

© Н.Р.Сахау, Г.Х.Мирсаева, Ф.Х.Камилов, Р.М.Фазлыева, 2005
УДК 616.61-002.3-036:612.111

Н.Р. Сахау, Г.Х. Мирсаева, Ф.Х. Камилов, Р.М. Фазлыева

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНЫМ ХРОНИЧЕСКИМ ПИЕЛОНЕФРИТОМ

N.R.Sakhau, G.Kh.Mirsaeva, F.Kh.Kamilov, R.M.Fazlyeva

CLINICO-DIAGNOSTIC ASSESSMENT OF THE STATE OF CHRONIC MEMBRANES IN PATIENTS WITH PRIMARY CHRONIC PYELONEPHRITIS

Кафедры факультетской терапии и биохимии Башкирского государственного медицинского университета, г.Уфа, Башкортостан, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬЮ ИССЛЕДОВАНИЯ явилось установить значение морфологических и метаболических особенностей эритроцитов у больных первичным хроническим пиелонефритом в зависимости от степени тяжести заболевания и обосновать методы коррекции выявленных нарушений. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** Под наблюдением находилось 96 больных хроническим пиелонефритом в фазе обострения в возрасте от 18 до 52 лет, из них 29 мужчин и 67 женщин. Контрольную группу составили 30 практически здоровых лиц того же возраста и пола. Специальные методы исследований включали: анализ функционального состояния ферментов катионного трансмембранного транспорта в эритроцитах, определение осмотической и кислотной резистентности эритроцитов. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Установлено, что в активной фазе хронического пиелонефрита наблюдается угнетение аденозинтрифосфатной активности в мембранах эритроцитов, наиболее выраженное при тяжелой и среднетяжелой формах заболевания. Наибольшие изменения коснулись Na-K-АТФазы. Активная фаза хронического пиелонефрита с выраженными клиническими проявлениями сопровождается снижением осмотической и кислотной резистентности эритроцитов. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Используемые нами биохимические тесты могут быть предложены для количественной верификации степени тяжести у больных со среднетяжелой и тяжелой формами болезни, прогнозирования возможных осложнений. Применение препаратов, оказывающих стабилизирующее действие на мембраны, может уменьшить тяжесть повреждений, предотвратить осложнения.

Ключевые слова: хронический пиелонефрит, мембрана эритроцита, аденозинтрифосфатазы, осмотическая и кислотная резистентность.

ABSTRACT

THE AIM of the research was to determine the role of morphologic and metabolic features of erythrocytes in patients suffering from initial chronic pyelonephritis depending on the severity of disease and to substantiate the methods of correction of the impairments revealed. **PATIENTS AND METHODS.** Under observation there were 96 patients suffering from chronic pyelonephritis in the phase of exacerbation. Among them there were 29 men and 97 women aged 18 to 52 years. The control group consisted of 30 healthy subjects of the same age and gender. Special research methods included an analysis of functional condition of enzymes of the cationic transmembrane transport in erythrocytes and determination of osmotic and acidic erythrocyte resistance. **RESULTS.** It was found that in the active phase of chronic pyelonephritis a suppression of adenosine triphosphate activity in erythrocyte membranes was noted which was more pronounced in severe and middle degree of severity disease. Most considerable changes could be seen in Na-K-ATPase. The active phase of chronic pyelonephritis with marked clinical manifestations was accompanied by a decreased erythrocyte osmotic and acidic resistance. The biochemical tests used can be proposed for quantitative verification of prognosis of the severity and possible complications in patients with the severe and middle degree of severity disease. **CONCLUSION.** The use of preparations having a stabilizing effect on membranes can minimize the severity of the lesions and prevent complications.

Key words: chronic pyelonephritis, erythrocyte membrane, adenosine triphosphates, osmotic and acidic resistance.

ВВЕДЕНИЕ

Пиелонефрит занимает второе место по частоте после острых респираторных заболеваний, первое место в структуре патологии почек и все еще имеет тенденцию к росту [1]. Широкая распространенность хронического пиелонефрита, трудность диагностики, частый исход в хроническую почечную недостаточность, требующую заместительной

почечной терапии, значительные трудопотери в связи с его обострениями и осложнениями, частая заболеваемость женщин репродуктивного возраста – все это определяет огромную социальную значимость пиелонефрита и актуальность проблемы диагностики и лечения больных с данной патологией.

Эритроцит (ЭР) представляет собой наиболее изученный в настоящее время клеточный объект,

который, однако, по-прежнему остается предметом пристального внимания исследователей. Наиболее выгодным для осуществления ЭР его газотранспортной функции является то положение, при котором минимальны трения и затраты энергии, связанные с передвижением крови по сосудам [1,2]. В этой связи важны специфические гемореологические свойства ЭР, специальная механическая функция эритроцитарной мембраны, обеспечивающая поступление ЭР с содержащимся в нем оксигемоглобином в капилляры, и молекулярно-биологические механизмы регуляции этих функций. Воздействия, приводящие к упругой обратимой деформации среды, весьма разнообразны, но все же основными из них являются: общее усилие сдвига, сдвигающее усилие плазмы, изменение осмолярности среды и реакция клеток на внешние воздействия – деформационный стресс [3, 4]. Механические свойства мембран ЭР обусловлены как особенностями их молекулярной организации, так и физико-химическими свойствами образующих ее молекул.

Структурные изменения биомембран ЭР при активации перекисного окисления липидов сопровождаются снижением активности таких важных белков, как транспортные АТФазы, которые являются ключевыми ферментами в клеточном обмене веществ. При многих тяжело протекающих, острых и хронических заболеваниях имеется мембранная альтерация ЭР, вызванная различными причинами [5–9].

Целью работы явилось установить значение морфологических и метаболических особенностей ЭР по показателям активности натрий,калий-активируемой аденозинтрифосфатазы (Na,K-АТФазы), кальций-активируемой аденозинтрифосфатазы (Са-АТФазы), магний-зависимой аденозинтрифосфатазы (Mg-АТФазы), а также осмотической и кислотной резистентности ЭР у больных первичным хроническим пиелонефритом в зависимости от степени активности процесса и обосновать методы рациональной коррекции выявленных нарушений.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Под наблюдением находилось 96 больных хроническим пиелонефритом в фазе обострения без сопутствующей патологии в возрасте от 18 до 52 лет, из них 29 мужчин и 67 женщин. Контрольную группу составили 30 практически здоровых лиц того же возраста и пола.

Диагноз верифицирован с учетом клинической картины заболевания, данных общеклинических методов исследований, которые включали: общие

анализы крови, мочи, биохимический анализ крови, анализы мочи по Нечипоренко, по Зимницкому, посев мочи на флору, проба Реберга–Тареева, ультразвуковое сканирование почек, экскреторную урографию, исследование глазного дна, электрокардиографию.

Специальные методы исследований включали: анализ функционального состояния ферментов катионного трансмембранного транспорта в эритроцитах по методу, описанному Н.Р. Елаевым [10], определение осмотической резистентности эритроцитов по Н.А. Василевской [11], кислотной резистентности – по методу И.И. Гительзон, И.А. Терскова [12].

Забор крови проводили утром натощак после 12-часового перерыва в приеме пищи. В работе применяли реактивы отечественного производства.

Исследование показателей осуществляли в динамике заболевания – в день поступления (до начала общепринятой лекарственной терапии), на седьмой день болезни и перед выпиской.

Статистическую обработку материала проводили на ЭВМ по специально разработанной программе с применением критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При индивидуальном анализе функциональной активности ферментов было выявлено следующее. Несмотря на отсутствие значительных колебаний абсолютных величин, полученные данные свидетельствуют об угнетении метаболических процессов в ЭР в активной фазе хронического пиелонефрита. При определении активности транспортных АТФаз было выявлено, что при тяжелой форме заболевания активность ферментов достигала минимальных величин депрессии. Наибольшие изменения коснулись Na,K-АТФазы. Так, при среднетяжелой форме заболевания до лечения активность фермента снижалась на 9,3%, на седьмой день болезни – на 11,2%, перед выпиской из стационара – на 6,4% ($p < 0,05$). При тяжелой форме это снижение составило: до лечения – 12,7%, на седьмой день болезни – 16,5%, перед выпиской – 13% ($p < 0,05$). Подобные изменения касаются и активности Са-АТФазы, у которой минимум энзиматической активности выявляется при тяжелой форме заболевания. Активность Са-АТФазы при легкой форме заболевания снизилась на 1,4%, при среднетяжелой форме это снижение составило: до лечения – 5,6%, на седьмой день пребывания в стационаре – 6,3%, перед выпиской – 5,1%. При тяжелом течении заболевания снижение активности этого фермента составило соответственно 9,10 и 7% по сравнению с контролем ($p < 0,05$, табл. 1).

Таблица 1

Динамика показателей активности транспортных аденозинтрифосфатаз у больных хроническим пиелонефритом ($\bar{X} \pm m$) нмоль/мин на 1 мл эритроцитов

Форма болезни	Период	Натрий, калий, активируемая АТФаза	Кальций, активируемая АТФаза	Магний-зависимая АТФаза
Контроль	Здоровые	15,8 $\pm$ 0,1	38,59 $\pm$ 0,2	17,62 $\pm$ 0,1
Легкая форма	До лечения	15,03 $\pm$ 0,1	38,07 $\pm$ 0,1	17,47 $\pm$ 0,1
	На седьмой день лечения	15,03 $\pm$ 0,1	38,05 $\pm$ 0,1	17,42 $\pm$ 0,1
	В конце лечения	15,1 $\pm$ 0,1	38,2 $\pm$ 0,1	17,53 $\pm$ 0,1
Среднетяжелая форма	До лечения	14,5 $\pm$ 0,1*	36,45 $\pm$ 0,2*	16,51 $\pm$ 0,1*
	На седьмой день лечения	14,2 $\pm$ 0,1*	36,16 $\pm$ 0,2*	16,49 $\pm$ 0,1*
	В конце лечения	14,8 $\pm$ 0,1*	36,63 $\pm$ 0,1*	16,47 $\pm$ 0,1*
Тяжелая форма	До лечения	13,8 $\pm$ 0,1*	35,13 $\pm$ 0,1*	15,82 $\pm$ 0,1*
	На седьмой день лечения	13,2 $\pm$ 0,2*	34,78 $\pm$ 0,1*	15,64 $\pm$ 0,1*
	В конце лечения	13,7 $\pm$ 0,1*	35,95 $\pm$ 0,1*	15,83 $\pm$ 0,1*

Примечание: * - различия достоверны по сравнению с контрольной группой (p<0,05).

Идентичные изменения касались и активности Mg-АТФазы.

Структурно-функциональная перестройка биомембран эритроцитов свидетельствует об изменении их проницаемости, оцениваемой нами по показателям осмотической и кислотной резистентности эритроцитов. При оценке осмотической резистентности у лиц с легкой формой заболевания отчетливого сдвига по сравнению с контролем не наблюдалось, а величина среднечеточной хрупкости эритроцитов (СКХ ЭР) не отличалась от нормы (p>0,05). При среднетяжелой и тяжелой формах пиелонефрита СКХ ЭР повышалась по мере увеличения степени тяжести болезни, что свидетельствует о нарастающем снижении осмотической резистентности (p<0,05, табл. 2).

Контуры кислотной эритрограммы у лиц с легкой формой заболевания совпадали с контрольной. У лиц со среднетяжелой и тяжелой формой пиелонефрита нами был выявлен сдвиг кислотной эритрограммы влево, что свидетельствует о критическом понижении стойкости мембраны к действию водородных ионов. Углубленные исследова-

ния кислотной резистентности эритроцитов показали, что у больных с тяжелой и среднетяжелой формой пиелонефрита наблюдалось смещение пика эритрограммы влево, укорочение ширины основания и сокращение времени продолжительности кислотного гемолиза по сравнению с контролем (p<0,05, табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Цитоскелет мембраны ЭР – это прочная эластичная белковая сеть, локализованная на внутренней поверхности липидного бислоя цитоплазматической мембраны. Различные фосфолипиды распределены неравномерно во внешнем и внутреннем слое липидного матрикса. От степени их насыщенности и содержания холестерина в мембранах ЭР зависит плотность упаковки липидного бислоя, что в свою очередь должно сказываться на упругих свойствах мембран. Основу структуры белкового цитоскелета составляют комплексы спектрин тетрамер – актин, от степени ассоциации которого собственно и зависят механические свойства ЭР [13,14]. Основным источником энергии в клетке – глюкоза. Энергия, необходимая для восстановления

Таблица 2

Показатели среднечеточной хрупкости эритроцитов у больных хроническим пиелонефритом ($\bar{X} \pm m$)

Форма болезни	Период	СКХ ЭР(%NaCl)
Контроль	Здоровые	0,43 $\pm$ 0,3
Легкая форма	До лечения	0,44 $\pm$ 0,1*
	На седьмой день лечения	0,44 $\pm$ 0,1*
	В конце лечения	0,43 $\pm$ 0,2*
Среднетяжелая форма	До лечения	0,45 $\pm$ 0,1*
	На седьмой день лечения	0,58 $\pm$ 0,1*
	В конце лечения	0,45 $\pm$ 0,2*
Тяжелая форма	До лечения	0,52 $\pm$ 0,1*
	На седьмой день лечения	0,69 $\pm$ 0,1*
	В конце лечения	0,55 $\pm$ 0,1*

Примечание: * - различия достоверны по сравнению с контрольной группой (p<0,05).

формы эритроцита, активного транспорта катионов через его мембрану, образуется в ходе анаэробного гликолиза, в этом цикле расходуется 90% потребляемой эритроцитами глюкозы. Торможение гликолиза, уменьшающее в клетке АТФ, приводит к накоплению в ней Na, H₂O, Ca, повреждению мембраны, что понижает механическую и осмотическую устойчивость ЭР, ускоряет разрушение. Контроль за состоянием цитоскелета ЭР реализуется через процесс фосфорилирования белков [3,15]. Спектрин среди белков цитоскелета выделяется самым высоким уровнем фосфори-

Таблица 3

Динамика показателей кислотной резистентности эритроцитов у больных хроническим пиелонефритом ($\bar{X} \pm m$, мин)

Форма болезни	Показатели кислотной резистентности эритроцитов				
	время начала гемолиза	время окончания гемолиза	пик кислотной эритрограммы	продолжительность гемолиза	среднее время гемолиза
Контроль	1,7 $\pm$ 0,09	6,98 $\pm$ 0,2	4,82 $\pm$ 0,1	7,62 $\pm$ 0,32	4,34 $\pm$ 0,2
Легкая форма	1,74 $\pm$ 0,1*	7,02 $\pm$ 0,1*	4,78 $\pm$ 0,19*	7,48 $\pm$ 0,43*	4,36 $\pm$ 0,23* $\pm$ 0,23
Среднетяжелая форма	1,91 $\pm$ 0,1*	7,47 $\pm$ 0,1*	4,15 $\pm$ 0,11*	6,91 $\pm$ 0,14*	4,69 $\pm$ 0,6*
Тяжелая форма	2,00 $\pm$ 0,1*	7,98 $\pm$ 0,1*	3,74 $\pm$ 0,18*	6,51 $\pm$ 0,41*	4,98 $\pm$ 0,4*

Примечание: * - различия достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

лирования и очень высокой скоростью включения фосфора в белковую молекулу [16]. Предполагают, что этот процесс контролирует система цАМФ-независимых протеинкиназ [17]. Однако фосфорилирование обеспечивают и цАМФ-зависимые протеинкиназы. Эту реакцию катализирует спектринкиназа, активность которой зависит от присутствия ионов Mg и в меньшей степени Ca. Снижение уровня фосфорилирования белков мембраны ведет к изменению свойств мембраны и формы клетки. Таким образом, возможно эффективно влиять на свойства мембраны ЭР через фосфорилирование белков цитоскелета. Изменяя содержание в ЭР АТФ как донора фосфата, можно регулировать этот процесс. Структурные изменения биомембран ЭР при активации перекисного окисления липидов сопровождаются снижением активности таких важных белков, как транспортные АТФазы, которые являются ключевыми ферментами в клеточном обмене веществ. С наличием Са-АТФазы связан не только транспорт ионов, но и поддержание двояковогнутой формы эритроцита, способность к ее изменению при движении ЭР по кровотоку. Наши исследования показали, что в активной фазе пиелонефрита при среднетяжелой и тяжелой формах заболевания происходит угнетение метаболических процессов в эритроцитах (ЭР). Об этом свидетельствует снижение активности ферментов катионного трансмембранного транспорта: натрий, калий-активируемой аденозинтрифосфатазы (Na, K-АТФазы), кальций-активируемой аденозинтрифосфатазы (Са-АТФазы), магний-зависимой аденозинтрифосфатазы (Mg-АТФазы). Нарушенная работа исследуемых АТФаз мембран ЭР приводит к серьезным поломкам ее цитоскелета [15], что существенно сказывается на деформабельности клеток красной крови. Нами выявлено также снижение осмотической и кислотной резистентности мембран эритроцитов (-ОРЭ и КРЭ). Важно, что КРЭ определяет в основном состояние фосфолипидного бислоя мембран ЭР, а ОРЭ – цитоскелета этих клеток, следовательно активная фаза хронического пиелонефрита ха-

рактеризуется перестройкой как липидного, так и белкового компонентов мембран.

Таким образом, микробно-воспалительный процесс сопровождается изменениями липидного бислоя и цитоскелета мембран эритроцитов. Активность воспалительного процесса в определенной мере связана с выраженностью анализируемых изменений, которые неспецифичны, но информативны для оценки степени тяжести больных в активной фазе хронического пиелонефрита. Используемые нами биохимические методы контроля доступны для любой химической лаборатории, не требуют громоздкого оборудования, дорогих реактивов.

Результаты настоящих исследований дали основание предположить, что лекарственные препараты, оказывающие мембраностабилизирующее действие, могут уменьшить тяжесть повреждений, снизить риск осложнений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В активной фазе хронического пиелонефрита наблюдается угнетение аденозинтрифосфатной активности в мембранах эритроцитов, наиболее выраженное при тяжелой и среднетяжелой формах заболевания. Наибольшие изменения коснулись Na-K-АТФазы.

2. Активная фаза хронического пиелонефрита с выраженными клиническими проявлениями сопровождается снижением осмотической и кислотной резистентности эритроцитов.

3. Используемые нами биохимические тесты могут быть предложены для количественной верификации степени тяжести у больных со среднетяжелой и тяжелой формами болезни, прогнозирования возможных осложнений.

4. Использование препаратов, оказывающих стабилизирующее действие на мембраны, может уменьшить тяжесть повреждений, предотвратить осложнения.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Захарова НБ, Хвостова НВ, Шведова РФ. Значение повреждения белкового и липидного состава эритроцитарных мембран в развитии снижения текучих свойств крови

при экстремальных состояниях. *Вопр мед химии* 1991; 37(1):53-56

2. Борисов ИА. Пиелонефрит и его лечение на современном этапе. *Тер арх* 1997; (8):49-54

3. Болдырев АА. *Введение в биохимию мембран*. Медицина, М., 1986; 112

4. Владимиров ЮА. Роль нарушения свойств липидного слоя мембран в развитии патологических процессов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия* 1989; (4): 7-19

5. Бородин ЕА, Ландышев ЮС, Савельева МВ. Структурно-функциональные свойства мембран эритроцитов у больных инфекционно-аллергической бронхиальной астмой. *Вопр мед химии* 1989; (6):109-114

6. Быкова ИА. Морфологические особенности эритроцитов в периферической крови в норме и патологии. *Гематология и трансфузиология* 1991; 36(6): 28-30

7. Вельтищев ЮЕ, Игнатова МС. Структура и функции биологических мембран при заболеваниях почек. *Сов мед* 1985; (4): 51-54

8. Голод ЕА. Перекисное окисление липидов и Са-АТФазная активность микросомной фракции почечной ткани больных нефролитиазом и хроническим пиелонефритом. *Урол и нефрол* 1996; (3): 14-16

9. Цветчих ВЕ, Родоман ВЕ, Жмуров ВА и др. Мембранодестабилизирующие процессы как универсальная основа воспаления. *Урол и нефрол* 1994; (4): 16-19

10. Елаев НР. Коррекция Na-K-АТФазной активности и синтеза белков в мембранах нервных клеток при воздействии ацетилхолина. *Цитология* 1978; (8): 970-972

11. Василевская НЛ. Методы определения осмотической резистентности эритроцитов. *Бюлл экп биол мед* 1955; (12): 67-72

12. Гительзон ИИ, Терсков ИА. *Эритрограмма как метод клинического исследования крови*. Красноярск, 1959; 248

13. Сторожок СА, Соловьев СВ. Структурные и функциональные особенности цитоскелета мембраны эритроцита. *Вопр мед химии* 1992; (2): 14-17

14. Ибрагимова ЛА, Фазлыева РМ. Клинико-диагностическая оценка изменений АТФазной активности, состояния ПОЛ и стабильности мембран эритроцитов у больных ГЛПС. *Тер арх* 2000; (11): 21-25

15. Tosukhowong P, Chotikasatit C, Tungsanga K et al. Abnormal erythrocyte Na, K-ATPase activity in a northeastern Thai Population. *Southeast Asian. J Trop Med Public Health* 1992; 23 (3):526-530

16. Овчинников АА. *Клинико-патогенетическое обоснование применения эссенциале-форте в лечении больных хроническим пиелонефритом*. Автореф. дис. ...канд. мед.-наук. Тюмень, 1992; 167

17. Doris PA. Regulation of Na,K-ATPase by endogenous ouabain-like materials. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994; 205 (3): 202-212

Поступила в редакцию 22.08.2004 г.