

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.61-78:616.155.1-076.5-073.5:621.375.826

Ю.А. Борисов¹, Е.Н. Левыкина², И.В. Миндукшев³, Е.Д. Суглобова²**МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ЭРИТРОГРАММ У ПАЦИЕНТОВ, НАХОДЯЩИХСЯ НА ХРОНИЧЕСКОМ ГЕМОДИАЛИЗЕ, ПОСРЕДСТВОМ АППАРАТНОГО ИСПОЛНЕНИЯ ЛАЗЕРНОГО МАЛОУГЛОВОГО СВЕТОРАССЕЯНИЯ**¹ГБОУ ВПО СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, 197022, Санкт-Петербург; ²НИИ нефрологии ГБОУ ВПО СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, 197022, Санкт-Петербург; ³Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (ИЭФБ РАН), 194223, Санкт-Петербург

Детальный анализ структурных свойств эритроцитов может быть произведен с помощью метода эритрограмм, однако практическое его применение в условиях медицинской лаборатории – длительный и трудоемкий процесс, малоприменимый для экспресс-диагностики. Для регистрации изменений морфофункциональных свойств эритроцитов у пациентов, находящихся на хроническом гемодиализе, по сравнению с лицами без ренальной патологии предлагается новый метод малоуглового светорассеяния, никогда не применявшийся ранее в этих целях. Поэтому целью настоящей работы является решение вопроса об адекватности применения этого метода для регистрации изменений функционального статуса эритроцитов у пациентов отделения хронического гемодиализа по сравнению с лицами без ренальной патологии. В экспериментах по определению устойчивости эритроцитов выявлены значимые различия для кислотной и аммонийной моделей лизиса между группами лиц без ренальной патологии и пациентов, находящихся на хроническом гемодиализе, а также в группе пациентов в ходе самой диализной сессии. В случае аммонийного лизиса статистически достоверными оказались различия между группами лиц без ренальной патологии и пациентов, находящихся на хроническом гемодиализе, а при кислотной модели – у пациентов в ходе диализной сессии. Таким образом, применение метода малоуглового светорассеяния является адекватным и информативным для оценки функционального статуса эритроцитов у лиц с терминальной стадией хронической болезни почек, получающих лечение регулярным гемодиализом. Сама методика малоугловатратна, несложна в исполнении и легко воспроизводится. Поэтому метод малоуглового светорассеяния может применяться как для научных исследований, так и в клинической практике для определения характеристик устойчивости мембранных систем.

Ключевые слова: эритрограммы; лизис эритроцитов в аммонийной среде; лизис эритроцитов в кислой среде; метод малоуглового светорассеяния.

Yu.A. Borisov¹, E.N. Levykina², I.V. Mindukshev³, E.D. Suglobova²

THE MODIFICATION OF METHOD OF ERYTHROGRAMS IN PATIENTS UNDER CHRONIC HEMODIALYSIS USING HARDWARE-CONTROLLED ADMINISTRATION OF LASER LOW-ANGLE LIGHT SCATTERING

¹The I.P. Pavlov St. Petersburg medical university, 197022 St. Petersburg, Russia; ²The research institute of nephrology of the I.P. Pavlov St. Petersburg medical university, 197022 St. Petersburg, Russia ; ³The I.M. Sechenov institute of evolutionary physiology and biochemistry of the Russian academy of sciences, 194223 St. Petersburg, Russia

The detailed analysis of structural characteristics of erythrocytes can be implemented with method of erythrograms. However, its practical application in conditions of medical laboratory is a long and labor-intensive process of little avail for express-diagnostic. To register alterations of morphologic functional characteristics of erythrocytes in patients under chronic dialysis as compared with patients without renal pathology the new technique of low-angle light scattering never applied before for this purpose. Therefore, the purpose of this study is to resolve issue concerning validity of application of this technique for registration of alterations of functional status of erythrocytes in patients of department of chronic dialysis as compared with patients without renal pathology. The experiments concerning the identification of resistance of erythrocytes established significant differences for acid and ammonium models of lysis between patients without renal pathology and patients under chronic dialysis and also in patients in the course of dialysis session. In case of ammonium lysis, the differences were statistically significant between patients without renal pathology and patients under chronic hemodialysis. In case of acid model, the differences were statistically significant in patients in course of dialysis session. Therefore, the application of low-angle light scattering technique is valid and informative for evaluation of functional status of erythrocytes in patients with terminal stage of chronic renal disease receiving treatment of regular hemodialysis. The technique itself is low-cost, simple in application and easily reproduced. Therefore, the technique of low-angle light scattering can be applied both in research studies and clinical practice to identify characteristics of stability of membrane systems.

Key words: erythrogram, lysis, erythrocyte, ammonium medium, lysis, acid medium, technique of low-angle light scattering

Для корреспонденции:

Борисов Юрий Анатольевич, науч. сотр.
Адрес: 197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6/8.
E-mail: yuri-borisov@yandex.ru

Введение. Почти всегда стремление к раскрытию молекулярно-клеточных механизмов прогрессирования глубоких метаболических нарушений неизбежно приводит исследователя к необходимости тщательного анализа клеточ-

ного ответа на действие внешних повреждающих факторов. При развитии патологии изменения затрагивают различные клеточные структуры, а среди них – «первую линию обороны» клетки – плазматическую мембрану. Методические подходы, применяемые в современной мембранологии, позволяют оценить как качество мембраны в целом, так и структурно-функциональный статус ее отдельных компонентов как маркеров системных метаболических сдвигов. При проведении таких исследований наиболее удобным и доступным объектом на протяжении нескольких десятилетий и до сих пор служит эритроцит [1].

Эритроцит – универсальная модель для изучения процессов, происходящих в клеточной мембране под действием самых различных агентов. Детальное исследование изменений свойств эритроцитов под влиянием различных химических раздражителей, с которыми живой организм сталкивается в процессе естественных взаимоотношений с природой, позволяет полнее установить возможные последствия и определить наиболее эффективные пути их коррекции при различной патологии. Занимая значительную долю (до 10%) от общего клеточного объема организма и обеспечивая газообмен, красные кровяные клетки выполняют еще ряд важных функций: контролируют кислотно-щелочное равновесие, распределение электролитов и воды между кровью и тканями, осуществляют сорбцию и транспорт разнообразных неорганических и органических молекул [2, 3], в том числе азотсодержащих [4]. Поэтому их функциональное состояние, резистентность к внешним воздействиям и тем более вопросы, связанные с гибелью эритроцитов, имеют ключевое значение для организма в целом [5, 6].

Многочисленные исследования показали, что прогрессирование системных нарушений на уровне организма сопровождается выраженными изменениями морфофункционального статуса красных кровяных клеток. Их значимая морфологическая перестройка приводит к изменениям деформационных характеристик, мембранной проницаемости, осмотической и кислотной резистентности, повышению агрегационной способности и в конечном счете к разрушению [7, 8].

Для эритроцитов, как и для ядерных клеток, известны два главных варианта гибели клеток. Первый из них – некротическая гибель эритроцитов или гемолиз, который является основной причиной ряда гемолитических анемий [9]. Сравнительно недавно было установлено, что эритроциты, будучи безъядерными постклеточными элементами, подвержены и запрограммированной гибели, характерной для обычных ядерных клеток, – апоптозу [10, 11]. Во многих случаях ключевым звеном при апоптозе эритроцитов (его синонимом является термин «эриптоз») является повышение внутриклеточной концентрации кальция, в результате которого активируется выход катионов калия и анионов хлора, что приводит к уменьшению объема клетки [12, 13]. В качестве основного системного воздействия, приводящего к апоптозу эритроцитов, рассматривается окислительный стресс. Предположительно окислительный стресс приводит к истощению запасов глутатиона [6], что вызывает активацию NSC-каналов и усиленный транспорт Ca^{2+} внутрь красных кровяных клеток [14, 15].

Системная дисфункция, развивающаяся при прогрессировании ренальной патологии, имеет яркие клинические проявления и может фиксироваться разнообразными клинико-биохимическими тестами с большей или меньшей степенью успешности, в том числе у пациентов с хронической почечной недостаточностью в терминальной ее стадии. Большая часть этих пациентов получает терапию в виде регулярного (хронического) гемодиализа. Как правило, у таких больных оцениваются изменения параметров либо по краткосрочной схеме «до сеанса диализа – после сеанса диализа», либо в динамике в течение месяцев, реже – лет. Такие исследования проводились нами в отношении качества плазматических мембран [16–18]. Адаптационные способности мембранных систем при многолетнем существовании в условиях постоян-

ной экстракорпоральной детоксикации имеют свои особенности. Например, известно, что степень хрупкости эритроцитов с высокой вероятностью отражает филогенетические характеристики, а также способность организма реагировать на осмотические проблемы, связанные с циклическими дегидратациями и регидратациями. Примеры из мира живой природы показывают, что при таком длительном эофизиологическом стрессе механическая прочность эритроцитов возрастает [19]. Подобным «тренировкам на осмотическую стойкость» постоянно подвергаются эритроциты пациентов, находящихся на хроническом гемодиализе, 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 [18].

Для детального анализа структурных свойств эритроцитов может быть применен метод эритрограмм [20]. Эритрограмма представляет собой графическое отображение последовательного вовлечения эритроцитов различной стойкости в процесс гемолитической трансформации. Для практического применения метода эритрограмм в условиях медицинской лаборатории требуется множество предварительных процедур (стерилизация пробирок, разведение растворов, термостатирование, подготовка спектрофотометра и т. д.) и сложная математическая обработка экспериментальных данных с целью их анализа и интерпретации. Все это делает данный метод громоздким, трудоемким и поэтому неприемлемым для экспресс-диагностики.

Новый метод малоуглового светорассеяния никогда не использовался ранее для сравнения морфофункциональных свойств эритроцитов у больных, которым проводится лечебное регулярным гемодиализом, по сравнению со здоровыми донорами, а также для регистрации изменений состояния красных кровяных клеток, происходящих у пациентов в ходе гемодиализной процедуры. Поэтому целью настоящей работы является решение вопроса об информативности этого метода для регистрации изменений функционального статуса эритроцитов, во-первых, у пациентов, находящихся на хроническом гемодиализе, по сравнению с лицами без ренальной патологии и, во-вторых, внутри группы пациентов в условиях схемы «до сеанса диализа – после сеанса диализа», а также выявление тех параметров лизиса, которые имеют наибольшую информативность.

Материалы и методы. Для исследования функционального статуса эритроцитов использовали метод лазерной корреляционной спектроскопии. Сущность метода заключается в прохождении параллельного монохроматического пучка света от источника через кювету, где он рассеивается суспензией клеток. Рассеянный свет фокусируется и регистрируется приемным устройством. Форма индикатрисы рассеяния содержит в себе информацию о дисперсном составе рассеивающих частиц.

К преимуществам описанного метода следует отнести возможность непрерывного фотометрирования дисперсионной среды, что позволяет проводить динамическую регистрацию сигналов фотодетекторов, тем самым обеспечивая дополнительные возможности – осуществлять визуальный контроль выполнения методик. Метод делает возможной непрерывную кинетическую регистрацию процесса изменений состояния красных кровяных клеток, происходящих при действии внешних факторов и эффекторов. Лазерное сканирование эритроцитов под разными углами позволяет получать информацию о размере и форме частиц в каждый момент времени, вплоть до возможности создания их трехмерной модели.

Аппаратное исполнение эксперимента обеспечивалось лазерным анализатором частиц «Ласка-Т» (производство

ООО «БиоМедСистем», Санкт-Петербург), адаптированным для цитологических исследований. Для данного прибора ранее были разработаны аппаратные и методические основы по применению техники малоуглового светорассеяния для исследования тромбоцитов, а затем и эритроцитов [21, 22].

Источником излучения в анализаторе частиц «Ласка-Т» является лазерный диод. Приемником излучения служит линейка фотодиодов, которые преобразуют световые сигналы в электрические в соответствующих измерительных каналах. Оптическая схема анализатора обеспечивает прохождение светового луча от лазерного диода через фокусирующую линзу, диафрагму, рабочую ячейку с пробой и далее на приемное устройство, состоящее из линейки 32 фотодиодов. Первый фотодиод в линейке является фотодетектором пропускания, имеющим угловую координату 0° , остальные 31 – фотодетекторы индикатрисы. Фотодиоды пропускания в каждом анализаторе имеют угловую координату 0° .

После аналогового преобразования электрические сигналы от фотодиодов поступают на блок индикации самого прибора и на выходной разъем, соединяемый кабелем со стандартным СОМ-портом компьютера.

Программное обеспечение анализатора «Ласка-Т» осуществляется программой «LaSca_32», работающей в среде Windows. Указанная программа позволяет принимать массив измеряемых интенсивностей светорассеяния в реальном масштабе времени, автоматически пересчитывает полученные величины с учетом градуировки и производит обработку экспериментальных данных, включающую распределение частиц по размерам и проведение кинетического анализа.

Специальная конструкция перемешивающего устройства, оснащенная цилиндрическим магнитным волчком, позволяет создать в кювете с исследуемой суспензией клеточных элементов гидродинамический режим с развитой, однородной по всему объему кюветы, турбулентностью. Благодаря вращению волчка со скоростью 1200 об/мин при обновлении сканируемого объема дисперсный состав среды не изменяется, а уровень флуктуации сигнала составляет всего 1–2%. При таком щадящем режиме перемешивания, с одной стороны, не образуется «воронка», которая обычно приводит к появлению пузырей воздуха в кювете, и с другой – не происходит спонтанного лизиса клеток, который может возникать при более жестком механическом воздействии.

Простота пробоподготовки, минимальное количество биологического материала достаточное для исследования, и небольшая продолжительность эксперимента приближают его по этим параметрам к экспресс-методам.

В рамках представленной работы изучены свойства эритроцитов здоровых лиц без ренальной патологии (доноры) и пациентов отделения хронического гемодиализа НИИ нефрологии СПбГМУ им. И.П. Павлова. Группа доноров состояла из 22 лиц без ренальной патологии – 7 мужчин и 15 женщин, средний возраст 43 года (здоровые доноры), а группа пациентов – из 25 больных с терминальной почечной недостаточностью (хроническая болезнь почек в 5-й стадии), получающих лечение хроническим гемодиализом – 12 мужчин и 13 женщин, средний возраст 49 лет. В группе пациентов, находящихся на гемодиализе, 5 больных страдали хроническим гломерулонефритом, у 15 отмечался нефросклероз, у двух – хронический пиелонефрит, у одного больного диагностирован поликистоз и еще у одного – амилоидоз почек.

В эксперименте в качестве моделей клеточной смерти использовали два варианта мягкого лизиса клеток – кислотный и аммонийный.

Эксперименты проводили в изотоничных солевых средах следующего состава (в мМ):

раствор № 1 (рН 7,4): NaCl – 140, KCl – 5, HEPES (буфер) – 5, MgCl₂ – 1, глюкоза – 5;

раствор № 2 (рН 7,4): NH₄Cl – 140, KCl – 5, HEPES (буфер) – 5, CaCl₂ – 1, глюкоза – 5.

Раствор № 1 использовали для подготовки исходной су-

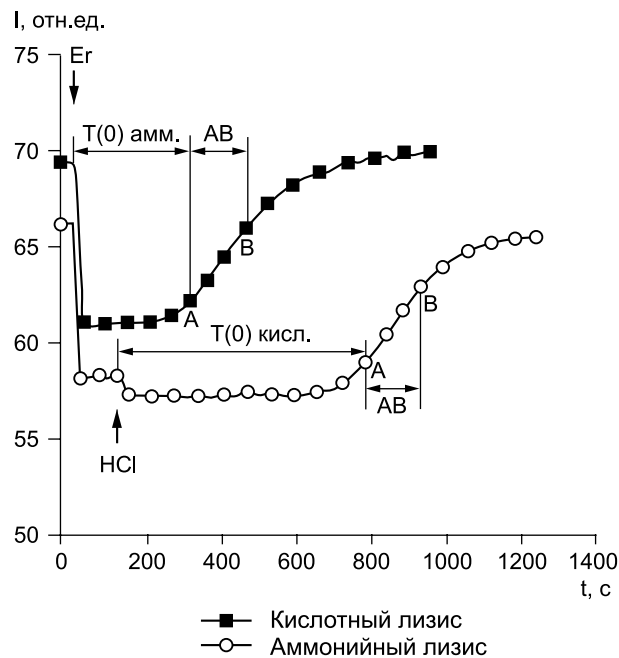


Рис. 1. Параметры лизиса, определяемые по кинетическим зависимостям интенсивности светорассеяния от времени для кислотной и аммонийной моделей клеточной гибели, угол сканирования 0° .

$T(0)$ амм. – время достижения V_{lys} для аммонийной модели; $T(0)$ кисл. – для кислотной модели; АВ – участок кинетической зависимости, расположенный между точками А и В, на котором достигается V_{lys} ($V(0)$); вертикальными стрелками обозначены моменты внесения в инкубационную среду суспензии эритроцитов (Er) – при обеих моделях лизиса и раствора соляной кислоты (HCl) – при кислотной модели.

Здесь и на рис. 2 по оси абсцисс – время в с; по оси ординат – интенсивность светорассеяния, отн. ед.

спензии эритроцитов и для проведения кислотного лизиса, а раствор № 2 – для аммонийного лизиса.

При заборе крови в качестве антикоагулянта использовался ЭДТА. Эритроциты отделяли от плазмы центрифугированием крови в течение 10 мин при 4000 об/мин. Затем готовили исходную суспензию, предназначенную для внесения в пробу. Для этого отбирали эритроцитарную массу из осадка в количестве 50 мкл и смешивали ее с 10 мл раствора № 1. В кювету из кварцевого стекла с помещенным в нее волчком вносили 7 мл раствора № 1 в случае кислотной модели или 7 мл раствора № 2 в случае аммонийного лизиса. Кювету немедленно помещали в кюветное отделение прибора, включали режим перемешивания и запускали программу регистрации светорассеяния. После установления стабильной величины светорассеяния (через 1–2 мин) в пробу вносили 20 мкл исходной суспензии. В случае аммонийной модели лизиса измерения проводили до окончания процесса. В случае кислотной модели ожидали установления стабильных величин светорассеяния после добавления суспензии и затем инициировали лизис внесением в пробу 25 мкл 1N HCl.

Результаты и обсуждение. Лизис эритроцитов оценивали по дифференциальной характеристике кинетики (производная скорости) с помощью метода кислотных эритрограмм, разработанного И.А. Терсковым [23]. Эритрограмма отражает скорость лизиса и позволяет количественно характеризовать его кинетику рядом параметров, среди которых V_{lys} – максимальная скорость лизиса и T_{lys} – время достижения максимальной скорости лизиса. В качестве примера на рис. 1 представлено графическое определение этих величин на типичных эритрограммах, полученных для аммонийного и кислотного лизиса, угол светорассеяния 0° .

Таблица 1

Параметры кислотного лизиса у доноров и пациентов отделения хронического гемодиализа

Параметры лизиса	(1) Доноры	(2) Пациенты до сеанса гемодиализа	(3) Пациенты после сеанса гемодиализа	Критерий Манна-Уитни		Критерий Вилкоксона p_{2-3}
				P_{1-2}	P_{1-3}	
V(O), отн. ед./с	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(O), с	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(O)/T(O)	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./с	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), с	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. Здесь и в табл. 2: в графах "доноры", "пациенты до и после гемодиализа" 1-я строка – $\bar{X} \pm m$, 2-я – медиана, 3-я – (min-max)

В табл. 1 и 2 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 отделения хронического гемодиализа до и после сессии.

Основным результатом приведенных экспериментов по определению динамических характеристик устойчивости эритроцитов стало выявление значимых различий кинетических характеристик кислотного и аммонийного лизисов в группах лиц без ренальной патологии и пациентов отделения хронического гемодиализа, а также у пациентов, находящихся на гемодиализе, в ходе диализной сессии.

Данные табл. 1 и 2 свидетельствуют о том, 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 у пациентов отделения хронического гемодиализа. У последних

в ходе сеанса статистически достоверные различия напротив, отмечаются в случае кислотной модели лизиса. Графически эти различия представлены на рис. 1 и 2.

В случае аммонийной модели лизиса замена ионов Na^+ на NH_4^+ во внеклеточной среде, по-видимому, приводит к резкой активации аммонийного транспортера – Rh-белка, играющего ключевую роль в участии эритроцитов в азотистом обмене [4]. При этом время достижения максимальной скорости лизиса красных кровяных клеток, вероятно, сильно зависит от степени выраженности окислительного стресса, непосредственно предшествующего манифестации апоптоза [24]. Как известно, при окислительном стрессе, наблюдающемся в условиях уремии, происходит значительное повреждение липопротеиновых и гликопротеиновых структурных компонентов мембранных систем [6]. Одновременно с этим наличие персистирующего микровоспаления обуславлива-

Таблица 2

Параметры аммонийного лизиса у доноров и пациентов отделения хронического гемодиализа

Параметры лизиса	(1) Доноры	(2) Пациенты до сеанса гемодиализа	(3) Пациенты после сеанса гемодиализа	Критерий Манна-Уитни		Критерий Вилкоксона p_{2-3}
				P_{1-2}	P_{1-3}	
V(O), отн. ед./с	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(O), с	314,7 ± 21,8 311,5 (170,1-551,9)	241,1 ± 28,7 238,5 (54,7-757,6)	227,1 ± 35,7 168,6 (78,2-956,0)	0,050	0,001	0,150
V(O)/T(O)	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./с	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), с	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

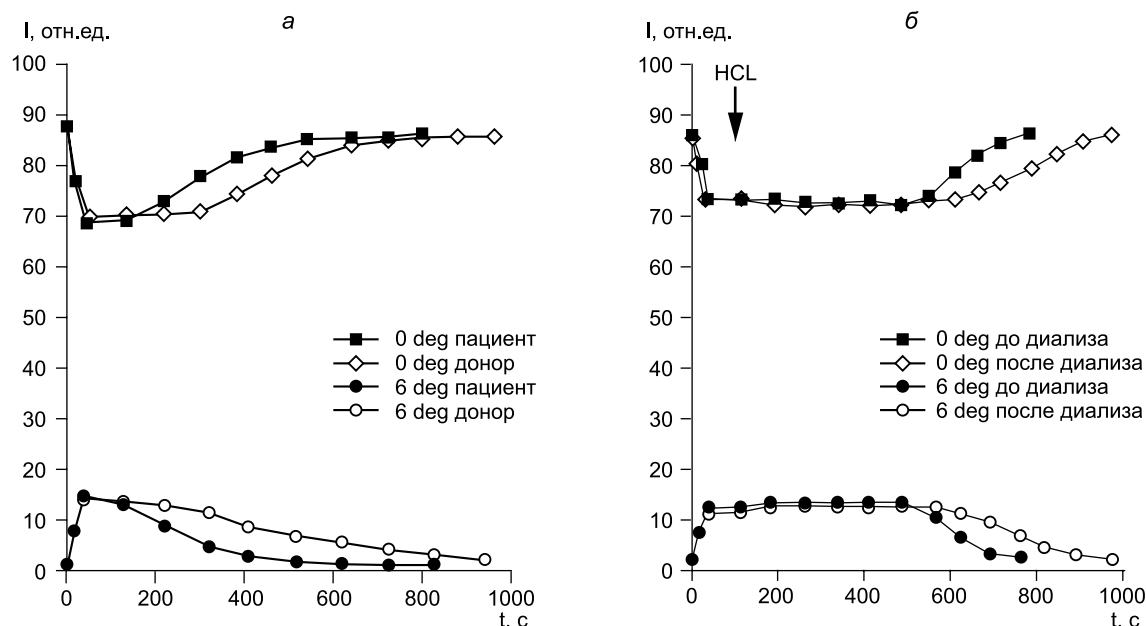


Рис. 2. Типичные эритрограммы, полученные для лица без ренальной патологии (донор) и пациента отделения хронического гемодиализа (пациент) при углах светорассеяния 0° (0 deg) и 6° (6 deg).

а – аммонийная модель лизиса при сравнении эритрограмм, полученных для донора и пациента; б – кислотная модель лизиса при сравнении эритрограмм, полученных для пациента до сеанса гемодиализа (до диализа) и по окончании процедуры (после диализа).

Отсчет времени с момента внесения суспензии эритроцитов в среду. В случае кислотного лизиса (б) стрелкой указан момент внесения в пробу соляной кислоты (HCl).

ет снижение рН внутриклеточной среды, сопровождающее изменения кинетики функционирования внутриклеточных ферментных комплексов. У пациентов гемодиализа эритроциты в силу длительного пребывания в условиях хронической экстракорпоральной детоксикации лучше адаптированы к закислению по сравнению с клетками красной крови лиц без ренальной патологии.

Воздействие ионов аммония на внешнюю поверхность мембраны приводит к патологически быстрому нарастанию активности (СI/НСO₃⁻)-обменника и расшатыванию спектральной сети цитоскелета [25]. В результате время достижения максимальной скорости лизиса эритроцитов сокращается.

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 [25, 26]. 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 эти характеристики с интенсивностью протонирования поверхностных остатков сиаловых кислот, потенциал(Н⁺)-зависимой активацией аквапоринов и, вполне вероятно, работой механосенситивных каналов [27–30]. Быстрое перераспределение внутриэритроцитарного водного пула, происходящее в ходе диализной сессии является физическим сигналом, реализуемым мембранно-цитоскелетным механизмом и направленным на стабилизацию белково-липидных взаимодействий [31]. Конформационные изменения и, возможно, даже частичная инактивация поврежденных систем приводят к увеличению времени достижения тотального лизиса даже при резком закислении внеклеточной среды.

Заключение. Таким образом, в ходе исследования мы подтвердили применимость и информативность метода малоуглового светорассеяния при построении эритрограмм для

лиц без ренальной патологии и пациентов с терминальной стадией хронической болезни почек, получающих лечение хроническим гемодиализом. Выявлены кинетические параметры, наиболее информативные при оценке функционального статуса эритроцитов как при сравнении групп лиц без ренальной патологии и пациентов, находящихся на хроническом гемодиализе, так и в самой группе пациентов при проведении гемодиализной процедуры.

Использованная методика определения устойчивости мембран эритроцитов при кислотной и аммонийной нагрузках малозатратна, несложна в исполнении и легко воспроизводится. Следовательно, метод малоуглового светорассеяния может применяться как для научных исследований, требующих анализа эритрограмм, так и в клинической практике при определении характеристик устойчивости мембранных систем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Камкин А.Г., Киселева И.С. *Физиология и молекулярная биология мембран клеток: Учебное пособие*. М.: Академия; 2008.
2. Lieberman M., Marks A., Peet A. *Marks' Basic Medical Biochemistry, 4th ed.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
3. Геннис Р. Биомембраны. *Молекулярная структура и функции*. М.: Мир; 1997.
4. Van Kim C.L., Colin Y., Cartron J.-P. Rh-proteins: Key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Rev.* 2006; 20: 93–110.
5. Жмуров В.А., Фролова А.Б., Ковальчук Д.Е., Швайбович С.А. Структурно-функциональные нарушения мембран эритроцитов у больных с терминальной почечной недостаточностью и анемией: влияние рекомбинантного человеческого эритропоэтина. *Нефрология*. 2008; 12 (1): 24–8.
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 Haematol.* 1994; 91 (4): 187–93.

См. продолжение на пол. 39

7. 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.
8. Bratosin D., Estaquier J., Petit F., Arnould D., Quatannens B., Tissier J.P. 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): 1143–56.
9. Румянцев А.Г., Морщакова Е.Ф., Павлов А.Д. *Эритропоэтин в диагностике, профилактике и лечении анемий*. М.; 2003.
10. Lang F., Qadri S.M. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. *Blood*. 2012; 33 (1–3): 125–30.
11. Lang K.S., Lang P.A., Bauer C., Duranton C., Wieder T., Huber S.M. et al. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell. Physiol. Biochem*. 2005; 15 (5): 195–202.
12. Lang P.A., Kaiser S., Myssina S., Wieder T., Lang F., Huber S.M. Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2003; 285 (6): 1553–60.
13. Lang F., Birka C., Myssina S., Lang K.S., Lang P.A., Tanneur V. et al. Erythrocyte ion channels in regulation of apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2004; 559: 211–7.
14. Lang F., Qadri S. M. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. *Blood*. 2012; 33 (1–3): 125–30.
15. Lang E., Syed M., Quadri S.M., Lang F. Killing me softly – suicidal erythrocyte death. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2012; 44: 1236–43.
16. Суглобова Е.Д., Спиридонов В.Н., Борисов Ю.А., Гавриленков П.В. Биофизические характеристики мембран эритроцитов у больных, получающих лечение регулярным гемодиализом. 1. Резистентность к действию внешнего каналоформера. *Нефрология*. 1998; 2 (4): 68–76.
17. Спиридонов В.Н., Суглобова Е.Д., Борисов Ю.А., Левыкина Е.Н. Динамика гемолиза и некоторых лабораторных показателей у больных ХПН в процессе лечения заместительной почечной терапией. *Нефрология*. 2004; 8 (2): 225.
18. 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; 11 (1): 38–54.
19. Buffenstein R., McCarron H.C.K., Dawson T.J. Erythrocyte osmotic fragility of red (*Macropus rufus*) and grey (*Macropus fuliginosus* and *Macropus giganteus*) kangaroos and free-ranging sheep of the arid regions of Australia. *J. Comp. Physiol. B: Biochem. Syst. Environ. Physiol*. 2001; 171 (1): 41–7.
20. Гительзон И.И., Терсков И.А. *Эритрограммы как метод клинического исследования крови*. Красноярск: Издательство Сибирского отделения Академии наук СССР; 1959.
21. Mindukshev I.V., Jahatspanian I.E., Goncharov N.V., Jenkins R.O., Krivchenko A.I. A new method for studying platelets, based upon the low-angle light scattering technique. 1. Theoretical and experimental foundations of the method. *Spectroscopy*. 2005; 19: 235–46.
22. Mindukshev I.V., Krivoshlyk V.V., Ermolaeva E.E., Dobrylko I.A., Senchenov E.V., Goncharov N.V. et al. Necrotic and apoptotic volume changes of red blood cells investigated by low-angle light scattering technique. *Spectroscopy*. 2007; 21 (2): 105–20.
23. Терсков И.А., Гительзон И.И. Метод химических (кислотных) эритрограмм. *Биофизика*. 1957; 11 (2): 259–66.
24. 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.
25. 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.
26. 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. *J. Theor. Biol*. 2008; 251: 93–107.
27. Gullingsrud J., Schulten K. Lipid bilayer pressure profiles and mechanosensitive channel gating. *Biophys. J*. 2004; 86: 3496–509.
28. Hamill O.P., Martinac B. Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol. Rev*. 2001; 81: 658–740.
29. Sachs F., Morris C.E. Mechanosensitive ion channels in nonspecialized cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*. 1998; 132: 1–77.
30. Raoux M., Rodat-Despoix L., Azorin N., Giamarchi A., Hao J., Mainregret F. et al. Mechanosensor channels in mammalian somatosensory neurons. *Sensors*. 2007; 7: 1667–82.
31. 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>.

REFERENCES

1. Kamkin A.G., Kiseleva I.S. *Physiology and molecular biology of cell membranes: Manual*. Moscow: Akademiya; 2008 (in Russian).
2. Lieberman M., Marks A., Peet A. *Marks' Basic Medical Biochemistry, 4th ed.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
3. Gennis R. Biomembranes. *Molecular structure and functions*. Moscow: Mir; 1997 (in Russian).
4. Van Kim C.L., Colin Y., Cartron J.-P. Rh-proteins: Key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Rev*. 2006; 20: 93–110.
5. Zhmurov V.A., Frolova A.B., Koval'chuk D.E., Shvaybovich S.A. Structural and functional alterations of erythrocyte membranes in patients with the end stage renal failure and anemia: impact of recombinant human erythropoietin. *Nefrologiya*. 2008; 12 (1): 24–8 (in Russian).
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 Haematol*. 1994; 91 (4): 187–93.
7. 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.
8. Bratosin D., Estaquier J., Petit F., Arnould D., Quatannens B., Tissier J.P. 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): 1143–56.
9. Rummyantsev A.G. Morshchakova E.F. Pavlov A.D. *Erythropoietin in diagnostics, prevention and treatment of anemia*. Moscow; 2003 (in Russian).
10. Lang F., Qadri S.M. *Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes*. *Blood*. 2012; 33 (1–3): 125–30.
11. Lang K.S., Lang P.A., Bauer C., Duranton C., Wieder T., Huber S.M. et al. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell. Physiol. Biochem*. 2005; 15 (5): 195–202.
12. Lang P.A., Kaiser S., Myssina S., Wieder T., Lang F., Huber S.M. Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2003; 285 (6): 1553–60.
13. Lang F., Birka C., Myssina S., Lang K.S., Lang P.A., Tanneur V. et al. Erythrocyte ion channels in regulation of apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2004; 559: 211–7.
14. Lang F., Qadri S.M. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. *Blood*. 2012; 33 (1–3): 125–30.
15. Lang E., Syed M., Quadri S.M., Lang F. Killing me softly – suicidal erythrocyte death. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2012; 44: 1236–43.
16. Suglobova E.D., Spiridonov V.N., Borisov Yu.A., Gavrilencov P.V. Biophysical characteristics of erythrocyte cell membranes in regular hemodialysis patients. 1. Resistance to external action of a channel former. *Nefrologiya*. 2008; 2 (4): 68–76 (in Russian).
17. Spiridonov V.N., Suglobova E.D., Borisov Yu.A., Levykina E.N. *Dynamics of hemolysis and some laboratory parameters in chronic renal failure in regular hemodialysis treatment*. *Nefrologiya*. 2004; 8 (2): 225 (in Russian).
18. 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. *Nefrologiya*. 2007; 11 (1): 38–54 (in Russian).
19. Buffenstein R., McCarron H.C.K., Dawson T.J. Erythrocyte osmotic fragility of red (*Macropus rufus*) and grey (*Macropus fuliginosus* and *Macropus giganteus*) kangaroos and free-ranging sheep of the arid regions of Australia. *J. Comp. Physiol. B: Biochem. Syst. Environ. Physiol*. 2001; 171 (1): 41–7.
20. Gitelzon I.I., Terskov I.A. *Erythrograms as method of a clinical blood test*. Krasnojarsk: Izdatelstvo Sibirskogo otdelenija Akademii nauk SSSR; 1959 (in Russian).
21. Mindukshev I.V., Jahatspanian I.E., Goncharov N.V., Jenkins R.O.,

- Krivchenko A.I. A new method for studying platelets, based upon the low-angle light scattering technique. 1. Theoretical and experimental foundations of the method. *Spectroscopy*. 2005; 19: 235–46.
22. Mindukshev I.V., Krivoslyk V.V., Ermolaeva E.E., Dobrylko I.A., Senchenkov E.V., Goncharov N.V. et al. Necrotic and apoptotic volume changes of red blood cells investigated by low-angle light scattering technique. *Spectroscopy*. 2007; 21 (2): 105–20.
 23. Terskov I.A., Gitelzon I.I. Method of chemical (acid) erythrograms. *Biofizika*. 1957; 11 (2): 259–66 (in Russian).
 24. Mindukshev I.V., Rukoyatkina N.I., Dobrylko I.A., Skvertchinskaya E.A., Nikitina E.R., Krivoslyk V.V. et al. Characterisation of enucleator cells apoptosis: human platelets and erythrocytes. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal*. 2013; 99 (1): 92–110 (in Russian).
 25. 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.
 26. 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. *J. Theor. Biol.* 2008; 251: 93–107.
 27. Gullingsrud J., Schulten K. Lipid bilayer pressure profiles and mechanosensitive channel gating. *Biophys. J.* 2004; 86: 3496–509.
 28. Hamill O.P., Martinac B. Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol. Rev.* 2001; 81: 658–740.
 29. Sachs F., Morris C.E. Mechanosensitive ion channels in nonspecialized cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1998; 132: 1–77.
 30. 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.
 31. 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>.

Поступила 10.10.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 612.119.083

Д.Ф. Глузман, Л.М. Скляренко, С.В. Коваль, Т.С. Ивановская

О ВОЗМОЖНЫХ ДОПОЛНЕНИЯХ К СОВРЕМЕННОЙ СХЕМЕ НОРМАЛЬНОГО КРОВЕТВОРЕНИЯ НА ОСНОВЕ ИЗУЧЕНИЯ ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ БЛАСТНЫХ КЛЕТОК

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого Национальной академии наук Украины, Киев

На основе многолетнего опыта лабораторной диагностики онкогематологических заболеваний у взрослых и детей и анализа опубликованных в доступной литературе данных о нормальном кроветворении обсуждается вопрос о внесении ряда дополнений в современную схему кроветворения. Предполагается существование общих олиголинейных предшественников для В-лимфоцитов и моноцитов, ЕК-клеток и моноцитов, а также общей клетки-предшественницы Т-лимфоцитов и дендритных клеток. В то же время вызывает сомнение вопрос о наличии у человека общей клетки-предшественницы лимфопоэза, способной дифференцироваться в В-, Т-лимфоциты и ЕК-клетки.

Ключевые слова: схема кроветворения; полипотентные гемопоэтические стволовые клетки; мультипотентные и олиголинейные клетки-предшественники; лейкемические стволовые клетки.

D.F. Gluzman, S.M. Skliyarenko, S.V. Koval, T.S. Ivanivskaya

ABOUT POSSIBLE ADDITIONS TO ACTUAL SCHEME OF NORMAL BLOOD FORMATION ON THE BASIS OF STUDY OF LEUKEMIC BLAST CELLS

The issue of introduction of number of additions into actual scheme of blood formation is discussed. The long standing experience of laboratory diagnostic of oncologic hematological diseases in adults and children and the analysis of published data about normal blood formation are involved into consideration. The existence is surmised of common oligo-linear precursors for B-lymphocytes and monocytes, natural killer cells and monocytes and common cell-precursor of T-lymphocytes and dendrite cells as well. At the same time, the issue concerning the existence of human common cell-precursor of lymphization capable of differentiating into B- and T-lymphocytes and natural killer cells is disputable.

Key words: scheme of blood formation, polypotent hematopoietic stem cells, multi-potent and oligo-linear cells-precursors, leukemic stem cells

Почти 40 лет назад на основе унитарной теории кроветворения А.А. Максимова, И.Л. Чертков и А.И. Воробьев [1], а также G. Mathé и соавт. [2] независимо друг от друга представили отличавшуюся лишь в некоторых деталях современную схему гемопоэза. В последующие годы получившая наибольшее признание в странах СНГ отечественная схема кроветворения И.Л. Черткова и А.И. Воробьева широко обсужда-

лась, в нее вносились уточнения и изменения, но основные принципы и структура предложенной модели оставались неизменными [3–8].

В настоящее время изучение верхних стволовых отделов кроветворной иерархии проводится на основе использования современных молекулярно-биологических методов, геной инженерии, проточной цитофлюориметрии и клеточных сортеров [9].

В качестве одного из подходов к характеристике нормальных полипотентных гемопоэтических стволовых клеток (ПГСК) и кроветворных клеток-предшественников могут быть использованы результаты морфоцитохимического и иммуноцитохимического изучения клонов лейкемических бластных клеток различного происхождения и разного уров-

Для корреспонденции:

Глузман Даниил Фишелевич, д-р мед. наук, проф., зав. отд. иммуноцитохимии

Адрес: 03022, Украина, Киев, ул. Васильковская, 45

E-mail: gluzman@onconet.kiev.ua