

ВЫЯВЛЕНИЕ ЭТАПОВ АУТОИММУННОЙ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АНЕМИИ С ПОМОЩЬЮ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЕФОРМИРУЕМОСТИ И ПЛОТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ

Е.С.Шурхина, В.М.Нестеренко, И.Л.Лисовская, Н.В. Цветаева,
С.В.Колодей, О.Ф.Никулина, Ф.И.Атауллаханов

Гематологический научный центр РАМН, Москва

Исследование плотности и деформируемости эритроцитов больных аутоиммунной гемолитической анемией, включающее длительный мониторинг 5 больных, позволило охарактеризовать патологические процессы, приводящие к изменению популяции эритроцитов в разные периоды течения болезни и выявить основные этапы заболевания (агглютинация, патологическая дегидратация, сочетание патологической дегидратации и микровезикуляции, гемолитический криз, ремиссия).

Ключевые слова: деформируемость эритроцитов, плотность эритроцитов, АИГА

Аутоиммунная гемолитическая анемия (АИГА) — это заболевание, при котором в крови появляются антитела к собственным эритроцитам, провоцирующие сборку комплекса из компонентов комплемента [7]. Сложный механизм взаимодействия эритроцитов с антителами и компонентами комплемента приводит к разнообразным изменениям популяции эритроцитов при АИГА, спровоцированным их агглютинацией, дегидратацией [4] и микровезикуляцией [8], а также секвестрацией поврежденных эритроцитов и выбросом в кровоток ретикулоцитов разной степени зрелости.

Целью настоящей работы был анализ вида и степени повреждения эритроцитов в разные периоды АИГА, исследование их плотности и деформируемости.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Диагноз АИГА ставили на основании рутинных тестов (проба Кумбса, полибренновый тест). Кровь для исследования брали из локтевой вены, в качестве консерванта использовали гепарин. Применяли ресуспендирующий раствор HEPES 10 мМ, KCl 3.5 мМ, NaCl в количестве, необходимом для получения растворов с осмоляемостью 290–170 мОсм рН 7.4.

Распределение эритроцитов по плотности (РЭПП) определяли с помощью фталатного ме-

тода Данон—Мариковского, аппроксимировали функцией Больцмана и находили следующие параметры: среднюю плотность эритроцитов; ширину РЭПП — интервал плотности, в который попадает 60% эритроцитов (исключаются 20% самых легких и 20% самых тяжелых клеток); I_{\max} — максимум на кривой РЭПП — максимальное количество эритроцитов (в %), попадающих в интервал плотности 0.004 г/мл; процент клеток, выходящих за пределы нормы: легкую фракцию, состоящую из клеток с плотностью менее 1.086 г/мл (ретикулоциты); тяжелую фракцию, состоящую из клеток с плотностью более 1.112 г/мл (дегидратированные клетки, сферо- и микросфероциты) [3]. Контрольная группа состояла из 10 здоровых добровольцев в возрасте 23–42 лет (3 женщин и 7 мужчин).

Деформируемость эритроцитов оценивали фильтрационно-осмотическим методом [1], в основе которого лежит измерение фильтруемости эритроцитов при различных осмолярностях среды. Измерения проводили с помощью гемореометра “Ида1” и кинетического фильтрометра “Сip1M”. Оба прибора разработаны и изготовлены в лаборатории физической биохимии ГНЦ РАМН. С помощью “Ида1” измеряется время фильтрации фиксированного объема жидкости и находится зависящий от отношения площади поверхности эритроцита к объему параметр U_{st} (осмолярность, при которой суспензия эритроци-

тов перестает фильтроваться вследствие перекрытия всех пор фильтра). В выбранных условиях измерений (средний диаметр пор — 3 мкм, плотность пор — 7.3 см^{-2} , диаметр фильтра — 10 мм, толщина фильтра — 7 мкм, измеряемый объем — 250 мкл; давление — 60 мм водн. ст., гематокрит — 0.1%; pH 7.4; температура — 24°C) для перекрытия всех пор фильтра в исследуемом образце должно содержаться не менее $30 \pm 10\%$ нефилтрирующихся эритроцитов [1]. У здоровых доноров $U_{\text{сг}} = 195 \pm 5 \text{ мОсм}$ [1,3].

Кинетический фильтрометр позволяет регистрировать изменение скорости фильтрации разбавленной крови во времени. С помощью математической обработки кинетической кривой [2] определяли процент нефилтрирующихся клеток при различных значениях осмолярности среды.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование плотности и деформируемости эритроцитов 29 больных АИГА, включающее длительный (3-5 лет) мониторинг 5 больных, позволило охарактеризовать патологические процессы, приводящие к изменению популяции эритроцитов в разные периоды течения болезни и выявить основные этапы заболевания.

Агглютинация неоднократно выявлялась у 7 больных с неполными тепловыми антителами (1-я подгруппа, $n=8$) и у 9 больных с холодowymi антителами (2-я подгруппа, $n=12$) и проявлялась в уменьшении ширины РЭПП и увеличении I_{max} (таблица; рис. 1, а). Причиной уменьшения ширины РЭПП в цельной крови является слипание эритроцитов, имеющих разную плотность, и образование агрегатов с усредненной плотностью. Средняя плотность эритроцитов при этом близка к норме (таблица). Отмывка эритроцитов приводит к разрушению агрегатов и увеличению ширины РЭПП (рис. 1, а). Деформируемость эритроцитов на этапе агглютинации менялась в широких пределах.

Патологическая дегидратация (ПАД) наблюдалась у 9 больных, обследовавшихся 1-17 раз ($n=25$); Она может продолжаться в течение многих месяцев [3].

Наиболее выраженные отличия от нормы: увеличение средней плотности эритроцитов, увеличение тяжелой фракции эритроцитов, уменьшение $U_{\text{сг}}$ (таблица, рис. 1, б). Уменьшение $U_{\text{сг}}$ свидетельствует об увеличении отношения площади поверхности эритроцита к объему [1]. Такие эритроциты могут фильтроваться при более низкой осмолярности среды, чем в норме.

Параметры, характеризующие плотность и деформируемость эритроцитов на разных стадиях АИГА

Этап	Число больных	Количество исследований (n)	I_{max} , %	Ширина РЭПП, г/мл	Средняя плотность эритроцитов, г/мл	Легкая фракция, %	Тяжелая фракция, %	$U_{\text{сг}}$, мОсм	Гематокрит, %
Контрольная группа	10	10	42.9 ± 4.5	0.006 ± 0.001	1.099 ± 0.001	0.6 ± 0.3	0.3 ± 0.3	195 ± 5	35-50
Агглютинация									
1-я подгруппа	7	8	62.1 ± 9.2	0.004 ± 0.001	1.099 ± 0.002	1.1 ± 1.2	0	185 ± 10	40.4 ± 4.5
2-я подгруппа	9	12	73.5 ± 15.7	0.002 ± 0.001	1.098 ± 0.003	2.4 ± 2.3	0	203 ± 24	34.0 ± 8.0
ПАД	9	25	36.9 ± 6.9	0.008 ± 0.002	1.104 ± 0.003	0.5 ± 0.6	8.6 ± 7.7	177.0 ± 4.7	42.5 ± 3.8
ПАД+микровезикуляция	12	24	27.2 ± 8.2	0.013 ± 0.005	1.105 ± 0.003	1.1 ± 0.9	18.8 ± 15.0	205 ± 14	36.1 ± 5.2
Гемолитический криз	20	70							
1-я подгруппа		55	19.4 ± 5.7	0.023 ± 0.008	1.098 ± 0.014	19.0 ± 11.4	21.2 ± 11.8	248 ± 27	30.6 ± 6.4
2-я подгруппа		15	38.3 ± 11.5	0.010 ± 0.005	1.094 ± 0.004	22.9 ± 19.1	0	214 ± 12	28.9 ± 5.9
Ремиссия	5	11	40.8 ± 6.1	0.007 ± 0.001	1.097 ± 0.001	3.5 ± 0.8	0.1 ± 0.1	194 ± 2	39.0 ± 5.3

Сочетание ПАД и микровезикуляции эритроцитов отмечено у 12 больных, обследовавшихся 1-10 раз ($n=24$), характеризуется увеличением средней плотности эритроцитов, ширины РЭПП, тяжелой фракции (таблица, рис. 1, *а*). В крови с помощью морфологического исследования выявляются сферо- и микросфероциты (до 40%). РЭПП на этом этапе аналогично РЭПП при наследственном микросфероцитозе (рис. 1, *в*). Деформируемость эритроцитов ухудшена (таблица), поскольку у сферо- и микросфероцитов уменьшено отношение площади поверхности к объему [9,10].

Гемолитический криз наблюдался у 20 больных, обследовавшихся 1-24 раза ($n=70$). У всех больных наблюдалось увеличение легкой фракции (рис. 1, *з*) и Усг. Тяжелая фракция в 55 слу-

чаях была увеличена (1-я подгруппа; таблица, рис. 1, *з*), а в 15 случаях (2-я подгруппа; таблица) отсутствовала. Ухудшение деформируемости эритроцитов на этом этапе связано с появлением незрелых ретикулоцитов, а в 1-й подгруппе также с присутствием сферо- и микросфероцитов, наличие которых подтверждалось с помощью морфологического исследования мазков крови.

Ремиссия наступила у 5 больных, обследовавшихся 1-5 раз ($n=11$). На этом этапе сохраняется умеренный ретикулоцитоз, вследствие чего наблюдается незначительное изменение РЭПП: легкая фракция незначительно увеличена, а средняя плотность уменьшена. Остальные параметры в пределах нормы (таблица).

Количество нефилтрующих клеток при снижении осмолярности среды на разных эта-

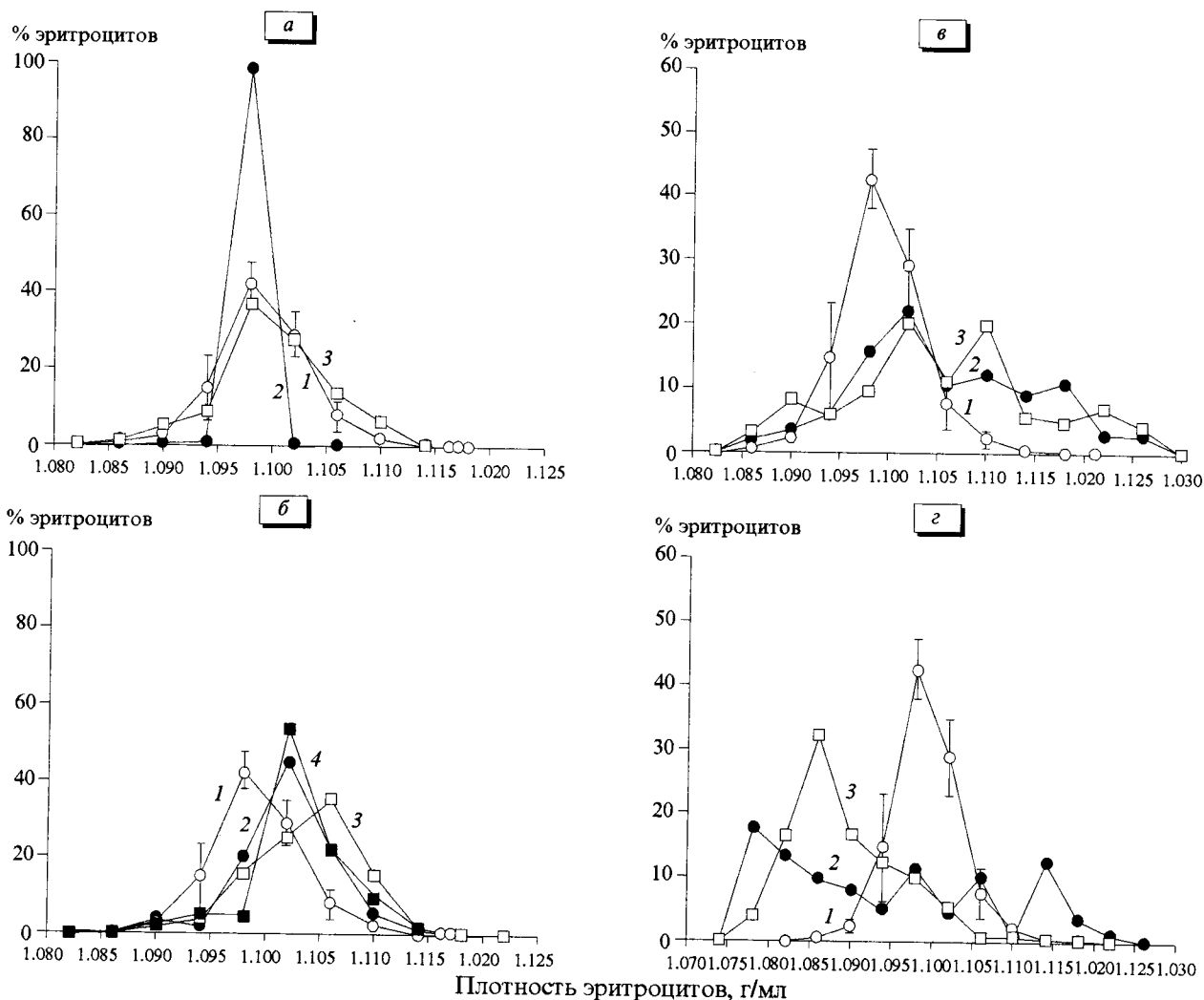


Рис. 1. Распределение эритроцитов по плотности на разных этапах аутоиммунной гемолитической анемии. *а* — агглютинация: 1 — контроль, 2 — кровь, 3 — отмытые эритроциты; *б* — патологическая дегидратация: 1 — контроль, 2-4 — разные больные; *в* — патологическая дегидратация в сочетании с микровезикуляцией: 1 — контроль, 2 — аутоиммунная гемолитическая анемия, 3 — наследственный микросфероцитоз; *з* — гемолитический криз: 1 — контроль, 2 — увеличены легкая и тяжелая фракции, 3 — увеличена легкая фракция.

пах АИГА меняется (рис. 2). Во время гемолитического криза большое количество нефилтрующих клеток появляется уже при осмолярностях, близких к физиологической.

Таким образом, с помощью фильтрационно-осмотического метода исследования деформируемости эритроцитов и фталатного метода измерения распределения эритроцитов по плотности выявлено 5 этапов АИГА: агглютинация, ПАД, сочетание ПАД и микровезикуляции, гемолитический криз, ремиссия. Поскольку эритроциты неодинаковы, они в разной степени связывают антитела и компоненты комплемента. Поэтому на каждом этапе могут присутствовать разные виды патологически измененных клеток, но преобладают характерные для того или иного этапа. В период гемолитического криза в крови преобладает легкая фракция (ретикулоциты), но присутствуют также клетки с нормальной и увеличенной плотностью: дегидратированные клетки, сферо- и микросфероциты (рис. 1, 2).

Патогенез при АИГА зависит от этапа заболевания. Патогенетическим фактором агглютинации является ухудшение микроциркуляции и закупорка мелких сосудов, в ряде случаев уменьшение количества циркулирующих эритроцитов (снижение гематокрита). При ПАД увеличение внутриклеточной вязкости приводит к тому, что необходимое для микроциркуляции изменение формы эритроцитов происходит медленнее, и это приводит к ухудшению снабжения органов и тканей кислородом [9]. Кроме того, дегидратация эритроцитов приводит к увеличению их адгезии к эндотелию [10]. При сочетании ПАД и микровезикуляции в крови присутствуют эритроциты с ухудшенной деформируемостью ($Ucr > N$), что приводит к ухудшению микроциркуляции. Эритроциты с ухудшенной деформируемостью секвестрируются селезенкой [6], поэтому у больных на этом этапе наблюдается снижение гематокрита и спленомегалия. После спленэктомии характерные для этой стадии изменения РЭПП и деформируемости могут наблюдаться в течение многих месяцев. ПАД и микровезикуляция провоцируются увеличением содержания внутриклеточного Ca^{2+} , поэтому на этих этапах нужно с осторожностью применять для лечения препараты, влияющие на кальциевый гомеостаз. При гемолитическом кризе наибольшую опасность представляет падение гематокрита, а также наличие большого количества плохо деформирующихся стресс-ретикулоцитов, которые из-за плохой деформируемости ухудшают реологические свойства крови.

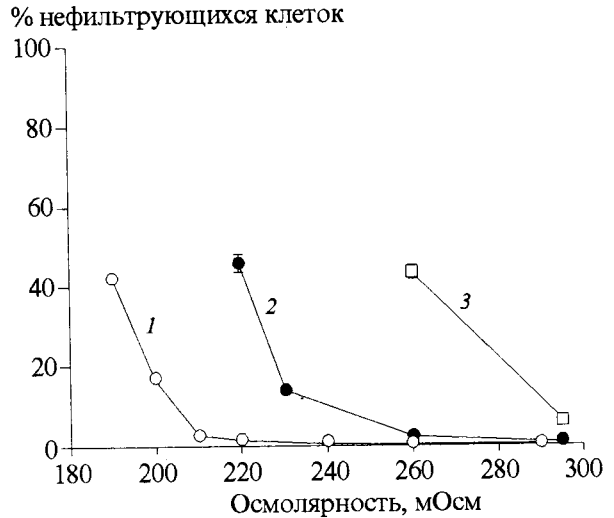


Рис. 2. Зависимость количества нефилтрующих клеток от осмолярности среды на разных этапах аутоиммунной гемолитической анемии (результаты получены на кинетическом фильтрометре "Сip 1M"). 1 — норма, 2 — сочетание патологической дегидратации и микровезикуляции, 3 — гемолитический криз.

Исследование плотности и деформируемости эритроцитов позволит проводить своевременную коррекцию терапии и контролировать ее эффективность. Поскольку результаты исследования обрабатываются с помощью ЭВМ, они легко могут быть включены в программу компьютерной диагностики.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 02-04-48155).

ЛИТЕРАТУРА

1. Лисовская И.Л., Шурхина Е.С., Нестеренко В.М. и др. // Биол. мемб. 1998. Т. 15. С. 300-307.
2. Розенберг Ю.М., Шурхина Е.С., Лисовская И.Л. и др. // Тромбоз, гемостаз и реология. 2001. № 3. С. 33-39.
3. Шурхина Е.С., Цветаева Н.В., Колодей С.В. и др. // Гематол. и трансфузиол. 2003. Т. 48. С. 19-22.
4. Halperin J.A., Brugnara C., Nicholson-Weller A. // J. Clin. Invest. 1989. Vol. 83. P. 1466-1471.
5. Hasegawa S., Nomura T., Imo M. et al. // Clin. Hemorheol. 1994. Vol. 14. P. 571-584.
6. Mohandas N., Phillips W.M., Bessis M. // Seminars Hematol. 1979. Vol. 16. P. 95-115.
7. Muller-Eberhard H.J. // Annu. Rev. Immunol. 1986. N 4. P. 503-528.
8. Pascual M., Lutz H.U., Steiger G. et al. // J. Immunol. 1993. Vol. 51. P. 397-404.
9. Reinhart W.H., Chien S. // Am. J. Physiol. 1985. Vol. 248. P. 473-479.
10. Rivera A., Jarolim P., Brugnara C. // Blood. 2002. Vol. 99. P. 357-363.

Получено 26.12.03