

Ю.А. Борисов¹, Л.В. Дульнева², Е.Д. Суглобова¹

Теоретические и практические результаты оценки структурно-функционального статуса мембран эритроцитов человека

¹Кафедра биологической химии

²Кафедра общей и биоорганической химии

ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, 197022, Санкт-Петербург

Многие годы (уже более 20 лет) одной из ведущих тем нашей лаборатории, созданной в качестве проблемного научно-исследовательского подразделения при отделении хронического гемодиализа (далее – ХГД), остается изучение свойств биологических мембран у пациентов с терминальной стадией хронической болезни почек. В качестве объекта для экспериментов и «универсальной мембранной модели» мы выбрали мембрану эритроцитов. Сам биологический материал – эритроциты пациентов мы получали из остатков проб крови, забираемых при ежемесячном мониторинге клинико-лабораторных показателей. Вопрос о правомочности использования такой экспериментальной модели как структурной составляющей элементов красной крови, отвечающей закономерностям метаболизма большинства соматических клеток, до сих пор обсуждается. Однако, подавляющее большинство исследователей в области медицинской химии солидарны в том, что метаболические пути, характерные для эритроцитов в целом и, в особенности, функционирование их мембран, вполне отражают процессы, протекающие в специализированных клетках органов и тканей [1].

Как известно, мембрана эритроцита, как всякая плазматическая мембрана, представляет собой билипидный слой со встроенными в него белковыми

компонентами: поверхностными, интегральными и полуинтегральными. Следует отметить, что существуют две принципиально разных интерпретации понятия «биологическая мембрана». Часть исследователей понимает под этим определением только билипидный слой с «рыхлой» поверхностью, пронизанный функциональными белками, а другие рассматривают мембрану не только как целостный объект, но и как неотъемлемую часть цитоскелета [2].

Цитоскелет – сложная волокнистая структура, обнаруживаемая только в эукариотических клетках и, в основном, регулирующая их механику. Он обеспечивает физическую опору для плазматической мембраны, определяет форму клетки, взаимное расположение отдельных органелл и реагирует как на внешние, так и на внутренние стимулы. Цитоскелет эритроцита представляет собой упорядоченную сеть, локализованную на внутренней стороне мембраны. Его основные белки представлены белком полосы 3, гликофоринами А, В и С, которые выполняют транспортные и структурные функции. В целом белки эритроцитарного цитоскелета относят к мембранным компонентам, что напрямую связано с их функциональной активностью [2]. Именно благодаря высокой механической прочности и, в то же время, необычайной конформационной лабильности своей плазматической мембраны эритроцит способен выполнять транспортные функции и осуществлять газообмен даже в самых дистанцированных от сердца и легких тканях. Однако, для того, чтобы доставлять гемоглобин в самые отдаленные капилляры, красные кровяные клетки должны быть и прочными, и пластичными, то есть их мембрана должна обладать высокой резистентностью к внешнему воздействию, и прежде всего, к механическим нагрузкам.

Эритроцит, как известно, живет в среднем 120 дней, а затем, постарев и выполнив свои основные задачи, погибает. Чаще всего его гибель – некротическая [3]. Однако, не являясь полноценной клеткой, не имея ни ядра, ни митохондрий, ни ряда других органелл, эритроцит может быть разрушен и по классическому клеточному сценарию – путем апоптоза (эриптоза) [4, 5]. Этот механизм запрограммированной смерти для эритроцита был открыт относительно недавно и в настоящее время интенсивно изучается. В целом же, если устойчивость эритроцитов снижена, то сокращается срок их жизни и возникает анемия. Для больных с терминальной стадией хронической болезни почек характерно угнетение гемопоэза в силу нехватки эритропоэтического фактора (эритропоэтина), приводящее к снижению уровня гемоглобина – «транспортного средства», необходимого для доставки кислорода к тканям, что представляет собой серьезнейшую проблему для таких пациентов.

Стабильность мембраны эритроцита может нарушаться как вследствие «поломки» цитоскелета, так и при изменении свойств билипидного слоя. Изменение свойств белков, непосредственно отвечающих за механическую прочность мембраны, может происходить в условиях уремической интоксикации с участием токсинов различной этиологии, присутствующих в плазме крови, особенно на фоне смещения ее кислотно-основного состояния в кислую область. В этих условиях дополнительное протонирование внешних анионных мембранных сайтов, а, значит, и перезарядка «ворот» транспортных структур, приводят к локальной денатурации белковых структур в некоторых участках мембраны, что влечет за собой прогрессирование ее дисфункции. Такая денатурация сопровождается трансформациями и в билипидном слое. Основной причиной последних является усиление окисления липидных

компонентов. В результате происходят разнообразные изменения как в подвижности липидных компонентов, так и в транспортных процессах, что в конечном итоге приводит к нарушению упруго-эластических свойств мембранного цитоскелета [6].

Контрольным тестом для оценки качества плазматических мембран эритроцитов чаще всего служит определение осмотической устойчивости (osmotic fragility). Стандартная методика «по Идельсону» достаточно трудоемка, но ее результаты информативны: осмотическая резистентность характеризует стабильность мембраны в целом как результат взаимодействия цитоскелета и билипидного слоя - тест устойчивости «на разрыв». Определение осмотической устойчивости применяется как в клинической практике, так и в научных исследованиях [7, 8]. Значительную популярность снискала и другая проба, определяющая качество эритроцитарной мембраны в целом. Это - кислотный лизис, данные о кинетике которого, опубликованные Терсковым и Гительзоном в 1957 году, дали возможность построения так называемых эритрограмм [9]. Протонирование обменных анионных сайтов, изменение конформации гидрофильных структур и нарушение их взаимодействия с гидрофобной «сердцевинной» мембраны, в конечном итоге приводящие к лизису, широко обсуждаются в литературе. Так, например, уже давно показано, что кислотная резистентность достоверно коррелирует с возрастом эритроцитарных популяций [10]. Авторами предложена схема гемолитического процесса, в которой учтены как локализация центров связывания гемолизинов на поверхности мембраны, так и кооперативность последующих превращений этих центров.

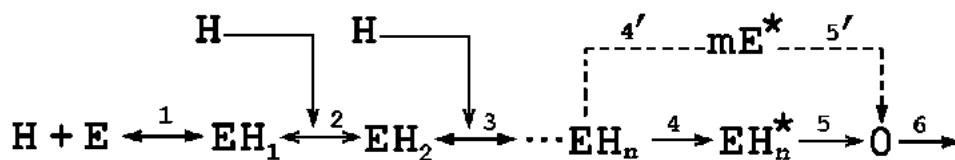


Рис. 1 Общая схема гемолитического процесса (по: Митрохин Н.М., Мунипов М.В., Команов А.В. Влияние температуры на химическую резистентность эритроцитов // Биофизика. – 1989. – Т. 34, № 5. – С. 819 -825.). **E** — центр связывания гемолизина на мембране или в строме эритроцитов; **H** — молекула гемолизина; **EH_n** - комплекс *n* молекул гемолизина с центром связывания; **mE*** — составные части центра связывания; **EH_n*** — измененный в результате взаимодействия центр связывания; **O** — дыры на поверхности мембраны; **1—3** — последовательные стадии взаимодействия молекул гемолизина с центром связывания на мембране или в строме эритроцитов; **4** — изменение конформационного состояния центра связывания; **4'** — диссоциация центра связывания; **5** — нарушение мембранной полупроницаемости и образование дыр, достаточных для выхода гемоглобина; **5'** — повышение осмотического давления цитоплазмы до уровня, соответствующего реологическим свойствам мембраны; **6** — лизис.

Как следует из приведенной выше схемы, на первых этапах происходит латентное повреждение белковых структур мембраны эритроцита, что приводит к нарушению и белок-белковых, и белково-липидных взаимодействий. Третий этап знаменует собой глобальное изменение мембранной поверхности, охватывающее ее значительные участки. Латентное повреждение белковых структур (стадия «накопления поломок») связано с набуханием эритроцитов, и только лишь затем происходит разрушение уже набухших клеток, пребывающих в напряженной сферической форме. Все указанные процессы ускоряются при снижении pH среды.

Вместе с тем изучение состояния самого билипидного слоя как основы мембраны эритроцитов человека представляет самостоятельный интерес, поскольку в ходе окислительного стресса страдают именно его компоненты и, прежде всего, фосфолипиды, подвергающиеся наиболее выраженным изменениям. Поэтому первоначально мы сосредоточили свое внимание на исследовании структурно-функционального статуса изучения качества прежде всего билипидного слоя.

Если в качестве объекта исследования выбирается исключительно билипидный слой, то необходимо применять агенты, воздействующие на отдельные компартменты мембраны и селективные по отношению к каким-либо транспортируемым молекулам. Примером такого агента, использованного в наших исследованиях, является вещество, способное организовать гидрофильные каналы, пронизывающие билипидный слой – полиеновый антибиотик амфотерицинового ряда нистатин. Форма образованного нистатином канала, состоящего из двух полупор – цилиндрическая, и определяется наличием амфотерных структур: гидроксильированные участки молекул нистатина обращены внутрь, а наружная поверхность гидрофобна и взаимодействует с холестерином мембраны. Внутренний диаметр полупоры составляет 4нм и достаточен для прохождения через канал гидратированного иона калия [11].

Эксперимент был поставлен следующим образом. Готовили рабочую пробу, представляющую из себя суспензию эритроцитов, отмытых от плазмы крови и ресуспендированных в среде определенного состава. Состав солевых сред, использованных для приготовления суспензии эритроцитов и их осмолярность, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Состав и величины осмолярности солевых растворов, используемых для приготовления суспензии эритроцитов в рабочей пробе.

Состав раствора, ммоль/л	Раствор Тироде (pH=7,0)	Раствор Моргана (pH=7,34)
KCl, ммоль/л	4	5
NaCl, ммоль/л	141	104
NaHCO ₃ , ммоль/л	-	25
Na ₂ HPO ₄ , ммоль/л	-	5

NaH_2PO_4 , ммоль/л	-	3,5
CaCl_2 , ммоль/л	2	2
MgCl_2 , ммоль/л	3	3
Глюкоза, ммоль/л	10	10
Сахароза, ммоль/л	-	27
Осмолярность, мосм/л	240	270

В качестве регистрирующего устройства применяли миниатюрные ионоселективные электроды, подключенные к иономеру, которые погружали во фторопластовую ячейку с суспензией эритроцитов (см. рис. 2).

Измерительная установка (схема)

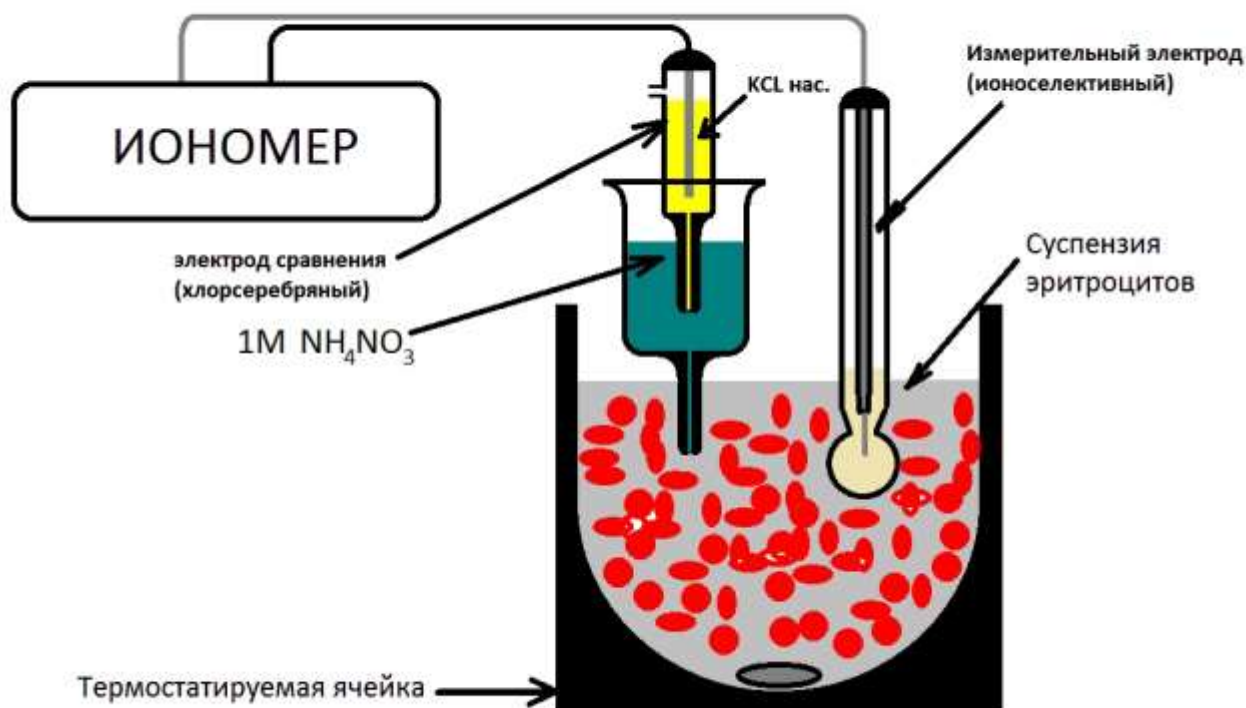


Рис. 2. Общая схема измерительной установки

Сюда вносили заданное количество нистатина, растворенного в диметилформамиде. По сформированным антибиотиком трансмембранным каналам ионы натрия начинали поступать внутрь красных кровяных клеток, а ионы калия – выходить наружу.

В результате получали кинетические зависимости внеклеточной концентрации иона от времени, прошедшего с момента внесения в пробу нистатина. Поскольку трансмембранный градиент концентрации для ионов калия на порядок выше, чем для натрия, то и его концентрация во внеклеточной среде при формировании неселективных нистатиновых каналов менялась в значительно большей степени. Таким образом, выбор в отношении агента мониторинга был сделан в пользу определения интегральных изменений концентрации именно ионов калия. Типичная форма такой зависимости с учетом поправки на самопроизвольный лизис эритроцитов (контрольная проба) представлена на рис. 3.

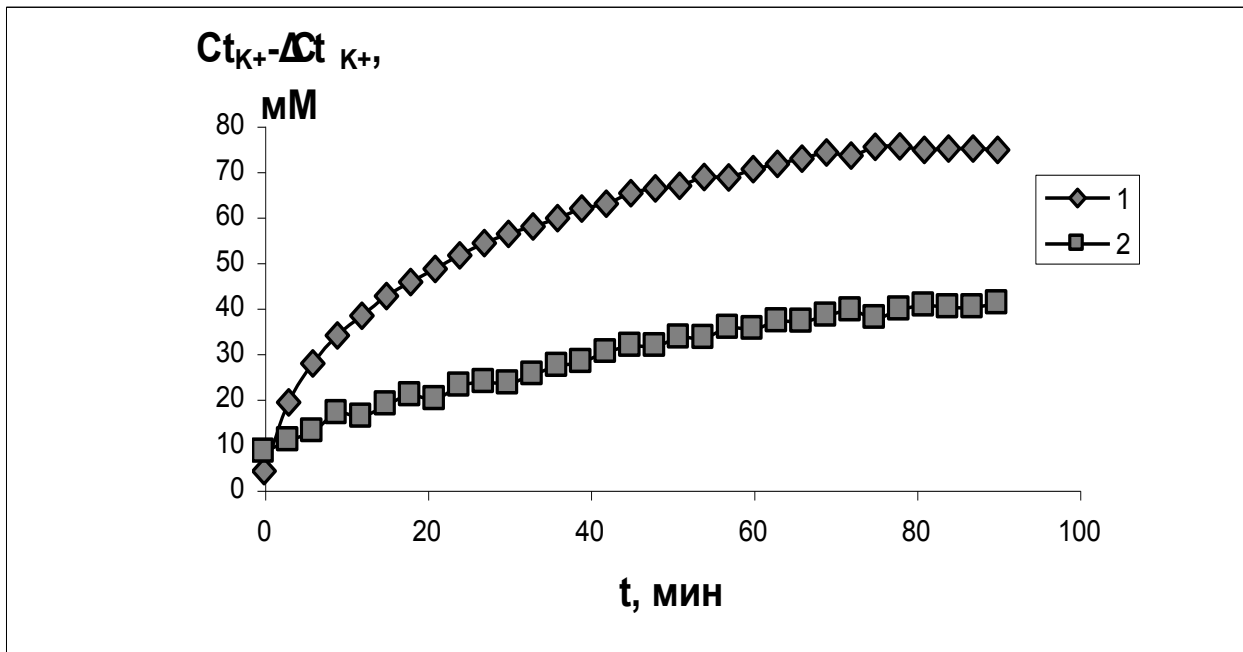


Рис. 3. Динамика внеклеточной концентрации K^+ при действии $2,78 \cdot 10^{-4} M$ ($0,263 \text{ мг/мл}$) нистатина на суспензию эритроцитов человека (объемное соотношение 5:1) в солевых растворах Тироде (кривая 1) и Моргана (кривая 2). По оси ординат: $(CtK^+ - \Delta CtK^+)$, где CtK^+ – внеклеточная концентрация иона в пробе в момент времени t , ΔCtK^+ – разница между внеклеточной концентрацией иона в контрольной пробе в момент времени t и внеклеточной концентрацией иона в контрольной пробе в начальный момент времени. Нистатин внесен в пробу в момент времени $t=0$. Доверительные 95%-ые интервалы не превышают 4% от средних значений.

На основании экспериментальных данных мы предположили, что при действии нистатина на отмытые от плазмы эритроциты во времени ионные потоки постепенно уменьшаются не только благодаря снижению трансмембранного градиента ионов калия, но и в связи с существованием других, параллельно протекающих процессов, и все они в совокупности определяют характер зависимости. С целью ее дифференцировки мы произвели расчет динамики изменения внеклеточной концентрации K^+ в случае, если бы зависимость включала в себя только его диффузию по каналам, сформированным нистатином и сравнили эту расчетную величину с

экспериментальной кинетической зависимостью. Графически результаты расчета представлены на рис. 4.

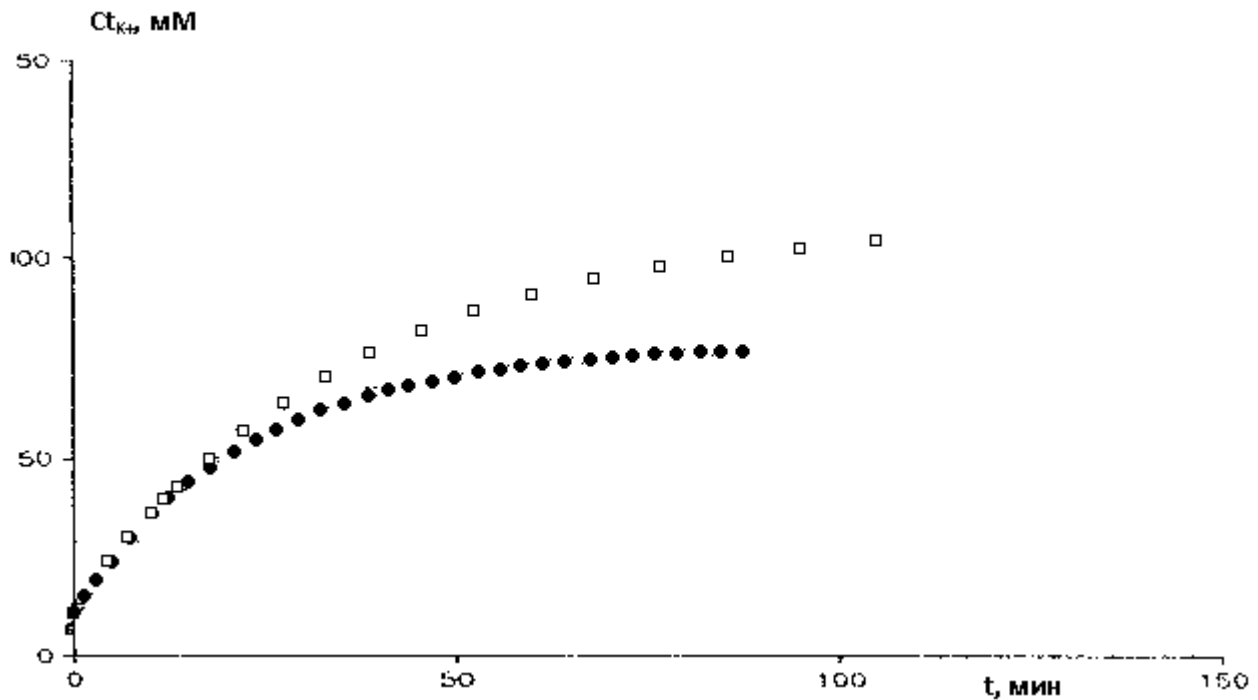


Рис. 4. Теоретическая (расчетная) ($\square$) и экспериментальная ($\bullet$) зависимости внеклеточной концентрации K^+ от времени при ресуспендировании эритроцитов в солевой среде. По осям абсцисс и ординат обозначения те же, что и на рис. 3. Отсчет времени – от момента внесения нистатина в пробу.

Из данных, представленных на рис. 4, следует, что разница в динамике нарастания внеклеточного K^+ между расчетной кривой и реальной кинетической зависимостью, существенна.

Наши опыты показали, что при действии нистатина на отмытые от плазмы эритроциты во времени ионные потоки постепенно уменьшаются, что связано не только с постепенным снижением трансмембранного градиента ионов калия, но и с инактивацией сформированных каналов. Однако интенсивность процессов репарации, к которым можно отнести такую инактивацию, в значительной степени зависит от физико-химических и биологических параметров внеклеточной среды.

При ресуспендировании клеток в сложном солевом растворе Моргана, максимально приближенного по содержанию макрокатионов и макроанионов к ионному составу плазмы крови по сравнению с более простым раствором Тироде, скорость выхода ионов калия из эритроцитов, наблюдающаяся в эксперименте, снижалась, поэтому разница между теоретической (расчетной) и экспериментальной зависимостями увеличивалась. Если же отмытые от плазмы эритроциты ресуспендировались в аутологичной плазме, скорость выхода ионов калия еще более возрастала по той же причине (рис.5).

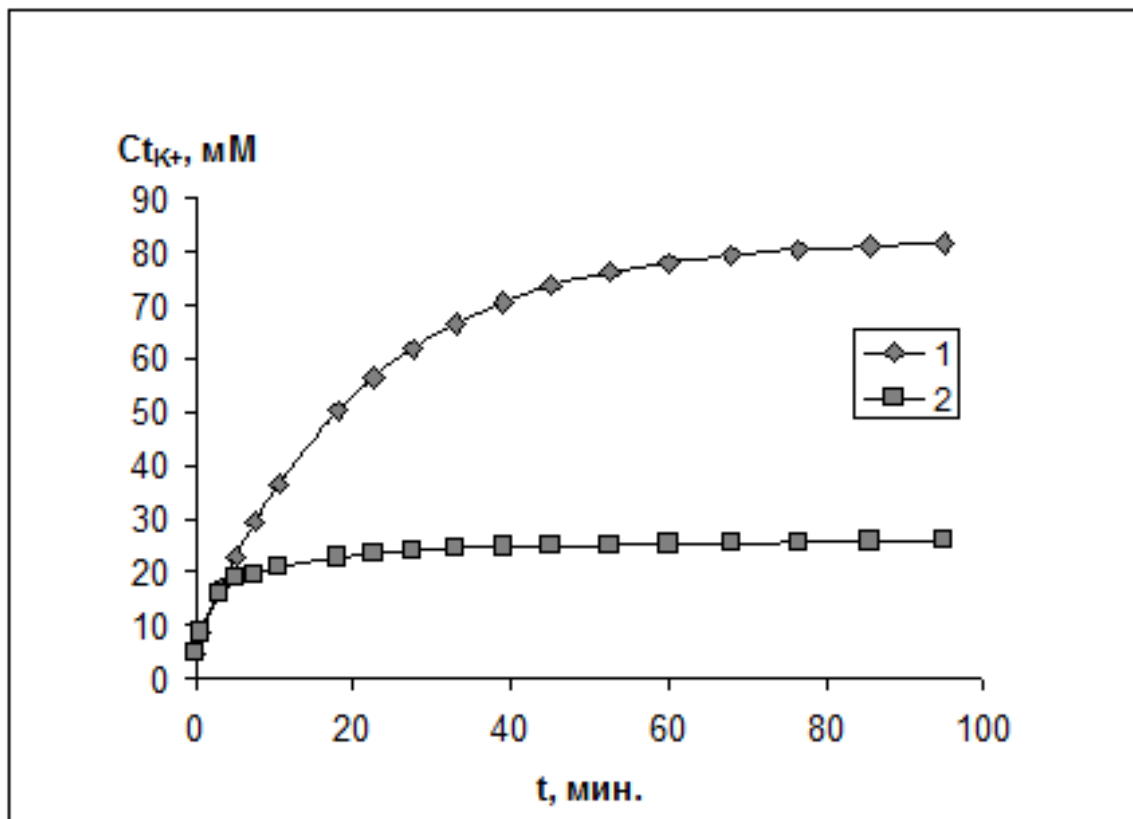


Рис. 5. Теоретическая (расчетная) (♦) и экспериментальная (■) кинетические зависимости внеклеточной концентрации K^+ от времени при ресуспендировании эритроцитов в аутологичной плазме. По осям абсцисс и ординат обозначения те же, что и на рис. 3. Отсчет времени – от момента внесения нистатина в пробу.

В ряде случаев (не во всех!) при ресуспендировании донорских клеток в нативной плазме крови наблюдался реверсный поток ионов калия внутрь эритроцитов, который мы связывали с активизацией работы Na^+, K^+ -АТФазы [12]. В координатах «внеклеточная концентрации ионов калия – время» это выражалось в появлении участка инверсии на графике кинетической зависимости (рис. 6).

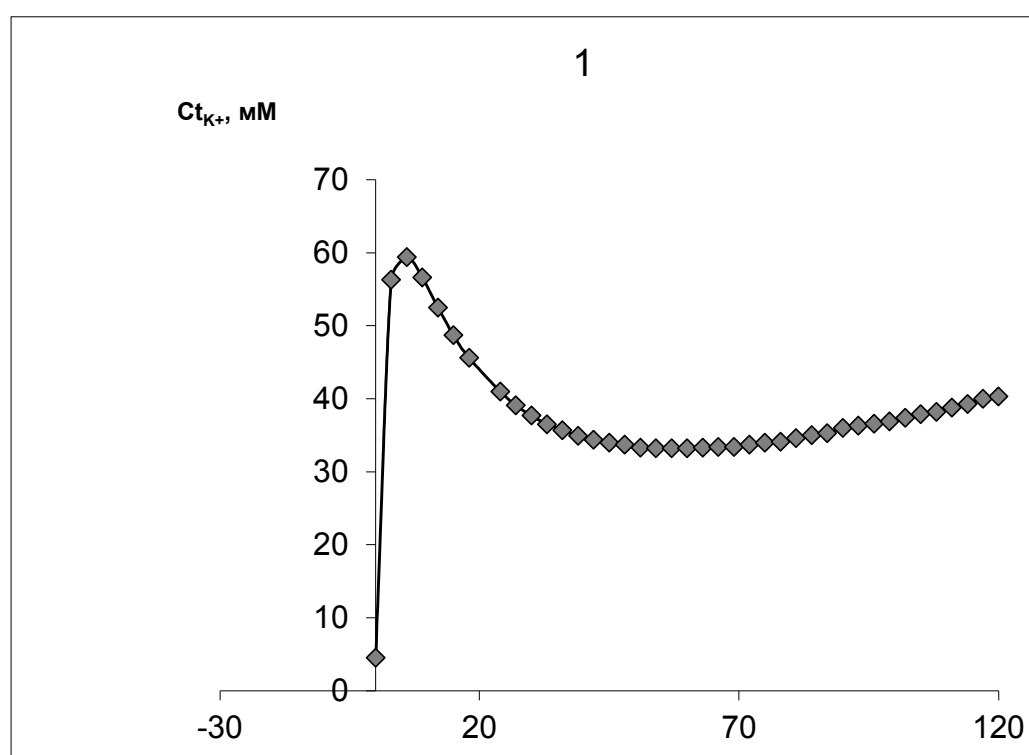


Рис. 6. Инверсионный вариант кинетической зависимости внеклеточной концентрации K^+ от времени при ресуспендировании эритроцитов в аутологичной плазме. По осям абсцисс и ординат обозначения те же, что и на рис. 3. Отсчет времени – от момента внесения нистатина в пробу.

Однако сглаженные или, по крайней мере, поддающиеся фильтрации кинетические зависимости наблюдались лишь для эритроцитов доноров, то есть лиц без ренальной патологии. При исследовании действия нистатина на эритроциты

пациентов ХГД было установлено, что для них кинетические зависимости внеклеточной концентрации ионов калия от времени не являются регулярными и практически не поддаются сглаживанию. Поэтому для их оценки пришлось перейти к относительным величинам: нормировку вели по отношению к лизисным показателям, то есть к общей концентрации ионов калия в пробе после тотального лизиса всех клеток в конце опыта. Таким образом, чтобы учесть все изменения внеклеточной концентрации за определенный временной отрезок, использовали интегральные изменения концентрации ионов. Поэтому в качестве главной характеристики процесса переноса K^+ по каналам, сформированным нистатином, мы предложили «интегральный нормированный выход ионов калия» - величину изменения внеклеточной концентрации ионов калия за определенные временные отрезки, определяемая ионометрически в интервалах 0-3 мин. и 0-10 мин., описывающих быстрые процессы, а также 25-35 мин. и 40-45 мин., характеризующих более медленные процессы, также вносящие вклад в трансмембранный перенос [13, 14]. Отсчет времени вели от момента внесения в пробу нистатина (рис. 7).

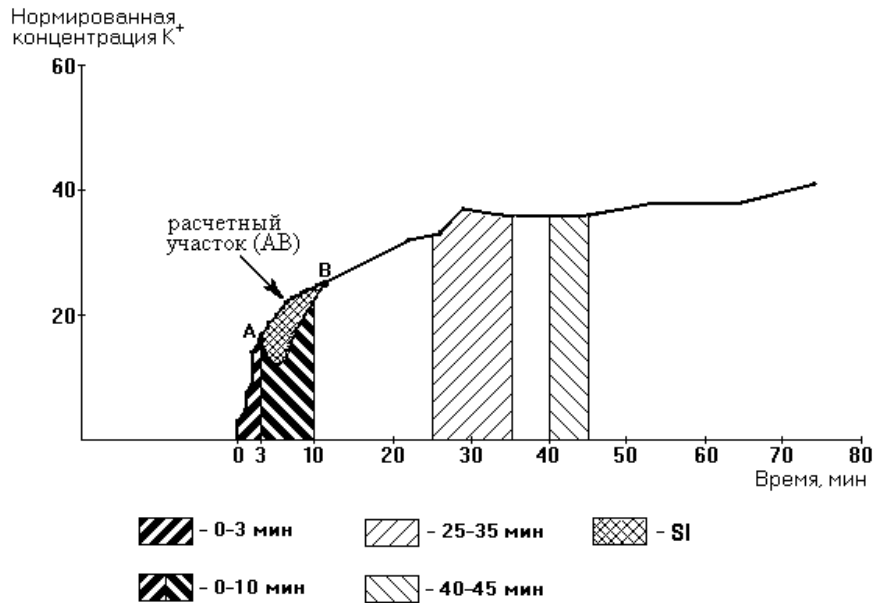


Рис. 7. Способ определения интегрального нормированного выхода калия.

По оси абсцисс: время в минутах, прошедшее с момента внесения нистатина в рабочую пробу. SI – площадь инверсии.

При систематизации данных о резистентности мембран эритроцитов по отношению к внешнему (внеклеточному) действию каналоформера были получены результаты, представленные в таблицах 2 и 3.

Таблица 2.

Интегральный нормированный выход калия при действии нистатина на эритроциты здоровых лиц и пациентов гемодиализа до и после сеанса, при ресуспендировании клеток в солевом растворе.

$M \pm m$

Медиана (min-max)

Показатель	Доноры n = 24 (N_y)	Пациенты n = 147		Критерий U Манна-Уитни, p
		(N_y) _{до}	(N_y) _{после}	
	1	2	3	
0 – 3 мин	12,0±1,1	23,0±1,8	25,0±2,4	$p_{1,2} = 0,088$
	12,1 (1,5-22,9)	15,6 (0,1-120,5)	14,7 (0,7-154,6)	$p_{1,3} = 0,059$ $p_{2,3} = 0,517$

0 – 10 _{мин}	89,0±6,1 91,7 (34,4-140,4)	132,2±8,4 104,9 (5,1-538,3)	141,2±9,8 116,4 (10,5-774,5)	p _{1,2} = 0,147 p _{1,3} = 0,104 p _{2,3} = 0,532
25–35 мин	238,5±12,1 249,7 (125,9-406,5)	312,7±12,7 290,3 (44,1-741,5) *	321,3±13,7 330,0 (11,1-909,8) *	p _{1,2} = 0,044 p _{1,3} = 0,008 p _{2,3} = 0,616
40-45 мин	125,3±6,7 128,2 (65,5-209,5)	177,0±6,6 174,8 (2,8-396,2) *	182,6±7,3 181,2 (9,8-472,5) *	p _{1,2} = 0,002 p _{1,3} = 0,001 p _{2,3} = 0,499
SI	0,5±0,5 0 (0,0-12,6)	24,3±4,6 0 (0,0-329,6) *	25,6±6,8 0 (0,0-758,2) *	p _{1,2} = 0,006 p _{1,3} = 0,021 p _{2,3} = 0,635

Примечания:

* - величина достоверно отличается от значения, полученного для эритроцитов доноров.

(Ny)_{до} - величины нормированной концентрации K⁺, полученные при действии только нистатина на эритроциты, взятые до сеанса гемодиализа;

(Ny)_{после} - величины нормированной концентрации K⁺, полученные при действии только нистатина на эритроциты, взятые после сеанса гемодиализа.

Таблица 3

Интегральный нормированный выход калия при действии нистатина на эритроциты здоровых лиц и пациентов гемодиализа до и после сеанса, при ресуспендировании клеток в аутологичной плазме.

M±m

Медиана (min – max)

Показатель	Доноры n = 24 (Pl + Ny)	Пациенты n = 114		Критерий U Манна-Уитни, p
		(Pl+Ny) _{до}	(Pl+Ny) _{после}	
	1	2	3	
0 – 3 мин	4,7±0,9 3,8 (0,4-21,2)	12,3±1,5 6,2 (0,1-77,5) *	8,5±1,0 5,4 (0,0-77,5) *	p _{1,2} = 0,007 p _{1,3} = 0,024 p _{2,3} = 0,163

0 – 10 мин	39,9±5,1 42,4 (7,0-88,6)	68,1±7,3 42,1 (1,4-500,9)	47,5±4,3 36,4 (0,7-342,6) #	$p_{1,2} = 0,322$ $p_{1,3} = 0,821$ $p_{2,3} = 0,014$
25 – 35 мин	96,8±10,8 85,6 (25,5- 227,9)	153,0±12,2 121,5 (6,4-713,9) *	124,7±8,4 95,2 (5,8-550,3)	$p_{1,2} = 0,046$ $p_{1,3} = 0,277$ $p_{2,3} = 0,055$
40 - 45 мин	50,2±5,6 45,1 (9,2-115,3)	88,7±6,7 67,5 (4,4-393,4) *	73,8±4,8 60,7 (3,2-303,4) *	$p_{1,2} = 0,004$ $p_{1,3} = 0,030$ $p_{2,3} = 0,063$
SI	3,3±2,9 0,0 (0,0-69,0)	15,7±4,2 0,0 (0,0-313,0)	9,5±2,6 0,0 (0,0-147,5)	$p_{1,2} = 0,118$ $p_{1,3} = 0,328$ $p_{2,3} = 0,203$

Примечания:

* - величина достоверно отличается от значения, полученного для эритроцитов здоровых доноров;

- величина достоверно различается до и после гемодиализа.

(PI+Ny)_{до} – величины, полученные при действии нистатина на эритроциты, ресуспендированные в аутологичной плазме крови, взятые до сеанса гемодиализа;

(PI+Ny)_{после} – величины, полученные при действии нистатина на эритроциты, ресуспендированные в аутологичной плазме крови, взятые после сеанса гемодиализа.

Согласно представленным в таблицах 2 и 3 данным, выявленные существенные отличия в резистентности билипидного слоя эритроцитарных мембран у пациентов ХГД по сравнению с лицами без ренальной патологии оказались статистически значимыми, несмотря на значительную индивидуальную вариабельность к внешнему воздействию каналообразующего агента.

Таким образом, данные, представленные в таблицах 2 и 3, свидетельствуют о выраженных деструктивных изменениях, происходящих в билипидном слое не только при уремической интоксикации, но и в ходе детоксикационных мероприятий (сеансов гемодиализа). Ярko проявилось стабилизирующее действие нативной плазмы крови: при ресуспендировании отмытых от нее эритроцитов в солевом растворе, имитирующем лишь ее ионный состав, средние значения интегрального

нормированного выхода калия во всех временных интервалах выше, чем при ресуспендировании клеток в их природном белково-липидном окружении.

Однако следует помнить, что уремическая интоксикация приводит к системной дисфункции, развивающейся при прогрессировании ренальной патологии и имеющей яркие клинические проявления. С другой стороны, при многолетнем существовании эритроцитов в условиях постоянной экстракорпоральной детоксикации существенное значение приобретают и приспособительные изменения в мембранных системах, которые имеют свои особенности. Например, известно, что степень хрупкости эритроцитов с высокой вероятностью отражает филогенетические характеристики, а также способности организма реагировать на осмотические проблемы, связанные с циклическими дегидратациями и регидратациями. Примеры из мира живой природы показывают, что при таком длительном экофизиологическом стрессе механическая прочность эритроцитов возрастает [15]. Подобным «тренировкам на осмотическую стойкость» постоянно подвергаются эритроциты пациентов ХГД во время диализных сессий. Наши многолетние исследования показали, что у этих пациентов за годы жизни в условиях постоянной экстракорпоральной детоксикации включаются адаптационные механизмы. Значительная часть таких приспособительных изменений формируется на протяжении длительного периода времени и представляет самостоятельный интерес для изучения, в том числе и практический с целью подбора адекватной корригирующей терапии [13].

В целом, тесты клеточной резистентности, которым подвергают эритроциты, предназначены для определения их механической прочности. При этом воздействие

направлено не только на структуры билипидного слоя, но и на цитоскелетные. Последовательная деградация характерна не только для поверхностных структур мембранного комплекса, но и для полуинтегральных и интегральных белков, пронизывающих толщу мембраны. Одной из основных причин, приводящих к столь радикальным переменам во взаимодействиях между липидными и белковыми (в основном – цитоскелетными) компонентами, служит изменение конформации центра связывания, отвечающего за сорбцию гемолизирующего агента и, возможно, его частичная денатурация, обратимая или же нет в зависимости от внешних условий. Следует отметить, что при таких вариантах развития событий в любом случае затрагивается цитоскелет.

Поэтому следующим этапом наших исследований стала оценка не столько билипидного слоя мембран эритроцитов у пациентов ХГД как главной мишени, выбранной для воздействия внешних эффекторов, сколько функционального состояния плазматической мембраны в целом, в том числе ее упруго-эластического белкового каркаса как части цитоскелета.

В первую очередь охарактеризовать свойства мембраны как единого структурного образования помогают тесты, в основе которых лежит регистрация механизмов клеточной гибели, имеющих много общих черт с некротическими и некоторое сходство с апоптотическими изменениями, наблюдаемыми *in vivo*. Были рассмотрены три таких механизма: осмотический, кислотный и аммонийный.

Помимо осмотической резистентности, и другие модели лизиса, такие как амонийный и кислотный тоже в значительной степени характеризуют механические свойства мембраны («тест на разрыв»). Поэтому был произведен выбор критериев,

характеризующих закономерности кислотного и аммонийного лизиса, сравнение величин этих параметров у пациентов ХГД и у лиц без ренальной патологии и, во-вторых, выявление возможных корреляций таких параметров с многочисленными временными, физическими, клиническими и биохимическими показателями, регулярно определяемыми у пациентов до сеанса гемодиализа, в том числе характеризующими кислотно-основное состояние организма (КОС) – рН и ВЕ (щелочной резерв).

Для регистрации кислотного и аммонийного гемолиза мы использовали новое направление в применении метода лазерной корреляционной спектроскопии, предназначенное для цитологических исследований. Среди наиболее информативных параметров, позволяющих характеризовать процесс лизиса с применением лазерного сканирующего анализатора, были выбраны V_{α} – максимальная скорость лизиса, определяемая по изменению интенсивности светорассеяния (относительные единицы) в секунду при угле α , T_{α} – время достижения максимальной скорости лизиса при угле α (секунды) и V_{α}/T_{α} – расчетная величина, характеризующая соотношение максимальной скорости лизиса и времени достижения его максимальной скорости при угле α (рис. 4 и 5).

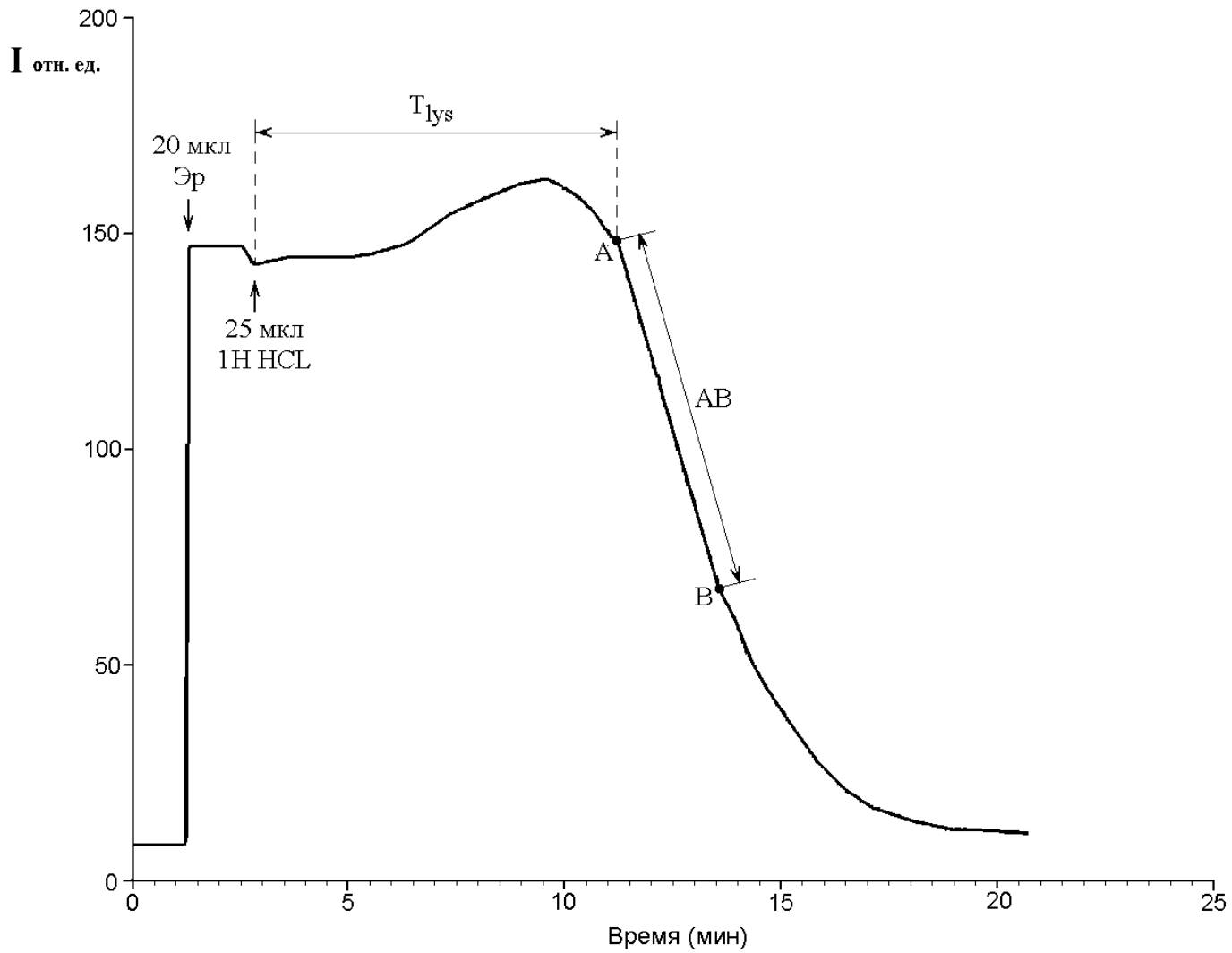


Рис.4. Типичная эритрограмма кислотного лизиса эритроцитов, полученная методом малоуглового светорассеяния ($\text{pH} = 3,58$). Угол $1,25$ град. По оси абсцисс – время в минутах, по оси ординат I – интенсивность светорассеяния в относительных единицах (отн.ед.). Стрелками указаны моменты внесения в пробу 20 мкл исходной суспензии эритроцитов (Эр 20 мкл) и 25 мкл соляной кислоты в концентрации 1H (25 мкл 1H HCl). AB на графике - участок между точками A и B , где достигается максимальная скорость лизиса. T_{lys} – время достижения максимальной скорости лизиса клеток.

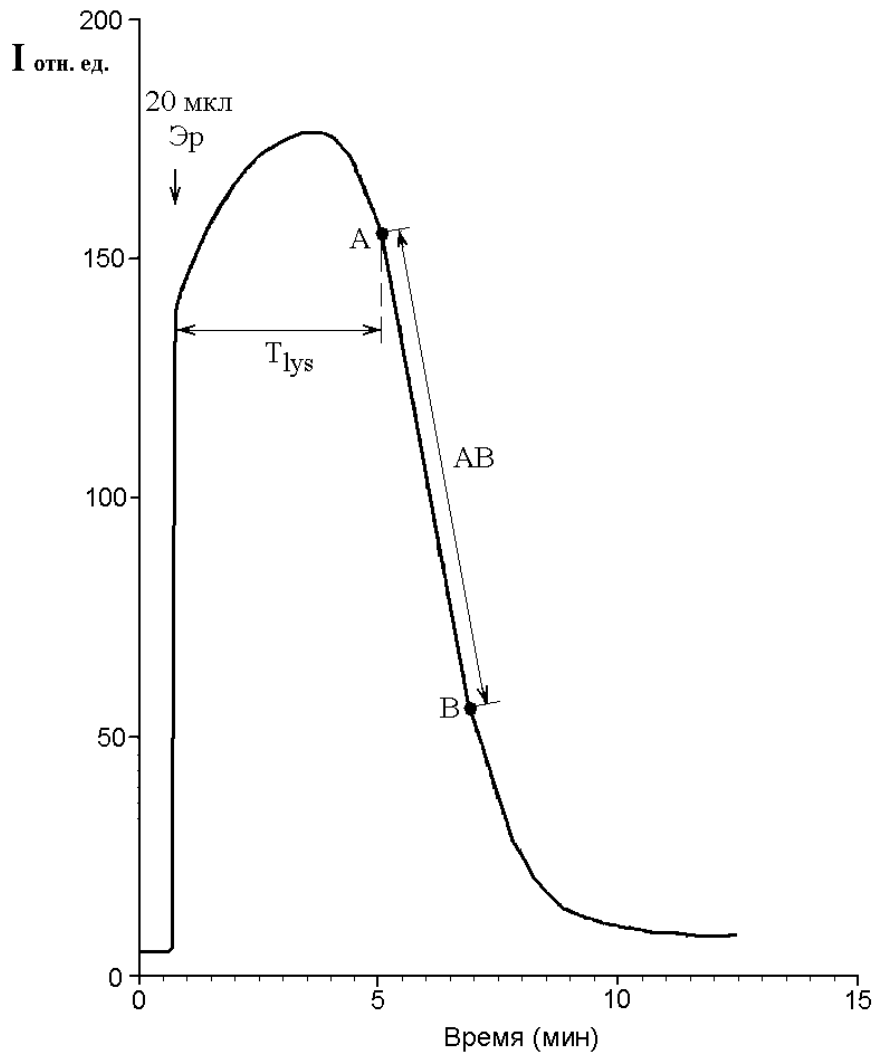


Рис. 5. Типичная эритрограмма лизиса эритроцитов в аммонийной среде, содержащей NH_4Cl в концентрации 140 мМ для лица без ренальной патологии ($\text{pH}=7,40$). Угол 1,25 град. По осям абсцисс и ординат обозначения те же, что и на рис. 1. Стрелкой указан момент внесения в пробу 20 мкл исходной суспензии эритроцитов (Эр 20 мкл). АВ на графике - участок между точками А и В, где достигается максимальная скорость лизиса. T_{lys} — время достижения максимальной скорости лизиса клеток.

В таблицах 4 и 5 приведены величины кинетических характеристик эритрограмм (в том числе и расчетные V_0/T_0 и V_6/T_6) для группы лиц без ренальной патологии и пациентов гемодиализа до и после сессии.

Таблица 4. Параметры кислотного лизиса у доноров и пациентов отделения ХГД.

Параметры лизиса	¹ Доноры M±m Медиана(min-max)	² Пациенты до сеанса ГД M±m Медиана(min-max)	³ Пациенты после сеанса ГД M±m Медиана(min-max)	Критерий Манна-Уитни		Критерий Уилкоксона P ₂₋₃
				P ₁₋₂	P ₁₋₃	
V_0 , отн.ед./сек	0,713±0,106 0,590(0,214-2,322)	0,765±0,081 0,678(0,261-1,871)	0,684±0,094 0,524(0,181-2,356)	0,690	0,765	0,128
T_0 , сек	514,1±44,6 526,5(104,5-863,3)	471,4±45,9 443,7(155,4-970,9)	551,4±47,1 468,0(247,2-1034,0)	0,510	0,701	0,069
V_0/T_0	0,0027±0,001 0,0012(0,0003-0,0222)	0,003±0,001 0,002(0,000-0,012)	0,002±0,000 0,001(0,000-0,004)	0,870	0,733	0,019*
V_6 , отн.ед./сек	0,993±0,174 0,7016(0,3343-3,3070)	0,875±0,113 0,701(0,264-2,824)	0,716±0,074 0,666(0,165-1,256)	0,560	0,327	0,253
T_6 , сек	575,8±72,9 548,1(130,8-1717,0)	463,2±51,4 420,1(152,6-1132,0)	573,6±54,7 503,4(154,9-1229,0)	0,210	0,848	0,028*
V_6/T_6	0,004±0,001 0,001(0,000-0,025)	0,003±0,001 0,001(0,000-0,013)	0,002±0,000 0,001(0,000-0,005)	0,560	0,576	0,016*

Примечание. Условные обозначения: V_0 и V_6 – максимальная скорость лизиса, определяемая по изменению интенсивности светорассеяния (относительные единицы) в секунду при углах светорассеяния 0 град. и 6 град. соответственно, T_0 и T_6 - время достижения максимальной скорости лизиса при углах светорассеяния 0 град. и 6 град. соответственно в секундах, V_0/T_0 и V_6/T_6 - расчетная величина, характеризующая соотношение максимальной скорости лизиса и времени достижения его максимальной скорости при углах светорассеяния 0 град. и 6 град. соответственно.

Таблица 5. Параметры аммонийного лизиса у доноров и пациентов отделения ХГД.

Параметры лизиса	¹ Доноры M±m Медиана(min-max)	² Пациенты до сеанса ГД M±m Медиана(min-max)	³ Пациенты после сеанса ГД M±m Медиана(min-max)	Критерий Манна-Уитни		Критерий Уилкоксона P ₂₋₃
				P ₁₋₂	P ₁₋₃	
V_0 , отн.ед./сек	0,460±0,029 0,435(0,283-0,850)	0,522±0,0490 0,461(0,193-1,055)	0,522±0,039 0,525(0,163-0,839)	0,280	0,241	0,778
T_0 , сек	314,7±21,8	241,1±28,7	227,1±35,7	0,050	0,001	0,150

	311,5(170,1-551,9)	238,5(54,7-757,6)	168,6(78,2-956,0)			
V_0/T_0	0,002±0,000 0,001(0,001-0,004)	0,003±0,001 0,002(0,000-0,011)	0,004±0,001 0,003(0,000-0,011)	0,010	0,008	0,051
V_6 , отн.ед./сек	0,509±0,067 0,400(0,193-1,363)	0,489±0,047 0,429(0,165-1,030)	0,535±0,063 0,488(0,155-1,646)	0,800	0,502	0,397
T_6 , сек	282,8±23,7 286,1(84,1-469,2)	186,3±28,4 160,3(33,2-690,1)	191,1±27,9 151,9(50,8-677,3)	0,010*	0,003*	0,692
V_6/T_6	0,002±0,000 0,002(0,001-0,010)	0,004±0,001 0,003(0,000-0,012)	0,004±0,001 0,003(0,000-0,011)	0,020*	0,021*	0,757

Примечание. Условные обозначения те же, что и в таблице 4.

Данные, приведенные в таблицах 4 и 5, свидетельствуют о значимых различиях кинетических характеристик аммонийного лизиса между группами лиц без ренальной патологии и пациентов ХГД, а также характеристик кислотного лизиса у пациентов ХГД в ходе самой диализной сессии.

Из данных, представленных в таблицах, видно, что ряд параметров аммонийного лизиса (T_0 , T_6), а также полученные на их основе расчетные величины V_0/T_0 и V_6/T_6 достоверно различаются у лиц без ренальной патологии и пациентов ХГД. У пациентов ХГД в ходе сеанса статистически достоверные различия напротив, отмечаются в случае кислотной модели лизиса.

Замена ионов Na^+ на NH_4^+ во внеклеточной среде (аммонийная модель лизиса), по-видимому, приводит к резкой активации аммонийного транспортера – Rh-белка, играющего ключевую роль в участии эритроцитов в азотистом обмене [16]. В свою очередь, воздействие NH_4^+ на внешнюю поверхность мембраны вызывает быстрое нарастание активности $(\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-)$ -обменника и расшатыванию спектриновой сети цитоскелета [17]. У лиц, длительно получающих лечение ХГД, постоянная уремическая интоксикация, по-видимому, приводит к глубокой конформационной перестройке Rh-белка, в результате которой значительно возрастает его сродство к

транспортируемому иону аммония и в результате время достижения максимальной скорости лизиса эритроцитов сокращается. Еще одна вероятная причина такого уменьшения – это сильная зависимость динамики лизиса от степени выраженности окислительного стресса, наблюдающегося в условиях уремии, при котором происходит значительное повреждение липопротеиновых и гликопротеиновых структурных компонентов мембранных систем [6, 18].

С другой стороны, сам сеанс гемодиализа не влияет на параметры аммонийного лизиса. Возможной причиной этой индифферентности является отсутствие прямой связи между трансмембранным перемещением иона аммония и воды [17, 19]. Аммонийный транспорт как вариант переноса формируется, по-видимому, в соответствии с особенностями физико-химических параметров внеклеточной среды, в одном случае – с благоприятным, в другом – с альтерирующим окружением функционирующего эритроцита.

При кислотном лизисе, напротив, время достижения максимальной скорости достоверно различается до и после процедуры гемодиализа, что напрямую связывает этот параметр с интенсивностью протонирования поверхностных остатков сиаловых кислот, потенциал(H^+)-зависимой активацией аквапоринов и, вполне вероятно, реакцией механосенситивных каналов [20, 21, 22, 23]. Быстрое перераспределение внутриэритроцитарного водного пула, происходящее в ходе диализной сессии, является физическим сигналом, реализуемым мембранно-цитоскелетным механизмом и направленным на стабилизацию белково-липидных взаимодействий [24]. Конформационные изменения и, возможно, даже частичная инактивация

поврежденных мембранных транспортных систем приводят к увеличению времени достижения тотального лизиса даже при резком закислении внеклеточной среды. изменением свойств поверхностных мембранных сайтов в результате их депротонирования в ходе гемодиализной сессии: дестабилизация мембраны постдиализных эритроцитов требует значительно больше времени, чем додиализных. Одновременно с этим наличие персистирующего микровоспаления обуславливает снижение рН внутриклеточной среды, сопровождающее изменения кинетики функционирования внутриклеточных ферментативных комплексов. Поэтому эритроциты пациентов ХГД в силу длительного пребывания в условиях хронической экстракорпоральной детоксикации лучше адаптированы к закислению по сравнению с клетками красной крови лиц без ренальной патологии.

Параметры КОС у лиц, длительно получающих лечение ХГД, обычно обозначают термином «корригированный ацидоз». В терминальной стадии хронической болезни почек антиацидотические функции буферных систем утрачиваются и, как следствие, рН крови снижается. Поэтому эритроциты у таких пациентов функционируют при постоянном закислении внешней среды. Эффективная коррекция этого состояния возможна лишь при проведении сеанса гемодиализа.

Специалисты отделения ХГД предоставили нам следующие данные для каждого конкретного пациента: срок пребывания на ХГД, диализное время (продолжительность сеанса), площадь диализирующей мембраны, вес пациента,

различные параметры артериального давления (пульсовое, систолическое, диастолическое), количество эритроцитов и лейкоцитов, уровень гемоглобина, концентрации креатинина, мочевины, мочевой кислоты, калия, натрия, кальция, фосфата, билирубина, общего белка, альбумина, глюкозы натощак, железа сыворотки крови, ферритина, СРБ, активность ГГТП (фермент гамма-глутамилтранспептидаза, который характерен для мембран гепатоцитов), МНО (международное нормализованное отношение – краткая коагулограмма), ПТИ (протромбиновый индекс), общего холестерина, холестерина ЛПВП, холестерина ЛПОНП, холестерина ЛПНП, триглицеридов, значения Kt/V (коэффициент, характеризующий эффективность очистки во время сеанса), ВЕ, ПТГ (паратгормон), рН, активности ферментов трансаминаз и щелочной фосфатазы. Строго учитывались временные соответствия определения тех или иных показателей дате проводимого эксперимента – либо полное совпадение с ней, либо ближайшая дата.

Для оценки результатов экспериментов применяли непараметрические методы статистического анализа с использованием критериев Манна-Уитни и Уилкоксона для парных выборок.

Результаты корреляционного анализа для некоторых из перечисленных показателей представлены в таблице 4.

Таблица 4.

Коэффициенты корреляции экспериментальных и клинико-биохимических показателей у пациентов отделения ХГД

	V0 до/д кисл, отн.ед ./сек	T0 до/д кисл, сек	V0/T0 до/д кисл	V6 до/д кисл, отн.ед./ сек	T6 до/д кисл, сек	V6/T6 до/д кисл	V0 до/д амм, отн.ед./ сек	T0 до/д амм, сек	V6 до/д амм, отн.ед./ Сек	T6 до/д амм, сек	V6/T6 до/д амм
--	--	----------------------------	-----------------------	--	----------------------------	-----------------------	------------------------------------	---------------------------	------------------------------------	---------------------------	----------------------

Срок на ХГД, мес.	,048	,313	-,113	,085	,165	-,069	-,023	-,282	,020	-,152	,086
АД пульсовое	-,257	,366	-,368	-,298	,354	-,376	,022	,055	-,078	,437	-,378
Эритроциты x 10E12 /л	,327	-,237	,291	,127	-,267	,146	-,314	,405	-,345	,044	-,156
Гемоглобин, г/л	,226	-,296	,243	,095	-,191	,119	-,390	,590	-,381	,319	-,372
КТ/V	,003	-,108	,079	,060	-,178	,099	,172	-,223	,114	-,211	,144
Альбумины, г/л	,194	-,270	,291	,207	-,267	,272	-,122	,313	-,042	,275	-,216
СРБ	,105	-,015	,089	-,028	-,100	,000	,130	-,313	,125	-,209	,123
РН до/д	-,321*	,857*	-,714*	-,750*	,786*	-,750*	,000	-,571	,071	-,107	,286
BE до/д	-,595*	,829*	-,829*	-,865*	,847*	-,919*	,090	-,414	,216	-,108	,252

*- достоверные различия.

Как следует из данных, представленных в таблице 3, для абсолютного большинства показателей, как представленных в таблице, так и не вошедших в ее рамки, корреляционные связи с параметрами кислотного гемолиза отсутствуют, причем даже для столь значимых для пациентов ХГД, как уровень гемоглобина, концентрации мочевины и креатинина.

Такие неожиданные результаты, по-видимому, свидетельствуют о высокой степени автономности клеточной мембраны и значительной толерантности ее структурных компонентов к длительному существованию в среде, характеризующейся постоянными изменениями физико-химических параметров и глубокими метаболическими сдвигами, связанных с хронической экстракорпоральной детоксикацией.

С другой стороны, для двух показателей, характеризующих кислотно-основное состояние у пациентов ХГД: для рН крови и ее буферной емкости (BE - щелочной резерв), выявлены устойчивые корреляционные связи с параметрами лизиса.

Наличие корреляционных связей между параметрами кислотного гемолиза и показателями КОС у пациентов ХГД позволяет судить о значительных изменениях

механических свойств мембраны эритроцитов. выработанных у клеток при длительном существовании в условиях постоянно заниженного рН среды. Такие адаптационные изменения, вырабатываемые у клеток при хроническом ацидозе, можно трактовать как своеобразные следы памяти, «записанные» в структурных компонентах мембраны, выражающиеся, по-видимому, в устойчивых изменениях белок-белковых и белково-липидных взаимодействий. Постоянное протонирование ионогенных группировок макромолекул, участвующих в формировании мембранных и внутриклеточных структур, происходящее на фоне десалинизации внешней поверхности мембраны, характерной для эритроцитов у пациентов ХГД, постепенно приводит к глобальным изменениям их свойств. Эти изменения при хроническом ацидозе, происходящие как в структуре самой мембраны, так и в системе «мембрана-цитоскелет» приводят к формированию стабильных межмолекулярных связей, нехарактерных для эритроцитов лиц без ренальной патологии. Это и есть мембранная память - энграммы, накладывающие отпечаток на функциональное состояние поведение эритроцитов у пациентов ХГД. Подобный механизм, видимо, призван обеспечивать лучшую устойчивость эритроцитов к закислению среды по сравнению с клетками красной крови у лиц без ренальной патологии.

Выводы:

1. Выявлено статистически достоверное снижение резистентности эритроцитов в случае аммонийной модели лизиса у пациентов ХГД по сравнению с группой лиц без ренальной патологии.

2. Установлено отсутствие влияния сеанса гемодиализа на резистентность эритроцитов у пациентов ХГД при аммонийном лизисе.
3. Показано, что гемодиализная сессия, снимающая уремическую интоксикацию и ослабляющая на этом фоне влияние окислительного стресса, приводит к повышению устойчивости эритроцитов при кислотном лизисе.
4. Длительное существование эритроцитов у пациентов ХГД в условиях хронического ацидоза вызывает устойчивые адаптационные изменения в клеточных структурах, характеризуемые как энграммы молекулярной памяти, что повышает их резистентность при закислении внешней среды в случае кислотной модели лизиса по сравнению с донорскими.

Список литературы:

1. Kamkin A.G., Kiseleva I.S. Physiology and molecular biology of cell membranes: Manual. Moscow: Akademiya; 2008 (in Russian).
2. Burton N.M., Bruce L.J. Modelling the structure of the red cell membrane // *Biochem. Cell. Biol.* 2011. Vol. 89. P. 200-215.
3. Bratosin D., Estaquier J., Petit F., Tissier J. P., Trandaburu I., Slomianny C. et al. Molecular and cellular mechanism of erythrocyte cell death. An apoptotic phenomenon. *Biochimie.* 1999; 81: 361.
4. Lang E., Syed M., Quadri S.M., Lang F. Killing me softly – suicidal erythrocyte death. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 2012; 44: 1236-43.1. Lang K.S., Lang P.A., Bauer C. et al. Mechanisms of suicidal erythrocyte death // *Cell Physiol. Biochem.* 2005; 15: 195-202.
5. Bratosin D., Estaquier J., Petit F. et al. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria // *Cell Death Differ.* 2001; 8: 1143-1156. 3. Daugas E., Cande C., Kroemer G. Erythrocytes: death of a mummy // *Cell Death Differ.* 2001; 8: 1131-1133.
6. Canestari F., Galli F., Giorgini A., Albertini MC, Galiotta P., Pascucci M. et al. Erythrocyte redox state in uremic anemia: effects of hemodialysis and relevance of glutathione metabolism. *Acta Haematologica.* 1994; 91 (4): 187-93.
7. 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.
8. 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.
9. Gitelzon I.I., Terskov I.A. Erythrograms as method of a clinical blood test Krasnojarsk: Izdatelstvo Sibirskogo otdelenija Akademii nauk SSSR; 1959 (in Russian).
10. Трикуленко А.В., Пинишко У.В. Кинетика кислотного лизиса эритроцитов разновозрастных популяций в присутствии лигандов некоторых интегральных белков плазматических мембран // *Гематология и трансфузиология.* – 1999. – Т. 44, № 1. – С. 16-18.
11. Ермишкин Л.Н., Зильберштейн Л.Я. Ионные каналы, образуемые антибиотиками, и их модели // *Биофизика мембран.* 1982. Т.2. С. 82-164.
12. Борисов Ю.А., Суглобова Е.Д., Щербак А.И. 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.
13. Borisov Yu.A., Lebedeva E.B., Spiridonov V.N., Suglobova E.D. Resistance to external action of a channel former as a characteristic of cell membranes of hemodialysis patients. *Nephrologiya.* 2007; 11 (1): 38-54 (in Russian).

14. Борисов Ю.А., Лебедева Э.Б., Спиридонов В.Н., Суглобова Е.Д. Резистентность к внешнему действию каналоформера как характеристика клеточных мембран пациентов гемодиализа. *Нефрология*, 2007, Т.11, №1, С. 38-54.
15. Buffenstein R., McCarron H.C.K., Dawson T.J. Erythrocyte osmotic fragility of red (Macropus rufus) and grey (Macrofuf fuliginosis and Macrofuf giganteus) kangaroos and free-ranging sheep of the arid regions of Australia. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*. 2001; 171 (1): 41-7.
16. Van Kim C.L., Colin Y., Cartron J.-P. Rh-proteins: Key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Reviews*. 2006; 20: 93-110.
17. Ionescu-Zanetti C., Wang L-P., Di Carlo D., Hung P., Di Blas A., Hughey R. et al. Alkaline Hemolysis fragility is dependent on cell shape: results from a morphology tracker. *Cytometry Part A*. 2005; 65A: 116-23.
18. Миндукшев И.В., Рукояткина М.И., Добрылко И.А., Скверчинская Е.А., Никитина Е.Р., Кривошлык В.В. и др. Особенности апоптоза безъядерных клеток: тромбоцитов и эритроцитов человека. *Российский физиологический журнал*. 2013; 99 (1): 92-110.
19. Chernychev A.V., Tarasov P.A., Semianov K.A., Nekrasov V.M., Hoekstra A.G., Maltsev V.P. Erythrocyte lysis in isotonic solution of ammonium chloride theoretical modeling and experimental verification. *Journal of theoretical biology*. 2008; 251: 93-107.
20. Gullingsrud J., Schulten K. Lipid bilayer pressure profiles and mechanosensitive channel gating. *Biophysical Journal*. 2004; 86: 3496-509.
21. Hamill O.P., Martinac B. Molecular basis of mechanotransduction in living cells. 2001. *Physiological Reviews*. 2001; 81: 658-740.
22. Sachs F., Morris C.E. Mechanosensitive ion channels in nonspecialized cells. *Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology*. 1998; 132: 1-77.
23. Raoux M., Rodat-Despoix L., Azorin N., Giamarchi A., Hao J., Maingret F. et al. Mechanosensor channels in mammalian Somatosensory Neurons. *Sensors*. 2007; 7: 1667-82.
24. Sukharev S., Corey D.P. Mechanosensitive channels: Multiplicity of Families and Gating Paradigms. *Science's stke. Science Signaling*, 2004. Available at: <http://www.stke.sciencemag.org/cgi/content/full/sigtrans;2004/219/re4>.