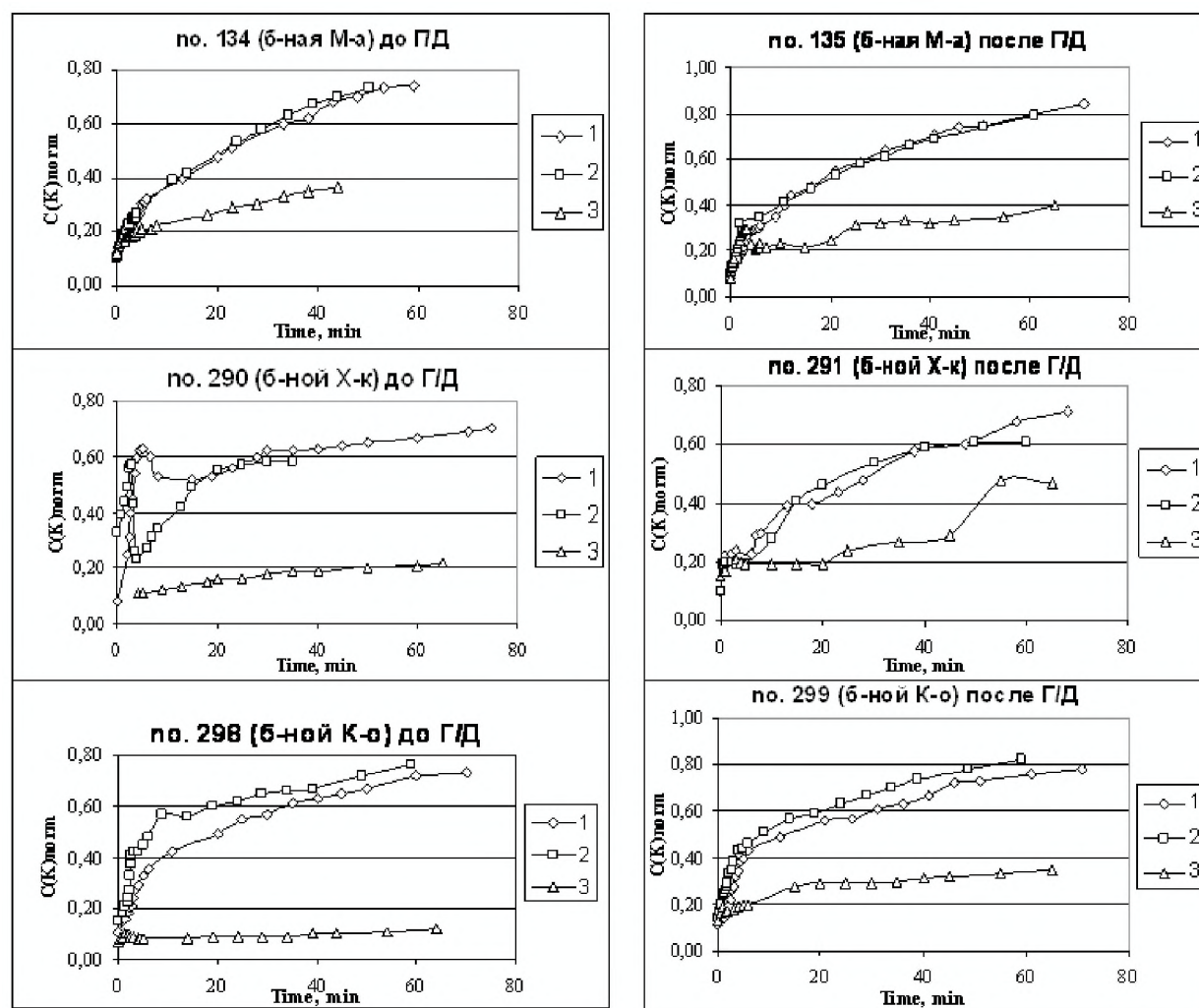


Рис.2. Кинетические зависимости изменения внеклеточной концентрации  $K^+$  при действии нистатина на эритроциты больных с ХПН, получающих терапию регулярным гемодиализом. По оси ординат:  $C(K)_{\text{норм}}$  – нормированная концентрация  $K^+$  во внеклеточной среде. По оси абсцисс: Time, min – время в минутах, прошедшее с момента внесения в рабочую пробу нистатина. 1 – при действии только нистатина; 2 – при действии нистатина с предварительной инкубацией с убаином; 3 – при ресуспендировании в аутологичной плазме и действии нистатина.

ло от индивидуальных особенностей эритроцитов и плазмы крови конкретного пациента гемодиализа. Однако к числу общих признаков таких зависимостей можно отнести немонотонность, чрезвычайно затрудняющую их динамическое сглаживание как функции времени. Такая особенность оказалась характерной именно для крови больных, получающих заместительную почечную терапию гемодиализом, по сравнению с эритроцитами и плазмой здоровых доноров. Поэтому расчет положения теоретических точек концентрации  $K^+$ , соответствующих отсутствию резистентного ответа плазматических мембран на внешнее действие каналоформера, оказался задачей трудновыполнимой.

Для оценки указанной резистентности эритроцитов по отношению к нистатину мы предложили использовать другой показатель, получивший описательное название «интегральный нормированный выход  $K^+$ », который рассчитывался следующим образом:

1. Нормировка внеклеточной концентрации  $K^+$ . Несмотря на то обстоятельство, что рабочие ячейки готовили стандартно, и количество эритроцитов в пробах одной серии было примерно одинаковым (в каждой ячейке определяли значение гематокрита), для нивелирования возникающих различий величину концентрации  $K^+$ , фиксируемую в каждый следующий момент, относили к конечному (лизисному) значению.

2. При определении «интегрального выхода  $K^+$ » вычисляли площадь области диаграммы, расположенную под кривой зависимости «нормированной концентрации  $K^+$ » от времени.

Для характеристики быстрых процессов рассчитывали «интегральный нормированный выход  $K^+$ » за 3 и 10 минут, прошедших с момента внесения в пробу нистатина. Для описания эффекта резистентности в целом более адекватными представлялись временные интервалы от 25-й до 35-й минуты от начала воздействия каналоформера и от 40-й до 45-й минуты (рис. 3).

Некоторая часть экспериментальных кривых носила инверсионный характер, в других же опытах инверсия временных концентрационных зависимостей не отмечалась [38]. Для оценки глубины или площади инверсии (фактически – непосредственной демонстрации функционирования активного притивогradientного транспорта) требуется построить виртуальный теоретический вариант кинетической кривой, отвечающий исключительно процессу пассивной диффузии ионов по нистатиновым каналам. Для этого мы попытались использовать прием линеаризации. Однако, ни при использовании сплайн-функции, ни функции степен-

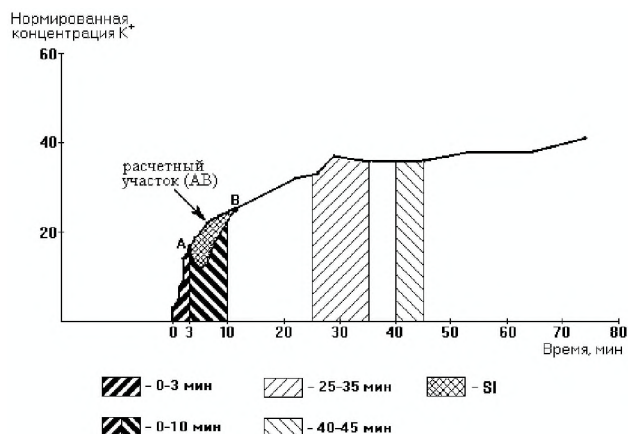


Рис.3. Определение интегрального нормированного выхода  $K^+$ . По оси абсцисс: время, мин – время в минутах, прошедшее с момента внесения в рабочую пробу нистатина.

ного многочлена удовлетворительный результат не был достигнут, в особенности для крайних участков кинетических кривых. Поэтому была разработана специальная компьютерная программа, позволяющая построить участок кривой между точками A и B (рис. 3), соответствующими моментам изменения знака производной  $S_{\text{норм},K^+} = f(t)$ . Местоположение точек A и B определялось для каждой экспериментальной кривой визуально. Теоретический участок кривой, расположенный между точками A и B, строился на основе координат этих точек.

Разность между площадями участка области диаграммы, расположенного под зависимостью, полученной расчетным путем, и участка под реальной опытной кривой  $S_{\text{норм},K^+} = f(t)$  и была определена как «площадь инверсии» (SI).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### ДЕЙСТВИЕ НИСТАТИНА НА ЭРИТРОЦИТЫ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

Величины интегрального нормированного выхода  $K^+$  при действии каналоформера нистатина на эритроциты контрольной группы здоровых доноров ( $n = 24$ ) представлены в табл. 1.

Во втором столбце приведены значения суммарного изменения внеклеточной концентрации  $K^+$  за первые 3 и первые 10 минут, в промежутках времени от 25-й до 35-й минуты, и от 40-й по 45-ю минуты от момента внесения нистатина в пробу. В третьем столбце для тех же временных интервалов внесены значения, полученные для ячейки, в которой отмытые от плазмы эритроциты, ресуспендированные в растворе Моргана, предварительно экспонировались с убаином в течение 10 минут. В столбце 4 – результаты экспериментов, в ходе которых в суспензию клеток, отмытых солевым раствором, добавляли аутологичную плазму.

Как следует из данных, представленных в табл.

**Интегральный нормированный выход калия для эритроцитов здоровых доноров ( $\bar{X} \pm m$ ; Медиана, min – max)**

| Показатель  | Доноры n = 24                           |                                         |                                        | t критерий<br>Стьюдента |
|-------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------|
|             | (Ny)                                    | (Ou + Ny)                               | (Pl + Ny)                              |                         |
| 0 – 3 мин   | 12,0 $\pm$ 1,1<br>12,1 (1,5-22,9)       | 14,6 $\pm$ 1,2<br>14,3 (1,6-30,5)*      | 4,7 $\pm$ 0,9<br>3,8 (0,4-21,2)*#      | p<0,0001                |
| 0 – 10 мин  | 89,0 $\pm$ 6,1<br>91,7 (34,4-140,4)     | 105,4 $\pm$ 5,6<br>106,6 (43,6-151,2) * | 39,9 $\pm$ 5,1<br>42,4 (7,0-88,6) *#   | p<0,0001                |
| 25 – 35 мин | 238,5 $\pm$ 12,1<br>249,7 (125,9-406,5) | 272,2 $\pm$ 9,4<br>282,3 (181,5-345,2)* | 96,8 $\pm$ 10,8<br>85,6 (25,5-227,9)*# | p<0,0001                |
| 40 – 45 мин | 125,3 $\pm$ 6,7<br>128,2 (65,5-209,5)   | 143,6 $\pm$ 4,9<br>148,4 (94,0-179,7) * | 50,2 $\pm$ 5,6<br>45,1 (9,2-115,3)*#   | p<0,0001                |
| SI          | 0,5 $\pm$ 0,5<br>0,0 (0,0-12,6)         | Не определяется<br>Не определяется      | 3,3 $\pm$ 2,9<br>0,0 (0,0-69,0)        | p=0,772                 |

Примечания: \* – величина достоверно отличается от значения интегрального нормированного выхода  $K^+$  для проб, в которые внесен только нистатин; # – величина достоверно отличается от значений интегрального нормированного выхода  $K^+$  для проб, в которые нистатин внесен после предварительной инкубации с убаином.

Здесь и далее: (Ny) – величины, полученные при действии на эритроциты только нистатина; (Ou+Ny) – величины, полученные при действии на эритроциты, предварительно инкубированные с убаином; (Pl+Ny) – величины, полученные при действии нистатина на эритроциты, ресуспендированные в аутологичной плазме крови.

1, в первые минуты после внесения нистатина в пробах, предварительно инкубированных с убаином, наблюдалось 18-20%-ное увеличение скорости выхода  $K^+$  по сформированным каналам, по сравнению с пробами, в которых отсутствовал специфический ингибитор  $Na^+, K^+$ -АТФазы. В дальнейшем различия между динамикой выхода  $K^+$  из эритроцитов и при наличии убаина в пробе, и без него уменьшались: для периода стабилизации транспортных процессов (25-35 мин с момента внесения ни-

сина в пробу) и в заключительной части фиксируемой кинетической зависимости (промежуток от 40-й до 45-й минуты) указанное превышение составляло 14%.  
Распределение величин интегрального нормированного выхода  $K^+$  для контрольной группы здоровых доноров является нормальным; проведенное сравнение по Стьюденту (попарно сопряженные коварианты) показало высокую достоверность описанных изменений.

Интенсивность выхода  $K^+$  из клеток, ресуспен-

дированных в модельном растворе Моргана, на всех этапах регистрируемой кинетической зависимости оказалась в 2,5 – 3 раза выше, чем эта же величина для проб, в которые добавляли плазму крови. Различия между зафиксированными интегральными величинами высоко достоверны. Протективные свойства нативной среды сказывались не только на увеличении общей резистентности мембран по отношению к внешнему воздействию каналоформера, но также и на величине «площади инверсии»,

то есть интегральной величины уменьшения нормированного ионного выхода при наличии инверсии на кривой в координатах « $C_{\text{норм } K^+} - f(t)$ ». В убаино-вых же пробах инверсия и вовсе не была зафиксирована. Однако дисперсия результатов здесь очень велика и различия недостоверны.

**ДЕЙСТВИЕ НИСТАТИНА НА ЭРИТРОЦИТЫ БОЛЬНЫХ ХПН, ПОЛУЧАЮЩИХ ЗАМЕСТИТЕЛЬНУЮ ТЕРАПИЮ РЕГУЛЯРНЫМ ГЕМОДИАЛИЗОМ**

В таблицах 2, 3 и 4 представлены результаты определения величин интегрального нормированного выхода  $K^+$  из эритро-

**Интегральный нормированный выход калия из эритроцитов здоровых доноров и эритроцитов пациентов гемодиализа до и после сеанса при действии нистатина ( $\bar{X} \pm m$ ; Медиана, min-max)**

| Показатель | Доноры n = 24<br>(Ny)                   | Пациенты n = 147                         |                                          | Критерий U<br>Манна-Уитни,<br>p                             |
|------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
|            |                                         | (Ny) <sub>до</sub>                       | (Ny) <sub>после</sub>                    |                                                             |
|            |                                         | 1                                        | 2                                        |                                                             |
| 0 – 3 мин  | 12,0 $\pm$ 1,1<br>12,1 (1,5-22,9)       | 23,0 $\pm$ 1,8<br>15,6 (0,1-120,5)       | 25,0 $\pm$ 2,4<br>14,7 (0,7-154,6)       | $p_{1,2} = 0,088$<br>$p_{1,3} = 0,059$<br>$p_{2,3} = 0,517$ |
| 0 – 10 мин | 89,0 $\pm$ 6,1<br>91,7 (34,4-140,4)     | 132,2 $\pm$ 8,4<br>104,9 (5,1-538,3)     | 141,2 $\pm$ 9,8<br>116,4 (10,5-774,5)    | $p_{1,2} = 0,147$<br>$p_{1,3} = 0,104$<br>$p_{2,3} = 0,532$ |
| 25–35 мин  | 238,5 $\pm$ 12,1<br>249,7 (125,9-406,5) | 312,7 $\pm$ 12,7<br>290,3 (44,1-741,5) * | 321,3 $\pm$ 13,7<br>330,0 (11,1-909,8) * | $p_{1,2} = 0,044$<br>$p_{1,3} = 0,008$<br>$p_{2,3} = 0,616$ |
| 40-45 мин  | 125,3 $\pm$ 6,7<br>128,2 (65,5-209,5)   | 177,0 $\pm$ 6,6<br>174,8 (2,8-396,2) *   | 182,6 $\pm$ 7,3<br>181,2 (9,8-472,5) *   | $p_{1,2} = 0,002$<br>$p_{1,3} = 0,001$<br>$p_{2,3} = 0,499$ |
| SI         | 0,5 $\pm$ 0,5<br>0 (0,0-12,6)           | 24,3 $\pm$ 4,6<br>0 (0,0-329,6) *        | 25,6 $\pm$ 6,8<br>0 (0,0-758,2) *        | $p_{1,2} = 0,006$<br>$p_{1,3} = 0,021$<br>$p_{2,3} = 0,635$ |

Примечания: \* – величина достоверно отличается от значения, полученного для эритроцитов доноров.

Здесь и далее: (Ny)<sub>до</sub> – величины, полученные при действии только нистатина на эритроциты, взятые до сеанса гемодиализа; (Ny)<sub>после</sub> – величины, полученные при действии только нистатина на эритроциты, взятые после сеанса гемодиализа.

**Интегральный нормированный выход калия из эритроцитов здоровых доноров и пациентов гемодиализа до и после сеанса при предварительной экспозиции с убаином и действии нистатина ( $\bar{X} \pm m$ ; Медиана, min-max)**

| Показатель  | Доноры n = 24<br>(Ou + Ny)       | Пациенты n = 147                 |                                   | Критерий U Манна-Уитни, p                                   |
|-------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------|
|             |                                  | (Ou+Ny) <sub>до</sub>            | (Ou+Ny) <sub>после</sub>          |                                                             |
|             |                                  | 1                                | 2                                 |                                                             |
| 0 – 3 мин   | 14,6±1,2<br>14,3 (1,6-30,5)      | 24,5±2,2<br>14,0 (0,2-165,9)     | 21,2±1,6<br>13,4 (2,1-94,8)       | $p_{1,2} = 0,676$<br>$p_{1,3} = 0,848$<br>$p_{2,3} = 0,116$ |
| 0 – 10 мин  | 105,4±5,6<br>106,6 (43,6-151,2)  | 136,6±9,4<br>101,9 (0,9-633,8)   | 128,4±8,3<br>105,2 (1,1-549,0)    | $p_{1,2} = 0,986$<br>$p_{1,3} = 0,931$<br>$p_{2,3} = 0,399$ |
| 25 – 35 мин | 272,2±9,4<br>282,3 (181,5-345,2) | 308,3±15,5<br>272,3 (10,1-898,6) | 309,2±14,4<br>166,7 (174,5-726,3) | $p_{1,2} = 0,982$<br>$p_{1,3} = 0,749$<br>$p_{2,3} = 0,689$ |
| 40 - 45 мин | 143,6±4,9<br>148,4 (93,9-179,7)  | 171,1±8,2<br>152,6 (0,0-493,0)   | 174,4±7,9<br>162,0 (0,0-505,3)    | $p_{1,2} = 0,536$<br>$p_{1,3} = 0,259$<br>$p_{2,3} = 0,839$ |
| SI          | 0<br>0                           | 23,5±5,1<br>0 (0,0-510,2) *      | 12,9±3,0<br>0 (0,0-283,5) *       | $p_{1,2} = 0,002$<br>$p_{1,3} = 0,018$<br>$p_{2,3} = 0,111$ |

Примечания: \* – величина достоверно отличается от значения, полученного для эритроцитов доноров.

Здесь и далее: (Ou+Ny)<sub>до</sub> – величины, полученные при действии нистатина на эритроциты, предварительно инкубированные с убаином, взятые до сеанса гемодиализа; (Ou+Ny)<sub>после</sub> – величины, полученные при действии нистатина на эритроциты, предварительно инкубированные с убаином, взятые после сеанса гемодиализа.

цитов больных ХПН, получающих лечение регулярным гемодиализом в сравнении с показателя-

у пациентов гемодиализа и до, и после сеанса величины 3-минутного выхода  $K^+$  в 2 раза, а 10-минутного – в полтора раза пре-

ми, зафиксированными для клеток здоровых доноров контрольной группы строго в тех же условиях эксперимента. В столбце 1 всех трех указанных таблиц приведены значения величин выхода  $K^+$  для контрольной группы, в столбце 2 – для пациентов гемодиализа до сеанса, а в столбце 3 – после него.

При действии нистатина на клетки, ресуспендированные в модельном растворе, с первых минут после внесения нистатина в пробу наблюдались значительные различия для эритроцитов доноров и пациентов диализа (см. табл. 2).

Однако следует отметить, что свойства клеток отдельных индивидуумов внутри группы больных существенно различались. Дисперсия здесь чрезвычайно велика и, несмотря на тот факт, что в среднем у пациентов гемодиализа и до, и после сеанса величины 3-минутного выхода  $K^+$  в 2 раза, а 10-минутного – в полтора раза превышали аналогичные показатели для контрольной группы, достоверность указанных различий отсутствовала.

На участке стабилизации кинетической зависимости в интервале от 25-й до 35-й минуты от момента внесения нистатина в пробу интегральный нормированный выход  $K^+$  у пациентов превышал соответствующие величины для здоровых доноров в 1,3-1,4 раза, и в данном случае различия в каналоформерной резистентности стали достоверными (312,7±12,73 и 321,3±13,65 против 238,5±12,12;  $p = 0,044$  и  $p = 0,008$  соответственно). То же можно сказать о значениях выхода  $K^+$  и в более отдаленный промежуток времени: от 40-й до 45-й минуты величины для клеток пациентов гемодиализа и до, и после сеанса дос-

**Интегральный нормированный выход калия из эритроцитов здоровых доноров и эритроцитов пациентов гемодиализа при ресуспендировании клеток в аутологичной плазме и действии нистатина ( $\bar{X} \pm m$ ; Медиана, min – max)**

| Показатель  | Доноры n = 24<br>(PI + Ny)     | Пациенты n = 114                  |                                | Критерий U Манна-Уитни, p                                   |
|-------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------|
|             |                                | (PI+Ny) <sub>до</sub>             | (PI+Ny) <sub>после</sub>       |                                                             |
|             |                                | 1                                 | 2                              |                                                             |
| 0 – 3 мин   | 4,7±0,9<br>3,8 (0,4-21,2)      | 12,3±1,5<br>6,2 (0,1-77,5) *      | 8,5±1,0<br>5,4 (0,0-77,5) *    | $p_{1,2} = 0,007$<br>$p_{1,3} = 0,024$<br>$p_{2,3} = 0,163$ |
| 0 – 10 мин  | 39,9±5,1<br>42,4 (7,0-88,6)    | 68,1±7,3<br>42,1 (1,4-500,9)      | 47,5±4,3<br>36,4 (0,7-342,6) # | $p_{1,2} = 0,322$<br>$p_{1,3} = 0,821$<br>$p_{2,3} = 0,014$ |
| 25 – 35 мин | 96,8±10,8<br>85,6 (25,5-227,9) | 153,0±12,2<br>121,5 (6,4-713,9) * | 124,7±8,4<br>95,2 (5,8-550,3)  | $p_{1,2} = 0,046$<br>$p_{1,3} = 0,277$<br>$p_{2,3} = 0,055$ |
| 40 - 45 мин | 50,2±5,6<br>45,1 (9,2-115,3)   | 88,7±6,7<br>67,5 (4,4-393,4) *    | 73,8±4,8<br>60,7 (3,2-303,4) * | $p_{1,2} = 0,004$<br>$p_{1,3} = 0,030$<br>$p_{2,3} = 0,063$ |
| SI          | 3,3±2,9<br>0,0 (0,0-69,0)      | 15,7±4,2<br>0,0 (0,0-313,0)       | 9,5±2,6<br>0,0 (0,0-147,5)     | $p_{1,2} = 0,118$<br>$p_{1,3} = 0,328$<br>$p_{2,3} = 0,203$ |

Примечания: \* – величина достоверно отличается от значения, полученного для эритроцитов здоровых доноров; # – величина достоверно различается до и после гемодиализа.

Здесь и далее: (PI+Ny)<sub>до</sub> – величины, полученные при действии нистатина на эритроциты, ресуспендированные в аутологичной плазме крови, взятые до сеанса гемодиализа; (PI+Ny)<sub>после</sub> – величины, полученные при действии нистатина на эритроциты, ресуспендированные в аутологичной плазме крови, взятые после сеанса гемодиализа.

товерно отличались от величин контрольной группы ( $177,0 \pm 6,6$  и  $182,6 \pm 7,3$  против  $125,3 \pm 6,7$ ;  $p=0,002$  и  $p=0,001$  соответственно).

Площадь инверсии при действии нистатина на эритроциты больных с терминальной ХПН значительно отличалась от соответствующего показателя у здоровых доноров: если в контрольной группе эта величина составляет всего лишь 0,5, то и до, и после диализа обращение кинетических зависимостей радикально изменяло общие интегральные характеристики выхода  $K^+$  из клеток. Что касается изменений, привнесенных самой гемодиализной сессией, то, несмотря на некоторое увеличение постдиализных показателей по сравнению с додиализными, достоверных различий между до- и постдиализными интегральными характеристиками не выявлено.

При предварительной инкубации эритроцитов с убаином – специфическим ингибитором  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазы (см. табл. 3), значения интегрального нормированного выхода калия, как и в случае действия на клетки только одного каналоформера для эритроцитов больных хронического гемодиализа в первые минуты после внесения нистатина в пробу, достоверно не отличались от величин, характеризующих контрольную группу, как до сессии, так и после нее. ( $24,5 \pm 2,2$  и  $21,2 \pm 1,6$  против  $14,6 \pm 8,2$  соответственно).

Хотя по средним величинам превышение и в дальнейшем составляло от 13 до 30%, но дисперсия оказалась весьма велика, и в области стабилизации изменений внеклеточных концентраций достоверности различий не наблюдалось (для интервала «25–35 мин» –  $308,3 \pm 15,5$  и  $309,2 \pm 14,4$  против  $272,2 \pm 9,4$  и для интервала «40–45 минут» –  $171,1 \pm 8,2$  и  $174,4 \pm 7,8$  против  $143,6 \pm 4,9$ ).

Достоверно отличались от характеристик контрольной группы только величины площади инверсии: так, если у здоровых доноров при действии нистатина на клетки, экспонированные с убаином, уменьшения внеклеточной концентрации  $K^+$  в ходе получасового наблюдения не зафиксировано (активный транспорт  $K^+$  внутрь клеток не осуществляется), то у больных ХПН как до, так и после сеанса диализа инверсия кинетических кривых оно оказалось достаточно значимым (в табл. 3:  $23,5 \pm 5,1$  и  $12,9 \pm 3,0$ ;  $p_{1,2} = 0,002$ ;  $p_{1,3} = 0,018$  соответственно). Несмотря на то, что в среднем постдиализная площадь инверсии почти в два раза меньше, чем додиализная, эти величины достоверно не различались.

Результаты экспериментов при действии нистатина на эритроциты, отмытые от плазмы солевым модельным раствором и в ней же ресуспен-

дированные, оказались принципиально иными по сравнению с полученными для исключительно солевых проб. Здесь за первые три минуты, прошедшие после внесения нистатина, интегральный выход  $K^+$  для эритроцитов гемодиализных больных превышал выход иона по сравнению с эритроцитами здоровых доноров в 2,6 раза до сеанса и почти в 1,8 раза после него. При этом зафиксированы достоверные различия величин, характеризующих контрольную группу и группу пациентов (в табл. 4:  $12,3 \pm 1,5$  против  $4,7 \pm 0,9$ ,  $p_{1,2} = 0,007$  и  $8,5 \pm 1,0$  против  $4,7 \pm 0,9$ ,  $p_{1,3} = 0,024$ ). Однако додиализные и постдиализные интегральные величины достоверно не отличались.

При оценке 10-минутных интегральных изменений следует отметить, что достоверные различия между характеристиками клеток здоровых доноров здесь не зафиксированы, и это несмотря на продолжающееся значительное превышение выхода  $K^+$  по сравнению с контрольными значениями (в 1,8 раза до сеанса гемодиализа и в 1,2 раза после процедуры:  $68,1 \pm 7,3$  и  $47,5 \pm 4,3$  против  $39,9 \pm 5,1$  соответственно). Однако наряду с этим, при определении интегральных изменений внеклеточных концентраций в ходе сеанса гемодиализа (додиализные  $68,1 \pm 7,3$  против постдиализных  $47,5 \pm 4,3$ )  $p_{2,3}$  оказалось равным 0,014.

Для области стабилизации процессов трансмембранного переноса ионов по нистатиновым каналам при ресуспендировании эритроцитов с добавлением аутологичной плазмы характерным оказалось значительное отличие в нормированном выходе  $K^+$  у больных перед гемодиализной процедурой по сравнению со здоровыми донорами на фоне отсутствия достоверной разницы по этому показателю между донорами и пациентами после сеанса, а при сравнении величин  $(PI+Nys)_{25-35 \text{ до}} = 153,0 \pm 12,2$  и  $(PI+Nys)_{25-35 \text{ после}} = 124,7 \pm 8,4$  (см. табл. 4)  $p_{2,3}$  оказалась равной 0,055.

В самой отдаленной части кинетической зависимости – через 45 минут от момента внесения нистатина в пробу, нормированный выход  $K^+$  достоверно отличался от величин, описывающих состояние мембран донорских эритроцитов ( $88,7 \pm 6,7$  против  $50,2 \pm 5,6$ ;  $p=0,004$  и  $73,8 \pm 4,8$  против  $50,2 \pm 5,6$ ;  $p=0,030$ ) и до сеанса, и после него, однако достоверной разницы между до- и постдиализными значениями интегральных ионных выходов не выявлено.

Что же касается площадей инверсии кинетических зависимостей при ресуспендировании клеток с добавлением аутологичной плазмы, то несмотря на значительную разницу в средних показателях (в силу весьма высокой дисперсии

Таблица 5

**Сравнительный анализ частоты встречаемости инверсии (в %) при действии только нистатина и при экспозиции с убаином на кривых зависимости « $C_{\text{нормК}^+}$  – время» для эритроцитов здоровых доноров и пациентов гемодиализа**

| Показатель | Доноры<br>n = 24 | Показатель                                                                 | Пациенты<br>n = 147     | Критерий<br>Фишера            |
|------------|------------------|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| (Ny)       | 4,2%             | (Ny) <sub>до</sub>                                                         | 26,9%                   | p=0,005                       |
| (Ou+Ny)    | 0%               | (Ny) <sub>после</sub><br>(Ou+Ny) <sub>до</sub><br>(Ou+Ny) <sub>после</sub> | 24,5%<br>31,3%<br>19,7% | p=0,030<br>p<0,001<br>p<0,001 |

результатов) достоверных различий ни между величинами, полученными для эритроцитов людей без почечной патологии, и пациентами гемодиализа, ни между до- и постдиализными пробами эритроцитов больных не зафиксировано.

**ЧАСТОТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРИСУТСТВИЯ ИНВЕРСИИ ДЛЯ КИНЕТИЧЕСКИХ ЗАВИСИМОСТЕЙ ИНТЕГРАЛЬНОГО НОРМИРОВАННОГО ВЫХОДА  $K^+$ .**

Данные по частоте наличия инверсии для кинетических зависимостей внеклеточной концентрации  $K^+$  приведены в табл. 5.

Из указанных данных следует, что при внешнем воздействии каналоформера на эритроциты больных, получающих терапию регулярным гемодиализом, интенсивное противодействие пассивной ионной диффузии по трансмембранным каналам и до, и после сеанса гемодиализа встречалось достоверно чаще, чем это наблюдалось при действии нистатина на клетки здоровых доноров (26,9% и 24,5% против 4,2%; p=0,005 и p=0,030 соответственно). В случае предварительной инкубации с убаином инверсия у здоровых доноров практически не встречалась вообще, тогда как в случае экспериментов с эритроцитами пациентов гемодиализа, взятыми до сеанса, она наблюдалась даже чаще, чем в опытах с «чисто нистатиновыми» пробами. Частота встречаемости процесса противогradientного транспорта в «убаиновых» пробах у больных хронического гемодиализа в десятки раз превышала таковую, наблюдающуюся у здоровых доноров. Напротив, для отмытых клеток, ресуспендированных с добавлением аутологичной плазмы, несмотря на численное преобладание инверсионных вариантов в случае проб с эритроцитами гемодиализных больных, взятыми как до, так и после процедуры гемодиализа, по сравнению со здоровыми донорами достоверных отличий не зафиксировано (22,1% и 15,9% против 8,3%; p=0,162 и p=0,526 соответственно) (табл. 6).

Таблица 6

**Сравнительный анализ частоты встречаемости инверсии (в %) при действии только нистатина и в присутствии аутологичной плазмы крови на кривых зависимости « $C_{\text{нормК}^+}$  – время» для эритроцитов здоровых доноров и пациентов гемодиализа**

| Показатель | Доноры<br>n = 24 | Показатель                                                                 | Пациенты<br>n = 113     | Критерий<br>Фишера            |
|------------|------------------|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| (Ny)       | 4,2%             | (Ny) <sub>до</sub>                                                         | 26,9%                   | p=0,005                       |
| (PI+Ny)    | 8,3%             | (Ny) <sub>после</sub><br>(PI+Ny) <sub>до</sub><br>(PI+Ny) <sub>после</sub> | 24,5%<br>22,1%<br>15,9% | p=0,030<br>p=0,162<br>p=0,526 |

**ЭФФЕКТОРЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ПО ОТНОШЕНИЮ К ВНЕШНЕМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ КАНАЛОФОРМЕРА НА МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ БОЛЬНЫХ С ХПН, ПОЛУЧАЮЩИХ ЗАМЕСТИТЕЛЬНУЮ ТЕРАПИЮ РЕГУЛЯРНЫМ ГЕМОДИАЛИЗОМ.**

В качестве эффекторов, изменяющих проницаемость клеточных мембран эритроцитов человека, модифицированных нистатином, мы рассмотрели убаин, компоненты нативной плазмы крови и эритропоэтин (рекомбинантный человеческий эритропоэтин – препарат Recormon). Результаты экспериментов представлены в таблицах 7 и 8.

Как следует из данных, представленных в таблицах 7 и 8, в описываемых сериях экспериментов в качестве реперных служили величины интегрального нормированного выхода  $K^+$ , полученные для опытов, в которых отмытые от плазмы солевым раствором Моргана и ресуспендированные в нем же клетки подвергались воздействию исключительно нистатина.

При оценке влияния на эритроциты специфического ингибитора  $Na^+, K^+$ -АТФазы убаина, в первую очередь, следует отметить, что ни до, ни после сеанса гемодиализа предварительная 10-минутная экспозиция клеток с этим эффектором не приводила к достоверным отличиям выхода  $K^+$  ни в первые минуты после внесения каналоформера (24,5±2,2 против 23,0±1,8 и 136,6±9,4 против 132,2±8,4, а также 21,2±1,6 против 25,0±2,4 и 128,±8,3 против 141,2±9,8) ни в области стабилизации кинетической зависимости (308,3±15,5 против 312,7±12,7, а также 309,2±14,4 против 321,3±13,7). По сравнению с экспериментами, проведенными на донорских эритроцитах, для которых, как следует из данных табл. 5, наблюдается достоверное увеличение внеклеточной концентрации  $K^+$  при внесении в пробу нистатина после предварительной экспозиции с убаином, здесь, наоборот, для «убаиновых» проб средние интегральные величины,

Таблица 7

**Влияние эффе́кторов на интегральный нормированный выход калия из эритроцитов  
до сеанса гемодиализа ( $\bar{X} \pm m$ ; Медиана, min-max)**

| Показатель  | (Ny) <sub>до</sub><br>n = 147    | (Ou + Ny) <sub>до</sub><br>n = 147 | (Pl + Ny) <sub>до</sub><br>n = 114 | (Erp + Ny) <sub>до</sub><br>n = 40 | Критерий<br>Фридмана |
|-------------|----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------|
| 0 – 3 мин   | 23,0±1,8<br>15,6 (0,1-120,5)     | 24,5±2,2<br>14,0 (0,2-165,9)       | 12,3±1,5<br>6,2 (0,1-77,5)*#       | 57,7±5,8<br>22,4 (0,0-159,0)*\$    | p<0,0001             |
| 0 – 10 мин  | 132,2±8,4<br>104,9 (5,1-538,3)   | 136,6±9,4<br>101,9 (0,9-633,8)     | 68,1±7,3<br>42,1 (1,4-500,9) *#    | 268,6±20,2<br>149,8 (0,0-663,7)*\$ | p<0,0001             |
| 25 – 35 мин | 312,7±12,7<br>290,3 (44,1-741,5) | 308,3±15,5<br>272,3 (10,1-898,6)   | 153,0±12,2<br>121,5 (6,4-713,9) *# | 468,9±22,0<br>408,3 (0,0-803,6)*\$ | p<0,0001             |
| 40 – 45 мин | 177,0±6,6<br>174,8 (2,8-396,2)   | 171,1±8,2<br>152,6 (0,0-493,0)     | 88,7±6,7<br>67,5 (4,4-393,4) *#    | 226,0±14,5<br>199,5 (0,0-598,5)\$  | p<0,0001             |
| SI          | 24,3±4,6<br>0,0 (0,0-329,6)      | 23,5±5,1<br>0,0 (0-510,2)          | 15,7±4,2<br>0,0 (0,0-313,0)        | 36,1±11,9<br>0,0 (0,0-294,4)       | p=0,327              |

Примечания: \* – величина достоверно отличается от значения интегрального нормированного выхода K<sup>+</sup>, полученного при действии только нистатина; # – величина достоверно отличается от значения интегрального нормированного выхода K<sup>+</sup> для проб, в которые нистатин внесен после предварительной инкубации с убаином; \$ – величина достоверно отличается от значения интегрального нормированного выхода K<sup>+</sup> при действии нистатина на эритроциты, ресуспендированные в аутологичной плазме.

Здесь и далее: (Erp+Ny)<sub>до</sub> – величины, полученные при действии нистатина на эритроциты при предварительной инкубации с эритропозтином, взятые до сеанса гемодиализа.

наблюдающиеся для эритроцитов больных после сеанса гемодиализа, были даже несколько ниже, чем для «безубаиновых» ячеек, а в случае «до-диализных» проб практически совпадали.

При ресуспендировании отмытых эритроцитов, взятых у пациентов гемодиализа, с добавлением аутологичной плазмы, в данном случае рассматриваемой в качестве эффе́ктора, при последующем воздействии на мембраны нистатина, как и в случае опытов с донорскими клетками, подвергаемыми такой же процедуре, выход K<sup>+</sup> во внеклеточную среду в значительной степени нивелировался. Все величины, характеризующие интегральный нормированный выход K<sup>+</sup> – и в «додиализном» варианте, и в «последдиализном», достоверно отлича-

лись от значений, полученных для проб, где отмытые от плазмы и ресуспендированные в растворе Моргана клетки подвергались воздействию исключительно нистатина. Однако здесь присутствовали и некоторые различия в кинетике процессов: так, если до сеанса гемодиализа изменение внеклеточной концентрации K<sup>+</sup> в первые минуты после внесения нистатина в пробу в присутствии аутологичной плазмы составляло 50–53% от значений, зафиксированных для проб с солевым раствором (12,3±1,5 по отношению к 23,0±1,8; p<0,0001), то после процедуры соотношение интегральных величин снизилось до 34% (8,5±1,0 по отношению к 25,0±2,4; p<0,0001). В отдаленных временных областях значения несколько сближались: если до

Таблица 8

**Влияние эффе́кторов на интегральный нормированный выход калия из эритроцитов  
после сеанса гемодиализа ( $\bar{X} \pm m$ ; Медиана, min-max)**

| Показатель  | (Ny) <sub>после</sub><br>n = 147 | (Ou + Ny) <sub>после</sub><br>n = 147 | (Pl + Ny) <sub>после</sub><br>n = 114 | (Erp + Ny) <sub>после</sub><br>n = 40 | Критерий<br>Фридмана |
|-------------|----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| 0 – 3 мин   | 25,0±2,4<br>14,7 (0,7-154,6)     | 21,2±1,6<br>13,4 (0,1-94,8)           | 8,5±1,0<br>5,4 (0,0-77,5) *#          | 54,5±4,5<br>43,6 (0,9-163,9)*#\$      | p<0,0001             |
| 0 – 10 мин  | 141,2±9,8<br>116,4 (10,5-774,5)  | 128,4±8,3<br>105,2 (1,1-549,0)        | 47,5±4,3<br>36,4 (0,7-342,6) *#       | 261,3±12,7<br>189,3 (9,2-648,1) *#\$  | p<0,0001             |
| 25 – 35 мин | 321,3±13,7<br>330,0 (11,1-909,8) | 309,2±14,4<br>166,7 (174,5-26,3)      | 124,7±8,4<br>95,2 (5,8-550,3) *#      | 481,3±16,0<br>435,6 (50,3-831,1) *#\$ | p<0,0001             |
| 40 – 45 мин | 182,6±7,3<br>181,2 (9,8-472,5)   | 174,4±7,9<br>162,0 (0,0-505,3)        | 73,8±4,8<br>60,7 (3,2-303,4) *#       | 222,9±15,2<br>170,8 (41,7-438,6)\$    | p<0,0001             |
| SI          | 25,6±6,8<br>0 (0,0-758,2)        | 12,9±3,0<br>0 (0,0-283,5)             | 9,5±2,6<br>0 (0,0-147,5)              | 27,2±12,3<br>0 (0,0—369,6)            | p=0,224              |

Примечания: \* – величина достоверно отличается от значения интегрального нормированного выхода K<sup>+</sup>, полученного при действии только нистатина; # – величина достоверно отличается от значения интегрального нормированного выхода K<sup>+</sup> для проб, в которые нистатин внесен после предварительной инкубации с убаином; \$ – величина достоверно отличается от значения интегрального нормированного выхода K<sup>+</sup> при действии нистатина на эритроциты, ресуспендированные в аутологичной плазме.

Здесь и далее: (Erp+Ny)<sub>после</sub> – величины, полученные при действии нистатина на эритроциты при предварительной инкубации с эритропозтином, взятые после сеанса гемодиализа.

диализа интегральный нормированный выход  $K^+$  от 25-й до 35-й минуты при использовании аутологичной плазмы при ресуспендировании составлял около 50% от величины, характеризующей чисто солевые пробы ( $153,0 \pm 12,2$  по отношению к  $312,7 \pm 12,7$ ), то постдиализные величины соотношения интегральных изменений внеклеточной ионной концентрации уменьшались до 40% ( $124,7 \pm 8,4$  по отношению к  $321,3 \pm 13,7$ ).

Прямое действие эритропоэтина как клеточного эффектора принципиально отличалось от действия и убаина, и компонентов нативной плазмы. При предварительной 10-минутной экспозиции клеток с рекормоном и последующем внесении нистатина интегральный нормированный выход  $K^+$  в первые минуты после добавления каналоформера возрастал в 2–2,5 раза перед диализом и в 1,8–2,2 раза после сеанса по сравнению с исключительно нистатиновыми пробами ( $57,7 \pm 5,8$  против  $23,0 \pm 1,8$ ,  $268,6 \pm 20,2$  против  $132,2 \pm 8,4$  и  $54,5 \pm 4,5$  против  $25,0 \pm 2,4$ ,  $261,3 \pm 12,7$  против  $141,2 \pm 9,8$ ;  $p < 0,0001$ ). В области же стабилизации кинетических зависимостей такие различия пропадали: интегрированный выход иона в период от 25-й до 35-й минуты, и с 40-й по 45-ю минуту в обоих случаях (и до, и после процедуры) составил 150% и 120% в «эритропоэтиновых» пробах по сравнению с «чисто нистатиновыми» соответственно ( $468,9 \pm 22,0$  против  $312,7 \pm 12,7$ ,  $226,0 \pm 14,5$  против  $177,0 \pm 6,6$  и  $481,3 \pm 16,0$  против  $321,3 \pm 13,7$ ,  $222,9 \pm 15,2$  против  $182,6 \pm 7,3$ ;  $p < 0,0001$ ). Следует отметить, что все различия между обсуждаемыми величинами высоко достоверны.

В отношении площади инверсии кинетических зависимостей следует отметить, что, несмотря на значительную разницу между средними величинами при действии эффекторов облегченного канального транспорта  $K^+$ , ни до, ни после сеанса достоверных отличий не выявлено.

## ОЦЕНКА РАЗНОСТНЫХ ДОДИАЛИЗНЫХ И ПОСЛЕДИАЛИЗНЫХ ВЕЛИЧИН ИНТЕГРАЛЬНОГО НОРМИРОВАННОГО ВЫХОДА $K^+$ .

Особый интерес представляет сравнение разностных величин интегрального нормированного выхода  $K^+$  при ресуспендировании эритроцитов в растворе Моргана и интегрального нормированного выхода  $K^+$  при ресуспендировании клеток с добавлением аутологичной плазмы крови (см. табл. 9), поскольку именно эти переменные характеризуют состояние отмытой плазматической мембраны без нативного окружения и состояние мембраны, взаимодействующей с активными компонентами естественной среды пребывания эритроцита. Изменения, происходящие во время диализной процедуры, тем более важны, поскольку они отражают модификации поверхностных слоев при движении по экстракорпоральной системе кровообращения и взаимное влияние трансформированных молекул, находящихся на внешней поверхности, и «очищенного» в процессе детоксикации комплексов веществ жидкой фазы.

За первые три минуты, прошедшие с момента внесения в ячейку нистатина, указанная разностная величина после сеанса гемодиализа оказалась в 1,7 раза выше, чем до процедуры. Однако данные различия недостоверны. В дальнейшем, за 10 мин ( $79,0 \pm 11,0$  против  $50,7 \pm 10,0$ ), в периоды с 25-й по 35 минуту ( $172,5 \pm 14,6$  против  $134,9 \pm 15,3$ ), и с 40-й по 45-ю минуту ( $97,2 \pm 8,2$  против  $75,3 \pm 8,0$ ) с момента внесения нистатина в пробу, рассматриваемые отношения оказались достаточно высокими (они составили 150 – 130%) и значимыми.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты оценки резистентности эритроцитов здоровых доноров по отношению к внешнему воздействию каналоформера всецело подтвердили адекватность выбранного показателя «интегральный нормированный выход калия».

При анализе изменений внеклеточной концентрации иона в соответствии с величинами коэффициентов диффузии через модифицированную клеточную мембрану показано, что в случае предварительной инкубации суспензии эритроцитов с убаином рост внеклеточной концентрации  $K^+$  при последующем воздействии нистатина происходит более интенсивно по сравнению с пробами, неэкспонированными с этим специфическим ингибитором  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазы. Большее значение коэффициента диффузии в

**Разности интегральных нормированных выходов калия при действии нистатина на отмытые эритроциты, ресуспендированные в солевом растворе Моргана и в аутологичной плазме, до и после сеанса гемодиализа ( $\bar{X} \pm m$ ; Медиана, min-max)**

| Показатель  | $(Ny)_{до} - (Pl+Ny)_{до}$                 | $(Ny)_{после} - (Pl+Ny)_{после}$           | Критерий Уилкоксона z (p) |
|-------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------|
| 0 – 3 мин   | $7,1 \pm 2,1$<br>4,6 (-61,6 – 77,9)        | $12,6 \pm 2,3$<br>6,9 (-43,3 – 152,2)      | -1,75 (0,80)              |
| 0 – 10 мин  | $50,7 \pm 10,0$<br>34,1 (-439,1 – 413,2)   | $79,0 \pm 11,0$<br>57,7 (-217,3 – 769,5)   | -2,02 (0,043)             |
| 25 – 35 мин | $134,9 \pm 15,3$<br>137,5 (-525,7 – 543,5) | $172,5 \pm 14,6$<br>172,2 (-283,4 – 666,8) | -2,47 (0,014)             |
| 40 – 45 мин | $75,3 \pm 8,0$<br>78,1 (-251,9 – 311,5)    | $97,8 \pm 8,2$<br>96,4 (-187,4 – 395,7)    | -2,43 (0,015)             |

Таблица 9

случае инкубации с убаином, по-видимому, является следствием частичного или даже полного ингибирования убаин-чувствительной компоненты активного транспорта. Как уже обсуждалось, убаин не препятствует процессу инактивации нистатиновых каналов: латеральная диффузия, являющаяся единственным механизмом затекания пор на границе различных типов упаковок фосфолипидных цепей, при организации трансмембранного неселективного дефекта не блокируется [38]. Следует отметить, что ингибирование активного транспорта становится более заметным при регистрации быстрых процессов, то есть в начальный период изменения внеклеточной концентрации  $K^+$  после внесения в среду нистатина. По-видимому, снижение скорости переноса ионов при нарушении целостности гидрофильных структур несколько запаздывает во времени по сравнению с взаимодействием специфического ингибитора с калиевым сайтом  $Na^+, K^+$ -АТФазы. «Площадь инверсии» при наличии в пробе убаина равна нулю, что вполне соответствует теоретическим представлениям. Стабилизация мембран эритроцитов, выражающаяся в почти трехкратном уменьшении динамики нарастания внеклеточной концентрации  $K^+$  в случае добавления в ячейку аутологичной плазмы по сравнению с чисто «солевыми» пробами, скорее всего говорит об усилении в ее присутствии противодействия нативного гликокаликсного покрытия клеточной мембраны процессу каналообразования. С учетом чрезвычайно высокой скорости взаимодействия нистатина с мембраной эритроцита («посадки») и отсутствием его десорбции можно говорить не о нарушении связывания антибиотика, а о нерегулярности стерического расположения гидрофильных кластеров, которые впоследствии могли бы образовать ионный тоннель. Если на поверхности клеток, отмытых от плазмы солевым раствором Моргана и в нем же ресуспендированных, различные гликозилированные производные претерпевают неупорядоченные конформационные изменения, то при взаимодействии с белками и липопротеиновыми комплексами нативной плазмы они формируют протяженные полимерные правильно организованные отрицательно заряженные структуры. Именно поэтому ресуспендирование в аутологичной плазме осложняет процесс построения системы связей между молекулами нистатина и холестерина и уменьшает вероятность образования чередующейся последовательности стеринового и полиенового компонентов.

В отношении процессов, противодействующих транспорту ионов по сформированным нистатиновым каналам в соответствии с градиентами их

концентраций, можно утверждать, что их вклад в общую кинетическую картину становится более ощутимым в отдаленной, стабилизированной части зависимости. Интегральный нормированный выход калия для ячеек с нативной плазмой в первые три минуты после внесения нистатина составляет примерно 40% от его величины, измеренной для проб с эритроцитами, ресуспендированными в солевом растворе; в дальнейшем он достигает 45%. Весьма вероятно, что наибольший вклад диффузионной составляющей в кинетическую зависимость фиксируется именно в момент окончания формирования нистатиновых каналов. Процессы инактивации каналов и, возможно, активного транспорта «включаются» несколько позднее. В области 25–35 минут от момента внесения нистатина в пробу выход калия в опытах с плазмой вновь снижается до первоначального уровня, а поскольку указанное выше соотношение уже не меняется вплоть до окончания эксперимента, можно говорить о некотором «равновесии сил» в анализируемой системе.

Как следует из данных, приведенных в табл. 2–4, выход калия из эритроцитов у пациентов, получающих почечную заместительную терапию регулярным гемодиализом, при формировании в мембранах нистатиновых каналов, оказался в целом выше, чем у здоровых доноров; однако достоверные отличия, как было отмечено, обнаруживаются только в отдаленной, стабилизированной области экспериментальной кинетической зависимости. В области же быстрых процессов – первых минут после внешнего действия каналоформера, хотя различия в интегральном выходе калия и имеют такую же направленность, разброс данных весьма велик. Таким образом, формирование каналов в мембранах эритроцитов пациентов и в количественном, и в качественном отношении – чрезвычайно неоднородный процесс, поскольку качество билипидного мембранного слоя имеет значительные различия у разных индивидуумов. В целом же увеличение интегрального нормированного выхода калия из эритроцитов пациентов гемодиализа по сравнению со здоровыми донорами свидетельствует о сниженной резистентности мембранных систем по отношению к действию нистатина. На фоне интенсивного образования самих каналов, по-видимому, у больных снижается эффективность и систем активного транспорта и, что особенно важно, не реализуется в полной мере процесс самозалечивания мембран, т.е. замедляется инактивация каналов. Следует особо отметить, что при ресуспендировании эритроцитов в солевом растворе в условиях, когда клетки не подвергаются

воздействию нативных компонентов плазмы крови различий между додиализным и последиализным интегральным выходом калия нет.

Особый интерес вызывают результаты, полученные при инкубации отмытых от плазмы эритроцитов больных ХПН с убаином (см. табл. 3). Если при действии на клетки только нистатина интегральный нормированный выход калия у пациентов гемодиализа выше, чем у здоровых доноров, то при предварительном экспонировании с убаином достоверные различия в этом показателе не обнаруживаются. Как уже сообщалось выше, при блокировании активного транспорта у здоровых доноров выход калия из эритроцитов по сформированным нистатиновым каналам возрастал, а у пациентов гемодиализа в «убаиновых» пробах отмечалось даже некоторое его снижение по сравнению с «безубаиновыми». Более того, и до, и после сеанса гемодиализа площадь инверсии в случае применения убаина отлична от нуля. Таким образом, активный транспорт  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в данных условиях полностью не блокируется. Вполне возможно также, что в условиях хронического клеточного стресса, возникающего на фоне регулярного гемодиализа, не происходит ожидаемое снижение активности других видов транспорта ионов  $\text{K}^+$ , например  $\text{K}^+/\text{H}^+$ .

Для полноты проявления ионтранспортирующей функции  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -насоса необходимым условием является сохранение полноценной четвертичной структуры молекулы фермента [39]. Продолжительная уремическая интоксикация может приводить к изменению нормального количественного соотношения молекулярных форм  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, различающихся по чувствительности к убаину, а регулярные сеансы интенсивной экстракорпоральной детоксикации – к изменению сродства убаина к связывающему центру, находящегося в составе б-субъединицы фермента, к ингибитору. Наконец, образование малонового альдегида – продукта перекисного окисления формирующих бислой мембраны фосфолипидов, появление полиморфных валентных сшивок – спутников процессов полимеризации и поликонденсации и оснований Шиффа, формирование участков «повышенной гидрофильности» при включении кислорода в углеводородные цепи, и некоторые другие явления значительно изменяют локальное окружение  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы. Чувствительность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -насоса к убаину напрямую зависит от липидного состава выделенного участка мембраны. Однако события, приведенные выше, не дают полного объяснения парадоксальному снижению интегрального выхода калия в «убаиновых» пробах по сравнению с «безубаиновыми».

В этой связи имеются основания предполагать, что при локальной модификации поверхностной архитектоники, в том числе вследствие изменения заряда и стерических трансформаций, некоторые участки билипидного слоя становятся доступными для встраивания в них молекул убаина, в составе которых – стерановая группировка. Возможным результатом указанных процессов может явиться некоторая стабилизация бислоя, в результате чего действие убаина в отношении утечки  $\text{K}^+$  по каналам, сформированным нистатином, и является парадоксальным.

Отсутствие достоверных различий между додиализными и постдиализными величинами площади инверсии свидетельствует лишь о слишком большой вариабельности этой характеристики.

При ресуспендировании отмытых эритроцитов с добавлением аутологичной плазмы крови кинетическая картина совершенно иная. Присутствие нативных компонентов плазмы увеличивает резистентность мембран эритроцитов по отношению к внешнему действию каналоформера и приводит к снижению интегрального нормированного выхода калия даже в додиализных пробах почти в два раза для коротких процессов, и более чем в два раза – для отдаленных областей, по сравнению с «чисто солевыми» пробами (см. табл. 4). Следовательно, плазма крови, даже имеющая в своем составе токсические компоненты, создает на поверхности эритроцитарной мембраны некое подобие «барьера», препятствующего интенсивному образованию нистатиновых каналов. Такой своеобразный «барьер» у здоровых доноров достоверно эффективнее в первые 3 минуты после внесения нистатина, чем у больных, как до сеанса гемодиализа, так и после него. В последующий же период, когда в общую кинетическую картину включаются активный транспорт ионов и процесс инактивации каналов, различия уже не столь значимы. Последний факт, по-видимому, означает, что у пациентов мембранопротекторные процессы начинают действовать в разные моменты времени и с различной интенсивностью. Достоверное изменение выхода калия во внеклеточную среду, впервые проявившееся за время сеанса гемодиализа, с наибольшей вероятностью указывает на присутствие в плазме крови эндогенных ингибиторов  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -насоса, которые удаляются в ходе гемодиализной сессии. Вполне вероятно, что параллельно происходит и активация self-treatment'a. Запуск и интенсификация репаративных процессов приводит к очевидной стабилизации мембраны, что становится особенно заметным в отдаленной части кинетической зависимости: додиализное значение выхода калия от 25-й

до 35-й минуты с момента внесения в пробу нистатина у пациентов более, чем на 50% превышало его величину для доноров (и эти различия значимы!), а соответствующие последиализные значения у пациентов и доноров достоверно не различались.

При сопоставлении данных, полученных при ресуспендировании отмытых эритроцитов с добавлением аутологичной плазмы с параметрами, характеризующими мембранный статус эритроцитов, находящихся в солевом растворе, разнонаправленность изменений, происходящих в ходе диализной сессии, становится очевидной. Если при действии нистатина на эритроциты, ресуспендированные в растворе Моргана, после сеанса диализа интегральный выход калия несколько увеличивался, что, вероятно, является следствием изменений поверхности клеточных мембран при движении крови по экстракорпоральным магистралям через диализатор, то при ресуспендировании в плазме уменьшение указанной величины является результатом включения высокоинтенсивных превентивных процессов, препятствующих облегченной диффузии ионов по сформированным каналам. Последние сформулированные положения дают возможность представить разность  $\Delta = \text{ИНВК}_{\text{Nys}} - \text{ИНВК}_{\text{Pl+Nys}}$  (ИНВК – интегральный нормированный выход  $\text{K}^+$ ) в качестве характеристики влияния диализа на мембранный билипидный слой. Различия между указанными величинами  $\Delta$ , полученными до сеанса и после него, значимы почти для всех областей кинетической зависимости, но поскольку отношение  $\Delta' = (\Delta_{\text{после}} - \Delta_{\text{до}}) / \Delta_{\text{после}}$  уменьшается от 0,42 для первых трех минут с момента внесения нистатина в пробу до 0,22 для последнего этапа эксперимента, по всей видимости, можно утверждать, что именно стабилизирующая функция компонентов очищенной в ходе диализной сессии плазмы крови играет наиболее важную роль в резистентном ответе клеток на внешнюю агрессию каналоформера. Снижение числа полноценно сформированных нистатиновых каналов и в дальнейшем дает возможность мембране привлечь к защите своей целостности все доступные ресурсы, в том числе и энергетические. Следует отметить, что последнее утверждение справедливо не для всех пациентов: при общем увеличении площади инверсии по сравнению с ее величинами, полученными для контрольной группы, вариабельность данных очень велика и достоверных различий между глубиной инверсии для клеток, полученных от пациентов гемодиализа, и эритроцитов здоровых доноров, не найдено.

Сравнительно неожиданными оказались результаты экспериментов, в которых действию ни-

статина предшествовала экспозиция эритроцитов пациентов, получающих заместительную почечную терапию, с рекомбинантным человеческим эритропоэтином. В настоящее время обсуждается непосредственный эффект этого стимулятора эритропоэза как промоутера оксидативного стресса [40, 41]. По всей видимости, иначе трудно объяснить столь значительное увеличение интегрального выхода калия в присутствии эритропоэтина по сравнению с опытами, где использовался только каналоформер: при быстрых процессах превышение более чем двукратное, а в отдаленных областях – полуторное. Это означает, что наибольший эффект препарата наблюдается при формировании каналов. Взаимодействие пептидных цепей эритропоэтина с ионогенными группами, находящимися на поверхности клетки, приводит к модификации и открытых липопротеиновых участков мембраны, делая их более доступными для гидрофобных группировок молекулы антибиотика. Процесс инактивации в присутствии эритропоэтина протекает с меньшей интенсивностью, чем при действии на эритроциты только нистатина. Пока остается дискуссионным вопрос о вкладе в общую кинетическую картину эксперимента противогradientного транспорта. Но, по крайней мере, известно, что после проведения курса терапии рЭПО активность  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы уменьшалась [42]. Однако, поскольку лечение эритропоэтином достаточно длительно, гормон может быть воспринят клеточными анаболическими системами как промежуточное звено в цепи репрессии при синтезе новых единиц не только  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, но и других ионных переносчиков, таких, как  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$ -транспортеров, а также анионных транспортных систем. При данном варианте уменьшение ионтранспортирующей способности последних вследствие индуцированного окислительного стресса может ослабить позитивный эффект элиминации уремических токсинов при диализе. Безусловно, в ограниченных временных рамках кинетического эксперимента описанное воздействие рЭПО вряд ли реализуется, однако совершенно очевидно, что это высокоэффективное лекарственное средство, являющееся препаратом выбора при коррекции анемии в процессе лечения больных с ХПН регулярным гемодиализом, перитонеальным диализом, гемофильтрацией и т.д., в высоких концентрациях становится сильным клеточным ядом. Таким образом, приведенные результаты могут служить дополнительным косвенным аргументом в пользу применения эритропоэтина в малых дозах при выборе алгоритма лечения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основными тестами, характеризующими состояние плазматических мембран, в настоящее время являются: кислотный гемолиз эритроцитов по Терскову-Гительзону, осмотический гемолиз по Идельсону и ультразвуковой гемолиз. Однако предложенный в нашей работе новый показатель – «интегральный нормированный выход  $K^+$ » при внешнем воздействии каналаформера вполне может претендовать на полноправное членство в данном клинко-лабораторном ряду, поскольку позволяет оценить состояние билипидного слоя мембраны в целом в различных условиях существования эритроцитов и при действии на их мембрану разных по своей природе веществ.

Весьма значимые различия в величинах интегрального нормированного выхода  $K^+$  для эритроцитов здоровых доноров и больных с ХПН, получающих лечение регулярным гемодиализом, что говорит о кардинальных изменениях липидного бислоя мембраны при прогрессировании ХБП. Особенно показательными в смысле демонстрации таких трансформаций, происходящих с мембранными компонентами, представляются эксперименты, включающие в себя предварительную экспозицию клеток с убаином. Наблюдающееся парадоксальное уменьшение выхода  $K^+$  из эритроцитов при формировании нистатиновых каналов в присутствии этого эффектора указывает на наличие иного механизма взаимодействия убаина с плазматической мембраной кроме непосредственного ингибирования  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазы.

Важным представляется и выявление протективных свойств плазмы крови. Взаимодействие пограничных поверхностных слоев клеточной мембраны даже с уремической, но все же нативной средой приводит к значительному росту резистентности эритроцитов к внешней агрессии каналаформера. Качественная детоксикация радикально повышает указанную резистентность.

В целом «интегральный нормированный выход  $K^+$ » является новым и достаточно информативным клинко-лабораторным показателем для оценки качества клеточных мембран у больных, получающих заместительную почечную терапию хроническим гемодиализом.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Maher P, Singer SJ. Structural changes in membranes produced by the bindings of small amphiphilic molecules. *Biochemistry* 1984; 23: 232-240
2. Красильников ОВ, Сабиров РЗ, Терновский ВИ. Белки, ионные каналы и регуляция транспорта ионов в мембранах. Фан, Ташкент, 1991; 21-23
3. Бессонова СВ, Азимов РР, Сабиров РЗ. Формирова-

ние теней в постлитической стадии коллоидно-осмотического лизиса человеческих эритроцитов. *Биологические мембраны* 2002; 19 (3): 221-227

4. Hauser H, Phillips MC, Stubbs M. Ion permeability of phospholipid bilayers. *Nature* 1972; 239: 342-344

5. Овчинников ЮА, Иванов ВТ, Шкроб АМ *Мембраноактивные комплексоны*. Наука, М., 1974; 350-352

6. Palmer LG, Andersen OS. Interactions of amiloride and small monovalent cations with the epithelial sodium channel. Inferences about the nature of the channel pore. *Biophys J* 1989; 55: 779-787

7. Perozo E, Cortes DM, Cuello LG. Structural rearrangements underlying  $K^+$ -channel activation gating. *Science* 1999; 285: 73-78

8. Canessa CM, Merillat AM, Rossier BC. Membrane topology of the epithelial sodium channel in intact cells. *Am J Physiol* 1994; 267: 1682-1690

9. Cottrel GA. The first peptide-gated ion channel. *J Exp Biol* 1997; 200: 2377-2386

10. Poet M, Tauc M, Lingueglia E et al. Exploration of the pore structure of a peptide-gated  $Na^+$ -channel. *EMBO J* 2001; 20 (20): 5595- 5602

11. Шагина ЛВ, Каулин ЮА, Фейгин АМ и др. Зависимость свойств ионных каналов, образованных антибиотиком сирингомицином Е в липидных бислоях, от концентрации электролита в водной фазе. *Биологические мембраны* 1998; 15 (4): 433-446

12. Гелетюк ВИ, Казаченко ВН. *Кластерная организация ионных каналов*. Наука, М., 1990; 2-186

13. Kaulin YuA, Schagina LV, Bezrukov SM et al. Cluster organization of ion channels formed by the antibiotic syringomicin E in bilayer lipid membranes. *Biophys J* 1998; 74: 2918-2925

14. Малев ВВ, Каулин ЮА, Гурьев ФА и др. Кинетика открывания – закрывания каналов, образованных сирингомицином Е в липидных бислоях. *Биологические мембраны* 2000; 17 (6): 653-665

15. Agner G, Kaulin YA, Schagina LV et al. Effect of temperature on the formation and inactivation of syringomycin pores in red blood cells and bimolecular lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1466: 79-86

16. Szabo Z, Grof P, Schagina LV et al. Syringotoxin pore formation and inactivation in human red blood cell and model bilayer lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1567: 143-149

17. Гурьев ФА, Каулин ЮА, Такемото Д и др. Роль заряда и дипольного момента мембранных липидов в воротных свойствах ионных каналов, индуцируемых сирингомицином Е. *Биологические мембраны* 2002; 19 (3): 243-249

18. Malev VV, Schagina LV, Gurnev PA et al. Syringomycin E channel: a lipidic pore stabilized by lipopeptide? *Biophys J* 2002; 82: 1985-1994

19. Schagina LV, Gurnev PA, Takemoto JY, Malev VV. Effective gating charge of ion channels induced by toxin syringomycin E in lipid bilayers. *Bioelectrochem* 2003; 5776: 1-7

20. Sung S-S, Jordan PC. Why is gramicidin valence selective? *Biophys J* 1987; 51: 661-672

21. Urry DW, Goodall MC, Glickson JD, Mayers DC. The gramicidin A transmembrane channel: characteristics of head to head dimerized p (L, D) helices. *Proc Nat Acad Sci USA* 1971; 68: 1907-1911

22. Tosteson DC, Holmes SJ, Rasin M et al. Melittin lysis of red cells. *J Membrane Biol* 1985; 87: 35-44

23. Blasko K, Shagina LV, Grinfeldt AE, Lev AA. The dependence of tracer-determined permeability coefficients of gramicidin A treated red blood cell membranes and lipid bilayers on the ionic composition of the media. *Bioelectrochem Bioenerg* 1988; 19: 127-135

24. Shagina LV, Blasko K, Grinfeldt AE et al. Cholesterol dependent gramicidin A channel inactivation in red blood cell membranes and lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* 1989; 978: 145-150

25. Шагина ЛВ. Взаимодействие ионных потоков при индуцированном транспорте катионов через модельные и

клеточные мембраны. Автореф.... докт биол наук 1989; Л., 51с

26. De Kruiff B, Demel RA. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *acholeplasma laudilawii* cells and lecithin liposomes. III. Molecular structure of the polyene antibiotics cholesterol complexes. *Biochim Biophys Acta* 1974; 339: 57-70

27. Ermishkin LN, Kasumov KhM, Potseluyev VM. Single ionic channels induced in lipid bilayers by polyene antibiotics. *Nature* 1976; 262: 698-699

28. Ermishkin LN, Kasumov KhM, Potseluyev VM. The properties of Amphotericin B channel in a lipid bilayer. *Biochim Biophys Acta* 1977; 470: 357-367

29. Borisova MP, Kasumov KhM. Sterolstructure-dependent properties of amphotericin B channels. *Stud Biophys* 1978; 71: 197-202

30. Борисова МП, Ермишкин ЛН, Зильберштейн АЯ и др. Зависимость свойств каналов от структуры лактонового кольца молекул полиеновых антибиотиков. *Биофизика* 1978; 23: 910-911

31. Ермишкин ЛН, Зильберштейн АЯ. Ионные каналы, образуемые антибиотиками. Структура и свойства. *Биофизика мембран* 1982; 2: 82-88

32. Kasumov KhM, Borisova MP, Ermishkin LN et al. How do ionic channel properties depend on the structure of polyene antibiotic molecules? *Biochim Biophys Acta* 1979; 551 (2): 229-237

33. Касумов ХМ, Малафриев ОК. Механизм немонотонной проводимости, индуцируемой в липидном бислое амфотерицином В и его производным метиловым эфиром N,N,N-триметиламфотерицина В. *Studia Biophysica* 1982; 89 (1): 71-78

34. Борисов ЮА, Соболева ОЮ, Суглобова ЕД, Щербак АИ. Ионметрическое изучение потоков  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  через мем-

брану эритроцитов человека, модифицированную нистатином. *Цитология* 1991; (1): 24-32

35. Борисов ЮА, Соболева ОЮ, Суглобова ЕД, Федорович ЕЕ. Транспорт ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  через мембрану эритроцитов человека при формировании в ней нистатиновых каналов: некоторые особенности и анализ процессов. *Цитология* 1994; (5): 427-437

36. Cumberbatch M, Zareian K, Morgan DB, Swamihathan R. The relationship between sodium transport and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in human erythrocytes. *Biochem Med* 1981; 26: 60-66

37. Абрамова НЮ, Борисов ЮА, Братов АВ и др. Применение ионселективных полевых транзисторов (ИСПТ) с фотополимеризуемыми полиуретановыми мембранами в нефрологии для определения концентрации (активности) ионов калия. *Нефрология* 1998; (4): 68-76

38. Борисов ЮА, Суглобова ЕД, Щербак АИ. Динамика выхода калия из эритроцитов человека в присутствии нистатина в среде Моргана и аутологичной плазме. *Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова* 2004; (1): 76-79

39. Лопина ОД.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-аза: структура, механизм и регуляция активности. *Биологические мембраны* 1999; (6): 584-601

40. Herrera J, Nava M, Romero F, Rodriguez-Iturbe B. Melatonin prevents oxidative stress from iron and erythropoietin administration. *Am J Kidney Dis* 2001; 37 (4): 750-757

41. Ермоленко ВМ, Хасабов НН, Михайлова НА. Рекомендации по применению препаратов железа у больных с хронической почечной недостаточностью. *Анемия* 2005; (2): 9-25

42. Kavuksu S, Saatci U, Ciliv G et al. Effect of recombinant human erythropoietin on sodium balance in nondialysed children with chronic renal failure. *Int Urol Nephrol* 1993; 25 (6): 611-615

Поступила в редакцию 14.11.2006 г.

Принята в печать 20.12.2006 г.