

## ПЛОТНОСТЬ И ДЕФОРМИРУЕМОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ БОЛЬНОГО АУТОИММУННОЙ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АНЕМИЕЙ С АНТИФОСФОЛИПИДНЫМ СИНДРОМОМ В РАЗНЫЕ ПЕРИОДЫ ТЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ

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

Гематологический научный центр РАМН, Москва

**Резюме.** В работе приведены результаты 28-месячного мониторинга деформируемости и плотности эритроцитов больного аутоиммунной гемолитической анемией с антифосфолипидным синдромом. Показано, что при обострении заболевания плотность и деформируемость эритроцитов больного значительно отличаются от нормы. Анализ собственных и литературных данных позволил сделать вывод о том, что наблюдавшиеся изменения плотности и деформируемости эритроцитов являются следствием последовательных процессов дегидратации и микровезикуляции. Показано, что повреждение эритроцитов усиливается постепенно, поэтому при регулярном исследовании деформируемости и плотности эритроцитов больных можно уловить начало обострения до появления клинических признаков и симптомов. Исследование деформируемости и плотности эритроцитов в процессе лечения позволит оценить эффективность применяемой терапии.

**Ключевые слова:** плотность и деформируемость эритроцитов, аутоиммунная гемолитическая анемия, антифосфолипидный синдром

**Summary.** Density and deformability of red blood cells in a patient with autoimmune hemolytic anemia and antiphospholipid syndrome in different periods of the disease course. E. S. Shurkhina, N. V. Tsvetaeva, S. V. Kolodel, I. L. Lisovskaya, V. M. Nesterenko, S. V. Kuznetsov, F. I. Ataulakhonov. Hematological Research Centre, Moscow, Russia. Erythrocytic density and deformability were monitored for 28 months in a patient with autoimmune hemolytic anemia complicated by antiphospholipid syndrome. During the disease exacerbations both parameters significantly differed from the baseline. A comparison of these results with the data available in the literature led to the conclusion that changes in density and deformability of erythrocytes were caused by their dehydration followed by microvesiculation. As the lesions developed gradually, it is possible to predict exacerbation episodes before the appearance of any clinical manifestations by regularly assaying the patient's erythrocytes for deformability and density. Thus, monitoring of the erythrocyte density and deformability in the course of treatment can help to assess its efficacy.

**Key words:** erythrocytic density and deformability, autoimmune hemolytic anemia, antiphospholipid syndrome

Антифосфолипидный синдром (АФС) — это совокупность симптомов, обусловленных наличием аутоантител к различным протеинфосфолипидным комплексам. Основными клиническими признаками АФС являются тромбоцитопения, выкидыши, неврологические нарушения как следствие рецидивирующих тромбозов. Антифосфолипидные антитела относятся к иммуноглобулинам класса G и M, которые обладают способностью инициировать классический механизм активации комплемента. Поэтому у пациентов с АФС нередко наблюдается аутоиммунная гемолитическая анемия (АИГА) — заболевание, при котором происходит разрушение эритроцитов вследствие опосредованного антителами комплементзависимого лизиса. Одной из причин разрушения эритроцитов при АИГА является включение в их мембрану гидрофобного макромолекулярного комплекса, состоящего из терминальных белков каскада комплемента C5b-9. Этот атакующий мембрану комплекс (АМК) увеличивает проницаемость клеточной мембраны для катионов. Происходящие под влиянием АМК изменения эритроцитов можно выявить, анализируя их плотность и деформируемость.

Циркулирующие в крови эритроциты даже в норме отличаются друг от друга по объему, площади поверхности, содержанию гемоглобина и по

многим другим параметрам. Анализ распределений эритроцитов по этим параметрам позволяет определить соотношение клеток с различными морфологическими и функциональными свойствами. В норме плотность эритроцитов хорошо коррелирует с их возрастом, но эта зависимость не линейна [5]. Самые легкие клетки — ретикулоциты. Их плотность около 1,086 г/мл. Путем сложной перестройки мембраны, изменения внутриклеточной структуры и экзоцитоза они постепенно превращаются в обладающие более высокой плотностью дискоциты, которые претерпевают ряд возрастных изменений, включающих дегидратацию и потерю поверхности, и в итоге превращаются в подлежащие удалению клетки. На все эти превращения требуется около 4 мес. Распределение эритроцитов по плотности (РЭПП) у здоровых людей удивительно постоянно, тогда как при различных патологиях РЭПП может значительно отличаться от нормы [8].

Распределение эритроцитов также и по другим параметрам (объему, площади поверхности, содержанию гемоглобина) при различных заболеваниях позволяет определить долю патологически измененных клеток.

Эритроциты способны менять свою форму — деформироваться. Это позволяет им оптимальным образом перемещаться в кровеносном русле и про-

никать в узкие капилляры, диаметр которых гораздо меньше диаметра эритроцита, в кровотоке более крупных сосудов.

Деформируемость эритроцитов определяется геометрическими параметрами (отношение площади поверхности к объему —  $S/V$ ), жесткостью (ригидностью) мембраны и внутриклеточной вязкостью [10]. Последствиями попадания в кровяной поток эритроцитов с ухудшенной деформируемостью являются увеличение вязкости крови, нарушение микроциркуляции, ухудшение снабжения органов и тканей кислородом. Плохо деформирующиеся эритроциты, например сфероциты и микросфероциты, секвестрируются селезенкой, вследствие чего развивается анемия [6]. Одним из заболеваний, при которых в крови появляются микро- и сфероциты, является АИГА.

Цель нашей работы — показать значение длительного мониторинга деформируемости и плотности эритроцитов больного АИГА не только для понимания механизма развития анемии, но также для выявления взаимосвязи изменения этих показателей с разными периодами гемолитического процесса, оценки эффективности лечения и прогнозирования угрозы гемолитического криза.

**Материалы и методы.** Кровь для исследования деформируемости и плотности эритроцитов брали из локтевой вены. В качестве антикоагулянта использовали гепарин. Деформируемость эритроцитов оценивали фильтрационно-осмотическим методом (ФИОМ), разработанным в лаборатории физической биохимии системы крови ГНЦ РАМН [1, 4]. В основе ФИОМ лежит измерение фильтруемости эритроцитов при различных осмолярностях среды через фильтры с диаметром пор 3 мкм. Изменение осмолярности окружающей эритроцит среды позволяет менять его объем. При значениях осмолярности крови 290—300 мОсм покоящийся эритроцит представляет собой двояковогнутый диск с избыточной поверхностью, благодаря чему он может при необходимости менять свою форму. Если понизить осмолярность окружающей эритроцит среды, то концентрация осмотически активного материала внутри эритроцита окажется выше, чем снаружи, вследствие чего в эритроцит войдет такое количество воды, при котором осмолярности внутри и снаружи уравниваются. При этом объем эритроцита увеличится, отношение площади поверхности к объему уменьшится, вследствие чего ухудшится деформируемость эритроцита. Чем меньше запас избыточной поверхности у эритроцита в изотонических условиях, тем меньшее изменение осмолярности потребует для того, чтобы он перестал проходить через поры фильтра. Осмолярность, при которой эритроциты перестают фильтроваться, названа критической ( $U_{cr}$ ).

Для определения фильтруемости эритроцитов использовали модифицированный гемореометр Хансса (патент РФ № 2052194), разработанный и изготовленный в лаборатории физической биохимии ГНЦ РАМН.

РЭПП исследовали с помощью фталатного метода Данон—Мариковского [2]. Метод заключается в разделении суспензий эритроцитов по плотности с помощью смесей диметил- и дибутилфталатов известной плотности. Смесей фталатов с плотностями от 1,068 до 1,138 г/мл с инкрементом 0,004 г/мл готовили заранее и хранили в закрытых флаконах при комнатной температуре. Гематокритный капилляр последовательно заполняли смесью фталатов известной плотности (высота столбика 3—4 мм), а затем исследуемым образцом крови (высота столбика 50 мм). Сухой конец капилляра запаивали. После центрифугирования в гематокритной центрифуге при 12 000 г в течение 10 мин эритроциты, имеющие плотность выше, чем плотность смеси фталатов, оказывались в нижней части капилляра и отделялись от более легких клеток и плазмы смесью фталатов. Высоту столбиков эритроцитов измеряли с помощью линейки и находили процентное содержание легкой фракции эритроцитов для каждого гематокритного капилляра. После этого строили график распределения эритроцитов по плотности.

Общий, биохимический и иммунологический (прямая проба Кумбса и полибренновый тест) анализы крови проводили в лабораториях ГНЦ РАМН с помощью рутинных методов.

Контрольная группа состояла из 10 здоровых мужчин в возрасте от 23 до 48 лет. Для длительного мониторинга был выбран пациент П. Д. В. — мужчина 40 лет. На основании наличия анемии, ретикулоцитоза, положительной пробы Кумбса и положительного полибреннового теста, гипербилирубинемии ему был поставлен диагноз АИГА. Выявленные антитела к кардиолипину, тромбоз вен нижних конечностей и тенденция к тромбоцитопении позволили предположить наличие АФС. Исследования плотности и деформируемости эритроцитов больного проводили в течение 28 мес.

**Результаты и обсуждение.** Полученные для контрольной группы кривые распределения эритроцитов по плотности хорошо совпадали, значения находились в пределах 1,086—1,114 г/мл. Средняя плотность эритроцитов для контрольной группы ( $d_{cp}$ ) составила  $1,098 \pm 0,001$  г/мл. Критическая осмолярность эритроцитов в контрольной группе находилась в пределах 185—195 мОсм.

Исследование деформируемости и плотности эритроцитов пациента П. Д. В. было начато через 2 года после того, как ему был поставлен диагноз АИГА с АФС, и продолжалось в течение 28 мес. В течение периода исследования менялись как клиническое состояние пациента, так и реологические характеристики его эритроцитов. На рис. 1 изображен график изменения средней плотности эритроцитов больного П. Д. В. во времени. Как видно из рис. 1, в начальный период наблюдения (первые 10 мес) плотность эритроцитов была увеличена по сравнению с нормой. В этот же период наблюдалось ухудшение деформируемости эритроцитов (рис. 2) и появление в мазке крови около 4% микросфероцитов. Затем у пациента развился гемолитический криз. В этот период гематокрит пациента уменьшился до 21%, количество ретикулоцитов увеличилось до 15% (рис. 3), уровень гемоглобина снизился до 72 г/л, наблюдались гипербилирубинемия, тахикардия, одышка. Лечение пациента состояло из 4 процедур плазмафереза и приема преднизолона. В результате улучшилось клиническое состояние больного, нормализовались гематокрит и уровень гемоглобина, уменьшился положительный ответ в пробе Кумбса и полибренновом тесте.

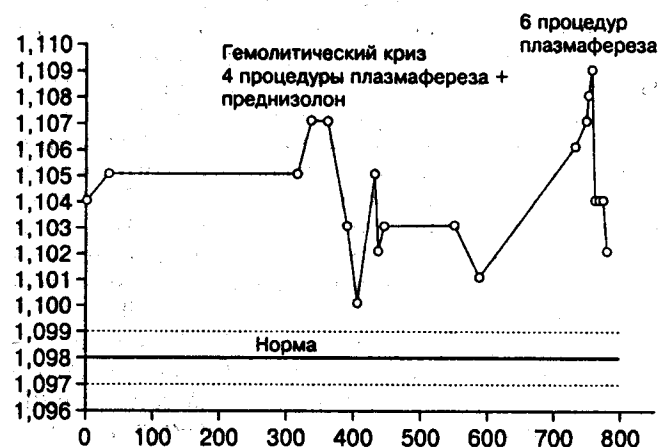


Рис. 1. Динамика изменения средней плотности эритроцитов больного П. Д. В. ( $d_{cp}$ , в г/мл).

Здесь и на рис. 2, 3: по оси абсцисс — дни от начала наблюдения.

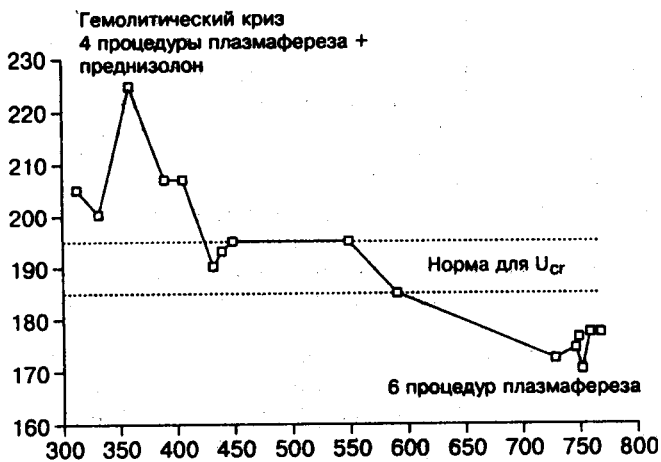


Рис. 2. Динамика изменения деформируемости эритроцитов больного П. Д. В. Критическая осмолярность (в мОсм) увеличивается при ухудшении деформируемости вследствие уменьшения отношения площади поверхности эритроцита к объему.

Средняя плотность эритроцитов пациента в период гемолитического криза увеличилась до 1,107 г/мл (см. рис. 1). Распределение эритроцитов по плотности в это время значительно отличалось от нормы. Как видно из рис. 4, во время обострения плотность основной массы эритроцитов увеличена, в то же время присутствует около 8% легких клеток. Легкая фракция эритроцитов может состоять из ретикулоцитов и из патологически раздувшихся эритроцитов. Во время выхода из гемолитического криза распределение эритроцитов по плотности постепенно приблизилось к норме, но не достигло ее.

Критическая осмолярность эритроцитов ( $U_{cr}$ ) в период гемолитического криза была увеличена, а при улучшении состояния пациента нормализовалась. Наибольшее увеличение  $U_{cr}$  произошло в период максимального увеличения числа ретикулоцитов (см. рис. 3).

В дальнейшем, на фоне постепенно наступившей компенсации гемолитического процесса пациент чувствовал себя хорошо, однако проба Кумбса и полибренновый тест у него оставались положительными, а средняя плотность эритроцитов была по-прежнему выше нормы. Поэтому через год после гемолитического криза ему было проведено 6 процедур лечебного плазмафереза. Средняя плотность эритроцитов пациента до начала лечения была 1,106 г/мл, после начала лечения стала увеличиваться и за 3 нед достигла 1,109 г/мл (см. рис. 1; 2-й курс плазмафереза). Гематокрит в течение этого периода оставался в пределах 41,5—44%. Количество ретикулоцитов было менее 1%, микросфероциты не обнаруживались. Признаков активации гемолиза не было. Через 3 нед средняя плотность эритроцитов стала уменьшаться и еще через 3 нед снизилась до 1,102 г/мл.

Перед, во время и после курса плазмафереза критическая осмолярность эритроцитов была сдвинута в гипотоническую область (см. рис. 2). Значение  $U_{cr}$  было около 175 мОсм при норме  $190 \pm 5$  мОсм.

Известно, что при АИГА в крови появляются антитела к собственным эритроцитам. Присоеди-

вшиеся к поверхности эритроцитов антитела (IgG и IgM) могут спровоцировать сборку гидрофобного макромолекулярного комплекса из компонентов системы комплемента, способного лизировать эритроциты. Как показано в работах [3, 7, 9], у эритроцитов, как и у ядерных клеток, существует защитный механизм против лизиса комплементом. Первый этап защиты наблюдается при малой концентрации комплемента. Поскольку поры, которые образует АМК в мембране, проницаемы для катионов, в клетке увеличивается содержание свободного  $Ca^{2+}$ , вследствие чего открываются Са-зависимые  $K^{+}$ -каналы (эффект Гардоса) [3]. Выход ионов калия из клетки влечет за собой выход воды, что является необходимым для поддержания равенств осмотического давления во внутренней и внешней среде. В результате объем эритроцитов уменьшается, плотность и отношение площади поверхности к объему увеличиваются.

Второй этап защиты от комплементарного лизиса — это экзоцитоз (микровезикуляция) — отщепление части поверхности, на которой закрепился АМК [9]. Следствием этого процесса является уменьшение отношения площади поверхности эритроцита к объему, что приводит к ухудшению деформируемости эритроцитов.

Если концентрация АМК продолжает повышаться, то наступает усиленное разрушение эритроцитов — гемолитический криз.

В период наблюдения у пациента П. Д. В. наблюдались все три описанных выше этапа взаимодействия с АМК с эритроцитами. В начальный период наблюдения у пациента была увеличена плотность и ухудшена деформируемость эритроцитов. Это означает, что происходила патологическая дегидратация эритроцитов и потеря ими части поверхности. В это время в крови пациента обнаруживались около 4% микросфероцитов — клеток, у которых значительно уменьшены объем, поверхность и отношение площади поверхности к объему. Через 10 мес после начала наблюдения у пациента развился гемолитический криз, во время которого у него снизился гематокрит и в крови появилось

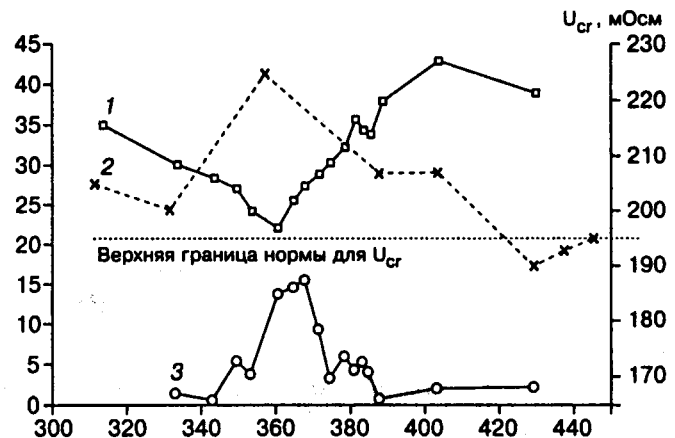


Рис. 3. Изменение гематокрита, процентного содержания ретикулоцитов в крови (слева, в %) и критической осмолярности эритроцитов (справа, в мОсм) больного П. Д. В. до, после и во время гемолитического криза.

1 — гематокрит; 2 — критическая осмолярность; 3 — ретикулоциты.

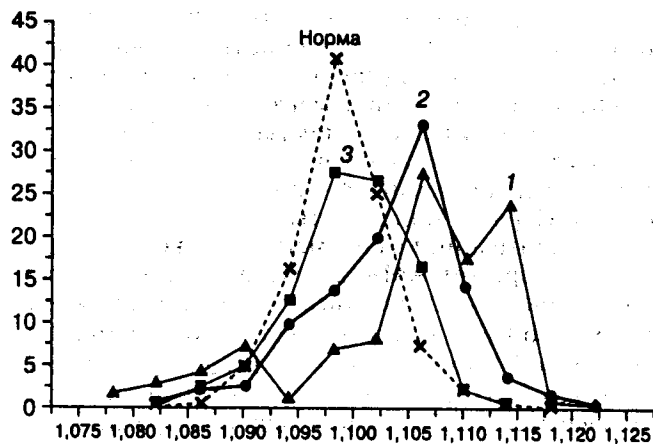


Рис. 4. Распределение по плотности эритроцитов больного П. Д. В. в различные периоды течения болезни.

1 — гемолитический криз; 2 — выход из гемолитического криза; 3 — клиническая ремиссия.  
По оси абсцисс — плотность эритроцитов (в г/мл); по оси ординат — объемный % эритроцитов.

большое количество ретикулоцитов. У больных АИГА ухудшение фильтруемости эритроцитов в период гемолитического криза связано с увеличением числа плохо деформирующихся ретикулоцитов [11].

После проведения курса лечебного плазмафереза плотность и деформируемость эритроцитов больного стали возвращаться к норме. Во время наступившего после гемолитического криза периода полной клинической компенсации гемолитического процесса деформируемость эритроцитов стала нормальной (см. рис. 3). Примерно через год после гемолитического криза пациенту провели повторный курс лечения. До, во время и после лечения критическая осмолярность была ниже нормы, что свидетельствует об увеличении отношения площади поверхности эритроцитов к объему. Средняя плотность эритроцитов во время лечения сначала продолжала увеличиваться, а потом снизилась аналогично тому, как это было в период гемолитического криза.

Сжатие эритроцитов без потери поверхности соответствует первому этапу взаимодействия АМК с эритроцитами. Следует отметить, что признаки дегидратации эритроцитов наблюдались у П. Д. В. в течение всего периода наблюдений. Полибренновый тест тоже был положительным в течение всего периода наблюдений. Это означает, что проводившееся лечение, включающее плазмаферез, не привело к полной элиминации антител.

Поскольку нормализации свойств эритроцитов не произошло, наблюдение за больным будет продолжено.

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что повреждение эритроцитов при АИГА усиливается постепенно и при регулярном исследовании деформируемости и плотности эритроцитов больных можно уловить начало обострения до появления клинических признаков и симптомов, а также контролировать полноту ремиссии, полученную в результате лечения больного.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Лисовская И. Л., Шуркина Е. С., Нестеренко В. М. и др. // Биол. мембраны. — 1998. — Т. 15. — С. 300—307.
2. Danon D., Marikovsky Y. // J. Lab. Clin. Med. — 1964. — Vol. 64. — P. 668—673.
3. Halperin J. A., Brugnara C., Nicholson-Weller A. // J. Clin. Invest. — 1989. — Vol. 83. — P. 1466—1471.
4. Lisovskaya I. L., Shurkhina E. S., Nesterenko V. M. et al. // Bi-orheology. — 1998. — Vol. 35, N 2. — P. 141—153.
5. Lutz H. U. // Blood Cells. — 1988. — Vol. 14. — P. 76—80.
6. Mohandas N., Phillips W. M., Bessis M. // Semin. Hematol. — 1979. — Vol. 16, N 2. — P. 95—115.
7. Muller-Eberhard H. J. // Annu. Rev. Immunol. — 1986. — Vol. 4. — P. 503—528.
8. Nakashima K., Toda S., Miwa S. // J. Lab. Clin. Med. — 1973. — Vol. 82. — P. 297—302.
9. Pascual M., Lutz H. U., Steiger G. et al. // J. Immunol. — 1993. — Vol. 51. — P. 397—404.
10. Reinhart W. H., Chlen S. // Am. J. Physiol. — 1985. — Vol. 248. — P. 473—479.
11. Shurkhina E. S., Lisovskaya I. L., Nesterenko V. M. et al. // Bi-orheology. — 1999. — Vol. 36, N 1/2. — P. 144.