

УДК 616.61/.155.1

СОРБЦИОННАЯ ЕМКОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПОЧЕК

Муравлёва Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Ключев Д.А., Демидчик Л.А., Калина А.С.

*Карагандинский государственный медицинский университет, Караганда,
e-mail: muravlev@inbox.ru; vilen53@mail.ru; mythrandir79@mail.ru*

Проведен анализ сорбционной емкости эритроцитов и степени поглощения метиленового синего эритроцитами крови больных с хронической болезнью почек. Были обследованы больные с хроническим пиелонефритом и с хроническим гломерулонефритом (гипертоническая и нефротическая формы). У больных с хронической болезнью почек зафиксирован единый тренд: уменьшение связывания красителя с эритроцитами (Сb) при увеличении поглощения метиленового синего эритроцитами (Q). Степень изменения этих параметров зависела от типа патологического процесса в почках. Изменения сорбционной емкости эритроцитов были не столь информативны.

Ключевые слова: хроническая болезнь почек, сорбционная емкость эритроцитов, метиленовый синий

SORPTION CAPACITY OF ERYTHROCYTES AT PATIENTS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE

Muravlyova L.E., Molotov-Luchanskiy V.B., Kluyev D.A., Demidchik L.A., Kalina A.S.

*Karaganda State Medical University, Karaganda, e-mail: mravlev@inbox.ru;
vilen53@mail.ru; mythrandir79@mail.ru*

The analysis of the sorption capacity of red blood cells and the degree of uptake of methylene blue by red blood cells of patients with chronic kidney disease was made. The patients with chronic pyelonephritis and chronic glomerulonephritis (nephrotic and hypertonic forms) were examined. At patients with chronic kidney disease the similar trend was fixed: reducing dye binding with erythrocytes (Cb) and increasing the methylene blue uptake by red blood cells (Q). The degree of change of those parameters depended on the type of pathological process in kidney. The changes in sorption capacity of red blood cells were not so informative.

Keywords: chronic kidney disease, sorption capacity of red blood cells, methylene blue

Хроническая болезнь почек (ХБП) рассматривается как некая наднозологическая форма, объединяющая ряд хронических заболеваний почек на стадии их неуклонного прогрессирования с необратимыми изменениями почечной паренхимы и/или интерстиция. На наш взгляд, использование общепринятой на сегодняшний день концепции ХБП в научных исследованиях позволит сосредоточиться на тонких патогенетических механизмах, ответственных за уменьшение массы действующих нефронов. Прежде всего, речь идет о протеомных aberrациях, обусловленных внутренними и внешними воздействиями: свободнорадикальной агрессией, вирусной атакой, интоксикационными явлениями и т.д. Очевидно, данные агенты либо не прекращают своего влияния на протяжении многих лет, как при хроническом пиелонефрите, либо являются триггерными факторами, запускающими цепь молекулярно-клеточных превращений, развивающихся в непрерывный аутоиммунный самовоспроизводящийся процесс, как при хроническом гломерулонефрите, IgA-депозитный гломерулопатии и других заболеваниях почек.

В настоящее время при изучении механизмов прогрессирования ХБП большое внимание уделяется исследованию физико-

химических свойств мембран эритроцитов. При хронической болезни почек выявлено снижение деформативности эритроцитов. Установлено увеличение агрегации эритроцитов у больных хроническим гломерулонефритом; нарушение реологических свойств крови отмечено у больных с хронической почечной недостаточностью. Показано, что рост осмолярности среды приводит к увеличению жесткости мембран эритроцитов [1, 5, 6, 8]. Нашими собственными исследованиями показано изменение физико-химических показателей эритроцитов крови больных хроническим пиелонефритом и гломерулонефритом [3].

Одним из наиболее распространенных методов оценки состояния мембран эритроцитов является определение сорбционной емкости эритроцитов (СЕЭ) с использованием метиленового синего. Анализ сорбционной емкости эритроцитов дает информацию о состоянии восстановительной способности эритроцитов, которая меняется по мере изменения барьерных свойств плазматической мембраны. Снижение сорбционной емкости интерпретируется с позиции энергетического дефицита в эритроцитах. Повышение сорбционной емкости эритроцитов считается индикатором повреждения мембран и клеточной дезорганизации [2].

В клинических исследованиях сорбционную емкость эритроцитов используют для оценки степени тяжести эндогенной интоксикации [2].

В тоже время вызывает интерес механизм сам характер взаимодействия метиленового синего с эритроцитарной мембраной, дискутируется вопрос, в какой форме метиленовый синий аккумулируется внутри эритроцитов [9, 10].

Gavrilov V.B et al. [7] предложен оригинальный подход, включающий оценку распределения метиленового синего между эритроцитами клетками и средой.

Целью настоящего исследования явилось изучение сорбционной емкости эритроцитов и особенностей поглощения метиленового синего (МС) эритроцитами больных с хронической болезнью почек.

Материал и методы исследования

Нами обследованы пациенты, страдающие хронической болезнью почек на II стадии её развития. Согласно классификации K/DOQI (2002), эта стадия характеризуется сохранной функцией почек (скорость клубочковой фильтрации – немногим меньше 90 мл/мин). Но при этом имеются не исчезающие признаки нефропатии: персистирующий мочевого синдром, структурные изменения, зафиксированные ультразвуковым исследованием почек, вторичная артериальная гипертензия и другие. Интегральный подход ХБП позволил нам, как объединить две основные нозологии, так и распределить пациентов по этиологическому признаку в две разные группы: пациенты, страдающие хроническим пиелонефритом (ХПл) и больные хроническим гломерулонефритом (ХГН). В первую группу вошел 21 пациент с хроническим пиелонефритом. Во вторую группу были включены больные хроническим гломерулонефритом гипертонической ($n = 12$) и нефротической формы ($n = 11$).

ХПл у всех больных характеризовался латентным течением, то есть обострения процесса протекали с минимальными клиническими проявлениями и/или не фиксировались чаще одного раза в два-три года. Критериями обострения процесса были дизурические явления, в основном в виде поллакиурии и никтурии и/или мочевого синдром с преобладанием лейкоцитурии и малой протеинурии (до 1 г/л в разовой порции утренней мочи и менее 1 грамма за сутки). Для подтверждения инфекционно-воспалительной природы патологии почек проводилось бактериологическое исследование мочи, результат которого читался как положительный при обнаружении не менее 10^6 микробных тел. У 79% больных ХПл высевались условно патогенная *E.coli* и *Enterococci*, у 30% больных микробный пейзаж был представлен *St. aureus*, *Klebsiella* и ассоциациями микроорганизмов.

В период нашего исследования у пациентов основных групп диагностировалась активность процесса минимальной или средней степени (критериями активности были выраженность мочевого синдрома, интенсивность дизурических явлений). Исследования эритроцитов крови проводились на этапах либо поступления в стационар, либо начала наблюдения у нефролога при минимуме лекарственного воздей-

ствия. Антибактериальная терапия начиналась спустя сутки после нашего осмотра и забора крови и мочи на специальные и стандартные виды исследований.

У пациентов с ХГН гипертонической формы выявлялась артериальная гипертензия в пределах 140–155/80–95 мм рт. ст. При этом в моче обнаруживался белок от 0,1 до 1,2 г/л (по общему анализу мочи). Нефротическая форма ХГН характеризовалась высокой суточной протеинурией (свыше 3,5 граммов), гипопротенемией и гиперхолестеринемией. У одного больного отеки получили тотальное распространение по телу в виде анасарки. Вместе с тем на момент нашего обследования пациенты с данной клинической формой гломерулонефрита находились в состоянии начинающейся ремиссии: регрессировала суточная протеинурия до 2–1,5 граммов, значительно уменьшились отеки. У пациента, поступившего в стационар с анасаркой, отеки сохранялись на лице в утренние часы.

Клубочковая фильтрация к моменту начала наших исследований у пациентов составляла в среднем $89 \pm 4,7$ мл/мин (рассчитано по формуле Кокрофта – Голта), уровень креатинина в плазме крови находился в пределах $0,079 \pm 0,08$ ммоль/л, относительная плотность мочи у больных ХПл колебалась от 1,017 до 1,012, у больных ХГН – в пределах 1,018–1,024. Контрольную группу составили здоровые лица ($n = 31$) в возрасте от 19 до 44 лет.

До начала исследования от всех больных и здоровых обследуемых было получено информированное согласие на участие.

Кровь отбирали венепункцией в утренние часы и стабилизировали гепарином. Эритроциты отделяли от плазмы, трижды промывали охлажденным физиологическим раствором. СЕЭ оценивали по методу А.А. Тогайбаева в модификации Т.В. Копытовой [2]. Единицы измерения – %. Кроме того, определяли количество красителя, связавшегося с клетками (Сб), количество красителя, оставшегося в растворе (Св), что позволило рассчитать коэффициент распределения метиленового синего между клеткой и средой (Q). Эти расчеты проводили, используя рекомендации Gavrilov V.B. et.al. [7]. Результаты обрабатывали статистическими методами. Достоверность различий оценивали по критерию Колмогорова – Смирнова.

Результаты исследования и их обсуждение

В таблице приведены результаты исследования поглощения метиленового синего эритроцитами крови больных ХПл и ХГН нефротической и гипертонической форм.

Из данных таблицы следует, что у больных ХПл снижался показатель Сб на 30% по сравнению с таковым контролем. Выявлена отчетливая тенденция к снижению коэффициента Q у больных ХПл по сравнению с контролем. В тоже время расчет СЕЭ не выявил значимых изменений этого показателя у больных обследуемых групп относительно контроля.

У больных ХГН (нефротической и гипертонической форм) снижались показатель Сб и коэффициент Q по сравнению с контролем. Так, у больных ХГН нефроти-

ческой формы показатель Сб был ниже такового контроля на 28 %, коэффициент Q – на 14 %. У больных ХГН гипертонической формы показатель Сб был ниже такового

контроля на 44 %, коэффициент Q – на 19 %. У больных обеих групп зафиксирован рост сорбционной емкости эритроцитов по сравнению с контролем.

Поглощение и сорбция метиленового синего эритроцитами крови больных с хронической болезнью почек ($M \pm m$)

Группы	Сб, %	Q	СЕЭ, %
Контроль ($n = 31$)	$0,69 \pm 0,31$	$1,08 \pm 0,21$	$36,2 \pm 1,4$
ХПН ($n = 21$)	$0,53 \pm 0,32^*$	$0,94 \pm 0,2^*$	$37,9 \pm 13,7$
ХГН н ($n = 12$)	$0,54 \pm 0,29$	$0,95 \pm 0,18$	$43,7 \pm 1,21^*$
ХГН г ($n = 11$)	$0,48 \pm 0,26^*$	$0,91 \pm 0,16^*$	$41,0 \pm 0,12^*$

Примечание: * – достоверность различий с группой контроля ($p \leq 0,001$).

Как следует из полученных данных, у больных ХБП зафиксирован единый тренд: уменьшение связывания красителя с эритроцитами при увеличении диффузии метиленового синего вовнутрь эритроцитов (снижение коэффициента Q) [7]. В тоже время степень изменения этих параметров зависит от вида патологии почек. Выраженное уменьшение показателя Сб у больных ХБП, на наш взгляд, можно объяснить не только диффузией МС в эритроциты. Можно предположить и повышение редуктазной активности, что приводит к образованию лейкоформы метиленового синего (leuco). Аргументом в пользу этого предположения являются результаты исследования [9], показавшие возможность образования leuco-формы метиленового синего при участии системы НАДФН /дисульфид редуктазы в присутствии кислорода. Восстановление метиленового синего с участием редуктаз эритроцитов рассматривалось также и в работе [10].

Другим фактором, влияющим на распределение метиленового синего, на наш взгляд, является состояние белков и липидов мембран эритроцитов. Ранее нами была показана различная устойчивость мембран эритроцитов к окислительному повреждению белков и липидов при хроническом пиелонефрите и хроническом гломерулонефрите [3], что также может влиять на связывание и диффузию метиленового синего в эритроциты. Немаловажным фактором является повышенный выход более ригидных молодых форм клеток, что, в частности, наблюдалось при гломерулонефрите [4], что также может влиять на поглощение метиленового синего эритроцитами.

Следовательно, определение СЕЭ не является достаточно информативным для характеристики состояния мембран эритроцитов. Дополнительный расчет связывания красителя с эритроцитами и оценки поглощения метиленового синего эритроцитами позволяет получить более подробную характеристику состояния физико-химических свойств мембран эритроцитов.

Таким образом, полученные нами данные выявили характерные нарушения физико-химических свойств мембран эритроцитов, зависящие от типа патологического процесса в почках.

Список литературы

1. Клеточно-воспалительные механизмы и методы их оценки при активном/прогрессирующем гломерулонефрите / О.Н. Сигитова, Э.А. Гурьянова, А.Г. Щербакова, Г.М. Субаева // Каз. мед.ж. – 2004. – № 2. – С. 106–110.
2. Копытова Т.В. Исследование сорбционной емкости мембран эритроцитов для оценки характера эндогенной интоксикации при дерматозах. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2006. – № 1. – С. 18–19.
3. Сравнительная характеристика функциональных параметров эритроцитов крови больных хроническим пиелонефритом и гломерулонефритом / Л.Е. Муравлёва, В.Б. Молотов-Лучанский, Д.А. Клюев, Е.А. Колесникова, А.М. Мурзатаева, Г.А. Омарова, Г.Т. Колебаева // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 2; URL: www.science-education.ru/96-4586
4. Структурные свойства эритроцитов и активация системы комплемента крови больных с различными формами нефропатий / С.Г. Резван, В.В. Гусинская, В.Г. Артюхов и соавт. // Вестник ВГУ. Серия химия и биология. – 2000. – С. 130–133.
5. Толстоухова Н.В. Клинико – патогенетические аспекты нарушения реологических параметров эритроцитов к больных с хронической почечной недостаточностью: автореф. дис. ... канд. мед. наук – Тюмень, 2008. – 22 с.
6. Brzeszczynska J., Luciak M., Gwozdinski K. Alterations of erythrocyte structure and cellular susceptibility in patients with chronic renal failure: Effect of haemodialysis and oxidative stress // Free Radical Research. – 2008. – Vol. 42. – № 1. – P. 40–48.
7. Gavrilov V.B., Kravchenko O.N., Konev S.V. Accumulation of methylene blue by erythrocytes and determination of its maximum sensitivity to cell damage // Biofizika. – 1999. – № 44(5). – P. 904–909.
8. Jakić M., Rupčić V., Stipanić S., Slanović V. Osmotic resistance in erythrocytes in patients with chronic renal insufficiency // Lijec Vjesn. – 1991. – № 113(11–12). – P. 398–401.
9. Interactions of Methylene Blue with Human Disulfide Reductases and Their Orthologues from *Plasmodium falciparum* / K. Buchholz, R.H. Schirmer, J.K. Eubel et al. // Antimicrob Agents Chemother. – 2008. – Vol. 52(1). – P. 183–191.
10. May J.M., Qu Z.C., Cobb C.E Reduction and uptake of methylene blue by human erythrocytes. // Am J Physiol Cell Physiol. – 2004. – Vol. 286(6). – P. C1390–1398.