

Снижение фильтруемости эритроцитов при нефрогенной анемии у больных хронической почечной недостаточностью, находящихся на программном гемодиализе

И. И. Степанова, Л. С. Бирюкова, И. Л. Лисовская,
Л. Л. Еременко, Ф. И. Атауллаханов

Гематологический научный центр РАМН, Москва

Резюме

С целью выяснения возможных механизмов снижения деформируемости эритроцитов и ее роли в развитии анемии у больных с ХПН использовали метод фильтрации суспензий эритроцитов через мембранные фильтры с диаметром пор около 3 мкм. В работе сравнивали кривые зависимости индекса фильтруемости (F) и процентного содержания нефилтрирующихся клеток (γ) от осмотической ресуспендирующей среды (u) для суспензий нормальных эритроцитов и эритроцитов больных ХПН, находящихся на программном гемодиализе. Обследовано 33 больных с терминальной стадией ХПН. В качестве контроля исследовали образцы крови 12 здоровых доноров.

Показано, что в изотонических условиях максимальное значение индекса фильтруемости больных ХПН (F_{max}), достоверно снижено по сравнению с нормой. По мере уменьшения осмотической ресуспендирующей среды величина F резко снижается, причем близкое к нулевому значение $F=0,1$ достигается для эритроцитов больных раньше, т.е. при более высоких значениях u , чем в норме. Величина сдвига составляет 15-20 мосм. Процентное содержание нефилтрирующихся клеток γ при $u > 260$ мосм одинаково в суспензиях эритроцитов доноров и больных ХПН. Процентное содержание нефилтрирующихся клеток γ при $u > 260$ мосм одинаково в суспензиях эритроцитов доноров и больных ХПН. При $u < 260$ мосм для суспензий эритроцитов больных наблюдается сдвиг кривой зависимости γ от u вправо на те же 15-20 мосм. Средний клеточный объем MCV эритроцитов больных ХПН снижен по сравнению с нормой на 10%. Наблюдаемые на эритроцитах больных ХПН эффекты могут быть результатом повышения внутриклеточного уровня кальция.

Введение

Существует множество причин развития анемии у больных хронической почечной недостаточностью (ХПН) в терминальной стадии. Ведущей из них является нарушение выработки поч-

Summary

Decreasing of ability of erythrocytes to pass the filters in the patients with chronic renal insufficiency during programmed hemodialysis.

I. I. Stepanova, L. S. Biriukova, I. L. Lisovskaia,
L. L. Eremenko, F. I. Ataullakhanov

We used the method of filtration of erythrocyte suspensions through the membranes pored about 3mm to evaluate the possible causes of low deformative abilities of erythrocytes and its role in the uremic anemia. We compared the curves of filtration index (F) and the content of the cells unable to filtrate (γ) depending upon the osmotic resistance of the media (u) for the normal red cells and the erythrocytes of the patients (pts) with chronic renal insufficiency during the chronic hemodialysis. We evaluated 33 pts and 12 healthy donors as the control group.

The results showed that in the isotonic media the filtration index (F) was reliably decreased to normal for the erythrocytes of patients with renal insufficiency. During the decreasing of osmolarity F dramatically decreased and resulted in $F=0,1$ much more earlier for the erythrocytes of pts compared to the control group. The shift was about 15-20 mosm. The content of the red cells unable to filtrate when $u > 260$ mosm is equal to the pts and normal donors. When $u < 260$, the curve is shifted for pts to the right for the same 15-20 mosm. The mean cellular volume (MCV) for erythrocytes of pts was decreased to 10% compared to normal ones. This effects may result to the increasing of intracellular content of Calcium.

ками эритропоэтина, который регулирует пролиферацию клеток эритроидного ряда на уровне костного мозга (1, 2). Наряду с этим, к причинам, вызывающим снижение продукции эритроцитов, можно отнести обусловленное уремией нарушение гормональной регуляции кроветворения, обмена белков, углеводов, железа, дефицит витаминов B_1 , B_{12} , E (3).

Кроме того, анемия у больных ХПН связана с разрушением эритроцитов в сосудистом русле, что подтверждается снижением продолжительности их жизни при исследованиях с использованием аутологичных эритроцитов, меченых хромом-51 (4, 5). В числе возможных причин деструкции эритроцитов при ХПН называют аутоиммунный гемолиз, обусловленный обнажением гликопротеиновых антигенов в результате прохождения клеток через аппарат гемодиализа, а также снижение деформируемости эритроцитов (6, 7, 8).

Циркулируя в сосудистом русле, эритроциты вынуждены проходить через узкие капилляры с диаметром, меньшим, чем диаметр самих клеток, подвергаясь значительным деформациям (9). При этом модифицированные, плохо деформируемые ("старые" или патологические) эритроциты могут подвергаться гемолизу или удаляться из кровотока макрофагами, что происходит, главным образом, в селезенке (10). Известно, что деформируемость эритроцитов больных ХПН, находящихся на программном гемодиализе, снижена по сравнению с нормой (11,12), однако механизмы, ответственные за снижение деформируемости эритроцитов при ХПН, изучены недостаточно.

Для выяснения возможных механизмов снижения деформируемости эритроцитов и ее роли в развитии анемии у больных с ХПН, находящихся на программном гемодиализе, мы использовали метод фильтрации суспензий эритроцитов через мембранные фильтры с диаметром пор около 3 мкм. В работе сравнивали кривые зависимости индекса фильтруемости (F) и процентного содержания нефилтрующихся клеток (γ) от осмотичности ресуспендирующей среды (u) для суспензий нормальных эритроцитов и эритроцитов больных ХПН, находящихся на программном гемодиализе.

Материалы и методы

Обследовано 33 больных с терминальной стадией ХПН, находящихся на программном гемодиализе (15 мужчин, 18 женщин). Процедуры гемодиализа проводились 3 раза в неделю в течение 4 часов с использованием диализаторов с ацетатцеллюлозной мембраной (Fresenius, F-6). Средний возраст больных — $37 \pm 4,4$ лет. У всех больных была нефрогенная анемия. Лабораторные данные (уровень гемоглобина, число эритроцитов, а также содержание мочевины, креатинина и калия, индекс Готча) представлены в таблице 1.

В качестве контроля исследовали образцы крови 12 здоровых доноров (7 мужчин, 3 женщин), средний возраст — $33,1 \pm 4,1$ лет.

Кровь у здоровых доноров и у больных ХПН, находящихся на программном гемодиализе, брали

из вены непосредственно перед подключением к аппарату в пробирку, содержащую гемоконсервант глюгицир, в соотношении 4 : 1. Исследование проводили при температуре 22°C, время от момента взятия крови до начала измерений составляло максимально 1 час. Перед началом исследования определяли гематокрит (Ht) цельной крови и средний клеточный объем (MCV), как отношение Ht к концентрации клеток.

Для приготовления суспензии эритроцитов кровь центрифугировали при 4000 оборотах в минуту в течение 5 мин. и отмывали дважды физиологическим раствором, а затем HEPES-буфером (145 мМ натрия хлорида, 5 мМ калия хлорида, 10 мМ HEPES, pH=7,4, осмотичность — 300 мосм), удаляя каждый раз надосадочную жидкость и верхний слой осажденных клеток. Затем клетки ресуспендировали этим же буфером до достижения 40-50 % гематокрита. Для исследования фильтруемости полученную суспензию клеток разбавляли растворами, содержащими 10 мМ HEPES и натрия хлорида в концентрациях, соответствующих требуемым значениям осмотичности, до Ht = 1%. Осмотичность растворов определяли с помощью криоскопического осмометра ОМКА 1Ц — 01.

Измерение фильтруемости эритроцитов проводили с помощью прибора, представляющего собой модифицированный гемореометр Хансса. Мембранные фильтры на основе полиэтилентерфталатной пленки имели толщину 7 мкм и средний диаметр пор — 3,1 мкм. Время протекания предварительно пропущенного ресуспендирующего раствора (t_b) и суспензии эритроцитов (t_s) регистрировали с помощью надетого сверху на колонку датчика, точность измерения которого составляет 0,1 сек.

Индекс фильтруемости вычисляли по формуле:

$$F = \frac{t_b}{t_s - t_b} \times Ht,$$

где Ht=1%, t_b — время протекания буфера, t_s — время протекания суспензии эритроцитов.

Для определения процентного содержания нефилтрующихся при данной осмотичности среды клеток в суспензии эритроцитов использовали разработанный нами метод (13), суть которого, вкратце, заключается в следующем. С помощью описанного выше фильтрометра измеряли величину t_b , которая зависит от исходного числа свободных пор N_0 на данном фильтре. Если пропустить через фильтр небольшой объем суспензии эритроцитов, содержащей n клеток, а затем пропустить через этот же фильтр намного больший объем буфера,

Таблица 1. Усредненные показатели крови 35 больных ХПН, находящихся на программном гемодиализе.

Гемоглобин (г/л)	Креатинин (ммоль/л)	Мочевина (ммоль/л)	Индекс Готча	Калий (ммоль/л)
$71,5 \pm 15$	$1,1 \pm 0,2$	$27,7 \pm 12,5$	$1,2 \pm 0,1$	$5,7 \pm 0,9$

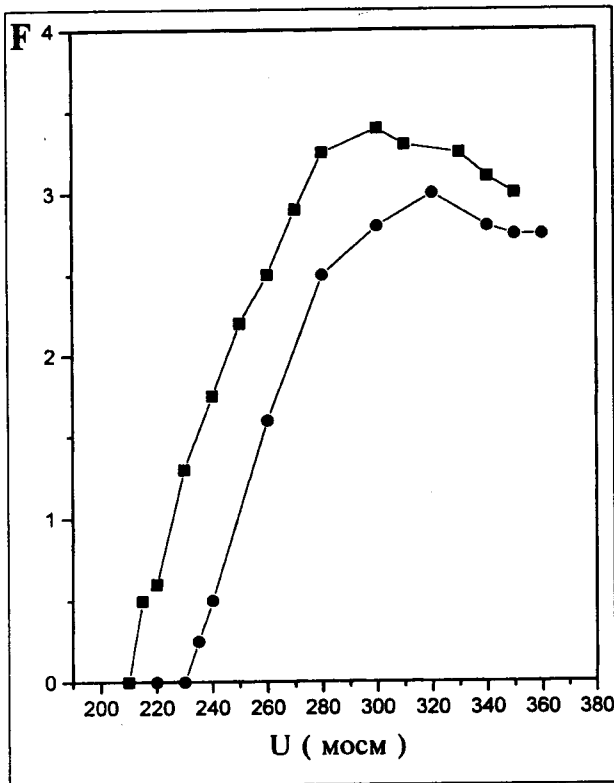


Рис. 1. Типичные кривые зависимости фильтруемости (F) от осмотичности ресуспендирующей среды (u). 1 — эритроциты донора; 2 — эритроциты больного ХПН, находящегося на программном гемодиализе.

то скорость протекания буфера, постепенно изменяясь, достигнет постоянного значения $t_b = t_{bn}$. Доля забитых пор при этом определяется как $R = (t_{bn} - t_b) / t_{bn}$. Абсолютное число забитых пор равно $R \times N_0$. Кривая зависимости абсолютного числа забитых пор от количества нанесенных на фильтр эритроцитов n имеет линейный участок, наклон которого равен относительному содержанию γ нефилтрирующихся клеток в исследуемой суспензии.

Результаты

На рисунке 1 представлены типичные фильтрационные кривые — кривые зависимости индекса фильтруемости (F) от осмотичности среды (u) для донорских эритроцитов (кривая 1) и эритроцитов больных ХПН (кривая 2).

Обе кривые имеют характерную колоколообразную форму с максимумом (F_{max}) в изотонической области (при $u = u_{max}$). При уменьшении осмотичности (u) эритроциты увеличиваются в объеме, сохраняя постоянное значение площади поверхности, и величина F резко снижается, достигая при некотором значении осмотичности ($u_{0,1}$) нулевого уровня: суспензия эритроцитов практически перестает проходить через фильтр.

Как было показано ранее (14), параметр $u_{0,1}$ характеризует геометрические свойства эритроцитов (отношение поверхность/объем). Максимальное значение индекса фильтруемости суспензий донорских эритроцитов (F_{max}) достигается, как правило, при осмотичности, равной 280 мосм (u_{max}). Максимум индекса фильтруемости эритроцитов больных ХПН, находящихся на программном гемодиализе, снижен по сравнению с донорами и часто достигается при более высоких значениях u_{max} : 300 - 320 мосм. При увеличении осмотичности по сравнению с изотоническими значениями отмечается небольшое снижение F, вероятно, обусловленное увеличением внутриклеточной вязкости в результате потери клеточной воды.

В таблице 2 представлены значения перечисленных параметров, а также значения MCV и MCNC для эритроцитов доноров и больных ХПН, находящихся на программном гемодиализе.

Из таблицы 2 видно, что величина $u_{0,1}$ у больных достоверно увеличена по сравнению с нормой. Средний клеточный объем MCV эритроцитов больных ХПН достоверно меньше, чем MCV эритроцитов доноров. Несмотря на то, что нефрогенная анемия считается нормохромной (15), в нашем исследовании средняя внутриклеточная концентрация гемоглобина (MCNC) в эритроцитах больных была достоверно снижена по сравнению с донорскими эритроцитами ($p < 0.001$).

На рисунке 2 показано наличие прямой корреляции между MCV и общим гемоглобином крови у уремических больных, т.е. степенью тяжести анемии. С другой стороны, существует достоверная обратная корреляция между MCV и $u_{0,1}$ (рис. 3).

Таким образом, можно утверждать, что приведенные в таблице 2 данные, свидетельствующие об изменении фильтрационных и геометрических параметров эритроцитов больных ХПН, взаимосвязаны и имеют непосредственное отношение к исследуемой патологии.

Таблица 2. Усредненные значения некоторых параметров, характеризующих эритроциты 12 здоровых доноров и 33 больных ХПН, находящихся на программном гемодиализе.

	MCV (мкм ³)	MCNC	F_{max}	$U_{0,1}$ (МОСМ)
Доноры (n = 12)	94 ± 7	316 ± 16	$3,3 \pm 0,6$	212 ± 8
Больные (n = 35)	84 ± 15	304 ± 18	$2,3 \pm 1$	232 ± 13
p	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001

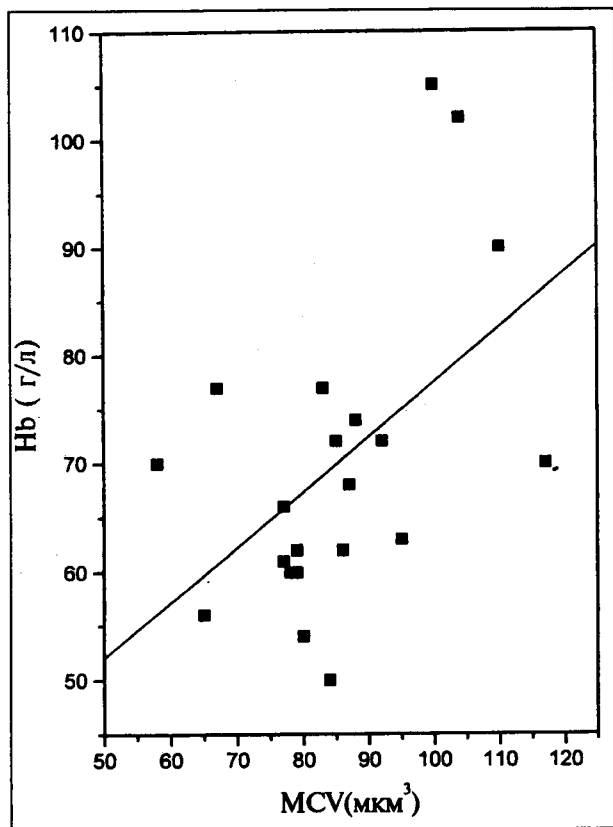


Рис. 2. Корреляция между MCV и общим гемоглобином крови больных ХПН, находящихся на программном гемодиализе.
 $R = 0.51$, $SD = 12.64$, $p = 0.018$.

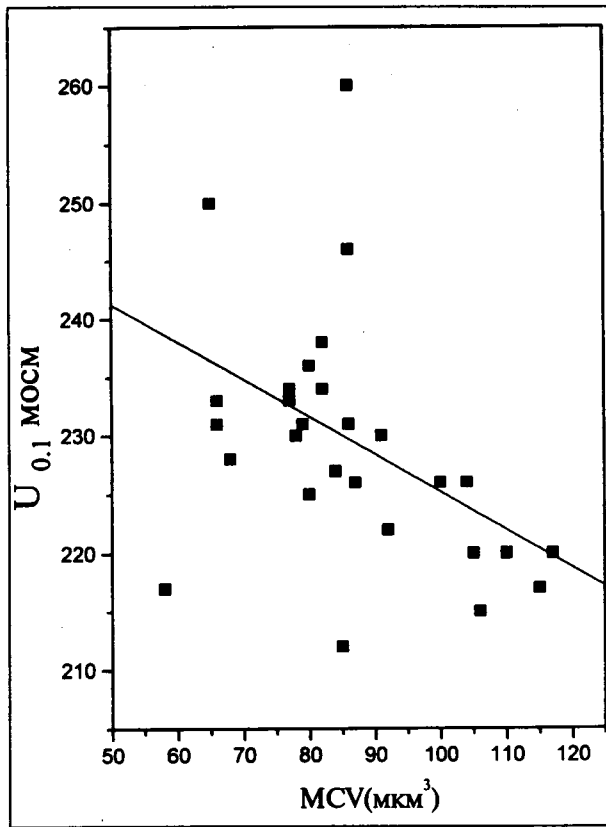


Рис. 3. Корреляция между MCV и значениями $u_{0.1}$ больных ХПН, находящихся на программном гемодиализе.
 $R = -0.45$, $SD = 9.88$, $p = 0.01$.

Как было показано нами ранее (16), обычный фильтрационный метод характеризует усредненные реологические свойства суспензий эритроцитов и не позволяет отличить изменение свойств основной массы клеток от появления небольшой примеси эритроцитов со сниженной фильтруемостью. В нашем случае увеличение $u_{0.1}$ для суспензий эритроцитов больных ХПН могло бы соответствовать уменьшению отношения поверхность/объем для основной массы клеток или свидетельствовать о наличии малой фракции (2-4%) эритроцитов со сниженным значением этого отношения.

С целью подтверждения той или иной версии мы определяли процентное содержание нефилтруемых эритроцитов (γ %) у 6 больных ХПН в зависимости от осмотичности среды (u). Полученные результаты представлены на рисунке 4.

Из рисунка 4 видно, что кривая зависимости γ от u для эритроцитов больных целиком сдвинута вправо по сравнению с контролем. Следовательно, у данной группы больных ХПН, находящихся на программном гемодиализе, основная масса эритроцитов имеет сниженное отношение поверхность/объем.

Обсуждение

Индекс фильтруемости для гомогенной суспензии (суспензии идентичных эритроцитов)

определяется следующими факторами: клеточным объемом (V), площадью поверхности клетки (S), соотношением этих параметров (S/V), а также внутриклеточной вязкостью и механическими свойствами мембраны (14).

Ранее нами были разработаны математическая модель и метод, позволяющие, зная зависимость индекса фильтруемости (F) от осмотичности среды (u), количественно оценить геометрический параметр (S/V) эритроцитов (14).

В реальной суспензии клетки неодинаковы, и индекс фильтруемости может быть резко снижен из-за присутствия минорных примесей плохо деформирующихся эритроцитов (17). Для оценки процентного содержания в исследуемых суспензиях эритроцитов клеток с измененными свойствами в данной работе использовали еще одну разработанную нами модификацию фильтрационного метода (13).

В настоящей работе, сравнивая фильтрационные параметры эритроцитов больных ХПН, находящихся на программном гемодиализе, и нормальных донорских эритроцитов, удалось показать следующее (таб. 2, рис. 4):

1. В изотонических условиях максимальное значение индекса фильтруемости больных ХПН, находящихся на программном гемодиализе (F_{max}), достоверно снижено по сравнению с нормой. Это соответствует имеющимся в литературе данным

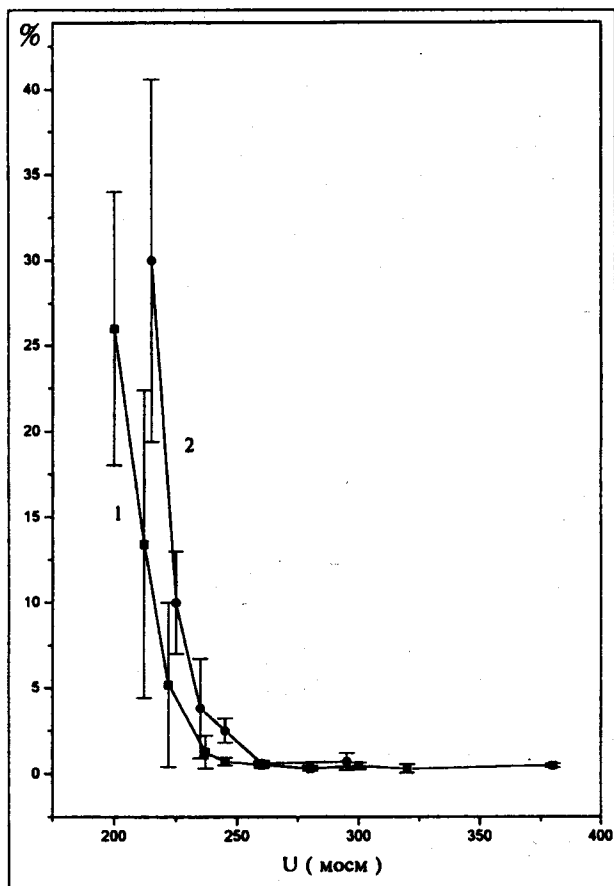


Рис. 4. Зависимость процентного содержания нефилтрующих клеток (γ %) в популяции эритроцитов от осмотичности ресуспендирующей среды (u). 1 — эритроциты доноров ($n = 10$); 2 — эритроциты больных ХПН, находящихся на программном гемодиализе ($n = 7$).

(11,12) и может свидетельствовать об изменении механических свойств (ужесточении) мембраны эритроцитов больных ХПН. Внутриклеточная вязкость эритроцитов больных ХПН не может быть ответственна за этот эффект, поскольку величина МСНС для этих клеток снижена.

2. По мере уменьшения осмотичности ресуспендирующей среды величина F резко снижается, причем близкое к нулевому значение $F = 0.1$ достигается для эритроцитов больных раньше, т.е. при более высоких значениях u , чем в норме. Величина сдвига составляет 15-20 мосм.

3. Процентное содержание нефилтрующих клеток γ при $u > 260$ мосм одинаково в суспензиях эритроцитов доноров и больных ХПН, находящихся на программном гемодиализе. При $u < 260$ мосм для суспензий эритроцитов больных наблюдается сдвиг кривой зависимости γ от u вправо на те же 15-20 мосм. Следовательно, изменение фильтрационных свойств эритроцитов больных ХПН, вероятно, обусловлено не малыми примесями плохо фильтрующихся клеток, а изменением геометрических параметров (снижением отношения: поверхность/объем) основной массы эритроцитов.

4. Средний клеточный объем МСV эритроцитов больных ХПН снижен по сравнению с нормой на 10%, что соответствует литературным данным (18). При неизменной площади клеточной поверхности S следовало бы ожидать сдвига $u_{0.1}$ в сторону гипотонических значений в результате увеличения отношения S/V . Однако наблюдается противоположный эффект: $u_{0.1}$ сдвигается в гипертоническую сторону на 20 ммсм. Следовательно, имеет место уменьшение площади поверхности эритроцитов больных ХПН, причем отношение поверхность/объем снижается по сравнению с нормой.

Имеются данные о том, что в эритроцитах больных ХПН снижена активность Са-АТФ-азы и существенно повышен уровень внутриклеточного кальция (19, 20). В ответ на повышение концентрации внутриклеточного кальция возможно проявление целого ряда эффектов: уменьшение МСV вследствие активации кальцийзависимых калиевых каналов и, соответственно, дегидратации эритроцитов (Gardos-effekt) (21); потери части клеточной поверхности в результате везикуляции (22); нарушение асимметричности трансмембранного распределения фосфолипидов, экспонирования сериновых остатков на поверхности эритроцита и, соответственно, ускоренного удаления эритроцитов из кровотока; наконец, возрастание ригидности мембраны эритроцитов в результате связывания с ней гемоглобина (23) или изменения взаимодействия интегральных белков с цитоскелетом (24).

Таким образом, практически все наблюдаемые нами на эритроцитах больных ХПН эффекты могут быть результатом повышения внутриклеточного уровня кальция. Однако в настоящее время неизвестно, чем вызвано это повышение: механической травмой в аппарате "искусственной почки", наличием в плазме больных специфических агентов ("уремических токсинов"), окислительными повреждениями (25) и т.д. или сочетанием этих или иных факторов.

Поступила 20.09.97 г.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Adamson J.V., Eschbach J., Finch C.A. The kidney and erythropoiesis. Amer.J.Med. 1968; 44: 725-733.
2. Koury M. J., Bondurant M. C., Atkinson J. B. Erythropoietin control of terminal erythroid differentiation. Maintenance of cell viability, production of hemoglobin and development of the erythrocyte membrane. Blood cells. 1987; 13: 217-226.
3. Fisher J. W. Mechanism of the anaemia of chronic renal failure. Nephron. 1980; 25: 106-111.
4. Eggert W., Bleiber R., Otting U., et al. Struktur- und funktionelle Veränderungen im zellschtoffwechsel roter Blutzellen bei chronischer Niereninsuffizienz. Nieren-Hochdruckkrankh. 1987; 16: 341-344.
5. Eschbach J. W., Funk D., Adamson J.W. Erythropoiesis in patients with renal failure undergoing chronic dialysis. N. Engl. J. Med. 1976; 276: 653-658.
6. Eschbach J.W. Hematological problems of dialysis patients. In: Replacement of renal function by dialysis. (ed. Maher J.F.) Dordrecht, 1989: 851-864.

7. Meier W., Paulischke M., Lerche D., et al. Microrheological properties of a uremic RBC. Alterations due to rhEPO therapy. *Studia Biophysica*. 1989; 34:161-166.
8. Meier W., Paulischke M., Lerche D., et al. Action of rhEPO on mechanical membrane properties of RBC in children with end-stage renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant*. 1991;6: 110-116.
9. Waugh R., Mohandas N., Jackson C., et al. Rheologic properties of senescent erythrocytes:: loss of surface area and volume with red blood cell age. *Blood*. 1992;79: 1351-1358.
10. Connor J., Pak C.C., Schroit A.J. Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells: relationship to cell density, cell age and clearance by mononuclear cells. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 2399-2404.
11. Viljoen M., De Olivera A.A., Milne F.J. Physical properties of the red blood cells in chronic renal failure. *Nephron*. 1991;59: 271-278.
12. Shand B.I., Buttmore A.L., Lynn K.L., et al. Effect of hemodialysis and recombinant human erythropoietin on determinants of blood viscosity. *Ren. Fail.* 1994; 16: 407-413.
13. Лисовская И. Л., Шурхина Е. С., Нестеренко В. М. и др. Определение содержания нефилтрирующихся клеток в суспензии эритроцитов. Модификация фильтрационного метода. *Биол. Мембр.* В печати.
14. Атауллаханов Ф. И., Витвицкий В. М., Лисовская И. Л. и др. Анализ геометрических параметров и механических свойств эритроцитов методом фильтрации через мембранные ядерные фильтры. I. Математическая модель. *Биофизика*. 1994; 39 (5): 672-681.
15. Paulitschke M. and Nash G.B. Micropipette methods for analysing blood cells rheology and their application to clinical research. *Clinical Hemorheology*. 1993,(13): 407-434.
16. Stuart J., Nash G. B. Technological advances in blood rheology. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1990; 28: 61-93.
17. Brooks D.E., Evans E.A.. Rheology of blood cell. In: Chien S., Dormandy J. (eds.) *Applications in cardiovascular and hematological disease, diabetes, surgery and gynaecology*. Dordrecht. 1987.
18. Bartels P.C., Soons B.J., Helleman P. W. Haemodialysis-induced changes in red blood cell size-distribution histograms. *Scand. J. Clin. Lab.* 1991; 51: 53-57.
19. Gafter u., Malachi T., Barak H., et al. Red blood cell calcium homeostasis in patients with end-stage renal disease. *J. Lab. Clin. Med.* 1989; 114: 222-231.
20. Linde T., Roquist G., Sandhagenen B., et al. Treatment of renal anaemia with recombinant human erythropoietin results in decreased red cell uptake of Ca⁻⁴⁵. *Nephron*. 1994; 68: 419-426.
21. Gardos G. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *B.B.A.* 1958;30: 635.
22. Henseleit U., Plasa G., Haset C. Effects of divalent cations on lipid flip-flop in the human erythrocyte membrane. *B.B.A.* 1990; 1029: 127-135.
23. Friederichs E., Farley R.A., Meiselman H. J. Influence of Calcium Permeabilizatia and membrane-attached hemoglobin on Erythrocyte Deformability. *American J. of Hematology*. 1992; 41: 170-177.
24. Lin S., Yang E., Huestis W.H. Relationship of phospholipid distribution to Shape Change in Ca-created and recovered human erythrocytes. *Biochemistry*. 1994; 33: 7337-7344.
25. Zachee P., Ferrant A., Daelemans R., et al. Oxidative injury to erythrocytes, cell rigidity and splenic hemolysis in hemodialysed patients before and during erythropoietin treatment. *Nephron*. 1993; 65: 288-293.