

© В.Н.Спиридонов, Ю.А.Борисов, Е.Н.Левыкина, Е.Д.Суглобова, 2004
УДК [616.61-008.64-036.12-085.38:612.11.6]:612.014.462.1+616-073.4

В.Н. Спиридонов, Ю.А. Борисов, Е.Н. Левыкина, Е.Д. Суглобова

КИСЛОТНАЯ, ОСМОТИЧЕСКАЯ И УЛЬТРАЗВУКОВАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ БОЛЬНЫХ, ПОЛУЧАЮЩИХ ЛЕЧЕНИЕ РЕГУЛЯРНЫМ ГЕМОДИАЛИЗОМ

V.N. Spiridonov, Yu.A. Borisov, E.N. Levykina, E.D. Suglobova

ACIDIC, OSMOTIC AND ULTRASONIC RESISTANCE OF ERYTHROCYTES IN REGULAR 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 являлась попытка оценить реакцию эритроцитов на уремию и лечение гемодиализом на основе многолетнего изучения различных типов гемолиза. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** Обследовали 108 больных с хронической почечной недостаточностью (66 мужчин и 42 женщин; средний возраст равнялся $43,29 \pm 1,22$ года.). Больные получили 200 сеансов стандартного бикарбонатного диализа. Контрольную группу образовали здоровые люди в количестве 27 человек (мужчин – 17, женщин – 12), средний возраст которых составил $46,2 \pm 3,1$ года. Изучено время кислотного, осмотического и ультразвукового гемолиза, а также осмотическая резистентность эритроцитов. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Время кислотного гемолиза у больных до начала сеанса гемодиализа удлинено на 33,8% по сравнению с этим же показателем для контрольной группы ($t=12,4$; $p<0,001$). Несмотря на то, что в результате сеанса гемодиализа время кислотного гемолиза сократилось на 11,8%, оно продолжало превышать показатель контрольной группы на 18% ($t=7,3$; $p<0,001$). Осмотическая резистентность у больных перед диализом на 6,5% превышала норму ($t=2,35$; $p<0,05$), а после диализа она достоверно увеличилась на 9,23% ($t=5,04$; $p<0,001$). Длительность осмотического и ультразвукового гемолиза до и после диализа достоверно не отличалась от аналогичных показателей контрольной группы. Выявлена слабая отрицательная связь между временем кислотного гемолиза и содержанием кальция и альбумина в плазме крови пациентов после сеанса гемодиализа. Коэффициенты корреляции составили $-0,206 \pm 0,070$ ($t=2,96$; $p<0,01$) и $-0,216 \pm 0,069$ ($t=3,11$; $p<0,001$) соответственно. В первый фактор с наибольшим весом вошли показатели артериального давления до и после сеанса гемодиализа, отражающие состояние сердечно-сосудистой системы пациентов. Вторая компонента с удельным весом чуть более 8% характеризует эффективность сеанса гемодиализа. В третий фактор вошли концентрации альбумина и холестерина в плазме крови. Четвертый фактор скомпонован из показателей, связанных исключительно с кислотной и ультразвуковой резистентностью эритроцитов. Лишь в девятый фактор вошли показатели осмотической резистентности. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** При анализе полученных данных о резистентности эритроцитов к кислотному и осмотическому гемолизу, отражающих функциональное состояние красных кровяных клеток в целом и, в частности, их плазматических мембран, выявлено достоверное позитивное влияние процедуры гемодиализа на клеточный сектор организма пациентов, получающих диализную терапию. Показано, что в ходе сеанса гемодиализа снижается время кислотного гемолиза и значительно возрастает осмотическая стойкость эритроцитов. Результаты корреляционного и факторного анализа полученных данных подтверждают высокую степень автономности эритроцитов. При этом показатели разных типов гемолиза, несколько уступая по своей информативности главным клиническим и биохимическим показателям, все же несут достаточно высокую факторную нагрузку.

Ключевые слова: кислотный, осмотический, ультразвуковой лизис эритроцитов, регулярный гемодиализ.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was to assess the reaction of erythrocytes to uremia and hemodialysis treatment based on many years of studying different types of hemolysis. **PATIENTS AND METHODS.** The examination included 108 patients with chronic renal failure (66 men and 42 women; mean age 43.29 ± 1.22 years). The patients received 200 sessions of standard bicarbonate dialysis. The control group consisted of 27 healthy subjects (17 men and 12 women; mean age 46.2 ± 3.1 years). The time of acidic, osmotic and ultrasonic hemolysis was studied as well as the osmotic resistance of erythrocytes. **RESULTS.** The time of acidic hemolysis in patients before the beginning of the hemodialysis session was 33.8% longer as compared with the same index for the control group ($t=12.4$; $p<0.001$). Although the time of acidic hemolysis was 11.8% shorter due to the hemodialysis session, it was still 18% higher ($t=7.3$; $p<0.001$). The osmotic resistance in patients before dialysis was 6.5% higher than normal ($t=2.35$; $p<0.05$), and after dialysis it was 9.23% reliably higher ($t=5.04$; $p<0.001$). The duration of osmotic and ultrasonic hemolysis before and after dialysis did not reliably differ from the similar indices of the control group. Weak negative correlation was revealed between the time of acidic hemolysis and content of calcium and albumin in the patients' blood plasma after hemodialysis session. The correlation coefficients were -0.206 ± 0.070 ($t=2.96$; $p<0.01$) and -0.216 ± 0.069 ($t=3.11$; $p<0.001$) respectively. The first factor with the greatest weight included the indices of arterial pressure before and after the hemodialysis session showing the state of the patients' cardiovascular system. The second component with the relative weight a little more than 8% characterized the effectiveness of the hemodialysis session. The third factor included the concentration of albumine and cholesterol in blood plasma. The fourth factor consisted of the indices associated exclusively with the acidic and ultrasonic resistance of erythrocytes. The indices of osmotic resistance were included but in the ninth factor. **CONCLUSION.** An analysis of the data on the erythrocyte resistance to acidic and osmotic hemolysis showing the functional state of red blood cells as a whole and, in particular, their

plasmatic membranes, has revealed a reliably positive influence of the hemodialysis procedure on the cellular sector of organism of the dialysis treated patients. It was shown that in the course of the hemodialysis session the acidic hemolysis time shortened and the osmotic resistance of erythrocytes considerably increased. The correlation and factor analysis of the data obtained has confirmed high degree of autonomy of erythrocytes. For all this, the indices of different types of hemolysis, being somewhat inferior by their informative value to clinical and biochemical indices, nevertheless have sufficiently high factor significance.

Key words: acidic, osmotic, ultrasonic lysis of erythrocytes, regular hemodialysis.

ВВЕДЕНИЕ

Давно известно, что прогрессирующая почечная дисфункция губительно сказывается на мембранных структурах организма в целом. Расплывчатость термина «уремическая интоксикация» не мешает ему, однако, оставаться широко употребляемым при описании патологического действия внеклеточной среды на клеточные системы. Уже многие годы продолжается поиск конкретных повреждающих факторов, возможно, ответственных за радикальные изменения и в продукции клеточных популяций, и в функционировании клеток. Считают, что таким действием прежде всего обладают молекулы средней молекулярной массы, то есть продукты катаболизма и/или субстраты минорных, либо угнетенных анаболических систем [1], а также пептиды небольших размеров. В последнее время взгляд на степень выраженности токсического действия в отношении отдельных эффекторов несколько изменился. Так, по предположению Ю.В. Наточина, одним из ведущих повреждающих факторов является повышение осмоляльности плазмы крови при развитии почечной недостаточности и неадекватная и, возможно, слишком медленная приспособительная реакция мембранных систем к новым условиям существования. Вполне понятно, что сами структурные изменения мембран, затрагивающие как фосфолипидные слои, так и белковые компоненты, замыкающие порочный круг «клетка-уремия-клетка», трудно поддаются дифференциальному определению. Клиницисту важнее иметь какой-либо интегральный показатель, характеризующий систему в целом и позволявший ее оценить при различных степенях выраженности патологии. В качестве критериев тяжести эндогенной интоксикации предлагается оценивать реакцию эритроцитов на тесты проницаемости и сорбционной способности их плазматических мембран [2, 3]. При таком подходе у лабораторного диагноста возникают два основных вопроса. Первый – об адекватности отражения комплекса свойств, присущих именно красной кровяной клетке, и характеристик всего возможного клеточного набора. Второй – об оптимальном соотношении достаточности и простоты в экспериментальном подходе к оценке проницаемости и резистентности мембраны.

В отношении первого из указанных вопросов

следует заметить, что, несмотря на особенности строения цитоскелета эритроцита, позволяющие, наоборот, иногда эффектно отгнать отличительные черты механизмов проницаемости, достаточно давно приведены убедительные корреляции между изменением свойств мембран красных кровяных клеток и клеточных мембран внутренних органов [4, 5]. Что же касается второго вопроса, разнообразие подходов к экспериментальному его решению очень велико, а сами данные, получаемые в ходе этих исследований, иногда противоречивы.

Методические приемы, применяемые для оценки химической (кислотной) резистентности и осмотической резистентности эритроцитов, в основном, базируются на классических исследованиях кислотного гемолиза [6–8]. Хрупкость клеток, характеризующая состояние их «упруго-эластического каркаса» [9], как клинический показатель фигурирует при обследовании пациентов со злокачественными новообразованиями [10, 11], с микроэлементозами [12], сахарным диабетом [13], гломерулонефритом [14], и больных с хронической почечной недостаточностью (ХПН), получающих лечение регулярным гемодиализом [15, 16] и т.д.

Сами по себе механизмы всех типов лизиса эритроцитов до сих пор также во многом остаются неясными. Так, например, кислотный лизис эритроцитов представляется многостадийным процессом, но конкретное содержание этих стадий остается дискуссионным. В работе [8] указывается, что на первом этапе происходит проникновение протонов через плазматическую мембрану, затем протонируется гемоглобин на фоне нарастающей гидратации, и в конечном итоге наступает осмотическое разрушение клетки. Другие авторы [17, 18] рассматривают первую стадию как конформационные изменения интегральных мембранных и примембранных белковых структур, возникающие при контакте с кислой внеклеточной средой. Денатурация гемоглобина отнесена ими к концу второго или даже к третьему этапу, который характеризуется как «период глубокого разрушения мембранной целостности кровяных клеток с дальнейшим нарушением белково-липидных, липид-липидных взаимодействий на больших участках мембраны». Что же касается осмотического гемолиза (в гипоосмоляльной среде), то он представляется одноэтапным процессом, сопровожда-

ющимся быстрым изменением формы клетки с параллельным уменьшением ее деформируемости и последующим разрывом мембраны с истечением гемоглобина.

Следует отметить, что и в случае кислотного, и в случае осмотического лизиса эритроцитов воздействию самого «лизирующего агента» на каркасные элементы цитоскелета предшествует транспорт этого агента внутрь клетки. И если транспорт универсального растворителя – воды – осуществляется в соответствии с градиентом концентрации этого неэлектролита по вполне определенным транспортным системам – аквапоринам [19, 20], то пути переноса протонов внутрь эритроцита не столь очевидны. Возможно, при увеличении концентрации H^+ во внеклеточной среде происходит изменение конформации интегральных мембранных белков, таких, как белок полосы 3, гидрофильный якорный белок анкирин [21], для протонов при этом образуются транспортные тоннели. С другой стороны, благодаря небольшим размерам и малой степени гидратации наряду с денатурацией внешних (по отношению к клетке) частей мембранных белков нельзя исключить вероятную экспансию протонов и внутрь клетки по существующим порам в билипидных слоях. По оценкам, приведенным в [22, 23], если область разрыва фосфолипидного бислоя находится на плоской части мембраны эритроцита, критический радиус поры составляет 50–70 нм, что примерно соответствует размерам ячейки спектрин-актиновой сети. Таким образом, физико-химические и биофизические свойства мембраны клетки зависят именно от характера взаимодействия участков мембранного цитоскелета [24, 25]. Что же касается механической устойчивости эритроцитарной мембраны, то особенности, связанные именно с этой характеристикой, стоят несколько особняком. По оценкам И.Б. Заводника и соавт. [26], к механическому лизису приводят нарушения поверхности на одной элементарной ячейке. Такой вывод противоречит приведенным выше расчетным и экспериментальным данным о возможности самозалечивания пор относительно небольшого диаметра. Вероятно, механическая прочность определяется не только состоянием белкового каркаса, но и билипидным слоем, его упругостью и вязкостью. Так, например, именно с понижением вязкости фосфолипидного слоя связывается уменьшение механической резистентности при действии на мембрану эритроцита жирных кислот и спиртов. Возможность облегченного латерального перемещения и даже флип-флоп переносов в данном случае лишь только стабилизирует взаимодействие двойного слоя с цитоскелетом.

Несмотря на широкое использование показателей гемолиза как критериев для оценки состояния клеточных мембран [15, 27, 28], систематических исследований резистентности эритроцитов пациентов хронического гемодиализа в доступной нам литературе не имеется. С другой стороны, выявление закономерностей в функционировании мембранных структур при терминальных стадиях хронической болезни почек необходимо в условиях продолжающегося поиска условий адекватного, а затем и оптимального гемодиализа [29]. Именно поэтому мы посчитали необходимым в данной работе свести воедино многолетние исследования различных характеристик мембранных компонентов эритроцитов.

Развитие уремии вызывает генерализованные метаболические нарушения, достаточно хорошо отражаемые изменениями показателей плазмы крови, лишь косвенно свидетельствующими о состоянии форменных элементов.

Целью настоящего исследования являлась попытка оценить реакцию эритроцитов на уремию и лечение гемодиализом. Методы исследования включали в себя некоторые виды гемолиза. Как было отмечено выше, эритроциты – довольно специфические форменные элементы, но в целом они сохраняют закономерности жизнедеятельности, присущие клеткам других органов и тканей, а их доступность придает им особенную ценность как объекту исследования.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Обследовали 108 больных с ХПН, которые получили 200 сеансов регулярного гемодиализа. Группа состояла из 66 мужчин и 42 женщин в возрасте от 17 до 69 лет. Средний возраст равнялся $43,29 \pm 1,22$ года. У 94 больных был диагностирован хронический гломерулонефрит, у 2 больных – хронический пиелонефрит, у 5 – поликистоз почек и вторичный пиелонефрит, у 3 больных – сахарный диабет, диабетическая нефропатия, у 2 больных – мочекаменная болезнь и вторичный пиелонефрит, и у 2 больных – прочие заболевания почек.

Все больные получали сеансы стандартного гемодиализа (бикарбонатный, 3 раза в неделю по 4 часа, Na^+ – 138 ммоль/л, K^+ – 2 ммоль/л, Ca^{2+} – 1,75 ммоль/л, Mg^{2+} – 0,5 ммоль/л, Cl^- – 105 ммоль/л, CH_3COOH – 3 ммоль/л, HCO_3^- – 35 ммоль/л). Количество сеансов гемодиализа у больных колебалось в пределах от 3 до 2580, составляя в среднем 587 ± 42 . Измерения производились до и после сеанса. У 39 больных исследования повторялись от 2 до 5 раз в зависимости от срока получения заместительной почечной терапии.

Достоверность различия данных ($p < 0,05$) до и после сеанса гемодиализа оценивалась по величине коэффициента Стьюдента.

Контрольную группу образовали здоровые люди в количестве 27 человек (мужчин – 17 и женщин – 12) в возрасте от 17 до 67 лет, средний возраст которых составил $46,2 \pm 3,1$ лет. Половозрастные показатели для пациентов контрольной группы были идентичными.

Измерения показателей резистентности производили с использованием концентрационного фотоэлектрического колориметра КФК – 2МП при $\lambda = 540$ нм. Для регистрации кислотного и осмотического гемолиза использовали кювету емкостью 2 мл, а для ультразвукового гемолиза – объемом 30 мл.

Забор крови от больного производили на входе в аппарат «Искусственная почка» до и после сеанса диализа в количестве 0,3 – 0,5 мл. Затем готовили разведение крови в физиологическом растворе с расчетом, чтобы поглощение светового потока находилось в пределах 0,8 – 1,0.

В работе применяли три типа гемолиза: кислотный, осмотический и ультразвуковой.

Кислотный гемолиз. Кислотный гемолиз производили по Терскову и Гительзону [7] 0,1N раствором соляной кислоты.

Перед измерением кювету емкостью 2 мл промывали физиологическим раствором. Затем в нее вносили 1 мл разведенной крови. Поверх образца крови наслаивали 0,1N раствор соляной кислоты того же объема, смесь перемешивали, и кювету помещали в КФК. Измеряли светопоглощение, временной интервал между измерениями составлял 10 секунд. Регистрацию гемолиза продолжали до момента прекращения процесса, то есть до получения постоянного значения светопоглощения, динамика которого представлена на рис.1.

В результате полного разрушения эритроцитов, наблюдающегося при кислотном гемолизе, светопоглощение не уменьшается до нуля, а имеет некое минимальное значение d . Для определения времени 50%-ного гемолиза из максимального значения светопоглощения h вычитали остаточное светопоглощение d , полученную разность делили пополам и к полученному результату, для возвращения в прежнюю систему координат, прибавляли остаточное светопоглощение d :

$$h\tau_{1/2} = (h-d)/2 + d = (h-d+2d)/2 = (h+d)/2$$

Точке $h\tau_{1/2}$ на оси ординат соответствует время 50%-ного гемолиза $\tau_{1/2}$ на оси абсцисс.

Ультразвуковой гемолиз. Ультразвуковой гемолиз производили с использованием аппарата для ультразвуковой терапии УЗТ-1.03 У в условиях,

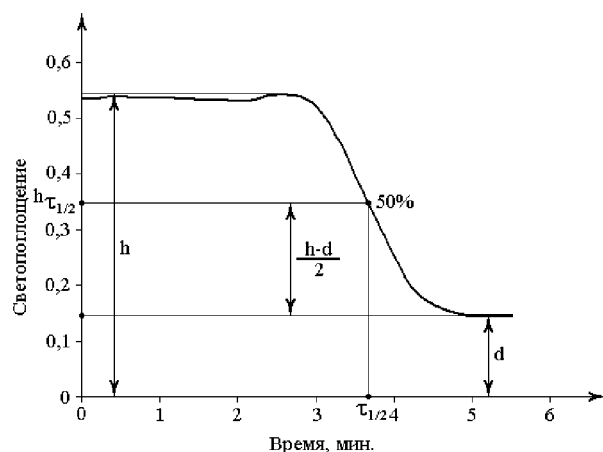


Рис. 1. Оценка динамики кислотного гемолиза: h – исходное светопоглощение; d – остаточное светопоглощение после кислотного гемолиза; $\tau_{1/2}$ – время 50%-го кислотного гемолиза.

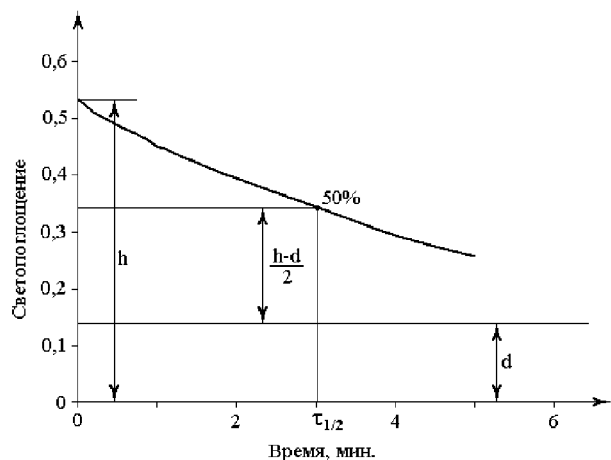


Рис. 2. Оценка ультразвукового гемолиза: h – исходное светопоглощение; d – остаточное светопоглощение после кислотного гемолиза; $\tau_{1/2}$ – время 50%-го ультразвукового гемолиза.

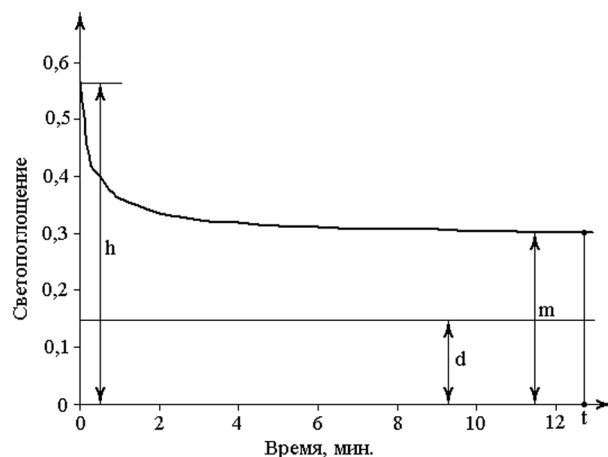


Рис.3. Оценка динамики осмотического гемолиза: h – исходное светопоглощение; d – остаточное светопоглощение после кислотного гемолиза; m – остаточное светопоглощение осмотического гемолиза; t – время осмотического гемолиза.

оптимальных для регистрации динамики светопоглощения: излучатель 3, интенсивность излучения – $1,0 \text{ Вт/см}^2$, режим работы импульсный 2 мс. Регистрировали время 50%-ного ультразвукового

Таблица 1

Показатели гемолиза в норме и у больных до и после сеанса гемодиализа

Показатель	Норма	До диализа	После диализа
Время кислотного гемолиза (мин)	2,60 ± 0,05	3,48 ± 0,05*	3,07 ± 0,04**
Осмотическая резистентность эритроцитов (%)	23,45 ± 2,50	30,00 ± 1,19*	39,23 ± 1,39**
Время осмотического гемолиза (мин)	12,21 ± 0,40	12,65 ± 0,20	12,75 ± 0,22
Время ультразвукового гемолиза (мин)	2,64 ± 0,17	2,76 ± 0,06	2,69 ± 0,06

* - показатели для больных достоверно отличаются от соответствующих показателей для группы здоровых доноров;

** - показатели для больных до сеанса достоверно отличаются от соответствующих показателей после сеанса.

Таблица 2

Достоверные изменения клинических показателей в ходе диализной процедуры

Название показателя	До сеанса гемодиализа	После сеанса гемодиализа	% изменения	t	p
Гематокрит	0,250±0,004	0,270±0,005	8	6,8	<0,001
Артериальное систолическое давление, мм. рт. ст.	137,3±2,0	129,6±2,1	-5,6	5,4	<0,001
Артериальное диастолическое давление, мм. рт. ст.	84,2±1,2	79,4±1,2	-5,7	5,6	<0,001
Масса тела, кг.	65,2±0,9	62,3±0,9	-4,4	2,3	<0,001
Калий плазмы, ммоль/л.	5,46±0,05	3,96±0,03	-27,5	25,9	<0,001
Фосфат плазмы, ммоль/л	2,04±0,04	1,27±0,02	-37,7	17,1	<0,001
Общий кальций плазмы, ммоль/л	2,28±0,01	2,59±0,02	13,6	13,8	<0,001
Мочевина плазмы, ммоль/л	30,43±0,57	11,67±0,26	61,6	18,8	<0,001
Креатинин плазмы, ммоль/л	0,980±0,015	0,471±0,012	51,9	16,5	<0,001

гемолиза таким же образом, как и кислотного (рис. 2). Следует отметить, что ультразвуковой гемолиз является тотальным, и поэтому значение остаточного светопоглощения будет таким же, как и при кислотном гемолизе.

Осмотический гемолиз. В качестве гипотонического раствора использовали 0,45% раствор хлористого натрия, приготовленный из стандартного физиологического раствора путем смешивания его с деионизированной водой в соотношении 1:1.

В малую кювету вносили 1 мл разведенной крови, наслаивали на нее 1 мл стандартного физиологического раствора, и после перемешивания регистрировали исходное значение светопоглощения (h). Затем кювету промывали физиологическим раствором и вносили в нее последовательно 1 мл разведенной крови и 1 мл деионизированной воды. Смесь перемешивали, и регистрировали светопоглощение с интервалом 15 секунд до момента пятикратного повторения одного и того же значения, которое обозначали как длительность осмотического гемолиза t (рис. 3). Следует отметить, что в 0,45% растворе NaCl тотального гемолиза обычно не происходит, поэтому величина остаточного светопоглощения выше, чем значение d, что дает возможность оценить резистентность эритроцитов ($R_{эп}$) при их нахождении в гипотонической среде:

$$R_{эп} = (m-d)/(h-d) \cdot 100\%,$$

где:

R – резистентность эритроцитов к гипотонической среде в процентах;

m – остаточное светопоглощение осмотического гемолиза;

d – остаточное светопоглощение кислотного гемолиза;

h – исходное светопоглощение осмотического гемолиза

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительная характеристика показателей различного типа резистентности эритроцитов у контрольной группы и у пациентов, получающих лечение хроническим гемодиализом, представлена в табл. 1.

Как видно из приведенных данных, время кислотного гемолиза у пациентов до начала сеанса гемодиализа возрастало на 33,8% по сравнению с этим же показателем у контрольной группы ($t=12,4$; $p<0,001$). Несмотря на то, что в результате сеанса гемодиализа время кислотного гемолиза сократилось на 11,8%, оно продолжало превышать показатель контрольной группы на 18% ($t=7,3$; $p<0,001$). Осмотическая резистентность у больных перед диализом на 6,5% превышала норму ($t=2,35$; $p<0,05$), а после диализа она достоверно увеличилась на 9,23% ($t = 5,04$; $p<0,001$). Длительность осмотического и ультразвукового гемолиза до и после диализа достоверно не отличалась от аналогичных показателей контрольной группы.

В табл. 2 приведен ряд клинических показателей, изменения которых в ходе сеанса гемодиализа оказались достоверными. Разумеется, в наибольшей степени указанные изменения коснулись концентраций мочевины и креатинина, а также концентраций фосфата и калия в плазме крови пациентов.

Следует отметить, что при проведении корре-

Таблица 3

Структура биохимических показателей и показателей гемолиза у больных, получающих лечение регулярным гемодиализом

№ фактора	Состав фактора	Факторная нагрузка	Вклад в структуру, %
1	АД систолическое до сеанса гемодиализа АД систолическое после сеанса гемодиализа АД диастолическое до сеанса гемодиализа АД диастолическое после сеанса гемодиализа	0,859 0,838 0,866 0,858	10,96
2	% удаления мочевины за сеанс гемодиализа % удаления креатинина за сеанс гемодиализа КТ/V	-0,814 -0,472 0,825	8,19
3	Альбумин плазмы Холестерин плазмы	0,900 0,360	7,17
4	Время кислотного гемолиза до сеанса гемодиализа Время кислотного гемолиза после сеанса гемодиализа Время ультразвукового гемолиза до сеанса гемодиализа Время ультразвукового гемолиза после сеанса гемодиализа	-0,749 -0,740 0,585 0,670	5,72
5	Гематокрит до сеанса гемодиализа Гематокрит после сеанса гемодиализа Эритроциты Гемоглобин СОЭ	0,772 0,782 0,871 0,876 -0,546	4,72
6	pH BE*	0,829 0,802	4,25
9	Осмотическая резистентность до сеанса гемодиализа, % Осмотическая резистентность после сеанса гемодиализа, % Время осмотического гемолиза до сеанса гемодиализа Время осмотического гемолиза после сеанса гемодиализа	0,726 0,667 0,522 0,380	3,76

* – резервная щелочность (показатель дефицита/избытка оснований).

ляционного анализа все связи между показателями гемолиза, а также все их связи с клиническими показателями оказались весьма слабыми. Так, коэффициент корреляции времени кислотного гемолиза со временем ультразвукового гемолиза до сеанса гемодиализа составил $-0,274 \pm 0,068$ ($t=4,0$; $p<0,001$), а после сеанса – $-0,314 \pm 0,067$ ($t=4,7$; $p<0,001$). Таким образом, чем ближе к норме находилось состояние поверхностных, гликокаликсных слоев мембраны эритроцита в отношении химической резистентности (в частности, степени протонирования локальных сайтов, несущих отрицательный поверхностный заряд), тем выше оказалась и ее механическая прочность.

Выявлена слабая отрицательная связь между временем кислотного гемолиза и содержанием кальция и альбумина в плазме крови пациентов после сеанса гемодиализа. Коэффициенты корреляции составили $-0,206 \pm 0,070$ ($t=2,96$; $p<0,01$) и $-0,216 \pm 0,069$ ($t=3,11$; $p<0,001$) соответственно.

Результаты факторного анализа представлены в табл. 3. Степень структурированности системы, включающей в себя двенадцать факторов, составляет 61%. Количество выбранных факторов соответствует критерию «каменистой осыпи» Кэттеля.

В первый фактор с наивысшим процентом общей дисперсии, составляющим примерно 11%, с наибольшим весом, в который вошли показатели

артериального давления до и после сеанса гемодиализа, отражающие состояние сердечно-сосудистой системы пациентов.

Вторая компонента с удельным весом чуть более 8% характеризует эффективность проводимого сеанса гемодиализа, поскольку в нее вошли проценты удаляемых за 1 сеанс мочевины и креатинина, а также расчетный показатель эффективности гемодиализа КТ/V.

В составе третьего фактора, вклад которого в общую структуру составляет 7,17 %, концентрации альбумина и холестерина в плазме крови, что отражает процессы метаболизма белков и липидов, а также в некоторой степени нутритивный статус пациентов.

Четвертый фактор скомпонован из показателей, связанных исключительно с кислотной и ультразвуковой резистентностью эритроцитов. Наибольшая отрицательная дисперсия характерна для входящего в его состав времени кислотного гемолиза до и после сеанса гемодиализа, а наибольшая положительная дисперсия – для времени ультразвукового гемолиза до и после сеанса гемодиализа.

Пятый и шестой факторы имеют относительно невысокую нагрузку. Пятый фактор характеризует состояние красной крови, шестой – кислотно-основное состояние пациентов. Лишь только девятый фактор объединил показатели ос-

мотической резистентности и длительности осмотического гемолиза эритроцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Систематический анализ экспериментального гемолиза прежде всего подтверждает ранее приведенное положение о несхожести механизмов различных его типов [17]. Если представить механизм кислотного гемолиза как процесс последовательной реализации диффузии протонов и денатурации белковых компонентов с соответствующим изменением их структуры и разрывом большого числа валентных неспецифических связей, то значимые отличия во времени гемолиза у контрольной группы и пациентов хронического гемодиализа, указывают на протонирование преимущественно поверхностных пептидных цепей, остатков сиаловых кислот и некоторых других компонентов плазматических мембран при относительном ацидозе пациентов. Только в этом случае скорость достижения протонами билипидного мембранного слоя с последующим формированием протонных каналов будет, в основном, определяться электростатическим взаимодействием свободно диффундирующих ионов водорода с фиксированными поверхностными зарядами. Известно, что проницаемость клеточной мембраны для протонов аномально высока – примерно на 4–5 порядков выше, чем для других простых ионов [30]. Возможно, это связано с наличием в составе мембран небольшого количества слабых кислот, которые и выступают в роли переносчиков протонов [31]. Однако при резком увеличении количества протонов в растворе, контактирующем с поверхностью клетки, как это происходит при кислотном лизисе, первым этапом на пути образования протонного тоннеля может стать появление гидрофильной поры критического размера, вероятность затекания которой мала. С другой стороны, согласно предложенной еще в 1989 г. Н.М. Митрохиным и М.В. Муниповым схеме [32], образованию подобной «дыры» в мембране предшествует многоступенчатое взаимодействие протонов с центрами связывания. Следует подчеркнуть, что центр связывания, по данной версии, находится «на мембране или в строме эритроцита». Результаты собственных экспериментов свидетельствуют об отсутствии выраженного эффекта стабилизации билипидного слоя эритроцитарной мембраны в ходе сеанса гемодиализа, некоторая стабилизация достигается лишь за счет изменения состава плазмы крови [33].

Сокращение времени кислотного гемолиза эритроцитов после сеанса гемодиализа, по всей види-

мости, является результатом ускорения диффузии протонов к центрам связывания после диализного депротонирования поверхности клетки. Таким образом, именно первый этап кислотного гемолиза является лимитирующим. В то же время, процесс изменения поверхностного заряда эритроцитов, по видимому, является общим вне зависимости от типа интоксикационной модификации: воздействие химических токсинов, во всяком случае, также увеличивает кислотную резистентность эритроцитов [33]. Вполне возможно, что клетки могут адекватно метаболически реагировать на изменение внешних условий. В настоящее время обсуждается усиление экспрессии фосфатидилсерина («анионного липопротеина») эритроцитами при ХПН [34, 35]. В рамках обсуждаемого механизма сохранения поверхностного заряда такую экспрессию можно трактовать как компенсаторный механизм, направленный на противодействие патологическому протонированию при уремии.

В целом, динамика кислотного гемолиза у пациентов, представленная в табл. 1, показывает достоверное снижение его времени с приближением к соответствующему показателю у контрольной группы. Поэтому сокращение времени кислотного гемолиза, наряду со снижением концентрации креатинина и мочевины в плазме крови, можно рассматривать как показатель уменьшения уремической интоксикации в результате сеанса гемодиализа.

Таким образом, время кислотного гемолиза может косвенно характеризовать степень уремической интоксикации на клеточном уровне.

Механизм осмотического гемолиза иной. Результаты экспериментов по исследованию осмотической резистентности позволяют говорить об «одноэтапности» лизиса [17], а интенсивность самого процесса трактовать как характеристику «прочности линии белковых взаимодействий». Указанные взаимодействия, как правило, связаны с глубокими изменениями в структурных элементах цитоскелета. Как известно, мембранный скелет включает в себя около 50% всех белков, присутствующих в мембране. Периферические цитоскелетные белки достаточно легко сольбилируются и могут быть переведены в раствор в среде с низкой ионной силой [36], что говорит о решающей роли валентных взаимодействий при формировании двумерной цитоскелетной структуры. Именно поэтому интенсивная гидратация белков при снижении внеклеточной концентрации электролитов, вероятно, приводит к быстрой «поломке» сетчатого каркаса.

В серии работ М.В. Самойлова с соавторами [37, 38, 49] показано, что для уремической интоксикации при ХПН характерна стомацитарная

трансформация. Эти же авторы наблюдали значительное возрастание доли сфероэритроцитов на фоне нормализации общей картины красной крови при обратной трансформации в группах больных именно с диализным лечением. Мы предполагаем, что изменение формы эритроцитов вплоть до сфероцитов, происходящее в связи с поступлением дополнительных количеств воды внутрь клетки в междиализный период, приводит к уменьшению энергии связей белков цитоскелета с разрывом некоторых из них. В дальнейшем происходит быстрое образование пор критического радиуса, особенно на поверхности сферической формы. Образовавшиеся глубокие дефекты мембраны уже не могут быть «залечены», а размеры их вполне достаточны для истечения гемоглобина во внешнюю среду.

В доступной нам литературе сообщения об изменении осмотической стойкости эритроцитов во время сеанса гемодиализа носят весьма противоречивый характер. Так, в 1988 г. Е.А. Стецюк и соавт. выявили снижение осмотической стойкости эритроцитов к моменту окончания сеанса гемодиализа [40]. В более поздних работах других авторов показано, что осмотическая стойкость эритроцитов у пациентов до гемодиализа была ниже, чем у лиц контрольной группы, а к концу сеанса гемодиализа она достоверно не отличалась от аналогичного показателя у контрольной группы [41, 42].

Согласно результатам наших экспериментов, как это следует из табл. 1, получающих лечение регулярным гемодиализом, до сеанса при внеклеточной концентрации NaCl 0,045%, не подвергается лизису значительно большее число эритроцитов, чем у представителей контрольной группы. Более того, в ходе дегидратации эритроцитов как результата ультрафильтрации, в ходе сеанса гемодиализа у больных осмотическая резистентность продолжает интенсивно возрастать. Среди вероятных причин этого явления следует назвать происходящую при умеренной дегидратации стабилизацию спектрин-актиновой сети, а также увеличение отношения площади поверхности эритроцитарной мембраны к внутреннему объему клетки.

Следует отметить, что рост осмотической резистентности, происходящий в ходе сеанса гемодиализа, в среднем составляет 31%, что значительно превышает показатели, приводимые в работе [42], в которой изучалась осмотическая стойкость эритроцитов у гемодиализных больных. Здесь изменение «медианы осмотической нестойкости», представляющей собой значение концентрации раствора NaCl, при котором подвергалось лизису 50% ресуспендированных клеток, достига-

ло лишь 5%. Безусловно, в качестве вероятных причин кардинального расхождения собственных экспериментальных данных, свидетельствующих о значительном возрастании осмотической резистентности эритроцитов при лечении хроническим гемодиализом, с имеющимися в литературе, можно привести и различия в использованных методических приемах, и разницу в состоянии самих эритроцитов разных групп больных на фоне несхожести схем применяемой терапии (например, применение алюминий-содержащих препаратов в тайваньской группе пациентов). Но рост данного показателя у гемодиализных больных, согласно нашим данным, столь значителен, что нуждается в дополнительном объяснении. Среди возможных причин столь своеобразной избирательности в отношении именно осмотической резистентности следует назвать упрочнение цитоскелета и стабилизацию связей между его белковыми структурами и мембранными белково-липидными комплексами эритроцитов гемодиализных больных по сравнению с нормой. Такую селективность, непосредственно связанную с массивированным трансмембранным перемещением воды и выраженной лабильностью связей между различными компонентами плазматической мембраны, можно трактовать как вариант приспособительной реакции эритроцитов к существованию в жестких условиях длительного контакта с системой экстракорпоральной детоксикации.

Что же касается резистентности эритроцитов по отношению к воздействию ультразвуком, то этот показатель оказался неожиданно маловариабельным при проведении гемодиализной процедуры и, более того, практически одинаковым как у пациентов хронического гемодиализа, так и у контрольной группы.

Вполне вероятно, что способность эритроцитов противостоять механическому воздействию не зависит от тех изменений, которые происходят с ними в ходе детоксикации. Косвенным подтверждением постоянства механических характеристик мембраны служит отсутствие выраженной деформируемости эритроцитов во время сеанса гемодиализа [43]. Однако неизменность механических свойств мембраны эритроцитов при длительном их пребывании в условиях уремического стресса в целом остается не вполне понятной.

Низкие значения коэффициентов корреляции при расчете корреляционных соотношений показателей различного типа гемолиза с биохимическими показателями свидетельствует о том, что эритроциты следует рассматривать как достаточно независимые объекты, целостность которых для организма представляет первостепенную важность. Их мем-

брана – это своеобразная последняя «линия обороны», стоящая на пути исчезновения индивидуальных свойств системы. Именно поэтому наиболее значимой из всех установленных слабых корреляционных связей кислотного гемолиза с остальными показателями оказалась связь с механической устойчивостью, и лишь на втором месте оказались корреляционные соотношения с белковым спектром плазмы крови и концентрацией в ней электролитов.

Результатом интерпретации данных, представленных в табл. 3, является уже упомянутая относительная независимость мембранных характеристик эритроцитов от наличия в плазме крови компонентов, элиминируемых в ходе сеанса гемодиализа. Поэтому данные параметры менее информативны по сравнению с классическими показателями, определяемыми обычно у пациентов хронического гемодиализа, такими, как артериальное давление и ряд характеристик процедуры диализа. Вместе с тем объединение в одной компоненте значений кислотной (химической) и ультразвуковой (механической) резистентности вполне закономерно и указывает на общность механизмов сохранения клеточной устойчивости в экстремальных внешних условиях. Отнесение величин, характеризующих осмотическую резистентность эритроцитов, лишь к 9-му фактору, скорее всего, говорит о хорошей адаптации клеточных систем пациентов к трансмембранным перемещениям больших объемов воды. Следовательно, риск дестабилизации мембранных структур при осмотических воздействиях на эритроциты не столь велик как при изменении поверхностного заряда, так и механических свойств мембраны, непосредственно связанных с ее деформируемостью и вязкостью.

Таким образом, приведенные результаты еще раз подчеркивают значимость показателей устойчивости клеточных систем для организма, подвергающегося интенсивным системным стрессам в ходе экстракорпоральной детоксикации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При анализе полученных данных о резистентности эритроцитов к кислотному и осмотическому гемолизу, отражающих функциональное состояние красных кровяных клеток в целом и, в частности, их плазматических мембран, выявлено достоверное позитивное влияние процедуры гемодиализа на клеточный сектор организма пациентов, получающих диализную терапию.

Показано, что в ходе сеанса гемодиализа снижается время кислотного гемолиза и значительно возрастает осмотическая стойкость эритроцитов.

Результаты корреляционного и факторного ана-

лиза полученных данных подтверждают высокую степень автономности эритроцитов. При этом показатели разных типов гемолиза, несколько уступая по своей информативности главным клиническим и биохимическим показателям, все же несут достаточно высокую факторную нагрузку.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Румянцев АШ. Особенности катаболизма белков в процессе развития хронической почечной недостаточности. Автореф. на соиск.....д.м.н., СПб, 2000: 31
2. Михайлович ВА, Марусанов ВЕ, Бичун АБ, Доманская ИА. Проницаемость эритроцитарных мембран и сорбционная способность эритроцитов – оптимальные критерии тяжести эндогенной интоксикации. *Анестезиология и реаниматология* 1993; (5): 66-69
3. Петросян ЭА, Неделько НА, Кадо АХ и др. Диагностическая ценность оценки проницаемости мембран эритроцитов в качестве критерия интоксикационного синдрома. *Клин Лаб Диагн* 2001; (8): 5-8
4. Покровский АА. Липиды. Структура, биосинтез. Превращения и функции. Наука, М., 1977; 118
5. Черницкий ЕА, Воробей АВ. Структура и функции эритроцитарных мембран. Наука и техника, Минск, 1981; 216
6. Поэтова ВГ, Гительзон ИИ, Терсков ИА. Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов. М., 1967; 81
7. Терсков ИА, Гительзон ИИ. Метод химических (кислотных) эритрограмм. *Биофизика* 1957; 2(2): 259-266
8. Трикуленко АВ, Пинишко УВ. Кинетика кислотного лизиса эритроцитов разновозрастных популяций в присутствии лигандов некоторых интегральных белков плазматических мембран. *Гематология и трансфузиология* 1999; 44(1): 16-18
9. Конев СВ. Структурная лабильность биологических мембран и регуляторные процессы. Наука и техника, Минск, 1987; 240
10. Kolanjiappan K, Manoharan S, Kayalvizhi M. Measurement of erythrocyte lipids, lipid peroxidation, antioxidants and osmotic fragility in cervical cancer patients. *Clin Chim Acta* 2002; 326 (1-2): 143-149
11. Abou-Seif MA, Rabia A, Nasr M. Antioxidant status, erythrocyte membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in malignant lymphoma patients. *Clin Chim Lab Med* 2000; 38(8): 737-742
12. Candan F, Gultekin F. Effect of vitamin C and zinc on osmotic fragility and lipid peroxidation in zinc-deficient haemodialysis patients. *Cell Biochem Funct* 2002; 20(2): 95-98
13. Matteucci E, Giampietro O. Oxidative stress in families of type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 2000; 23(8): 1182-1186
14. Devasena T, Lalitha S, Padma K. Lipid peroxidation, osmotic fragility and antioxidant status in children with acute post-streptococcal glomerulonephritis. *Clin Chim Acta* 2001; 308(1-2): 155-161
15. Ibrahim FF, Ghannam MM, Ali FM. Effect of dialysis on erythrocyte membrane of chronically hemodialyzed patients. *Ren Fail* 2002; 24(6): 779-790
16. Vlassopoulos DA, Hadjiyannakos DK, Anogiatis AG et al. Camitine action on red blood cell osmotic resistance in hemodialysis patients. *J Nephrol* 2002; 15(1): 68-73
17. Морозова ТФ, Липина ОВ, Шраго МИ, Бредихина ЛП. Динамика кислотного и осмотического лизиса при различных воздействиях. *Криобиология* 1990; (4): 14-18
18. Заводник ИБ, Пилецкая ТП. Кислотный лизис эритроцитов человека. *Биофизика* 1997; 42(5): 1106-1112
19. Verkman AS, Van Hock AN, Ma T et al. Water transport across mammalian cell membranes. *Am J Physiol* 1996; (270): 2-30
20. Van Os CH, Deen PMT. Role of aquaporins in renal

water handling: physiology and pathophysiology. *Nephrol Dial Transplant* 1998; (13): 1645-1651

21. Сторожок СА, Соловьев СВ. Структурные и функциональные особенности цитоскелета мембраны эритроцита. *Вопр Мед Химии* 1992; 38 (2): 14-17

22. Антонов ВФ. Липидные поры: стабильность и проницаемость мембран. *Соросовский образовательный журнал* 1998; (10): 10-17

23. Козлов ММ, Черномордик ЛВ, Маркин ВС. Механизм образования безбелковых участков мембраны эритроцита: разрыв мембранного скелета. *Биологические мембраны* 1989; 6(6): 597- 611

24. Казеннов АМ, Маслова МН. Структурно-биохимические свойства мембраны безъядерных эритроцитов. *Физиол журн СССР им Сеченова* 1987; 73 (12): 1587-1598

25. Горбунов НВ. Влияние структурной модификации белков на липид-белковое взаимодействие в мембране эритроцитов человека. *Бюлл Эксперим Биол и Мед* 1993; 116 (11): 488-491

26. Заводник ИБ, Пилецкая ТП, Степура ИИ. Механический лизис эритроцитов человека. Стабилизация мембран белками плазмы. *Укр Биохим Журн* 1991; 63 (6): 72-78

27. Шакиров ДФ, Самсонов ВМ, Кудрявцев ВП, Гильманов АЖ. Исследование кислотной и осмотической резистентности эритроцитов у рабочих нефтехимического производства. *Клин Лаб Диагн* 2003; 3 (7): 21-23

28. Иванов ВИ, Голенда ИЛ. Возрастная динамика картины крови и кислотного гемолиза по данным автоматизированного экспресс-анализа в условиях г. Кемерово. *Физиология человека* 1996; 22 (6): 76-81

29. Twardowski ZJ. We should strive for optimal hemodialysis: a criticism of the hemodialysis adequacy concept. *Hemodial Int* 2003; 7 (1): 5-16

30. Gutknecht J. Proton/hydroxide conductance through lipid bilayer membranes. *J Membr Biol* 1984; 82 (4): 105-112

31. Gutknecht J. Proton conductance through phospholipid bilayers: water wires or weak acids? *J Bioenerg Biomembr* 1987; 19 (3): 427-442

32. Митрохин НМ, Мунипов МВ, Команов АВ. Влияние температуры на химическую резистентность эритроцитов. *Биофизика* 1989; 34 (5): 819 -825

33. Суглобова ЕД, Спиридонов ВН, Борисов ЮА и др. Биофизические характеристики мембран эритроцитов у больных, получающих лечение регулярным гемодиализом. 1. Резистентность к действию внешнего каналоформера. *Нефрология* 1998; 2 (4): 68-76

34. Bonomini M, Siroli V, Settefrati N et al. Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10 (9): 1982-1990

35. Bonomini M, Ballone E, Di Stante S et al. Removal of uraemic plasma factor (s) using different dialysis modalities reduces phosphatidylserine exposure in red blood cells. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19 (1): 68-74

36. Казеннов АМ, Маслова МН. Влияние мембранного скелета безъядерных эритроцитов на свойства транспортных АТФаз. *Цитология* 1991; (11): 32 -41

37. Самойлов МВ, Мишнев ОД, Кудрявцев ЮВ и др. Морфофункциональная характеристика эритроцитов при хронической почечной недостаточности и гнойной интоксикации. *Клин Лаб Диагн* 2002; 2 (6): 18 -23

38. Самойлов МВ, Мишнев ОД, Кудрявцев ЮВ и др. Морфофункциональная характеристика эритроцитов при экстракорпоральной эфферентной детоксикации. *Клин Лаб Диагн* 2002; 2 (8): 19-23

39. Самойлов МВ, Мишнев ОД, Кудрявцев ЮВ. Трансформированные и патологические эритроциты при эндогенной интоксикации и экстракорпоральной детоксикации. *Арх Патол* 2002; 64 (5): 36-40

40. Стецюк ЕА, Ярмолинский ИС, Александров Н.П. и др. Исследование реологических свойств крови во время гемодиализа. *Урология и нефрология* 1988; 1: 42-44

41. Jakic M, Rupcic V, Stipanac S, Slanjic V. Osmotic resistance in erythrocytes in patients with chronic kidney insufficiency. *Lijec Vjesn* 1990 Sep-Oct; 112(9-10): 284-7

42. Wu SG, Jeng FR, Wei SY et al. Red blood cell osmotic fragility in chronically hemodialyzed patients. *Nephron* 1998; 78 (1): 28 -32

43. Nowak E, Wyrwicz G, Dabrowski Z et al. Rheological properties of red blood cells (including reticulocytes) in patients with chronic renal disease. *Clin Hemorheol Microcirc* 1999; 21 (2): 87- 94

Поступила в редакцию 14.05.2004 г.