

Карагандинский государственный медицинский университет

УДК 616.61:612.111.6

На правах рукописи

КОЛЕСНИКОВА ЕВГЕНИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**Роль нарушений физико-химических параметров эритроцитов
в прогрессировании хронической болезни почек**

6D110100 - Медицина

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Отечественный научный консультант:
д.б.н., профессор, Л.Е. Муравлёва

Зарубежный научный консультант:
PhD, профессор, Серго Табагари

Республика Казахстан
Караганда, 2016

СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1.1 Хроническая болезнь почек - глобальная проблема общественного здоровья.....	9
1.1.1 Распространенность хронической болезни почек	9
1.1.2 Определение и классификация хронической болезни почек	11
1.1.3 Факторы риска развития и прогрессирования хронической болезни почек	14
1.2 Современные представления о мембранных белках эритроцитов	16
1.3 Физико-химические свойства эритроцитов больных с хронической болезнью почек.....	20
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	28
2.1 Характеристика обследуемых групп.....	28
2.2 Материалы исследования	34
2.3 Методы исследования.....	34
2.3.1 Определение осмотической резистентности эритроцитов	34
2.3.2 Определение динамики изменения объема эритроцитов в аммонийной среде (деформационных свойств эритроцитов)	35
2.3.3 Определение сорбционной емкости эритроцитов	36
2.3.4 Определение молекул средней массы в эритроцитах	36
2.3.5 Определение фрагментов внеклеточных нуклеиновых кислот в эритроцитах	37
2.3.6 Определение малонового диальдегида в эритроцитах	37
2.3.7 Определение карбониловых производных белков в эритроцитах	37
2.3.8 Определение мембранно-связанного гемоглобина в эритроцитах	38
2.3.9 Определение зарядового баланса эритроцитов	38
2.3.9.1 Описание Регистратора электропроводности биологических жидкостей	39
2.3.9.2 Методика проведения исследования	40
2.3.10 Статистические методы исследования	41
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	42
3.1 Исследование устойчивости эритроцитов в гипоосмотической среде и выживаемости эритроцитов в аммонийной среде	42
3.2 Исследование сорбционных свойств эритроцитов.....	69
3.3 Исследование показателей окислительного стресса в эритроцитах.....	77
3.4 Исследование зарядового баланса эритроцитов в условиях термоиндукции	84
3.5 Концепция роли изменения физико-химических свойств мембран эритроцитов в прогрессировании хронической болезни почек	104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	106

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	108
ПРИЛОЖЕНИЯ	117

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

K/DOQI – Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
KDIGO – Kidney Disease: Improving Global Outcomes
NKF – National Kidney Foundation
АГ – Артериальная гипертензия
АФК – Активные формы кислорода
вкДНК – Внуклеотидная Дезоксирибонуклеиновая кислота
вкРНК – Внуклеотидная Рибонуклеиновая кислота
ГПО – Глутатионпероксидаза
ГР – Глутатионредуктаза
ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота
КПБ – Карбонильные производные белков
МДА – Малоновый диальдегид
МКБ – Мочекаменная болезнь
МОН РК – Министерство образования и науки Республики Казахстан
ОРЭ – Осмотическая резистентность эритроцитов
ПОЛ – Перекисное окисление липидов
РНК – Рибонуклеиновая кислота
СД – Сахарный диабет
СЕЭ – Сорбционная емкость эритроцитов
СКФ – Скорость клубочковой фильтрации
СМ – Средние молекулы
СОД – Супероксиддисмутаза
ТПН – Терминальная почечная недостаточность
УЗИ – Ультразвуковое исследование
ХБП – Хроническая болезнь почек
ХГ – Хронический гломерулонефрит
ХП – Хронический пиелонефрит
ХПН – Хроническая почечная недостаточность

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

В настоящее время хроническая болезнь почек (ХБП) получает все большее признание в качестве ключевого фактора, определяющего плохое состояние общественного здоровья. Проведенный анализ показывает, что в 2010 году во всем мире насчитывалось 2,6 миллиона человек получающих заместительную терапию гемодиализом, при этом 93 % этих пациентов проживают в странах с высоким уровнем дохода. В противоположность этому, число людей, нуждавшихся в заместительной почечной терапии, оценивалось в 4,9 - 9 миллионов человек. Таким образом, подобная оценка предполагает, что, по крайней мере, 2,3 миллиона человек погибли из-за отсутствия доступа к заместительной почечной терапии [1, с. 4]. В 2010 году в Казахстане также отмечалась низкая обеспеченность заместительной почечной терапией – 39 на 1 млн. населения (в России этот показатель равнялся 98, в Европе - 289, в Японии – 900) [2]. К 2030 году число людей, получающих заместительную почечную терапию по всему миру, по прогнозам, увеличится до 5,4 миллионов человек. Большая часть этого прироста будет за счет развивающихся стран Азии и Африки [1, с. 4].

До сих пор остаются нерешенными вопросы создания условий для замедления темпов прогрессирования хронической болезни почек. Это связано с недостаточной изученностью механизмов развития и прогрессирования ХБП [3]. Также необходимо отметить, что у многих пациентов на последней преддиализной стадии ХБП темпы снижения почечных функций ускоряются даже при отсутствии внешних провоцирующих факторов [4].

Анализ литературы показал, что одним из актуальных направлений исследования механизмов становления и прогредиентного развития хронической болезни почек является изучение физико-химических свойств мембран эритроцитов. Наиболее перспективным является изучение мембранных белков и их роли в изменении эритроцитов у пациентов с хроническими почечными патологиями.

Цель исследования

Оценить роль изменения физико-химических свойств мембран эритроцитов в прогрессировании хронической болезни почек

Задачи исследования

1. Изучить устойчивость эритроцитов в гипоосмотической и аммонийной среде у пациентов с хронической болезнью почек на различных стадиях ее развития.
2. Изучить сорбционные свойства эритроцитов пациентов с хронической болезнью почек на различных стадиях ее развития.
3. Изучить показатели окислительного стресса в эритроцитах у пациентов с хронической болезнью почек на различных стадиях ее развития.

4. Изучить зарядовый баланс эритроцитов у пациентов с хронической болезнью почек на различных стадиях ее развития.

5. Разработать концепцию о роли изменения физико-химических свойств мембран эритроцитов в прогрессировании хронической болезни почек.

Научная новизна

Впервые был зафиксирован феномен увеличения времени выживания эритроцитов в аммонийной среде у пациентов с хронической болезнью почек.

Впервые было обнаружено увеличение адсорбции фрагментов внеклеточных нуклеиновых кислот на эритроцитах пациентов с хронической болезнью почек. На эритроцитах больных хроническим гломерулонефритом превалировала адсорбция гидролизатов РНК, на эритроцитах больных хроническим пиелонефритом гидролизаты РНК и ДНК адсорбировались в равной степени.

Впервые было обнаружено увеличение содержания мембранно-связанного гемоглобина у пациентов с хронической болезнью почек, имеющее обратную зависимость от стадии ХБП.

Впервые был сконструирован оригинальный прибор «Регистратор электропроводности биологических жидкостей» в едином корпусе с программным универсальным измерителем-регулятором ТРМ151.

Впервые были получены индивидуальные типы термограмм изменения рН эритроцитов у пациентов с хронической болезнью почек.

Впервые изменения структурно-функциональных свойств эритроцитов у пациентов с хронической болезнью почек объяснены с точки зрения изменения активности транспортных белков мембраны.

Впервые предложена гипотеза о роли изменения физико-химических свойств эритроцитов в прогрессировании хронической болезни почек.

Теоретическая новизна и практическая значимость

Полученные данные позволят расширить и углубить фундаментальные представления о молекулярно-патогенетических механизмах развития и прогрессирования хронической болезни почек. Это дает возможность в дальнейшем использовать определение физико-химических свойств мембран эритроцитов в качестве прогностического критерия прогрессирования ХБП.

Внедрения результатов в практику

По материалам диссертации получен 1 инновационный патент (Приложение А), 4 свидетельства о государственной регистрации прав на объект авторского права (Приложение Б) и 1 свидетельство о государственной регистрации объекта интеллектуальной собственности (Приложение В).

Результаты диссертации используются в учебном процессе на элективных дисциплинах образовательных программ бакалавриата и магистратуры.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

У пациентов с хронической болезнью почек зарегистрировано увеличение времени выживания эритроцитов в аммонийной среде, наряду с этим обнаружено снижение осмотической резистентности эритроцитов и появление пула низкостойких эритроцитов по отношению к гипоосмотической среде.

У пациентов с хронической болезнью почек на мембране эритроцитов сорбируются низко- и среднемолекулярные вещества и фрагменты нуклеиновых кислот. Адсорбция фрагментов РНК на эритроцитах пациентов с хроническим гломерулонефритом превалирует над адсорбцией фрагментов ДНК.

У пациентов с хронической болезнью почек количество мембранно-связанного гемоглобина в начальных стадиях болезни резко повышается. С прогрессированием ХБП количество мембранно-связанного гемоглобина в эритроцитах снижается, но так и не достигает контрольных показателей.

У пациентов с хронической болезнью почек были зарегистрированы индивидуальные типы термограмм изменения рН эритроцитов в условиях термоиндукции.

Связь диссертации с другими научно-исследовательскими работами

Диссертация выполнялась на кафедре биологической химии в рамках научно-исследовательского проекта, финансируемого МОН РК «Молекулярно-клеточные механизмы развития хронической почечной недостаточности» (2013-2015), ГРН⁰0113РК00410.

Апробация работы

Основные положения и результаты работы докладывались на: Международной конференции молодых ученых «Мир науки и молодежь: традиции и инновации», Караганда, 19 февраля 2014 года; 22 Международном конгрессе по Клинической химии и лабораторной медицине, Стамбул, 22 – 26 июня 2014 года; Международном конгрессе Федерации европейских биохимических обществ «FEBS EMBO 2014», Париж, 30 августа – 4 сентября 2014 года; Международной конференции Европейского сообщества по исследованию свободных радикалов «Free Radicals: Insights in signaling and adaptive homeostasis», Париж 5 – 7 сентября 2014 года; Международной конференции молодых ученых «Мир науки и молодежь: достижения и перспективы», Караганда 26 февраля 2015 года; III Международной научной конференции студентов и молодых ученых, Тбилиси, 22 мая 2015 года; Международном конгрессе Федерации европейских биохимических обществ FEBS 2015 «The Biochemical Basis of Life», Берлин, 4 – 9 июля 2015 года; Шестой всероссийской с международным участием школе-конференции по физиологии кровообращения, Москва, 2 – 5 февраля 2016 года.

Предзащита проходила на расширенном заседании кафедры биологической химии КГМУ, протокол № 12 от 17 июня 2016 года.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 27 работ, в том числе 1 монография, утверждённая Департаментом науки и человеческих ресурсов Министерства здравоохранения и социального развития Республики Казахстан. В изданиях, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки, опубликовано 9 работ, в изданиях, имеющих Impact Factor Thomson Reuters и входящих в базу данных Scopus, опубликовано 7 публикаций, в том числе 1 статья и 6 тезисов.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 116 страницах, состоит из введения, основной части, заключения и списка использованных источников. Диссертация имеет 3 приложения.

В работе содержится 19 таблиц и 84 рисунка.

Список литературы включает 121 источник на русском и английском языках.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Хроническая болезнь почек – глобальная проблема общественного здоровья

1.1.1 Распространенность хронической болезни почек

Хроническая болезнь почек – общепопуляционная проблема, имеющая не только медицинское, но и большое социально-экономическое значение [5]. Распространенность ХБП по всему миру оценивается в 8-16 % [6].

Распространенность ХБП в различных странах мира представлена в таблице 1 [7, с. 91].

Таблица 1 – Распространенность ХБП в мире по данным популяционных исследований [7, с. 91]

Страна	Исследование	Распространенность 1 – 5 стадии ХБП, %
США	NHANES, 1999 - 2006	15
Нидерланды	PREVEND, 2005	17,6
Испания	EPIRCE, 2005	12,7
Китай	Beijing study, 2008	14
Австралия	AusDiab, 2008	13,4
Конго	Kinshasa study, 2009	12,4

Осложнениями ХБП являются увеличение смертности от различных заболеваний, прогрессирование хронической почечной недостаточности, острое повреждение почек, снижение когнитивных функций, анемия и минеральные нарушения. Во всем мире, сахарный диабет является наиболее частой причиной хронической болезни почек, но в некоторых регионах на первый план выходят другие причины развития ХБП, как, например, токсическое повреждение почек [8]. При этом незащищенные слои населения, имеющие низкий доход подвергаются наибольшему риску развития и прогрессирования хронической болезни почек. Своевременное оказание квалифицированной медицинской помощи может предотвратить прогрессирование ХБП, и в странах, где были реализованы стратегии управления здравоохранением, направленные на скрининг хронической болезни почек, частота терминальной стадии почечной недостаточности была уменьшена. Несмотря на это, во многих странах и среди множества врачей осознание хронической болезни почек как медико-социальной проблемы остается на низком уровне. Таким образом, планы профилактики и контроля хронической болезни почек должны быть включены в национальные программы по неинфекционным заболеваниям [9].

О распространенности ХБП в Казахстане можно судить по разрозненным исследованиям отдельных авторов. Так, Канатбаева А.Б. и Кабулбаев К.А., 2009, приводят результаты скрининга населения г. Алматы для выявления

хронической болезни почек. Всего было обследовано 4610 человек, проживающих в г. Алматы, из них 4054 (87,8 %) взрослых и 556 (12,2 %) детей. По данным анкетирования распространенность гломерулонефрита среди взрослого населения составила 0,3 %, хронического пиелонефрита – 27,5 %, сахарного диабета – 6,4 %, ишемической болезни сердца – 0,89 %. На изменения почек при проведении ультразвукового исследования (УЗИ) (включая мочекаменную болезнь (МКБ)) указывали 12,8 % взрослых обследованных, на операции на почках – 2,2 %, на наследственность по артериальной гипертензии (АГ) – 36,1 %, на наследственность по сахарному диабету (СД) – 14,1 %. Результаты анкетных данных у детей: распространенность гломерулонефрита – 0,3 %, распространенность хронического пиелонефрита – 29,4 %, наличие изменений почек на УЗИ (включая МКБ) – 3,4 %, проведение операций на почках – 2,15 %, наследственность по АГ – 43,7 %, наследственность по СД – 17,8 %. Артериальная гипертензия выявлена у 45,6 % взрослых и у 10,8 % детей. У 15,0 % взрослых выявлена протеинурия, у 26,5 % - эритроцитурия, у 3,4 % - глюкозурия. Среди детей протеинурия выявлена у 18,3 % обследованных, эритроцитурия – у 26,7 %, глюкозурия – у 1,8 %. После сопоставления анамнестических данных с результатами определения нитратов и лейкоцитов в моче, а также после расчета скорости клубочковой фильтрации (СКФ) распространенность хронического пиелонефрита у взрослых снизилась до 14,1 % у детей до 10,8 %. Расчет СКФ у взрослых производили по формуле Кокрофта-Голта, у детей по формуле Шварца [10, с.11].

Распространенность ХБП по результатам скрининга жителей г. Алматы представлена в таблице 2. Во избежание завышения или занижения частоты встречаемости ХБП 1 и 2 стадии авторы приводят результаты распространенности начальных стадий ХБП исходя только из расчета СКФ, а также из расчета ХБП с учетом протеинурии и ранее установленных диагнозов. Таким образом, по результатам однократного скринингового обследования, даже без учета на начальных стадиях заболевания протеинурии и ранее установленных диагнозов распространенность ХБП среди взрослых жителей г. Алматы составила 23,78 %. Этот показатель выше, чем в других странах, что в свою очередь ставит перед организациями здравоохранения Республики Казахстан задачи по принятию срочных мер по профилактике и раннему выявлению ХБП [10, с. 12].

Нургазина Л.С., Омарова Г.С. и соавт., 2010, указывают на более частую встречаемость ХБП у лиц пожилого возраста. При этом среди 60 диспансерных больных с хроническими заболеваниями почек в возрасте от 61 года до 74 лет, наблюдающихся в поликлиниках г. Караганды, 66,6 % обследованных женщины, 33,4 % - мужчины. По данным этих же авторов одной из самых распространенных форм хронической прогрессирующей нефропатии у людей пожилого возраста является хронический пиелонефрит [11].

Таблица 2 - Распространенность ХБП в г. Алматы при однократном скрининговом обследовании [10, с. 12]

Обследованные	Стадии ХБП	Распространенность, %
Взрослые	1	12,5 (15,8)*
	2	5,09 (6,86)*
	3	6
	4	0,13
	5	0,06
Дети	1	13,7
	2	1,68
	3	1,68
	4	-
	5	-
* - в скобках указана распространенность ХБП 1-2 стадий с учетом протеинурии и ранее установленных диагнозов		

1.1.2 Определение и классификация хронической болезни почек

В 2002 году Национальным Почечным Фондом США (National Kidney Foundation – NKF) при участии большой группы экспертов K/DOQI (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) было предложено объединить структурные и функциональные изменения почек длительностью 3 месяца и более в одно общее наднозологическое понятие «хроническая болезнь почек» [12]. Основанием для появления концепции ХБП послужили две причины: наличие общих механизмов прогрессирования нефропатий и высокая сердечно-сосудистая смертность больных с хроническими заболеваниями почек [13, с. 5].

Таким образом, под ХБП следует понимать наличие любых маркеров повреждения почек, которые выявляются при клиническом, лабораторном и инструментальном обследовании и отражают наличие патологического процесса в почечной ткани, вне зависимости от нозологического диагноза. [14]. Маркеры и признаки повреждения почек, характеризующие наличие ХБП представлены на рисунке 1 [7, с. 93].

Суммарный анализ многочисленных публикаций показал, что прогноз ХБП существенно зависит от величины скорости клубочковой фильтрации [15]. Критерием снижения функций почек является уровень СКФ, стандартизованной на поверхность тела, находящийся ниже нормальных значений, т.е. ниже 90 мл/мин/1,73 м² [16]. СКФ в пределах 60-89 мл/мин/1,73 м² расценивают как начальное или незначительное ее снижение. Для установления ХБП в этом случае необходимо наличие также и маркеров почечного повреждения. При их отсутствии ХБП не диагностируется. Для лиц 65 лет и старше это расценивают как вариант возрастной нормы. Лиц моложе этого возраста относят в группу высокого риска развития ХБП. Если СКФ ниже 60-89 мл/мин/1,73 м², наличие ХБП устанавливается даже при отсутствии каких-либо маркеров почечного повреждения [7, с. 93].

Повышенная альбуминурия/протеинурия

- Индексация альбуминурии/протеинурии: A0 – оптимальная, A1 – повышенная, A2 – высокая, A3 – очень высокая, A4 – нефротическая.
- Альбуминурия/протеинурия в концепции ХБП – K/DOQI рассматривается как маркер ренальной дисфункции. Однако физиологическое и клиническое значение этого показателя является более широким.
- Данный признак отражает повышение проницаемости клеточных мембран (размер-селективность, заряд-селективность), изменение транспортных процессов в проксимальных канальцах, повышение гемодинамической нагрузки на клубочек, наличие системной и ренальной эндотелиальной дисфункции.

Стойкие изменения в осадке мочи

- Эритроцитурия (гематурия), цилиндрурия, лейкоцитурия (пиурия)

Изменения электролитного состава крови и мочи

- Изменения сывороточной и мочевой концентрации электролитов, нарушения кислотно-щелочного равновесия и др. (в том числе характерные для «синдрома канальцевой дисфункции», синдром Фанкони, почечные тубулярные ацидозы, синдромы Барттера и Гительмана, нефрогенный несахарный диабет и т.д.)

Изменения почек по данным лучевых методов исследования

- Аномалии развития почек, кисты, гидронефроз, изменение размеров почек и др.

Патоморфологические изменения в ткани почек, выявленные при прижизненной нефробиопсии

- Признаки активного необратимого повреждения почечных структур, специфические для каждого хронического заболевания почек, и универсальные маркеры нефросклероза, указывающие на «хронизацию» процесса

Стойкое снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) менее 60 мл/мин/1,73 м²

- Указывает на наличие ХБП даже при отсутствии повышенной альбуминурии/протеинурии и других маркеров повреждения почек

Рисунок 1 – Основные маркеры, характеризующие наличие хронической болезни почек [7, с. 93]

В первом варианте классификации ХБП было предложено разделять ее на пять стадий в зависимости от значений СКФ [17]. Однако накопление новых данных позволило модифицировать первоначальный вариант стратификации ХБП и разделить третью стадию на две стадии: 3а и 3б. Необходимость подобного разделения была продиктована различными почечными и сердечно-сосудистыми прогнозами в группах лиц с ХБП 3 стадии с СКФ от 59 до 45 мл/мин/1,73 м² и от 44 до 30 мл/мин/1,73 м². У пациентов с СКФ от 59 до 45 мл/мин/1,73 м² имеются высокий сердечно-сосудистый риск и умеренные темпы прогрессирования ХБП, а у больных с градацией СКФ в пределах от 44 до 30 мл/мин/1,73 м² риск развития терминальной почечной недостаточности оказывается выше, чем риск сердечно-сосудистых осложнений [7, с. 98, 18].

В октябре 2009 года в Лондоне эксперты Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) пришли к консенсусу по вопросу стратификации тяжести ХБП [19]. На рисунке 2 представлена классификация стадий ХБП, рекомендованная KDIGO [7, с. 98].

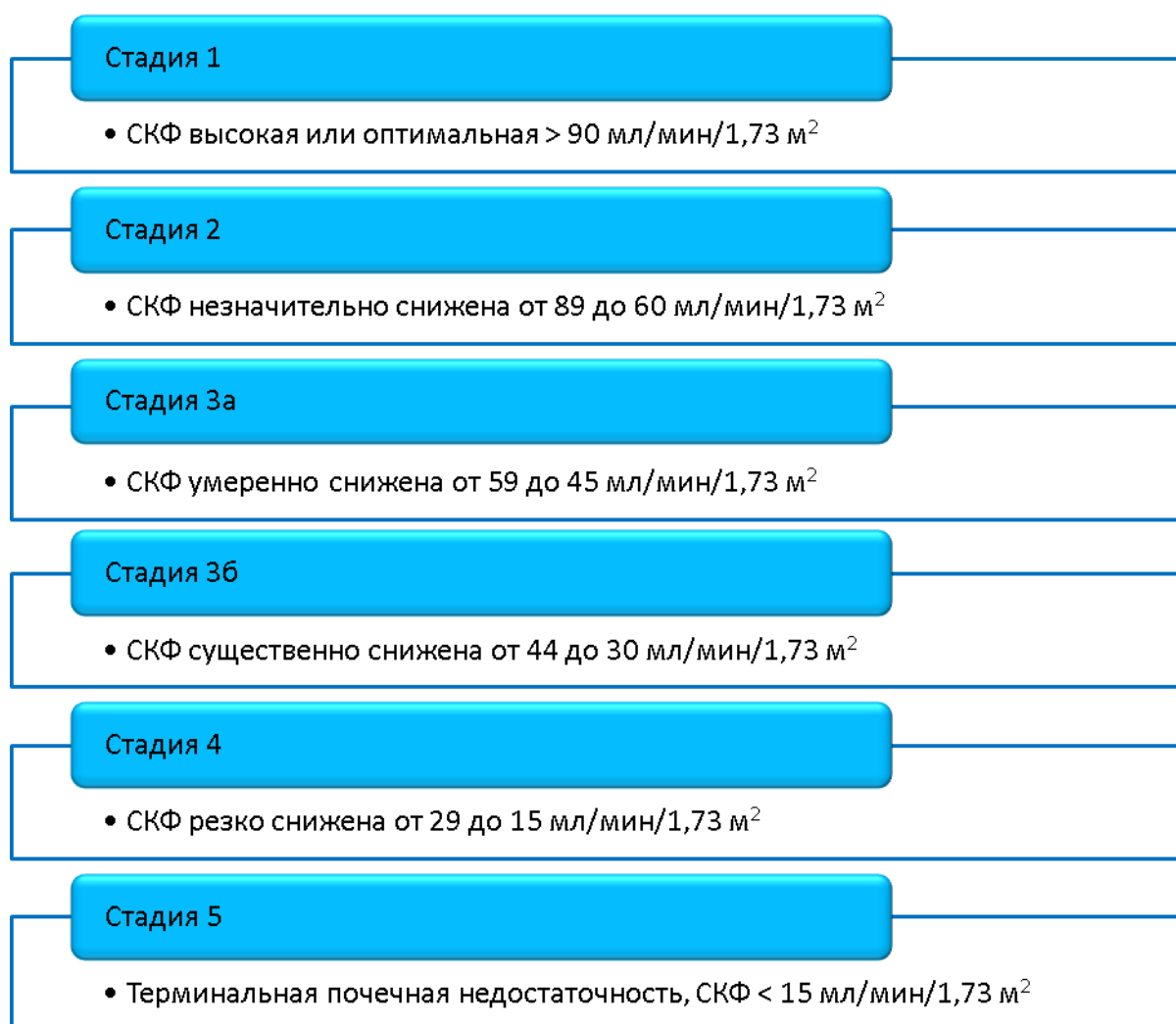


Рисунок 2 – Стратификация стадий ХБП по уровню СКФ [7, с. 98]

Принципиальным отличием понятия хроническая болезнь почек от хронической почечной недостаточности является включение в эту категорию пациентов в том числе и с нормальным функциональным состоянием почек [13, с. 5].

Следует подчеркнуть, что понятие ХБП не отменяет нозологический подход к диагностике заболеваний почек. В предложениях KDIGO была подчеркнута необходимость установления первичной этиологической нозологии, на фоне которой развилась хроническая болезнь почек [20].

1.1.3 Факторы риска развития и прогрессирования хронической болезни почек

Многие факторы могут оказать влияние на развитие и прогрессирование хронической болезни почек. К ним относятся персистенция инфекций, прием нефротоксических лекарственных препаратов, алкоголь, курение, состояние окружающей среды, климат, характер питания и наследственность [21].

Многие факторы риска развития хронической болезни почек соответствуют традиционным факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний. Это артериальная гипертензия, сахарный диабет, возраст, мужской пол, дислиппротеинемия, ожирение, метаболический синдром, курение. Также результаты исследований в области кардиологии указывают на то, что многочисленные кардиоваскулярные риски, такие как анемия, хроническое воспаление, гипергомоцистеинемия, увеличение синтеза асимметричного диметиларгинина, оксидативный стресс, активация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, стресс, гиперурикемия, натрийуретические факторы различного происхождения вероятней всего обусловлены прогрессирующей дисфункцией почек у пациентов с сердечно-сосудистой патологией [22]. Таким образом, концепция ХБП позволяет определить риск развития терминальной почечной недостаточности и сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с различной степенью нарушения почечных функций [23].

В процессе развития концепции хронической болезни почек была предпринята попытка классифицировать факторы риска развития и прогрессирования ХБП [20]. Выделялись факторы, повышающие восприимчивость почечной паренхимы к повреждающим агентам, инициирующие повреждение почечной ткани, способствующие прогрессированию почечного повреждения, факторы терминальной почечной недостаточности. Однако невозможно провести четкую грань между факторами развития и прогрессирования ХБП. Поэтому факторы риска развития ХБП и факторы ее прогрессирования во многом повторяют друг друга [24]. На рисунках 3 и 4 таблице представлены факторы риска развития ХБП и факторы прогрессирования ХБП [7, с. 100].

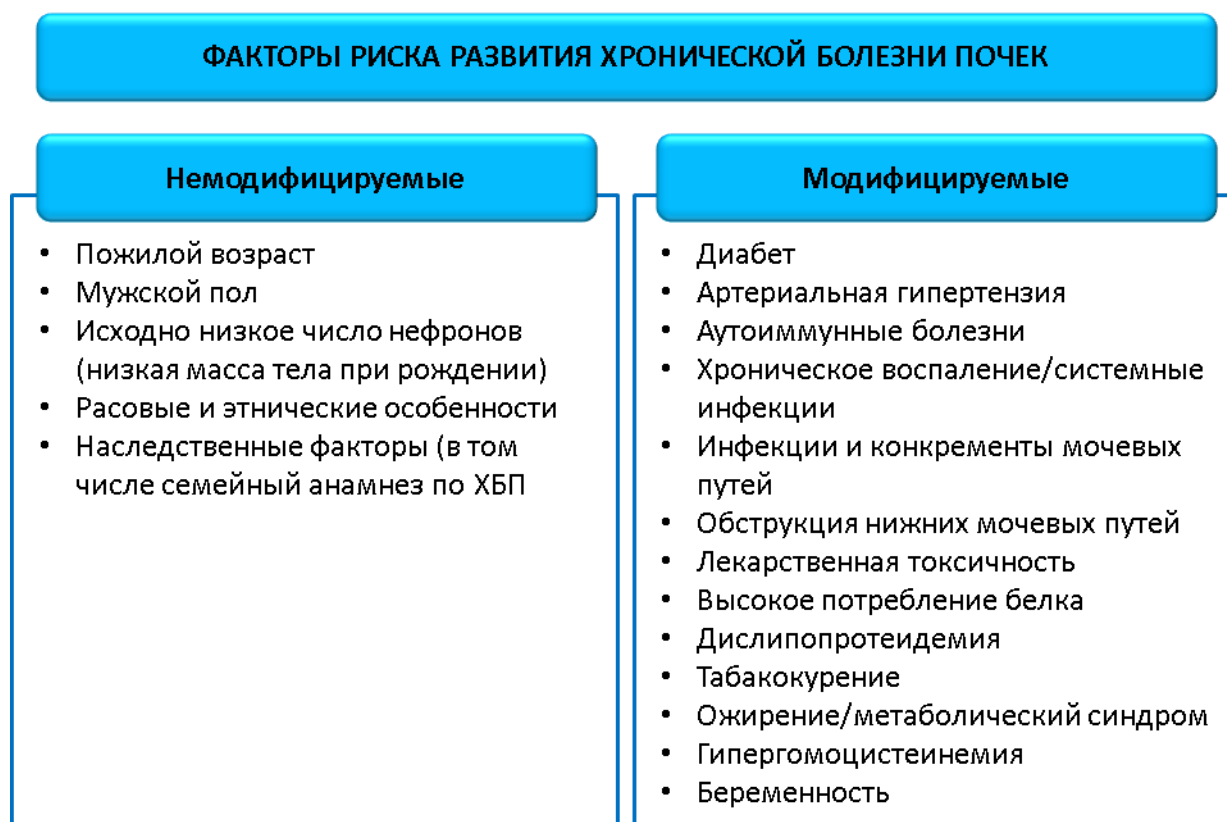


Рисунок 3 – Факторы риска развития хронической болезни почек [7, с. 100]

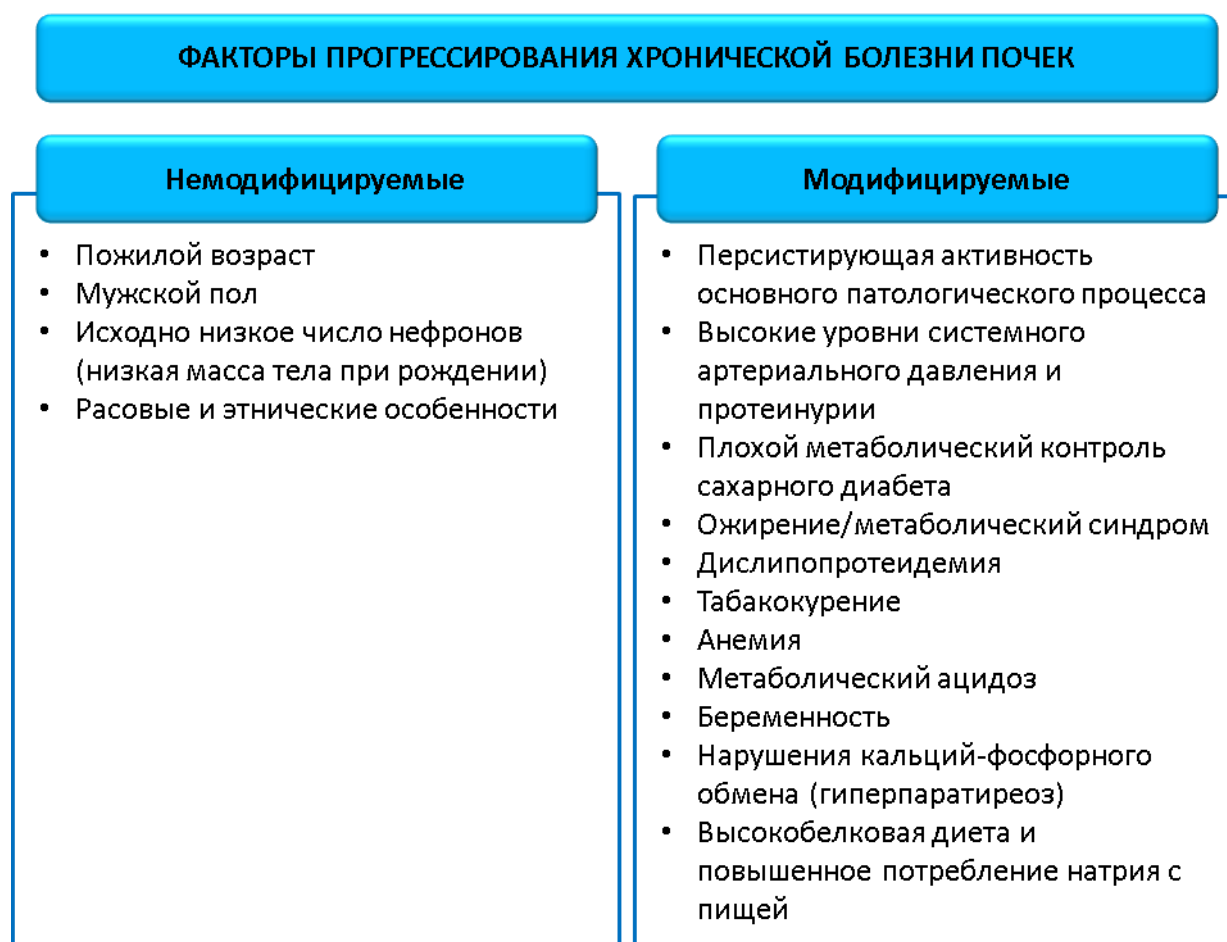


Рисунок 4 – Факторы прогрессирования хронической болезни почек [7, с. 100]

1.2 Современные представления о мембранных белках эритроцитов

Развитие протеомики в последнее двадцатилетие дало возможность существенно расширить представления о строении, функциях и взаимодействиях белков и макромолекулярных белковых комплексов в мембранах эритроцитов [25].

Основой мембраны эритроцита являются четыре белка: спектрин, анкирин, белок 4.1 (4.1R) и аддуцин (ADD1), которые также являются самыми ранними белками эритроцитов с точки зрения эволюции. Эти белки формируют цитоскелет эритроцита и связывают различные трансмембранные белки [26].

Спектрин – это крупный, гетеродимерный белок цитоскелета, состоящий из альфа и бета субъединиц. Обычно он содержит 106 повторяющихся аминокислотных последовательностей, которые называются "спектриновые повторы". Спектрин, как основной структурный белок, играет решающую роль для поддержания стабильности клеточной мембраны и формы клеток. Спектрин присутствует не только в эритроцитах человека. Так, помимо поддержания клеточной формы в других тканях спектрин выполняет разнообразные функции, такие как клеточная адгезия, распространение клеток и участие в клеточном цикле [27].

Анкирин – это адаптерный белок, который опосредуют прикрепление интегральных мембранных белков к спектриновой базе цитоскелета. В структуре анкирина выделяют четыре функциональных домена. N-концевой домен содержит 24 tandemных «анкириновых повторов», центральный домен связывается со спектрином, домен смерти связывается с белками, участвующими в апоптозе, С-концевой домен является регуляторным и сильно варьируется между различными анкириновыми белками. Помимо сайта связывания для бета-субъединицы спектрина на анкирине также присутствуют сайты связывания для 12 семейств интегральных мембранных белков. Эта связь необходима для поддержания целостности мембран и закрепления конкретных ионных каналов, ионообменников и ионных транспортеров в плазматической мембране [28].

Аддуцин является гетеротермерным белком, который состоит из альфа, бета субъединиц. Аддуцин выполняет несколько важных функций в мембранах эритроцитов. Во-первых, он образует мостик, который связывает место соединения спектрина и актина с основным трансмембранным белком - белком полосы 3. Разрыв этого мостика приводит к дестабилизации эритроцитарной мембраны и к ее спонтанной фрагментации. Во-вторых, аддуцин прикрывает быстро растущие концы актиновых филаментов, тем самым предотвращая протофиламенты от удлинения и формирования макроскопических микрофиламентов F-актина. В-третьих, аддуцин стабилизирует связь между актином и спектрином, в таком виде узловый спектриново-актиновый комплекс остается неизменным во время механических деформаций, которые неизбежно испытывает клетка, циркулирующая в крови. И, наконец, аддуцин отвечает за проведение сигналов, которые могут иметь важное значение в регулировании

таких свойств клетки как катионный транспорт и деформируемость мембран [29].

Белок 4.1 отвечает за поддержание формы эритроцита и контроль изменения механических свойств мембраны, а именно деформируемости и стабильности эритроцитарных мембран. Важность белка 4.1 была подтверждена при изучении пациентов с повреждением эритроцитов, характеризующимся отсутствием данного белка. Белок 4.1 нулевые эритроциты принимают эллиптическую форму и характеризуются нестабильными мембранами. Ключевая роль белка 4.1 является результатом нескольких латеральных белок-белковых взаимодействий со спектрин/актиновой сетью и вертикальных взаимодействий с цитоплазматическим доменом трансмембранных белков гликофорина C, белка полосы 3 и CD44 [30]. Важным свойством белка 4.1 является способность формировать комплекс с гликофорином C и белком p55. При этом бинарные взаимодействия в данном белковом ассоциате осуществляются в следующем порядке: гликофорин C взаимодействует с белком 4.1 и белком p55, которые в свою очередь взаимодействуют между собой. На данный момент имеется представление, что основную роль в данных межмолекулярных взаимодействиях играет именно белок 4.1. На белке 4.1 в области мембран-связывающего домена с молекулярной массой в 30 кДа определены сайты связывания для гликофорина C и p55. Кроме того белок 4.1 модулирует взаимодействие между гликофорином C и p55 и увеличивает их сродство друг к другу. Также известно, что белок 4.1 связывается с кальмодулином, В результате этого происходит Ca^{2+} - зависимое снижение сродства белка 4.1 к гликофориному C и p55 [31]. Активация протеинкиназы C и фосфорилирование белка 4.1 по 312 и 331 остаткам тирозина приводит к снижению способности белка 4.1 связываться с цитоплазматическими доменами гликофорина C, однако фосфорилирование никак не влияет на связь белка 4.1 с белком полосы 3. Фосфорилирование также ослабляет сродство белка 4.1 к актину и к бета-цепям спектрина. Таким образом, становится очевидным, что фосфорилирование регуляторной области в белке 4.1 приводит к структурным изменениям мембраны эритроцитов [32]. Следует отметить, что альтернативный сплайсинг в гене белка 4.1 приводит к синтезу различных изоформ данного белка, которые экспрессируются не только в эритроидных, но и в неэритроидных клетках. Так семейство белков 4.1 представлено эритроцитарным белком 4.1R, белком общего типа 4.1g, мозговым белком 4.1b и нейронным белком 4.1N [33].

Белок полосы 3 (также известный как Cl^-/OH^- обменник, или $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменник, или anion exchanger 1 (AE1), или solute carrier family 4 member 1 (SLC4A1)) является одним из наиболее распространенных мембранных белков в эритроцитах человека. Белок полосы 3 состоит из 911 аминокислотных остатков и имеет два структурно и функционально различных домена. Одним из них является N-концевой цитоплазматический домен (40 кДа), а другой представляет собой C-концевой мембранный домен (55 кДа). Цитоплазматический домен поддерживает форму эритроцитов путем взаимодействия с белками цитоскелета, такими как белок 4.1, белок 4.2,

анкирин и спектрин. Мембранный домен осуществляет обмен бикарбонат-ионов и ионов хлора через мембрану эритроцита [34]. Белок полосы 3 также взаимодействует с белками Rh комплекса, а именно с Rh-ассоциированным гликопротеином, Rh полипептидами, CD47 и гликофорином B [35].

Таким образом, белок полосы 3 образует ядро макрокомплекса интегральных и периферических мембранных белков эритроцитов. Наличие такого структурного макрокомплекса повышает вероятность того, что данная транспортная система помимо участия в газообмене CO_2 и O_2 выполняет своеобразную регуляторную роль [35]. Цитоплазматический домен белка полосы 3 связывается с дезоксигемоглобином, что еще раз подтверждает роль данного ионообменника в окисгенации. [36]. Регуляторная роль белка полосы 3 подтверждается тем, что его цитоплазматический домен также имеет сайты связывания с основными гликолитическими ферментами эритроцитов. Так, участок связывания альдолазы находится в пределах N-концевого домена белка полосы 3 в районе 1-23 аминокислотных остатков. Глицеральдегид-3-форфат дегидрогеназа имеет два tandemных сайта связывания на белке полосы 3, расположенных в области 1-11 и 12-23 аминокислотных остатков. Сайт связывания фосфофруктокиназы находится между 12 и 23 аминокислотными остатками цитоплазматического домена белка полосы 3 [37].

Исходя из того, что белок полосы 3 играет ключевую роль в удалении углекислого газа из тканей путем облегчения обмена хлорида и бикарбоната через плазматическую мембрану эритроцитов, объяснимым становится тот факт, что изоформы белка полосы 3 также присутствует в почках. И специфические мутации, приводящие к изменению структуры белка полосы 3 могут вызывать не только наследственные гемолитические анемии, но и почечный ацидоз [38].

Белок полосы 3 также играет важную роль в изменении объема эритроцитов, которое происходит не только за счет изменения активности ионообменников, но и за счет тепловых флуктуаций мембраны. Чрезмерная гидратация клеток возникает из-за аномальной проницаемости для катионов Na^+ и K^+ . На сегодняшний день, 5 различных мембранных белков, могут нести ответственность за изменение объема эритроцитов, так за гипергидратацию клеток и увеличение их объема ответственны мутации белка полосы 3 (SLC4A1), RHAG и GLUT1 (SCL2A1), мутации транспортера PIEZO1 и Gardos канала приводят к дегидратации и уменьшению объема клеток. [39]. Изменения мембран в условиях термоиндукции возникают в процессе взаимодействия основных компонентов мембраны между собой. Так взаимодействия актин-спектринового кортекса, липидного бислоя и трансмембранного белка полосы 3, приводят к перераспределению энергии и изменению жесткости мембраны. Это, в свою очередь, вызывает чередующиеся расширение и сжатие мембраны для того, чтобы обеспечить сохранение поверхности мембраны и объема клетки в целом. Также известно, что гибкость спектриновых волокон зависит от числа молекул белка полосы 3, прикрепленных к отдельным спектриновым нитям, и от фосфорилирования спектрин-актиновых переходов. Скорость изменения гибкости спектрина зависит от перегруппировки молекул белка полосы 3 [40].

Основным переносчиком глюкозы в эритроцитах человека является глюкозный транспортёр тип 1 или GLUT1. На мембране эритроцита представлено более 200000 молекул GLUT1 [41]. Существует сложный механизм регуляции активности GLUT1 в эритроцитах. Так, транспорт глюкозы в красные кровяные клетки зависит от концентрации АТФ в цитоплазме эритроцитов. Существует димерная и тетрамерная формы GLUT1. АТФ связывающий домен представлен на тетрамерной форме глюкозного переносчика. Так, связывание АТФ в районе 301 – 364 аминокислотных остатка GLUT1 приводит к снижению поглощения глюкозы эритроцитами. Однако этот эффект не постоянен и снимается повышением внутриклеточного АМФ и закислением цитоплазмы [42]. Цитоплазматический АТФ ингибирует транспорт глюкозы в эритроциты человека, однако этот механизм снижает основной поток глюкозы в клетки, но не ингибирует весь обмен глюкозы между эритроцитом и плазмой крови [43]. Это объясняется тем, что на мембранах эритроцитов также представлены другие переносчики глюкозы – это GLUT2 и GLUT5. Применение иммуноблоттинга и иммунолокализации позволило подтвердить, что основными переносчиками гексоз в эритроцитах являются GLUT1 и GLUT5, также, но в меньших количествах, обмен гексоз осуществляется при помощи GLUT2. Функциональные исследования с применением цитохалазина В, который является мощным ингибитором активности GLUT1 и GLUT2, позволили идентифицировать, что GLUT5 в основном участвует в транспорте фруктозы в эритроцитах человека [44].

Пассивный транспорт воды в эритроциты осуществляет аквапорин-1. Это небольшой интегральный мембранный белок гомотетрамер с одной N-гликозилированной субъединицей [45]. Существует две гипотезы физиологической роли существования водных каналов в эритроцитах. Исходя из первой гипотезы, аквапорины в мембране эритроцитов обеспечивают высокую водопроницаемость, это, в свою очередь, способствует беспрепятственным колебаниям мембраны. Согласно второй гипотезе, наличие водных пор на мембранах эритроцитов поддерживает транспорт других растворенных в воде веществ, таких как глюкоза, ионы хлора и гидрокарбонатов [46]. Также установлен тот факт, что через аквапорин-1 происходит обмен молекулярного CO_2 в эритроцитах [47]. Эту же функцию выполняет $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ транспортер или белок полосы 3 (SLC4A1) [48].

Исследование по сшиванию белков эритроцитарной мембраны *in situ* показало взаимодействие GLUT1, белка полосы 3 и аквапорина-1 через интегральный мембранный белок стоматин. Кроме того, ферропортин-1 (SLC40A1), транспортер мочевины-1 (SLC14A1), транспортер нуклеозидов (SLC29A1), кальциевый насос (Ca-ATPase-4), CD47, и флотиллин были идентифицированы как стоматин - взаимодействующие белки. Эти результаты согласуются с предположением о том, что стоматин является мембраносвязанным опорным белком, который способен модулировать различные ионные каналы и транспортеры на мембранах эритроцитов [49].

1.3 Физико-химические свойства эритроцитов больных с хронической болезнью почек

Изучению физико-химических свойств эритроцитов у пациентов с хронической болезнью почек посвящено множество работ. Интересы ученых весьма разнообразны, они охватывают структурные нарушения в эритроцитах, изменение текучести мембран эритроцитов, ответ эритроцитов на окислительный стресс в условиях уремии. На сегодняшний день актуальным направлением являются оценка функциональных изменений мембранных белков эритроцитов и изучение выживаемости эритроцитов у пациентов с ХБП.

В условиях уремии на поверхность эритроцитов выставляется фосфатидилсерин, который обладает прокоагулянтными свойствами, это неминуемо приводит к увеличению риска тромбозов. Vonomini M. et al, 2005 подтвердили прокоагулянтную активность эритроцитов у гемодиализных пациентов. Инкубация эритроцитов таких больных с аннексином V, белком имеющим высокое сродство к фосфатидилсерину, привела к торможению образования тромбина по сравнению с интактными эритроцитами. Авторы выдвинули предположение, что презентация фосфатидилсерина на поверхности эритроцитов может приводить к повышению в плазме крови маркеров для генерации тромбина и фибринолиза. Так была обнаружена взаимосвязь между фосфатидилсерином эритроцитов пациентов с ХБП и фрагментам протромбина F1.2, комплексами тромбин-антитромбин и плазмин-антиплазмин и D-димером [50]. Sirolli V. et al, 2004 в своих работах высказали предположение, что перераспределение фосфолипидов в мембранах эритроцитов и выставление фосфатидилсерина на поверхность клетки у больных ХБП происходит при наличии в их крови циркулирующих уремических факторов. Это, в свою очередь, приводит к снижению выживаемости эритроцитов и возникновению аномальных взаимодействий эритроцитов и эндотелия. Также авторы указывают на возможность удаления уремических токсинов из крови пациентов с хронической болезнью почек при помощи гемофореза [51]. Sakthivel R. et al, 2007 помимо экспозиции фосфатидилсерина на эритроцитах пациентов с ХПН изучали поверхностный заряд эритроцитов и их морфологию. Полученные результаты были сопоставимы с работами других исследователей. Авторы указали на увеличение экспозиции фосфатидилсерина на эритроцитах больных с ХПН в условиях уремии. Поверхностный заряд эритроцитов пациентов с ХПН был ниже, чем в контрольной группе здоровых людей. Также было показано, что усугубление степени уремии приводит к увеличению количества эхиноцитов в циркулирующей крови [52].

Осмотическая резистентность эритроцитов была изучена Mihaljevic D. et al, 2004. В данном случае осмотическую резистентность эритроцитов определяли по трем параметрам: начальная точка гемолиза, конечная точка гемолиза и средняя осмотическая резистентность. Так, у пациентов, получающих гемодиализ, были зарегистрированы более высокие уровни начального и конечного гемолиза эритроцитов в гипоосмотической среде, чем у здоровых людей. Это свидетельствует о снижении осмотической

резистентности эритроцитов у больных с терминальной стадией хронической болезни почек. Также в работе было показано, что применение человеческого рекомбинантного эритропоэтина у больных с ХБП не влияет на показатели осмотической резистентности и даже при применении эритропоэтина эритроциты проявляют низкую осмотическую стойкость. Также авторы провели корреляционный анализ и выявили наличие взаимосвязи между показателями осмотической резистентности эритроцитов и концентрацией кальция и ионов водорода в плазме крови пациентов с уремией [53]. Dolegowska B. et al, 2007 сообщают, что осмотическая резистентность эритроцитов пациентов с ХПН, получающих гемодиализ также зависит от наличия или отсутствия глюкозы в диализате. Так, в крови пациентов, которые получали гемодиализ с диализатом, обогащенным глюкозой, присутствовало более низкое количество маркеров гипоосмотического гемолиза, но более высокое содержание простагландина F_{2α}. Таким образом, в работе высказано предположение, что присутствие глюкозы в диализате с одной стороны защищает эритроциты от внутрисосудистого гемолиза, а с другой стороны увеличивает окислительные процессы в крови [54].

Brimble K.S. et al, 2006 сообщают, что у пациентов с заболеванием почек наблюдается повышенная вязкость крови при различных скоростях сдвига от 11 до 225 с⁻¹. По мнению авторов, это может быть связано с изменением формы эритроцитов и снижением их деформируемости [55]. Проведя проточную цитометрию и рассчитав коэффициент диссимметрии Пирсона и сферический индекс Piagnerelli M. et al, 2007 определили, что у пациентов с терминальной почечной недостаточностью (ТПН) эритроциты преимущественно имеют сферическую форму. Так, коэффициент диссимметрии Пирсона, рассчитанный для гистограммы эритроцитов у больных с ТПН составил -0,56 (0,14), $p < 0,05$, а у здоровых людей -0,89 (0,12). Сферический индекс у пациентов с ТПН составил 2,30 (0,20), $p < 0,05$, в группе контроля 2,72 (0,47) [56]. По мнению Brzeszczynska J. et al, 2008 изменения реологических свойств эритроцитов у пациентов с ХПН индуцированы окислительным стрессом. Так были изучены текучесть мембран эритроцитов, их осмотическая устойчивость и белок-белковые взаимодействия в цитоскелете эритроцитов диализных больных с ХПН. В результатах авторы привели значительное увеличение текучести мембран эритроцитов у больных с ХПН на 60 мин гемодиализа ($p < 0,05$), существенное снижение количества белок-белковых взаимодействий ($p < 0,005$) и повышение осмотическое хрупкости эритроцитов ($p < 0,0005$) диализных пациентов с ХПН. При этом добавление H₂O₂ к эритроцитам усугубили эти изменения. Авторы делают вывод, что эритроциты у пациентов с ХПН менее стабильны и подвержены дезинтеграции. Характеристики свойств эритроцитарных мембран у больных с хронической почечной недостаточностью свидетельствуют о том, что в их крови преобладают молодые, лабильные эритроциты, которые более восприимчивы к окислительному стрессу [57]. Tsuda K, 2013 изучал связь между функцией почек и текучестью мембран эритроцитов с использованием электронного парамагнитного резонанса методом меченных спинов. Параметр порядка

метода меченных спинов при исследовании эритроцитов больных с ХБП обратно коррелирует с расчетной скоростью клубочковой фильтрации. Исходя из этого, автор выдвигает предположение, что пониженное значение СКФ может быть связано со снижением текучести мембран эритроцитов. Многофакторный регрессионный анализ показал, что СКФ может быть значимым предиктором изменения текучести мембран эритроцитов. В работе также сообщается, что пониженные уровни текучести мембран эритроцитов и СКФ были связаны с повышенной концентрацией в плазме индекса окислительного стресса 8-изо-простагландина F_2 и сниженной концентрацией оксида азота в плазме. Таким образом, окислительный стресс может являться фактором, определяющим изменение микровязкости мембран эритроцитов у пациентов с ХБП [58].

Заряд эритроцитов и вязкость крови пациентов с хронической почечной недостаточностью изучали Самойлов М.В. и соавт., 1993. Изучаемые показатели определяли у пациентов с ХПН и гнойной интоксикацией после гемодиализа и после гемосорбции и сравнивали с такими же показателями здоровых людей. Так, у больных с ХПН после гемодиализа поверхностный заряд эритроцитов повышался, а после гемосорбции – понижался. Снижение вязкости крови наблюдалось в обоих случаях. Авторы отмечают, что существует корреляция между изменением заряда эритроцитов и вязкостью крови и концентрацией мочевины и креатинина в плазме. Таким образом, выдвинуто предложение, что реологические свойства крови и электростатические свойства эритроцитов зависят от степени азотемии [59]. По современным представлениям эритроциты, как и эндотелиальные клетки, имеют отрицательный заряд. Потеря отрицательного заряда эритроцитами приводит к повышенной чувствительности эритроцитов к натрию, что может быть оценено при помощи солевого теста крови. Kliche K. et al, 2015 проводили подобный тест на образцах крови пациентов с терминальной стадией хронической почечной недостаточности до и после гемодиализа. Так до проведения процедуры гемодиализа у 20 пациентов из 38 эритроциты были квалифицированы как солечувствительные. После четырехчасового гемодиализа только у 11 пациентов эритроциты были чувствительны к натрию. Таким образом, гемодиализ приводит к восстановлению заряда эритроцитов пациентов с ХПН [60].

Маркеры окислительного стресса в плазме и эритроцитах пациентов с хронической болезнью почек 1-5 стадий изучались Yilmaz M.I. et al, 2006. По их данным у пациентов с ХБП по сравнению со здоровыми людьми повышена концентрация МДА в плазме крови и понижены активности супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО) в эритроцитах [61]. Подобную картину снижения активности ферментов антиоксидантной защиты в эритроцитах у диализных больных с терминальной стадией хронической почечной недостаточности, получили в своих исследованиях Вавилова Т.П. и соавт, 2006. У пациентов с терминальной стадией ХПН активность СОД в эритроцитах до проведения сеанса гемодиализа составила 532 ± 178 Е/г Нв (в контрольной группе здоровых людей этот показатель был

равен 1352 ± 249 Е/г Нв), активность ГПО – $15,4 \pm 10,8$ Е/г Нв (контроль $56 \pm 26,6$ Е/г Нв), активность глутатионредуктазы (ГР) – $6,60 \pm 3,40$ Е/г Нв (контроль $8,95 \pm 4,25$ Е/г Нв). Статистически значимыми были снижения активности СОД и ГПО в эритроцитах пациентов с терминальной ХПН по сравнению со здоровыми людьми. После проведения сеанса гемодиализа у больных с ХПН активности изучаемых ферментов практически изменялись. Более того, повторное исследование активности ферментов антиоксидантной защиты эритроцитов через 6 месяцев у тех же пациентов показало дальнейшее снижение активности СОД и ГР [62]. Сходные данные по повышению концентрации МДА в плазме крови и снижению концентрации СОД в эритроцитах диализных больных с ХПН получили Коса Т. et al, 2010. В данной работе авторы также указывают на то, что с увеличением продолжительности гемодиализа увеличиваются и уровни МДА в плазме крови пациентов с ХПН [63]. В литературе также можно встретить предложения определять показатели обмена глутатиона в эритроцитах в качестве маркеров прогрессии ХБП. Так Dessì M. et al, 2012 в своей работе указывают, что активность эритроцитарной глутатион-S-трансферазы повышается в процессе прогрессирования ХБП от 1 до 4 стадии с максимумом у пациентов с ХБП 5 стадии, получающих гемодиализ. Также было показано наличие статистически значимой корреляции между активностью глутатион-S-трансферазы в эритроцитах и концентрацией гомоцистеина в плазме крови ($r^2 = 0,64$, $p < 0,0001$) у диализных пациентов с ХБП. По мнению авторов, результаты этого исследования свидетельствуют о наличии потенциала для автоматизированного анализа эритроцитарной глутатион-S-трансферазы в качестве ценного инструмента для дальнейшего изучения уремии токсичности при ХБП [64].

Lucchi L. et al, 2005 указывают на то, что эритроциты пациентов с терминальной стадией ХПН по сравнению с эритроцитами здоровых людей проявляли повышенную чувствительность к окислительному стрессу, индуцированному *in vitro* терт-бутилгидропероксидом. Индуцированный окислительный стресс также приводил к увеличению уровня МДА в эритроцитах. При этом гемодиализ не влиял на данные показатели, и эритроциты пациентов, получающих гемодиализ, оставались восприимчивы к окислительному стрессу. Трансплантация почки и продолжительный амбулаторный перитонеальный диализ приводили к нормализации данных отклонений в эритроцитах [65]. Da Silva A.C. et al, 2007 определяли уровни МДА в сыворотке и эритроцитах пациентов с ХПН. Концентрации МДА определяли в тех группах сравнения: здоровые люди, диализные пациенты с ХПН и преддиализные больные ХПН. Концентрация МДА в сыворотке была выше контрольного значения как в группе диализных, так и в группе преддиализных пациентов с ХПН. А концентрация МДА в эритроцитах была повышена только в группе больных с ХПН, получающих гемодиализ [66]. Для изучения карбонилового стресса в эритроцитах пациентов с терминальной стадией хронической почечной недостаточности Karg E. et al, 2009 определяли концентрацию метилглиоксала. Метилглиоксаль – продукт углеводного обмена, который образуется при карбониловом стрессе. Следует отметить, что

обследованные пациенты не страдали сахарным диабетом, а концентрация метилглиоксаля и активность глиоксалазы определялись в нормогликемических и гипергликемических условиях, созданных *in vitro*. В итоге в эритроцитах диализных пациентов даже в нормогликемических условиях были повышены концентрация метилглиоксаля и активность глиоксалазы II. По мнению авторов это свидетельствует, что больные с ХПН, получающие гемодиализ испытывают карбониловый стресс [67]. На увеличение скорости карбонилирования белков в эритроцитах пациентов с терминальной стадией хронической почечной недостаточности также указывают Włodek P. et al, 2010 [68]. Goi G. et al, 2009 определяли гидроперекиси, антиоксидантный ответ и текучесть мембран эритроцитов у пациентов с ХПН. Данные показатели были изучены у здоровых людей, у пациентов с ХПН на консервативной терапии, на гемодиализе и на перитонеальном диализе. Так во всех группах больных с ХПН независимо от типа лечения в эритроцитах наблюдалось увеличение содержания гидроперекисей, снижение антиоксидантного ответа и повышение текучести мембраны [69]. По мнению Stepniewska J., Ciechanowski K., 2005 у больных хронической почечной недостаточностью окислительный стресс помимо участия в снижении устойчивости эритроцитов к гемолизу и усугублению анемии, еще и осложняет лечение таких больных, снижая эффективность классических терапевтических процедур [70].

Selvaraj N. et al, 2005 изучали концентрацию гликированного гемоглобина у пациентов с хронической почечной недостаточностью не страдающих сахарным диабетом. Так, у пациентов с ХПН процент гликированного гемоглобина был выше, чем у здоровых людей. Также авторы работы предполагают, что перекисное окисление липидов играет роль в процессе ускоренного гликозилирования гемоглобина у больных с ХПН. Этот вывод был сделан на основании того, что концентрация малонового диальдегида (МДА) в плазме крови больных с ХПН была выше, чем в контрольной группе, а инкубация эритроцитов здоровых людей в среде с глюкозой и МДА привела к тому, что гликозилирование гемоглобина ускорилось [71].

Активность белка полосы 3 на эритроцитах пациентов с хронической болезнью почек изучали Saradhadevi V. et al, 2005. Активность белка полосы 3 в эритроцитах изучали хроматографическим методом по интенсивности потока оксалатов в эритроцит. Так оксалат-связывающая активность мембран эритроцитов пациентов с ХПН (5,3 пмоль/мг белка) была значительно ниже, чем у здоровых людей (36 пмоль/мг белка). Также, при помощи эозина-5-малеимида – флуоресцентного красителя, который специфически связывается с белком полосы 3, было установлено, что на мембранах эритроцитов больных с ХПН выставлено лишь 32% белков полосы 3 по сравнению с содержанием белка полосы 3 на контрольных эритроцитах здоровых людей. Авторы также указывают на то, что в эритроцитах пациентов с ХПН увеличено содержание холестерина и снижены активности в эритроцитах Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+} АТФаз. [72]. Активность Ca^{2+} АТФазы в плазматической мембране эритроцитов у детей с ХБП 1-3 стадий изучали Polak-Jonkisz D. et al, 2007. Активность Ca^{2+} АТФазы в плазматической мембране в эритроцитах детей с ХБП была ниже, чем у

здоровых детей [73]. На выборке взрослых лиц снижение активности Ca^{2+} АТФазы в эритроцитах пациентов на начальных стадиях ХБП изучали Kaderjakova Z. et al, 2012. По мнению авторов, подобные изменения активности мембранных ионных переносчиков приводит к увеличению внутриклеточной концентрации кальция [74]. Показано, что в мембранах эритроцитов пациентов с ХБП происходят масштабные изменения белкового состава. Так в работах Costa E. et al, 2008 показано, что у пациентов с ХБП 5 стадии, которые получают гемодиализ снижается количество спектрина в эритроцитах. Это привело к изменению соотношений белок 4.1/спектрин, спектрин/белок полосы 3, спектрин/анкирин, анкирин/ белок полосы 3, белок 4.1/белок полосы 3 и белок 4.2/белок полосы 3. Также отмечено, что у диализных пациентов, которые не получали рекомбинантный человеческий эритропоэтин наблюдается микроцитоз и анизоцитоз эритроцитов. По мнению авторов, полученные данные свидетельствуют о том, что процедура гемодиализа, способствуют снижению количества спектрина в эритроцитах, что приводит к снижению их деформируемости [75, 76]. Antonelou M.H. et al, 2011 было проведено исследование с целью оценки состояния окислительного стресса в эритроцитах, а также его связи с изменением клеточной ультраструктуры и модификацией белков эритроцитарной мембраны у больных с терминальной стадией почечной недостаточности на гемодиализе. Согласно результатам данного исследования в эритроцитах пациентов с ТПН образуется большее по сравнению со здоровыми людьми количество активных форм кислорода (АФК). Диализ частично снижает количество АФК, но при этом вызывает клеточную чувствительность к действию экзогенных окислительных раздражителей. Общие мембранные модификации у пациентов с ТПН включают потери, агрегации, фрагментации и карбонилирование основных компонентов, а также избыточную экспрессию маркеров стресса. Гемодиализ вносит значительный вклад в ремоделирование белков мембраны, особенно это актуально для аквапорина-1, пероксиредоксина-2 и убиквитинированных белков. Внутриклеточный окислительно-восстановительный потенциал также тесно связан с такими мембранными модификациями, как нестабильность мембраны, потеря площади поверхности мембраны путем её везикуляции, развитие эхиноцитоза и стоматоцитоза [77]. Эта же группа ученых, Antonelou M.H. et al в 2014 году представила результаты трехлетнего пилотного исследования пациентов с терминальной стадией хронической почечной недостаточности. Так авторы указывают на то, что длительность гемодиализа связана с тенденцией к увеличению внутриклеточной концентрации гемоглобина, усилению экспрессии на мембранах эритроцитов GLUT-1 и стоматина и уменьшению количества стоматоцитов, циркулирующих в крови. Это свидетельствует о том, что эритроциты пациентов с ТПН демонстрируют впечатляющие компенсаторные возможности в ответ на хроническую уремию [78]. С развитием протеомики удалось выделить конкретные белки эритроцитарных мембран, чья экспрессия изменена при ХБП. Так Alvarez-Llamas G. et al, 2012 анализировали белки мембраны эритроцитов при помощи 2D электрофореза в флуоресцентном разделяющем геле. Белки, количество

которых было изменено у пациентов с ХБП, идентифицировали с помощью масс-спектрометрии, проверку результатов проводили с помощью Вестерн-блоттинга и конфокальной микроскопии. В процессе проведения электрофореза у преддиализных больных с ХБП и диализных пациентов, получающих эритропоэтин, было выделено 9 фракций белков, отличных по количеству от контрольных белков у здоровых людей. При помощи масс-спектрометрии удалось идентифицировать 5 белков: бета-аддуцин, HSP71/72, тропомодулин-1, эзрин и радиксин. При сравнении пациентов с ХБП было показано, что бета-аддуцин был повышен в обеих группах больных. У пациентов, получающих лечение гемодиализом и эритроэтином была повышена экспрессия эзрина и радиксина, а в группе преддиализных пациентов повышена экспрессия тропомодулина-1. По мнению авторов, найденные изменения в соотношении белков в эритроцитарных мембранах пациентов с ХБП могут играть роль в патогенезе изменений свойств эритроцитов условиях уремии [79]. Ruskovska T. et al, 2015 также при помощи Вестерн-блоттинга определили, что в эритроцитах пациентов с ТПН наиболее окислен анкирин. Таким образом, концентрация функциональных анкириновых белков в эритроцитах пациентов с ТПН по сравнению со здоровыми людьми снижена на 60% [80].

По мнению Tennankore K.K. et al, 2011 макроцитоз может быть связан со смертностью диализных больных с ХБП. Было проведено одноцентровое проспективное когортное исследование 150 стабильных, взрослых пациентов, получающих хронический гемодиализ. Срок исследования составил девять месяцев. Среднее значение MCV в группе исследования составило $99,1 \pm 6,4$ фл, (диапазон 66-120 фл). У 92 (61%) пациентов MCV составил > 97 фл и у 45 (30%) - > 102 фл. По имеющимся данным пациенты не имели дефицит витамина B12 или фолиевой кислоты. Проведен регрессионный анализ и анализ выживаемости. По результатам анализа нескорректированный объем эритроцитов более 102 фл был связан со смертностью (отношение рисков 3,24, 95% доверительный интервал 1.42-7.39, $p = 0,005$). Таким образом, макроцитоз может быть связан со смертностью больных, находящихся на хроническом гемодиализе [81].

Ly J. et al, 2004 изучали выживаемость эритроцитов у пациентов с терминальной стадией болезни почек. Так, у пациентов, получавших классический гемодиализ по схеме 3 раза в неделю время жизни эритроцитов в среднем составило $14,5 \pm 1,6$ дней, у пациентов, проходивших ночной гемодиализ - $17,1 \pm 4,7$ дней, а у пациентов, получавших короткий ежедневный гемодиализ - $15,9 \pm 2,2$ дней. У здоровых людей время жизни эритроцитов составило 23,5 дня. Таким образом, авторы отмечают, что, не смотря на более стабильные показатели концентрации мочевины у пациентов, находившихся на ночном или ежедневном гемодиализе, время жизни эритроцитов у таких больных существенно не отличается от пациентов, получавших гемодиализ 3 раза в неделю. В заключении авторы подтверждают тот факт, что, несмотря на технологический прогресс, снижение продолжительность жизни эритроцитов у пациентов с ХПН продолжает вносить свой вклад в развитие нефрогенной

анемии [82]. О снижении выживаемости эритроцитов на 20-30% у диализных пациентов с ХБП также указывают Korell J. et al, 2011 [83].

Последнее десятилетие в научной литературе активно обсуждается суицидальная смерть эритроцитов или эритроптоз. Abed M. et al, 2014 в своей работе изучали триггеры эритроптоза у пациентов с хронической почечной недостаточностью до процедуры гемодиализа и после нее. Так у пациентов с ХПН до диализа процент фосфатидилсерина на эритроцитах ($0,84 \pm 0,09\%$), был значительно выше, чем у здоровых людей ($0,43 \pm 0,04\%$), при этом после диализа происходило дальнейшее увеличение данного показателя ($1,35 \pm 0,13\%$). Увеличение экспозиции фосфатидилсерина на эритроцитах также сопровождалось увеличением внутриклеточного Ca^{2+} , активных форм кислорода и количества церамидов [84]. Ранее эта же группа исследователей во главе с Ahmed M.S., 2013 также указали на возможность уремических токсинов запускать эритроптоз путем увеличения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и мембранной концентрации фосфатидилсерина и церамидов [85]. Polak-Jonkisz D. et al, 2013 изучали активность каспазы-3 в эритроцитах детей с ХБП 1-4 стадий. По результатам исследования активность каспазы-3 в эритроцитах детей с ХБП растет по мере прогрессирования заболевания [86].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Характеристика обследуемых групп

В исследовании приняли участие 195 человек: 33 практически здоровых человека, которые составили группу контроля, и 162 пациента с хронической болезнью почек. Все участники исследования достигли 18 лет, получили полную, достоверную и объективную информацию о ходе исследования и добровольно и самостоятельно согласились участвовать в нем.

Критериями включения пациентов в нозологические группы было наличие хронического пиелонефрита (ХП) или хронического гломерулонефрита (ХГ) в стадии обострения. Критериями исключения являлись конкурирующие острые заболевания или обострения хронических заболеваний в их высокоактивной фазе, ишемическая болезнь сердца с выраженной стенокардией, недавно перенесенный инфаркт миокарда или инсульт, аутоиммунные заболевания в фазе активного воспаления.

Диагностика пациентов с хронической болезнью почек проводилась согласно клиническому протоколу «Хроническая почечная недостаточность», утвержденному Экспертной комиссией по вопросам развития здравоохранения Министерства здравоохранения Республики Казахстан, протокол № 14 от 12 июля 2013 года. Подтверждение диагноза «хронический пиелонефрит» проводилась на основании критериев, предложенных Тиктинским О.Л. [87], Сейсембековым Т.З. [88] и Борисовым И.А. [89]. Хронический гломерулонефрит диагностировался на основании комплексного клинического исследования, предложенного в клиническом протоколе «Хронический гломерулонефрит», который был утвержден на заседании Экспертной комиссии по вопросам развития здравоохранения Министерства здравоохранения Республики Казахстан протокол № 6 от 5 мая 2014 года.

Дальнейшее разделение пациентов по стадиям ХБП проводилось исходя из скорости клубочковой фильтрации, рассчитанной для каждого пациента. В клиническом протоколе № 14 от 12 июля 2013 года для расчета СКФ была предложена формула Кокрофта-Голта, которая и применялась при клиническом обследовании пациентов. Формула Кокрофта-Голта [90] проста в применении, однако необходимость стандартизации полученного значения на поверхность тела пациента значительно осложняет расчеты. Другой формулой расчета значения СКФ является формула MDRD [91]. В отличие от формулы Кокрофта-Голта она не требует дополнительной стандартизации полученного значения на поверхность тела пациента, и, соответственно, в данном случае не нужно определять антропометрические показатели пациента. Для расчета СКФ по полной формуле MDRD наряду с креатинином необходимо знать результаты определения альбумина и мочевины в сыворотке крови. Для использования сокращенной формулы MDRD необходимы данные по возрасту, полу, расе и уровню креатинина сыворотки. Результаты, получаемые при использовании обеих формул, сопоставимы. Однако формула MDRD имеет ряд существенных недостатков [92]. На 3-5 стадиях хронической болезни почек она точнее

отражает функцию, чем формула Кокрофта-Голта, однако при истинной СКФ выше 60 мл/мин/1,73 м² она дает заниженные результаты [7, с. 95]. Также формула MDRD, полученная при обследовании североамериканской популяции, некорректно отражает уровень СКФ у представителей монголоидной расы [93].

В 2009 – 2011 годах был разработан наиболее универсальный и точный метод расчета СКФ, работающий на любой стадии ХБП и у представителей всех трех рас – уравнения СКД-EPI [94]. Разработчикам уравнений СКД-EPI удалось преодолеть обе причины искажений: влияние различий в мышечной массе лиц разного возраста и пола и ошибку, связанную с активацией канальцевой секреции креатинина на поздних стадиях ХБП [7, 96]. Уравнения СКД-EPI представлены в таблице 3 [7, с. 95,].

Таблица 3 – Уравнения СКД-EPI, 2009 года, модификация 2011 года [7, с. 95]

Раса	Пол	SCr*, мг/100 мл**	Формула
Негроидная	Жен.	≤0,7	$167 \times (0,993)^{\text{Возраст}} \times (\text{SCr}/0,7)^{-0,328}$
Негроидная	Жен.	>0,7	$167 \times (0,993)^{\text{Возраст}} \times (\text{SCr}/0,7)^{-1,210}$
Негроидная	Муж.	≤0,9	$164 \times (0,993)^{\text{Возраст}} \times (\text{SCr}/0,9)^{-0,412}$
Негроидная	Муж.	>0,9	$164 \times (0,993)^{\text{Возраст}} \times (\text{SCr}/0,9)^{-1,210}$
Монголоидная	Жен.	≤0,7	$151 \times (0,993)^{\text{Возраст}} \times (\text{SCr}/0,7)^{-0,328}$
Монголоидная	Жен.	>0,7	$151 \times (0,993)^{\text{Возраст}} \times (\text{SCr}/0,7)^{-1,210}$
Монголоидная	Муж.	≤0,9	$149 \times (0,993)^{\text{Возраст}} \times (\text{SCr}/0,9)^{-0,412}$
Монголоидная	Муж.	>0,9	$149 \times (0,993)^{\text{Возраст}} \times (\text{SCr}/0,9)^{-1,210}$
Европеоидная	Жен.	≤0,7	$144 \times (0,993)^{\text{Возраст}} \times (\text{SCr}/0,7)^{-0,328}$
Европеоидная	Жен.	>0,7	$144 \times (0,993)^{\text{Возраст}} \times (\text{SCr}/0,7)^{-1,210}$
Европеоидная	Муж.	≤0,9	$141 \times (0,993)^{\text{Возраст}} \times (\text{SCr}/0,9)^{-0,412}$
Европеоидная	Муж.	>0,9	$141 \times (0,993)^{\text{Возраст}} \times (\text{SCr}/0,9)^{-1,210}$
* SCr – концентрация креатинина в сыворотке крови			
** SCr, мг/100 мл = (SCr, мкмоль/л)×0,0113			

Таким образом, формулой для расчета СКФ в нашем исследовании были выбраны уравнения СКД-EPI, 2011. Расчет СКФ у пациентов с ХБП по формуле СКД-EPI также рекомендован в клиническом протоколе «Хроническая болезнь почек (у взрослых)», утвержденном Объединенной комиссией по качеству медицинских услуг Министерства здравоохранения и социального развития Республики Казахстан, протокол № 3 от 13 мая 2016 года. Однако при определении СКФ у обследуемых нами пациентов возникла проблема в том, что всё разработанные калькуляторы, имеющиеся в свободном доступе, позволяли выбрать только две пограничные расы, либо негроидную, либо европеоидную. В нашем же исследовании преимущественно участвовали представители монголоидной и европеоидной рас. Нормограммы, представленные в Национальных рекомендациях Научного общества нефрологов России [7, с. 109 - 112], позволяют определять СКФ по уравнению

СКД-ЕРІ у пациентов монголоидной и европеоидной рас. Однако ограничением использования подобных нормограмм стала невозможность подстановки точных значений уровня креатинина в сыворотке крови и возраста пациентов. При работе с нормограммами данные показатели округляются до десятков. Максимальными концентрациями креатинина сыворотки крови, представленными в нормограммах были 430 мкмоль/л у женщин и 500 мкмоль/л у мужчин, что также не укладывалось в диапазон значений, полученных у обследованных пациентов. Поэтому на базе программы Microsoft Excel мы создали собственный прототип калькулятора для расчета СКФ по уравнениям СКД-ЕРІ, 2011 у представителей монголоидной и европеоидной рас. Таблица 4 является макетом листа в программе Microsoft Excel.

Таблица 4 - Калькулятор для расчета СКФ по уравнениям СКД-ЕРІ, 2011 у представителей монголоидной и европеоидной рас

	A	B	C	D	E	F	G
1	ID	ФИО	Раса	Пол	Возраст	Креатинин, мкмоль/л	SCr, мг/100 мл
2	-	-	«мо» или «ев»	«м» или «ж»	Кол-во полных лет	-	Формула 1

Продолжение таблицы 4

Н	I	J	K	L	M	N	O	P
Мон. жен, SCr ≤0,7	Мон. жен, SCr >0,7	Мон. муж, SCr ≤0,9	Мон. муж, SCr >0,9	Европ. жен, SCr ≤0,7	Европ. жен, SCr >0,7	Европ. муж, SCr ≤0,9	Европ. муж, SCr >0,9	СКФ, мл/мин /1,73 м ²
Формула 2	Формула 3	Формула 4	Формула 5	Формула 6	Формула 7	Формула 8	Формула 9	Формула 10

Формула 1: =F2*0,0113

Формула 2: =151*(СТЕПЕНЬ(0,993;E2))*(СТЕПЕНЬ(G2/0,7;-0,328))

Формула 3: =151*(СТЕПЕНЬ(0,993;E2))*(СТЕПЕНЬ(G2/0,7;-1,21))

Формула 4: =149*(СТЕПЕНЬ(0,993;E2))*(СТЕПЕНЬ(G2/0,9;-0,412))

Формула 5: =149*(СТЕПЕНЬ(0,993;E2))*(СТЕПЕНЬ(G2/0,9;-1,21))

Формула 6: =144*(СТЕПЕНЬ(0,993;E2))*(СТЕПЕНЬ(G2/0,7;-0,328))

Формула 7: =144*(СТЕПЕНЬ(0,993;E2))*(СТЕПЕНЬ(G2/0,7;-1,21))

Формула 8: =141*(СТЕПЕНЬ(0,993;E2))*(СТЕПЕНЬ(G2/0,9;-0,412))

Формула 9: =141*(СТЕПЕНЬ(0,993;E2))*(СТЕПЕНЬ(G2/0,9;-1,21))

Формула 10:

=ЕСЛИ(C2="мо";(ЕСЛИ(D2="ж";(ЕСЛИ(G2<=0,7;H2;I2));(ЕСЛИ(G2<=0,9;J2;K2))));(ЕСЛИ(D2="ж";(ЕСЛИ(G2<=0,7;L2;M2));(ЕСЛИ(G2<=0,9;N2;O2))))))

В ячейку A2 вносится идентификационный номер пациента, в ячейку B2 – ФИО пациента. В ячейке C2 указывается раса пациента, так, для работы представленных формул, монголоидная раса кодируется кодом «мо», европеоидная раса – кодом «ев». В ячейку D2 записывается пол пациента, возможные варианты для работы формул – «м» и «ж». В ячейку E2 вносится возраст больного в годах, в F2 – концентрация креатинина в сыворотке крови в мкмоль/л. Ячейки G2 – P2 заполняются представленными выше формулами. Результат выбирается логическим алгоритмом, где сначала идет выбор расы, далее пола, далее идет оценка концентрации креатинина в мг/100 мл. Таким образом, в ячейке P2 отображается скорость клубочковой фильтрации, рассчитанная для каждого конкретного человека. Например, если пациентом является женщина монголоидной расы с уровнем креатинина SCr = 0,85 мг/100 мл, то СКФ этой больной рассчитывается в ячейке I2 и переносится в ячейку с результатом – P2.

Таким образом, по итогам клинического исследования и расчета СКФ было выделено 12 групп. Первую группу составили условно здоровые люди, которые на момент исследования не имели острых заболеваний и не указывали на наличие хронических патологий. Вторую группу сформировали пациенты с хроническим пиелонефритом, ХБП 1 стадии, третью группу составили больные хроническим пиелонефритом, ХБП 2 стадии, четвертую – больные хроническим пиелонефритом, ХБП 3 стадии, пятую – больные хроническим пиелонефритом, ХБП 4 стадии. Шестая группа была сформирована пациентами с пиелонефритом, ХБП 5 стадии, которые еще не получали заместительную почечную терапию гемодиализом. Седьмую группу составили пациенты с хроническим пиелонефритом, ХБП 5 стадии, которые получают системный гемодиализ. Пациенты с хроническим гломерулонефритом, ХБП 1 стадии составили восьмую группу, пациенты с хроническим гломерулонефритом, ХБП 2 стадии – девятую группу, пациенты с хроническим гломерулонефритом, ХБП 3 стадии – десятую группу, пациенты с хроническим гломерулонефритом, ХБП 4 стадии – одиннадцатую группу. Двенадцатая группа была сформирована больными хроническим гломерулонефритом, ХБП 5 стадии, проходящими гемодиализ.

Выделение шестой додиализной группы среди пациентов с хроническим пиелонефритом ХБП 5 стадии изначально запланировано не было. Но за 2 года набора материала в лечебных учреждениях, которые являлись клиническими базами исследования, на лечении находилось 8 таких пациентов, 2 из которых отказывались от лечения гемодиализом, а у 6 в условиях стационара формировалась артериовенозная фистула для проведения гемодиализа. Использование непараметрических статистических методов позволило нам включить эту группу в исследование.

Также на окончательном этапе формировании групп нами было принято решение исключить из исследования всех пациентов, у которых хроническая болезнь почек на фоне хронического пиелонефрита или хронического гломерулонефрита, сопровождалась любым другим видом нефропатии. Таким образом, из групп пациентов с хроническим пиелонефритом было исключен 21

пациент с сахарным диабетом и диабетической нефропатией и 2 пациента с множественной миеломой и миеломной нефропатией. Из числа пациентов с хроническим гломерулонефритом было исключено 2 человека с диабетической нефропатией на фоне сахарного диабета. Численный, гендерный и возрастной состав сформированных групп представлен в таблице 5.

Таблица 5 - Характеристика обследуемых групп

№	Группы			Численность (количество, муж., жен.)	Возраст (медиана, квартили)
	Нозология	Название	Сокращение		
1	Здоровые люди	Контроль	Контроль	33 (17; 16)	28 (21; 32)
2	Хронический пиелонефрит, ХБП 1 стадии	ХП, ХБП 1	ХП 1	20 (6; 14)	27 (25; 47)
3	Хронический пиелонефрит, ХБП 2 стадии	ХП, ХБП 2	ХП 2	23 (4; 19)	40 (28; 68)
4	Хронический пиелонефрит, ХБП 3 стадии	ХП, ХБП 3	ХП 3	13 (5; 8)	62 (47; 74)
5	Хронический пиелонефрит, ХБП 4 стадии	ХП, ХБП 4	ХП 4	9 (3; 6)	50 (40; 68)
6	Хронический пиелонефрит, ХБП 5 стадии (до диализа)	ХП, ХБП 5 (до диал)	ХП 5.1	8 (1; 7)	59 (51; 62)
7	Хронический пиелонефрит, ХБП 5 стадии (диализ)	ХП, ХБП 5 (диал)	ХП 5.2	35 (21; 14)	55 (41; 62)
8	Хронический гломерулонефрит, ХБП 1 стадии	ХГ, ХБП 1	ХГ 1	6 (6; 0)	26 (22; 28)
9	Хронический гломерулонефрит, ХБП 2 стадии	ХГ, ХБП 2	ХГ 2	6 (4; 2)	32 (30; 41)
10	Хронический гломерулонефрит, ХБП 3 стадии	ХГ, ХБП 3	ХГ 3	7 (7; 0)	34 (31; 37)
11	Хронический гломерулонефрит, ХБП 4 стадии	ХГ, ХБП 4	ХГ 4	8 (7; 1)	44 (36; 47)
12	Хронический гломерулонефрит, ХБП 5 стадии (диализ)	ХГ, ХБП 5 (диал)	ХГ 5	27 (19; 8)	39 (34; 47)

Скорость клубочковой фильтрации в группах исследования представлена в таблицах 6 - 7 и на рисунках 5 - 6.

Таблица 6 – Скорость клубочковой фильтрации у пациентов с хронической болезнью почек, развившейся на фоне хронического пиелонефрита

Группы	СКФ, мл/мин/1,73 м ²
Контроль	95,61 (78,93; 114,04)
ХП, ХБП 1	103,31 (95,23; 114,68)
ХП, ХБП 2	80,52 (74,08; 86,44)
ХП, ХБП 3	44,37 (39,37; 49,77)
ХП, ХБП 4	21,08 (19,20; 22,07)
ХП, ХБП 5 (до диализа)	10,12 (8,50; 11,62)
ХП, ХБП 5 (диализ)	7,13 (5,48; 9,76)

Таблица 7 – Скорость клубочковой фильтрации у пациентов с хронической болезнью почек, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита

Группы	СКФ, мл/мин/1,73 м ²
Контроль	95,61 (78,93; 114,04)
ХГ, ХБП 1	116,23 (99,82; 130,76)
ХГ, ХБП 2	68,42 (65,62; 81,39)
ХГ, ХБП 3	34,40 (32,60; 41,31)
ХГ, ХБП 4	16,57 (15,68; 18,37)
ХГ, ХБП 5 (диализ)	8,37 (6,25; 9,14)

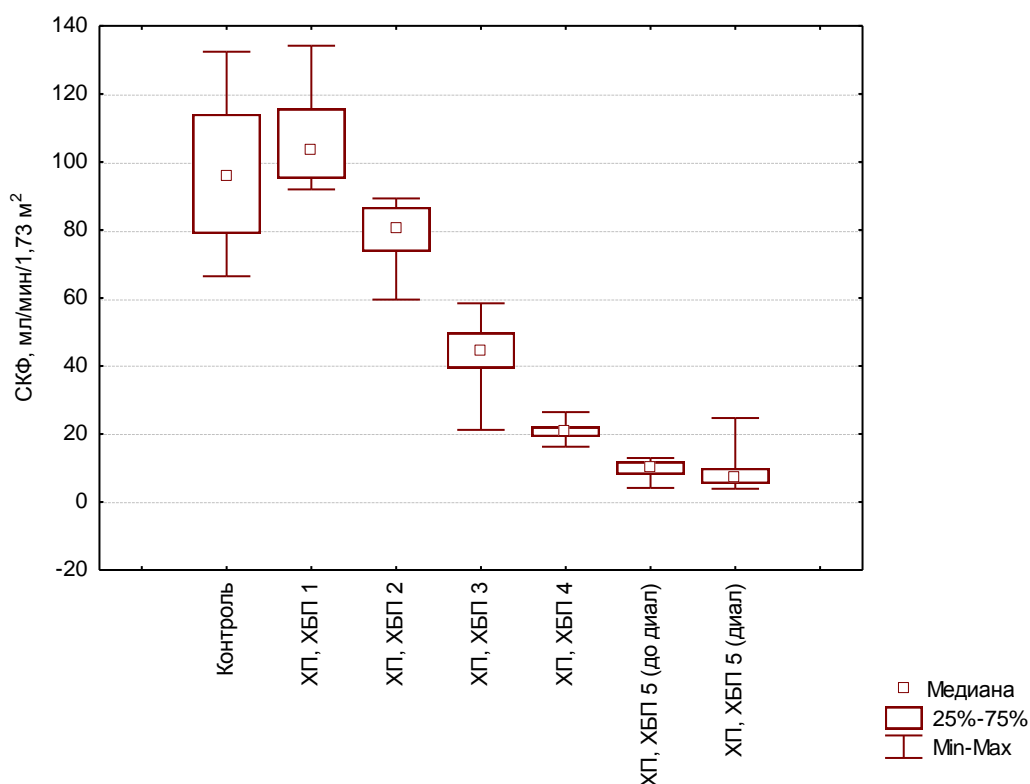


Рисунок 5 – Скорость клубочковой фильтрации у пациентов с хронической болезнью почек, развившейся на фоне хронического пиелонефрита

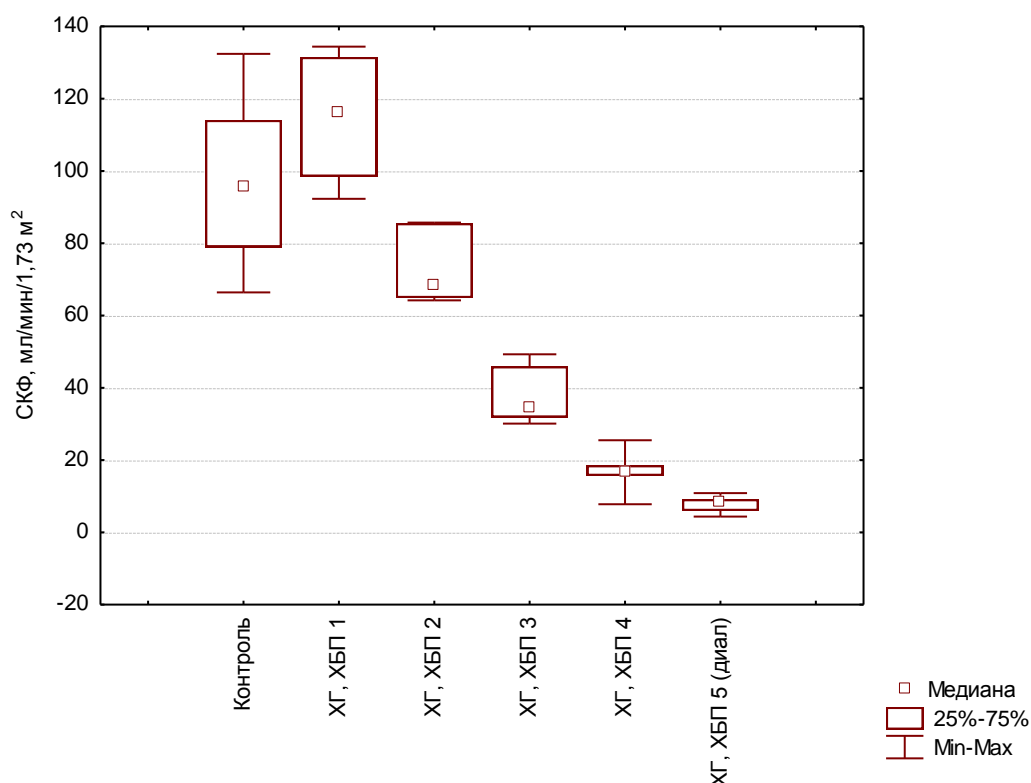


Рисунок 6 – Скорость клубочковой фильтрации у пациентов с хронической болезнью почек, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита

2.2 Материалы исследования

В качестве материала исследования использовалась венозная кровь. Забор крови проводился натошак из локтевой вены обследуемого в объеме 7 мл. Забор крови больных осуществляется в процедурных кабинетах городской больницы № 2 г. Караганды, ТОО МФ «Гиппократ», областной клинической больницы г. Караганды, консультативно-диагностического центра КГМУ с соблюдением всех правил асептики. Кровь стабилизировали гепарином. Для определения аммонийной устойчивости, осмотической резистентности и мембранно-связанного гемоглобина использовалась цельная кровь. Для определения сорбционной емкости, зарядового баланса, содержания молекул средней массы, фрагментов внеклеточных нуклеиновых кислот, малонового диальдеида и карбонильных производных белков использовали отмытые эритроциты. Для этого эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования крови при 3000 об/мин в течение 10 мин. Далее эритроцитарную массу дважды отмывали трехкратным объемом физиологического раствора.

2.3 Методы исследования

2.3.1 Определение осмотической резистентности эритроцитов

Осмотическую резистентность эритроцитов (ОРЭ) определяли методом Идельсона Л.И. [95] в модификации Резвана С.Г. [96].

Резистентность эритроцитов оценивали путем определения степени их гемолиза в различных гипотонических растворах хлорида натрия. В ряд пробирок наливали по 5 мл растворов с концентрациями хлорида натрия 0,9 %, 0,7 %, 0,5 %, 0,45 %, 0,3 %, в последнюю пробирку наливали дистиллированную воду. В каждую пробирку добавляли по 0,02 мл перемешанной гепаринизированной крови, полученную взвесь инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут, далее взвесь крови центрифугировали при 1500 об/мин в течение 7 минут. Спектрофотометрически при длине волны 500 нм определяли оптическую плотность надосадочной жидкости. Холостой пробой служила надосадочная жидкость в пробирке, содержащей физиологический раствор. За 100 % гемолиз принимали гемолиз в пробирке, содержащей дистиллированную воду. Процент гемолиза в каждой пробирке вычисляли по формуле (1) [96]:

$$H(\%) = \frac{E_x \cdot 100}{E_l} \quad (1)$$

где: $H(\%)$ – процент гемолиза в различных концентрациях NaCl;
 E_x – экстинкция исследуемой пробы;
 E_l – экстинкция надосадочной жидкости в пробирке с дистиллированной водой.

2.3.2 Определение динамики изменения объема эритроцитов в аммонийной среде (деформационных свойств эритроцитов)

Для изучения ответа эритроцитов на аммонийную нагрузку использован метод Миндукшева И.В. и соавторов [97].

Деформацию эритроцитов определяли путем инкубации цельной крови в изотонической аммонийной среде (140 мМ NH_4Cl , 5 мМ KCl , 5 мМ глюкозы, 1 мМ CaCl_2) [97, с. 30]. В этих условиях защелачивание внутриклеточного рН за счет проникновения NH_3 приводит к активации обменника, регулирующего вход ионов хлора в клетку, что неизбежно приводит к набуханию клеток. Начальной точкой был исходный объем эритроцитов, определенный до проведения аммонийной нагрузки. В аммонийной среде эритроциты инкубировались 15 минут с измерением объема эритроцитов на 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 и 15 минутах инкубации.

Получение «нулевой» точки: 100 мкл цельной крови вносили в 1 мл физиологического раствора, перемешивали и проводили гематологическое исследование на гемоанализаторе Mindray BC 3200. Записывали показатель MCV.

Получение деформационной кривой: 100 мкл цельной крови вносили в 1 мл аммонийной среды, засекали время, замер MCV проводили в каждую нечетную минуту инкубации. В каждом случае перед аспирацией образцы тщательно перемешивались во избежание оседания эритроцитов. По 9

полученным точкам строилась кривая изменения объема эритроцитов в аммонийной среде.

Путем вычисления разности между максимальным объемом эритроцитов, полученным в процессе аммонийной нагрузки и начальным объемом эритроцитов, записанным до инкубации, получали показатель изменения объема эритроцитов Δ MCV. Скорость прироста объема эритроцитов U MCV рассчитывалась путем деления показателя Δ MCV на время, за которое достигался максимальный объем эритроцитов. Показатель Δ MCV имеет размерность fL, показатель U MCV - fL/min.

2.3.3 Определение сорбционной емкости эритроцитов

Сорбционную емкость эритроцитов (СЕЭ) определяли по методу Тогайбаева А.А. [98] в модификации Копытовой Т.В. [99].

К 1,0 мл отмытых эритроцитов добавляли 3,0 мл 0,025 % раствора красителя метиленового синего. После 10 мин инкубации образцы центрифугировались при 3000 об/мин в течение 10 мин. Оптическую плотность исходного раствора и надосадочной жидкости измеряли на спектрофотометре при длине волны 630 нм против физиологического раствора в кювете с длиной оптического пути 10 мм. Спектрофотометрически оценивалось количество непоглощенного красителя, количество адсорбированного мембраной эритроцита красителя рассчитывали по формуле (2) [99]:

$$A(\%) = 100 - \frac{E_{оп} \cdot 100}{E_k}, \quad (2)$$

где: A – количество поглощенного красителя,
 $E_{оп}$ – оптическая плотность опытной пробы,
 E_k – оптическая плотность исходного раствора.

2.3.4 Определение молекул средней массы в эритроцитах

Уровень средних молекул (СМ) в эритроцитах определяли по методу Ковалевского А.Н. и Нифантьева О.Е. [100].

Осаждение белков проводили путем внесения 0,1 мл отмытых эритроцитов в 1 мл 13 % трихлоруксусной кислоты. Взвесь перемешивали и центрифугировали при 3000 оборотах в минуту в течение 15 минут. 0,3 мл надосадочной жидкости вносили в 3 мл дистиллированной воды, смесь перемешивали. Спектрофотометрически определяли оптическую плотность полученных проб при длине волны света 254 нм и 280 нм против дистиллированной воды. Рассчитывали коэффициент $K_{СМЭ} = (E_{280}/E_{254})$. Результаты выражали в единицах оптической плотности [100].

2.3.5 Определение фрагментов внеклеточных нуклеиновых кислот в эритроцитах

Адсорбцию фрагментов внеклеточных РНК и ДНК (вкРНК и вкДНК) на эритроцитах оценивали по методу Маркушевой Л.И и соавторов [101].

Принцип метода заключается в экстракции нуклеиновых кислот после гидролиза, проводимого при различной температуре на водяной бане с помощью хлорной кислоты определенной концентрации. К 1 мл отмытых эритроцитов добавляли 5 мл 0,5 н. HClO_4 , перемешивали, а затем центрифугировали 15 мин при 5000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали. К осадку добавляли 10 мл 10% HClO_4 , перемешивали и выдерживали 10 минут при 37°C, а затем центрифугировали 15 мин при 5000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали в пробирку – это гидролизат РНК. К осадку добавляли 3 мл 10% HClO_4 , перемешивали и выдерживали 7 мин при 70°C, а затем центрифугировали 15 мин при 5000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали в пробирку – это гидролизат ДНК. Спектрофотометрию гидролизатов проводили при длине волны 260 нм и 280 нм [101].

2.3.6 Определение малонового диальдегида в эритроцитах

Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли методом Гончаренко М.С. и Латыповой А.М. [102].

Для приготовления гемолизата в 0,25 мл дистиллированной воды вносили 0,05 мл отмытых эритроцитов, перемешивали до полного разрушения эритроцитов. К 0,3 мл гемолизата добавляли 2,4 мл 0,08 н серной кислоты и 0,3 мл 10 % фосфорновольфрамовой кислоты, тщательно перемешивали и оставляли инкубироваться при комнатной температуре в течение 10 минут. Смесь центрифугировали при 3000 оборотах в минуту в течение 10 минут, полученный осадок дважды промывали 1 мл дистиллированной воды. Промытый осадок растворяли в 3 мл дистиллированной воды и добавляли 1 мл 0,8 % тиобарбитуровой кислоты, растворенной в 50 % уксусной кислоте. Полученный раствор инкубировали в кипящей водяной бане в течение 60 минут. Реакцию прекращали путем охлаждения проб в холодной воде. Для удаления мутности пробы центрифугировали при 3000 оборотах в минуту в течение 10 минут. Измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости при длине волны 532 нм против дистиллированной воды. Расчет концентрации МДА проводили по формуле $C_{\text{МДА}} = (E_{532}/1,56) \cdot 200$ и выражали в мкмоль/мл [102].

2.3.7 Определение карбониловых производных белков в эритроцитах

Карбониловые производные белков (КПБ) определяли по методу Levine R.L и соавторов [103].

В пробирки вносили 0,1 мл эритроцитарной массы, добавляли 0,5 мл 20% трихлоруксусной кислоты и 0,5 мл 0,1М HCl 2,4-динитрофенилгидразина.

Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 50 минут. Далее центрифугировали 5 минут при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, к осадку добавляли смесь этанол – этилацетат (1:1) в объеме 0,5 мл, взвесь перемешивали и центрифугировали 3 минуты при 3000 об/мин. Экстракцию липидов из осадка этанол-этилацетатной смесью повторяли 2 раза. Осадок, лишенный липидов, высушивали в термостате при 37°C в течение 18 часов. Далее осадок растворяли в 2 мл 8М раствора мочевины. Регистрацию карбониловых производных белков проводили спектрофотометрически при длине волны 370 нм. Расчет концентрации карбониловых производных белков производили по формуле (3) [103]:

$$C = E/0,1155, \quad (3)$$

где E – экстинкция полученного раствора
карбониловых фенилгидразонов
против дистиллированной воды.

2.3.8 Определение мембранно-связанного гемоглобина в эритроцитах

Содержание мембранно-связанного гемоглобина в эритроцитах определяли по методу Токтамысовой З.С. и соавторов [104].

Пробы для спектрофотометрического анализа готовили путем центрифугирования гемолизата эритроцитов в течение 20 минут при 3000 об/мин. Определение оптической плотности растворов производили до центрифугирования и после центрифугирования. Содержание гемоглобина определяли при длине волны 575 нм, содержание метгемоглобина - при 630 нм. Изменение концентрации гемоглобина и метгемоглобина в растворах после центрифугирования выражали в виде процентного отношения, что соответствует мембранно-связанному гемоглобину [104].

2.3.9 Определение зарядового баланса эритроцитов

Определение зарядового баланса эритроцитов в условиях термоиндукции проводили по методу Громова А.Е. и соавторов [105].

Для регистрации зарядового баланса эритроцитов в условиях термоиндукции сконструирован оригинальный прибор, защищенный инновационным патентом РК № 25629 на изобретение «Регистратор электропроводности биологических жидкостей» [106]. На прибор получен сертификат соответствия № KZ.3500564.05.0106913, выданный РК НИЦ АО «Черметавтоматика» KZ.И.00.0060 от 09 декабря 2010 года [107, с. 40]. Разработано программное обеспечение, защищенное Свидетельством о государственной регистрации объекта интеллектуальной собственности № 1092 от 18 июня 2010 года [108].

2.3.9.1 Описание Регистратора электропроводности биологических жидкостей

На рисунке 7 изображена блок-схема регистратора электропроводности биологических жидкостей [106].

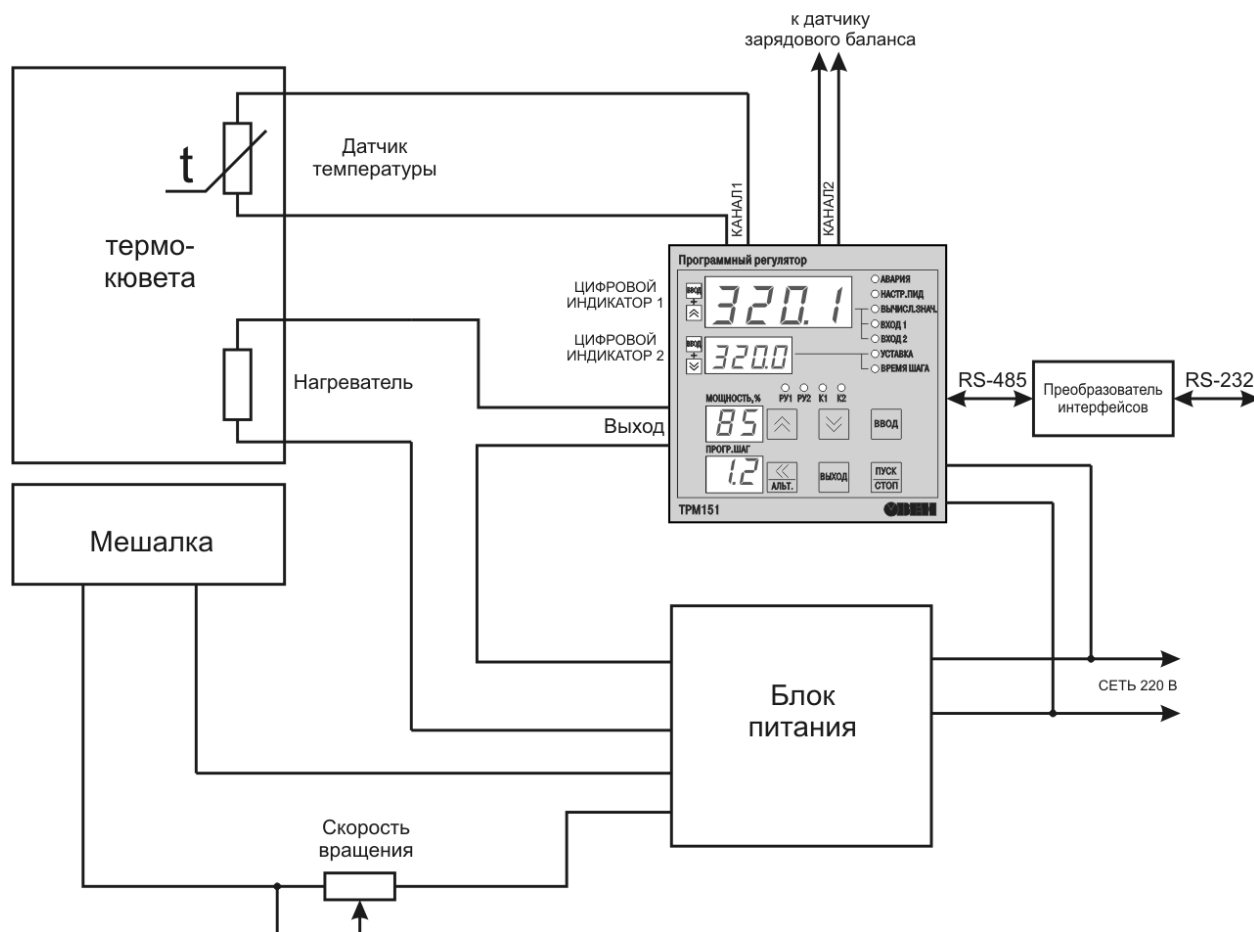


Рисунок 7 – Блок-схема регистратора электропроводности биологических жидкостей [106, с. 3]

Регистратор конструктивно выполнен в виде отдельного блока, устанавливаемого на горизонтальной поверхности. Лицевая панель регистратора легко снимается, что обеспечивает доступ ко всем частям, установленным внутри, при проведении ремонтных работ. На лицевой панели, расположены программный универсальный измеритель-регулятор TPM151 с индикацией и органами управления, верхняя часть модуля термокюветы, выключатель сетевого напряжения, ручка регулирования скорости вращения магнитной мешалки. С внутренней стороны на лицевой панели закреплены программный универсальный измеритель-регулятор TPM151 с индикацией и органами управления и модуль термокюветы с магнитной мешалкой. На задней стенке расположены предохранитель, ввод сетевого кабеля, точка заземления корпуса регистратора, разъём для подключения электрода, разъём DB-9 - для подключения интерфейса RS-232 [106, с 2.].

Регистратор осуществляет измерение зарядового баланса крови, нагрев и стабилизацию температуры термокюветы а также перемешивание крови с помощью модуля магнитной мешалки. Для измерения зарядового баланса крови используется второй измерительный канал программного универсального измерителя-регулятора ТРМ151 с подключенным к нему электродом SP10T, разъем которого выведен на заднюю панель регистратора. Измеренное значение можно считать по протоколу RS-232 или вывести на дисплей прибора [106, с. 2].

Термокювета состоит из ёмкости, в стенках которой находится нагревательный элемент, и датчик температуры (термодатчик). Термодатчик представляет собой терморезистор ТСМ-100, который подключен к первому измерительному каналу ТРМ151. ТРМ151 осуществляет измерение температуры и осуществляет её регулирование путём включения или отключения реле нагревательного элемента. Для получения заданной точности используется закон ПИД регулирования. Измеренное значение температуры можно вывести на цифровом индикаторе 1 или считать по протоколу RS-232. Значение уставки постоянно отображается на цифровом индикаторе 2 [106, с. 2].

Магнитная мешалка представляет собой постоянный магнит, находящийся в основании термокюветы. Магнит приводится во вращение электродвигателем. Скорость вращения электродвигателя регулируется переменным резистором, орган управления которого выведен на лицевую панель прибора [106, с. 2].

Анализируемый раствор наливается в кювету, в него опускается полимерная мешалка. Затем кювета помещается в термокювету, устанавливается необходимое число оборотов мешалки и запускается нагрев и стабилизация температуры. С датчиков зарядового баланса крови и температуры электрический сигнал поступает для последующей обработки в универсальный измеритель-регулятор ТРМ151 [106, с. 2].

2.3.9.2 Методика проведения исследования

Перед началом работы выбирали температуру нагревания термокюветы до 58°C. После установки температурного режима термокювета начинала нагреваться, во избежание рассеивания тепла верхняя часть модуля термокюветы накрывалась бумажной крышкой. Электрод помещали на 30 минут в дистиллированную воду комнатной температуры вне греющей кюветы. Данное время было выбрано исходя из правил подготовки электрода к работе [107, с. 41].

Отмытые эритроциты разбавляли физиологическим раствором, имеющим комнатную температуру, в соотношении 1:6 (1 часть эритроцитов, 6 частей физиологического раствора). Эритроцитарная суспензия аккуратно перемешивалась [107, с. 41].

Электрод перемещали из дистиллированной воды в физиологический раствор комнатной температуры на 2 минуты. Из физиологического раствора

электрод помещали в стеклянную кювету с суспензией эритроцитов на 2 минуты. Эти манипуляции производились вне термокюветы прибора с целью подготовки электрода к измерению. Далее стеклянную кювету с электродом помещали в термокювету прибора, электрод подвешивали на штативе таким образом, чтобы оставалось небольшое пространство между дном кюветы и электродом, но при этом все измерительные части электрода находились в суспензии эритроцитов. Во избежание вспенивания эритроцитарной взвеси устанавливали небольшую частоту вращения магнитной мешалки. Ячейку закрывали бумажной крышкой с прорезью для электрода [107, с. 41].

Запускали программу измерения зарядового баланса биологических жидкостей. Запись начинали при прогреве кюветы до 35°C и продолжали до установления температуры 58°C [107, с. 41].

Алгоритм обработки кривых зарядового баланса крови, защищен Свидетельством о государственной регистрации прав на объект авторского права № 1024 от 12 июля 2011 года [109]. Контрольной точкой являлось значение рН эритроцитарной взвеси, зарегистрированное при температуре 37°C. Далее в каждой точке измерения вычислялся показатель изменения электропроводности эритроцитов (Δ рН) относительно контрольной точки. Определялись максимальные и минимальные значения Δ рН, которые могли быть либо положительными, либо отрицательными. Графически по зависимости изменения Δ рН эритроцитов от температуры инкубации определяли характер и направленность кривой. При возможности отмечали температуру, при которой график изменения рН из возрастающей зависимости переходил в убывающую.

2.3.10 Статистические методы исследования

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием демоверсий программ STATISTICA 7 и IBM SPSS Statistics 20 с учетом вычислительных методов непараметрической статистики, рекомендуемых для изучения статистической значимости различий независимых количественных показателей в малых выборках с ненормальным распределением.

Проверка нормальности распределения проводилась графическим методом по гистограммам и квантильным диаграммам и количественным методом при оценке критерия Колмогорова – Смирнова.

Средние тенденции описывались медианами и квартилями. Статистическая значимость различий оценивалась по критерию Краскала – Уоллиса. Доверительные интервалы для долей рассчитывались откорректированным методом Вальда. Разделение на кластеры производилось методом k-средних. Анализ выживаемости проводился методом Каплана-Мейера.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Исследование устойчивости эритроцитов в гипоосмотической среде и выживаемости эритроцитов в аммонийной среде

В таблице 8 и на рисунке 8 представлены результаты определения осмотической резистентности эритроцитов у пациентов с хронической болезнью почек различной стадии, развившейся на фоне хронического пиелонефрита.

Таблица 8 – Показатели осмотической резистентности эритроцитов больных с ХБП различной стадии, развившейся на фоне хронического пиелонефрита

Группа	Статистическая величина	Процент лизированных эритроцитов, при различных концентрациях NaCl				
		0,7 %	0,5 %	0,45 %	0,35 %	0,3 %
Контроль	Медиана	1,52	4,61	31,39	87,31	94,22
	Нижний квартиль	0,64	4,13	24,81	85,43	92,09
	Верхний квартиль	2,09	5,71	41,45	91,18	96,65
ХП 1	Медиана	0,96	17,54	64,64	80,35	93,17
	Нижний квартиль	0,28	7,25	48,88	74,85	87,52
	Верхний квартиль	1,30	30,99	77,39	91,91	97,36
ХП 2	Медиана	0,98	12,38	55,60	83,81	89,33
	Нижний квартиль	0,36	4,41	36,67	63,44	85,59
	Верхний квартиль	1,66	22,23	73,19	92,44	92,74
ХП 3	Медиана	0,56	11,52	57,76	90,58	95,65
	Нижний квартиль	0,00	5,80	49,59	87,70	91,82
	Верхний квартиль	2,63	31,66	80,00	92,71	98,19
ХП 4	Медиана	1,57	18,50	64,17	95,42	96,36
	Нижний квартиль	0,99	13,22	43,38	83,33	95,04
	Верхний квартиль	1,94	25,10	76,49	96,66	98,82
ХП 5.1 (до диализа)	Медиана	1,68	27,74	66,52	89,72	93,56
	Нижний квартиль	0,25	4,94	44,17	82,58	89,04
	Верхний квартиль	2,78	35,46	79,22	93,58	95,04
ХП 5.2 (диализ)	Медиана	1,34	9,77	43,35	92,28	94,38
	Нижний квартиль	0,78	5,34	29,35	87,21	90,88
	Верхний квартиль	2,20	17,03	70,16	96,62	98,66
Критерий Краскала-Уоллиса, достигнутый уровень р		0,8187	0,0038*	0,0143*	0,0208*	0,0844
* - статистически значимые различия						

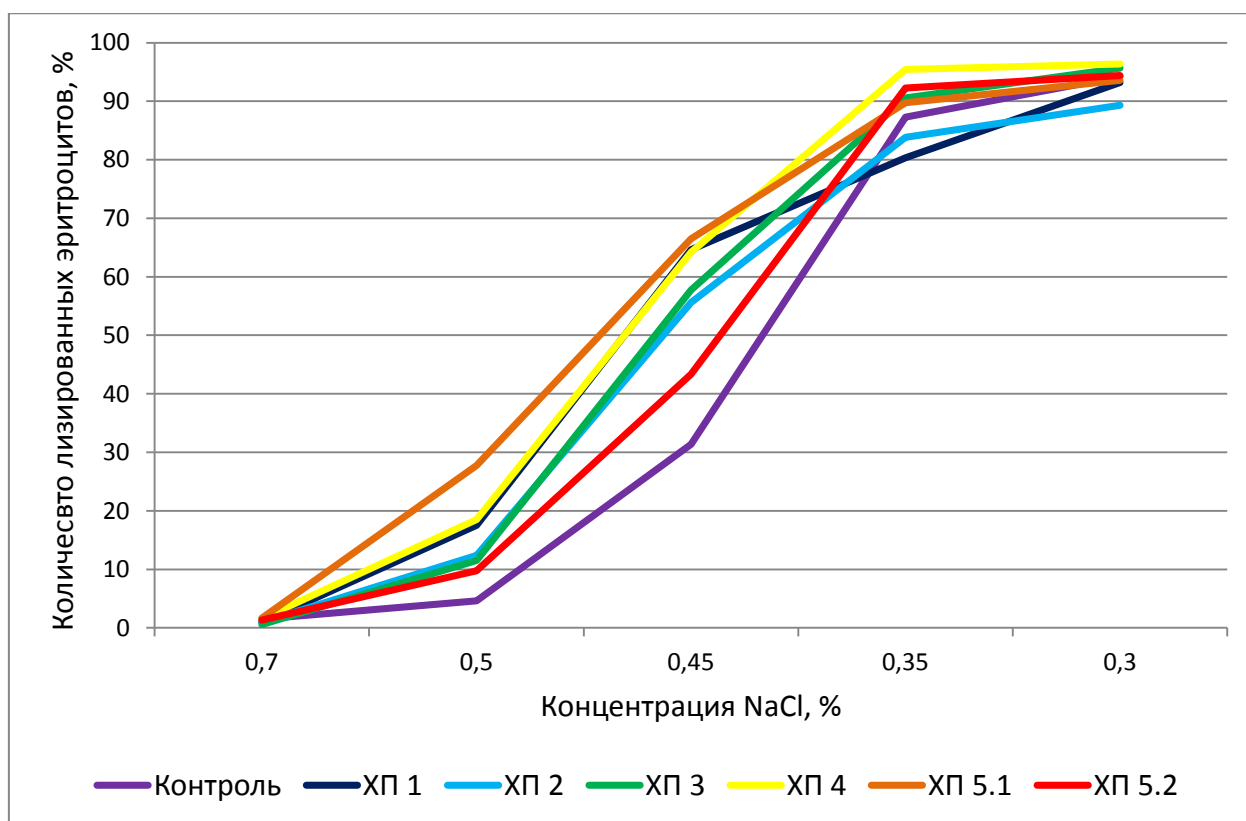


Рисунок 8 - Кривые осмотической резистентности эритроцитов больных с ХБП различной стадии, развившейся на фоне хронического пиелонефрита

При помещении крови в 0,7 % раствор NaCl наблюдается стабильная устойчивость эритроцитов как в группе контроля, так и у пациентов с хроническим пиелонефритом. Подобная стабильность в отсутствии устойчивости к гипоосмотическому гемолизу эритроцитов у всех участников исследования наблюдается при помещении крови в 0,3 % раствор NaCl. Это подтверждается отсутствием статистически значимых различий в процентном показателе гемолиза при данных концентрациях хлорида натрия в сравниваемых группах. Однако, при помещении крови в промежуточные концентрации растворов NaCl, устойчивость эритроцитов заметно и статистически значимо меняется в зависимости от стадии ХБП.

У пациентов с хроническим пиелонефритом ХБП 1 в сравнении с группой контроля эритроциты менее стабильны при концентрациях 0,5 % и 0,45 % NaCl, однако в 0,35 % растворе наблюдается заметное повышение стойкости эритроцитов к гипоосмотическому гемолизу. При этом процент гемолиза эритроцитов при такой концентрации хлорида натрия у пациентов с ХП, ХБП 1 меньше не только по сравнению с контролем, но и по сравнению с другими исследуемыми группами больных.

Кривые осмотической резистентности эритроцитов больных хроническим пиелонефритом ХБП 2 и ХБП 3 практически идентичны друг другу с той лишь разницей, что при концентрациях NaCl 0,5 % и 0,45 % процент гемолиза в обеих группах выше контрольных показателей, а в точке 0,35 % NaCl эритроциты пациентов с ХП, ХБП 2 более стабильны по сравнению с

контролем, а пациентов с ХП, ХБП 3 – менее стабильны. Эритроциты больных хроническим пиелонефритом ХПБ 4 и 5 заметно менее устойчивы к гипоосмотическому гемолизу, чем эритроциты здоровых людей. Следует отметить, что прогрессирование хронической болезни почек сопровождается уменьшением осмотической стойкости эритроцитов, однако проведение системного гемодиализа у пациентов с хроническим пиелонефритом улучшает показатель стойкости эритроцитов. Так у пациентов с ХП, ХБП 4 эритроциты наименее устойчивы при концентрации 0,35 % NaCl. А у пациентов с ХП, ХБП 5 до проведения сеансов гемодиализа эритроциты крайне не стабильны при концентрации хлорида натрия 0,5% и 0,45 %. У пациентов с хроническим пиелонефритом, получающих гемодиализ, устойчивость эритроцитов в 0,5 % и 0,45 % растворах NaCl даже выше, чем у пациентов с ХБП 1,2 и 3 стадиями.

В таблице 9 и на рисунке 9 представлены результаты определения осмотической резистентности эритроцитов у пациентов с хронической болезнью почек различной стадии, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита.

Таблица 9 – Показатели осмотической резистентности эритроцитов больных с ХБП различной стадии, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита

Группа	Статистическая величина	Процент лизированных эритроцитов, при различных концентрациях NaCl				
		0,7 %	0,5 %	0,45 %	0,35 %	0,3 %
Контроль	Медиана	1,52	4,61	31,39	87,31	94,22
	Нижний квартиль	0,64	4,13	24,81	85,43	92,09
	Верхний квартиль	2,09	5,71	41,45	91,18	96,65
ХГ 1	Медиана	2,52	6,66	61,27	84,37	90,00
	Нижний квартиль	1,30	2,46	41,30	81,63	86,47
	Верхний квартиль	2,93	12,86	74,95	85,76	94,56
ХГ 2	Медиана	0,73	24,28	73,93	85,07	89,68
	Нижний квартиль	0,33	15,54	67,82	83,75	87,32
	Верхний квартиль	1,41	25,88	77,15	90,24	91,56
ХГ 3	Медиана	0,36	6,73	57,58	88,17	92,25
	Нижний квартиль	0,17	2,57	27,90	83,09	85,68
	Верхний квартиль	1,50	12,49	68,12	88,99	93,43
ХГ 4	Медиана	0,62	7,99	41,06	81,05	90,00
	Нижний квартиль	0,00	5,63	11,14	68,36	85,88
	Верхний квартиль	1,28	13,07	60,11	88,09	93,14
ХГ 5 (диализ)	Медиана	1,74	11,66	61,11	94,70	96,11
	Нижний квартиль	0,68	6,60	31,54	91,16	93,79
	Верхний квартиль	2,24	24,22	78,65	97,39	99,07
Критерий Краскала-Уоллиса, достигнутый уровень p		0,0510	0,0031*	0,0168*	0,0005*	0,0130*
* - статистически значимые различия						

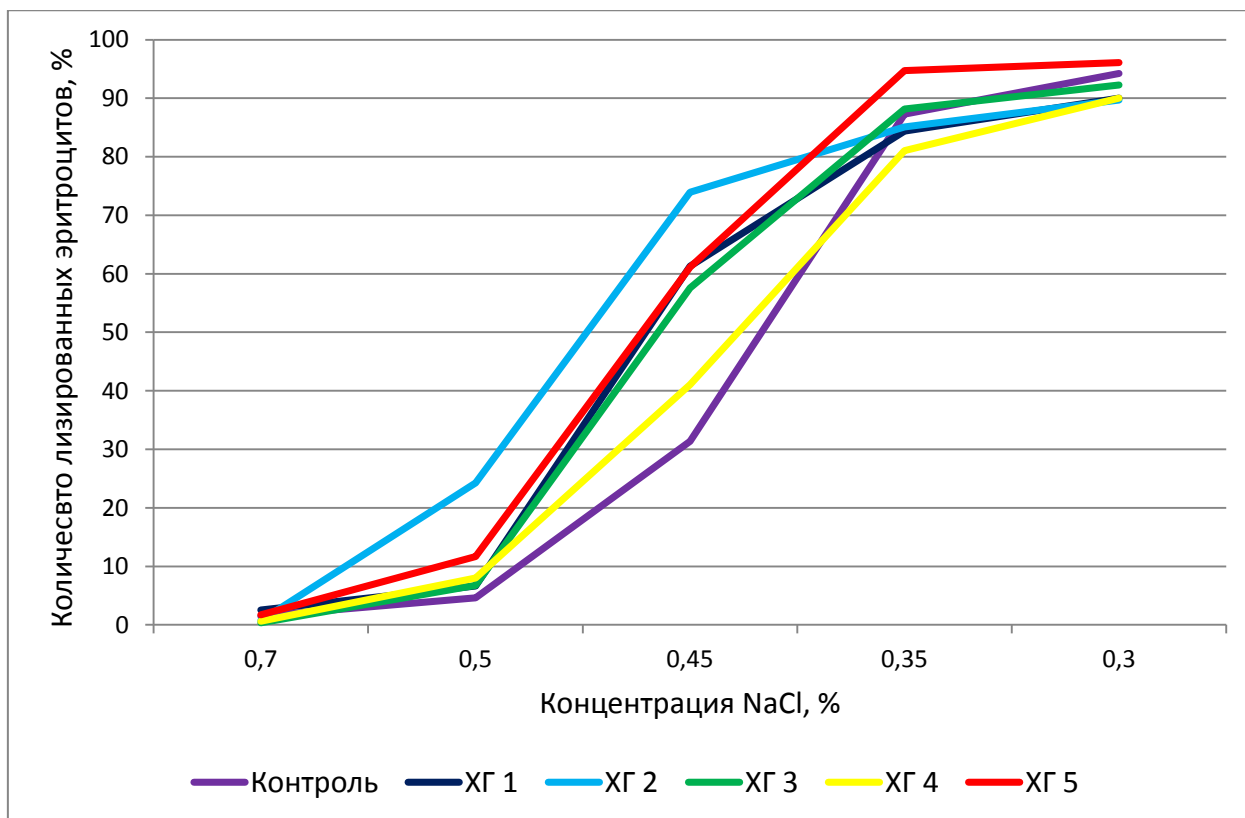


Рисунок 9 - Кривые осмотической резистентности эритроцитов больных с ХБП различной стадии, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита

И у пациентов с хроническим гломерулонефритом и у здоровых людей эритроциты обладают устойчивостью в растворе с концентрацией NaCl 0,7 %. Статистически значимых различий в процентах гемолиза при данной концентрации хлорида натрия в сравниваемых группах выявлено не было. Значимые различия в осмотической стойкости эритроцитов у здоровых людей и у пациентов с хроническим гломерулонефритом на различных стадиях ХБП наблюдаются при помещении крови в растворы NaCl от 0,5 % до 0,3 %.

Так у пациентов с ХГ, ХБП 1 при 0,5 % растворе NaCl показатель осмотической стойкости эритроцитов незначительно меньше контрольного, при 0,45 % растворе хлорида натрия эритроциты больных данной группы заметно менее устойчивы к гипоосмотическому гемолизу. При 0,35 % и 0,3 % растворах NaCl показатель осмотической резистентности незначительно больше контрольного.

Кривая осмотической резистентности эритроцитов у больных хроническим гломерулонефритом, ХБП 2 наиболее отличается от подобной кривой в группе здоровых людей. Эритроциты пациентов данной нозологической группы наименее устойчивы к их помещению в 0,5 % и 0,45 % растворы хлорида натрия, показатель гемолиза в группе больных с ХГ, ХБП 2 при данных концентрациях NaCl выше, чем во всех остальных группах. В точках 0,35 % и 0,3 % NaCl показатели гемолиза эритроцитов у пациентов с ХГ, ХБП 2 идентичны таковым у пациентов с ХГ, ХБП 1.

Кривая осмотического гемолиза эритроцитов в группе пациентов с ХГ, ХБП 3 практически идентична подобной кривой, зарегистрированной у пациентов в группе ХГ, ХБП 1. Отличием является то, что стойкость эритроцитов в растворах 0,35 % и 0,3% NaCl сопоставима с группой контроля, а не с группой ХГ, ХБП 1.

У пациентов с ХГ, ХБП 4 эритроциты обладают выраженной устойчивостью при их помещении в 0,45 % раствор NaCl, данная стойкость выше, чем во всех других группах, кроме контрольной. Стойкость эритроцитов в растворах с 0,35 % и 0,3 % хлорида натрия у пациентов с ХБП 4 стадии на фоне хронического гломерулонефрита выше, по сравнению со всеми сравниваемыми группами, в том числе выше и по сравнению с контролем.

Кривая осмотической резистентности эритроцитов у пациентов с хроническим гломерулонефритом, ХБП 5 стадии, находящихся на гемодиализе в начале, при концентрации NaCl 0,5 % и 0,45 % повторяет кривые гипоосмотического гемолиза эритроцитов у пациентов групп ХГ, ХБП 1 и ХГ, ХБП 3. В растворах с концентрациями хлорида натрия 0,35 % и 0,3 % эритроциты больных ХГ, ХБП 5 обладают наименьшей стойкостью по сравнению со всеми остальными группами.

В итоге можно сделать вывод, что и у пациентов с хроническим пиелонефритом и у пациентов с хроническим гломерулонефритом осмотическая стойкость эритроцитов отличается от контрольных показателей. Следует отметить, что у больных хроническим пиелонефритом наименьшая устойчивость эритроцитов в гипоосмотических средах наблюдается при ХБП 4 стадии и ХБП 5 стадии до подключения заместительной терапии, после перевода пациентов на системный гемодиализ устойчивость эритроцитов в растворах с различной концентрацией NaCl повышается, но не достигает контрольной. У пациентов с хроническим гломерулонефритом наименьшая осмотическая резистентность эритроцитов наблюдается в группе больных с ХБП 2 стадии, наибольшая – у больных с ХБП 4 стадии. Таким образом, тенденции изменения осмотической резистентности эритроцитов в зависимости от стадии хронической болезни почек радикально отличаются в группах больных хроническим пиелонефритом и хроническим гломерулонефритом.

Общая осмотическая стойкость эритроцитов зависит от преобладания в крови различных популяций эритроцитов: высокостойкой, среднестойкой и низкостойкой. Для определения данных популяций эритроцитов в крови здоровых людей и пациентов с хронической болезнью почек был проведен кластерный анализ. Все показателей осмотической резистентности эритроцитов во всех группах были объединены и разделены на три кластера методом К – средних. Данные кластеры представлены на рисунке 10. Первый кластер соответствует высокостойким эритроцитам, второй - среднестойким, третий – низкостойким.

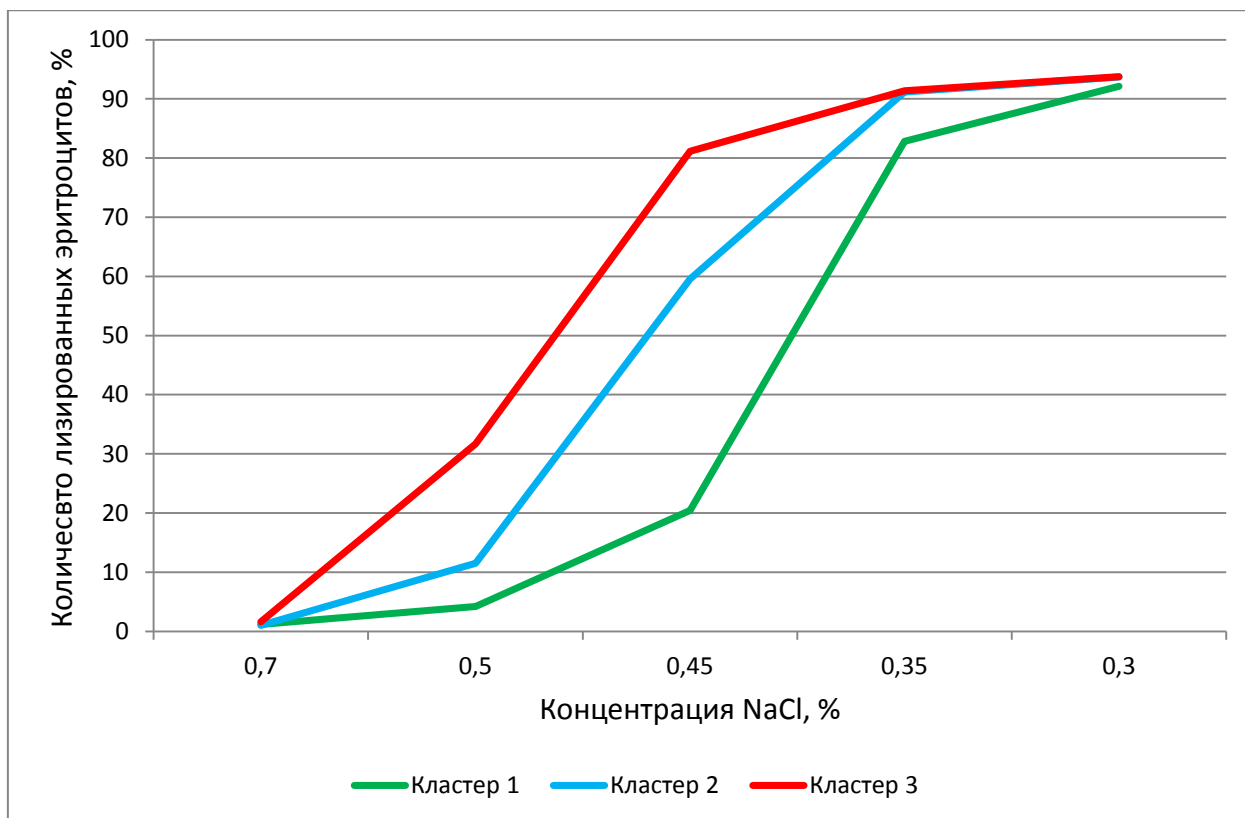


Рисунок 10 – Разделение всех полученных осмотических эритрограмм на кластеры

Далее весь массив данных был вновь разделен на исследуемые группы, это позволило получить сведения о наличии и преобладании различных популяций эритроцитов в различных группах исходя из всей выборочной совокупности. Разделение эритроцитов по осмотической стойкости в группе контроля и в группах пациентов с хронической болезнью почек представлены на рисунках 11 – 22.

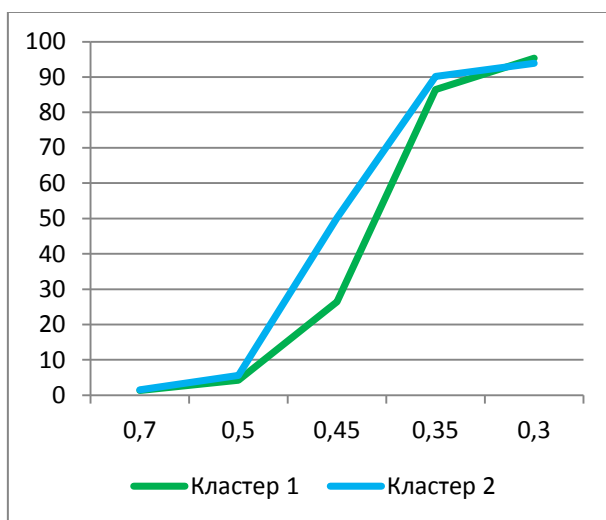


Рисунок 11 – Разделение эритроцитов по осмотической стойкости в группе контроля

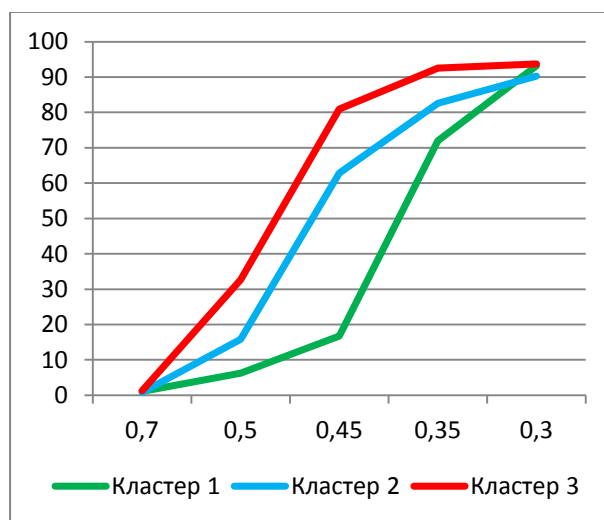


Рисунок 12 – Разделение эритроцитов по осмотической стойкости в группе пациентов с ХП, ХБП 1

В контрольной группе (рисунок 11) у 66,67 % (41,50 %; 85,04 %) участников исследования в крови преобладает популяция высокостойких эритроцитов, у 33,33 % (14,96 %; 58,50 %) – среднестойких эритроцитов. В группе здоровых людей не выявлено ни одного представителя с преобладанием в его крови популяции низкостойких эритроцитов. У пациентов с хроническим пиелонефритом, ХБП 1 (рисунок 12) преобладание в крови высокостойких эритроцитов выявляется в 25,00 % (10,81 %; 47,25 %) случаев, среднестойких эритроцитов – в 40,00 % (21,83 %; 61,40 %) случаев, низкостойких эритроцитов – в 35,00 % (17,99 %; 56,84 %) случаев.

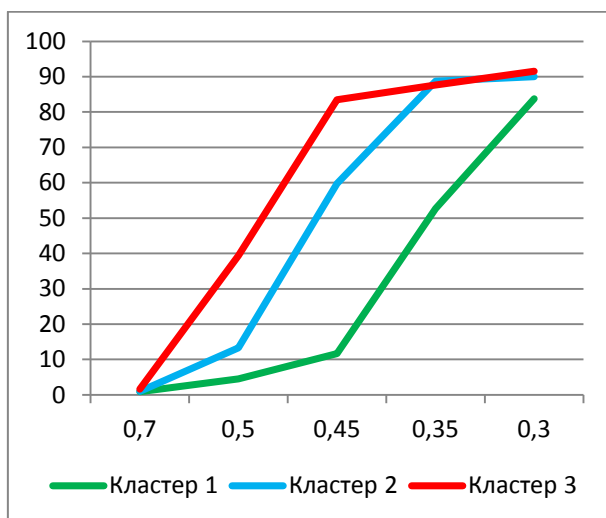


Рисунок 13 – Разделение эритроцитов по осмотической стойкости в группе пациентов с ХП, ХБП 2

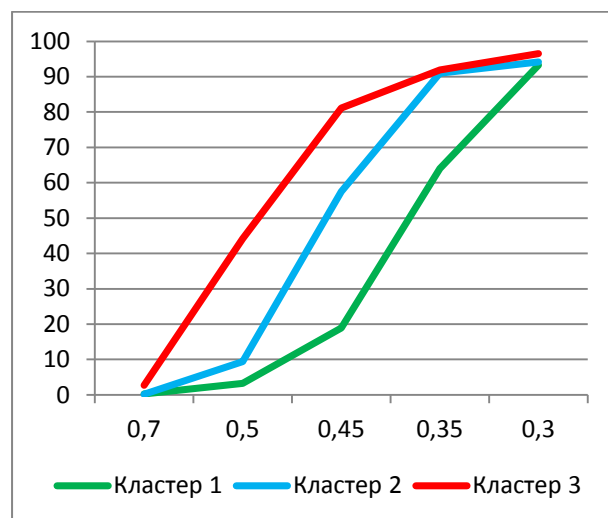


Рисунок 14 – Разделение эритроцитов по осмотической стойкости в группе пациентов с ХП, ХБП 3

У 30,43 % (15,41 %; 51,06 %) пациентов из группы ХП, ХБП 2 (рисунок 13) в крови преобладает популяция высокостойких эритроцитов, у 43,48 % (25,61 %; 63,21 %) – популяция среднестойких эритроцитов, у 26,09 % (12,26 %; 46,76 %) – популяция низкостойких эритроцитов. В группе больных хроническим пиелонефритом, ХБП 3 стадии (рисунок 14) у 15,38 % (3,10 %; 43,46 %) пациентов в крови преобладают высокостойкие эритроциты, у 46,15 % (23,19 %; 70,87 %) – среднестойкие эритроциты, у 38,46 % (17,60 %; 64,59 %) – низкостойкие эритроциты.

Среди больных хроническим пиелонефритом, ХБП 4 стадии (рисунке 15) высокостойкие эритроциты преобладали в крови 11,11 % (0,18 %; 45,67 %) пациентов данной группы, среднестойкие эритроциты – в крови 44,44 % (18,84 %; 73,37 %) пациентов, низкостойкие эритроциты преобладали в крови также у 44,44 % (18,84 %; 73,37 %) пациентов. В группе больных хроническим пиелонефритом, ХБП 5 стадии до применения гемодиализа в качестве основного способа лечения (рисунке 16) у 12,50 % (0,11 %; 49,22 %) пациентов в крови преобладает популяция высокостойких эритроцитов, у 37,50 % (13,49 %; 69,62 %) – популяция среднестойких эритроцитов, у 50,00 % (21,52 %; 78,48 %) – популяция низкостойких эритроцитов.

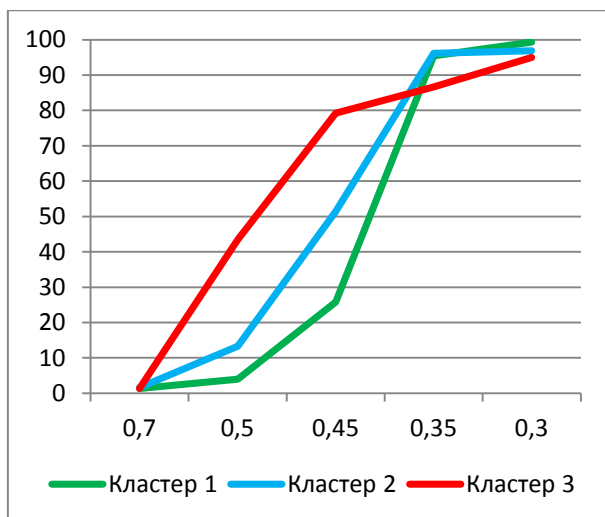


Рисунок 15 – Разделение эритроцитов по осмотической стойкости в группе пациентов с ХП, ХБП 4

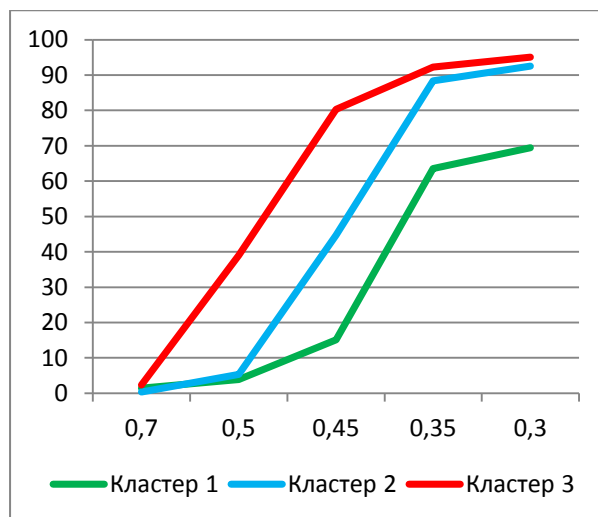


Рисунок 16 – Разделение эритроцитов по осмотической стойкости в группе пациентов с ХП, ХБП 5 (до диализа)

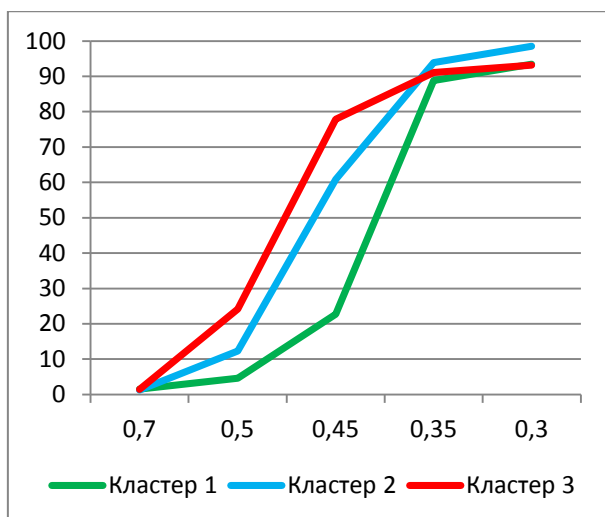


Рисунок 17 – Разделение эритроцитов по осмотической стойкости в группе пациентов с ХП, ХБП 5 (диализ)

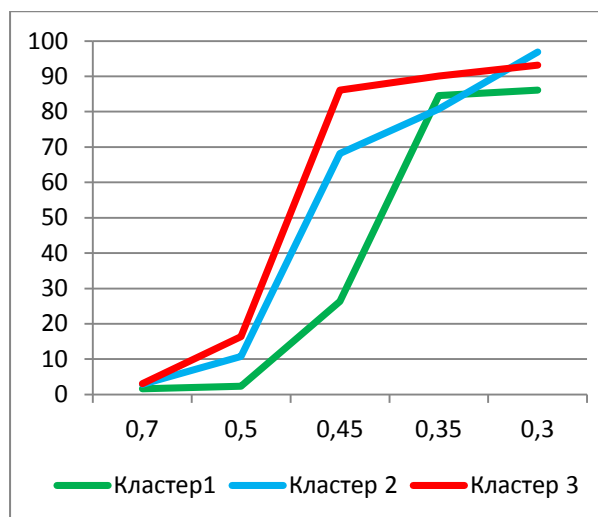


Рисунок 18 – Разделение эритроцитов по осмотической стойкости в группе пациентов с ХГ, ХБП 1

У пациентов с хроническим пиелонефритом, ХБП 5 стадии, получающих заместительную терапию гемодиализом (рисунок 17) преобладание в крови высокостойких эритроцитов наблюдается в 39,47 % (25,57 %; 55,31 %) случаев, среднестойких эритроцитов – в 44,74 % (30,14 %; 60,30 %) случаев, низкостойких эритроцитов – в 15,79 % (7,06 %; 30,80 %) случаев.

В группе больных хроническим гломерулонефритом, ХБП 1 стадии (рисунок 18) у 33,33 % (9,25 %; 70,43 %) пациентов в крови преобладает популяция высокостойких эритроцитов, у 50,00 % (18,76 %; 81,24 %) – популяция среднестойких эритроцитов, у 16,67 % (1,14 %; 58,22 %) – популяция низкостойких эритроцитов.

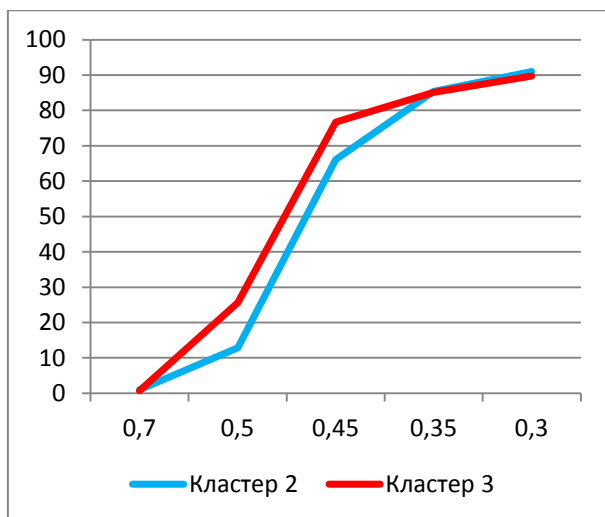


Рисунок 19 – Разделение эритроцитов по осмотической стойкости в группе пациентов с ХГ, ХБП 2

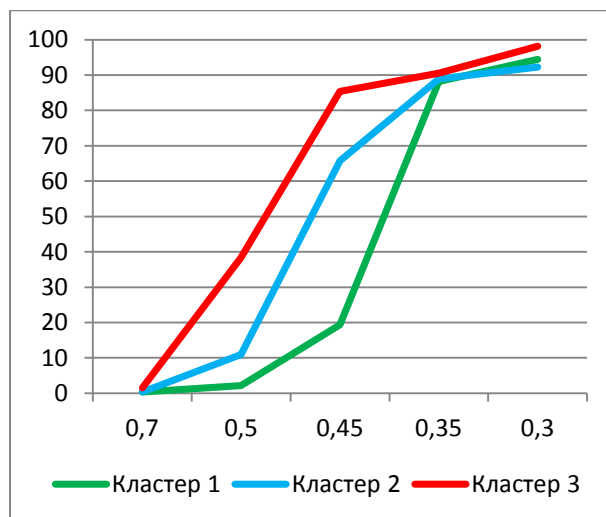


Рисунок 20 – Разделение эритроцитов по осмотической стойкости в группе пациентов с ХГ, ХБП 3

Среди больных с хроническим гломерулонефритом, ХБП 2 стадии (рисунок 19) не зарегистрировано ни одного случая с преобладанием в крови пациента высокостойких эритроцитов, среднестойкие эритроциты преобладают в крови пациентов данной группы в 33,33 % (9,25 %; 70,43 %) случаев, низкостойкие эритроциты - в 66,67 % (29,57 %; 90,75 %) случаев. У 42,86 % (15,75 %; 75,02 %) пациентов из группы ХГ, ХБП 3 (рисунок 20) в крови преобладает популяция высокостойких эритроцитов, у такого же процента пациентов 42,86 % (15,75 %; 75,02 %) в крови преобладает популяция среднестойких эритроцитов, и лишь у 14,29 % (0,53 %; 53,35 %) – популяция низкостойких эритроцитов.

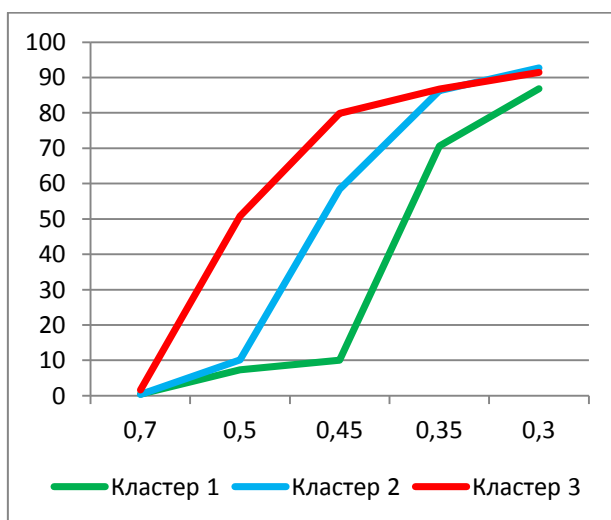


Рисунок 21 – Разделение эритроцитов по осмотической стойкости в группе пациентов с ХГ, ХБП 4

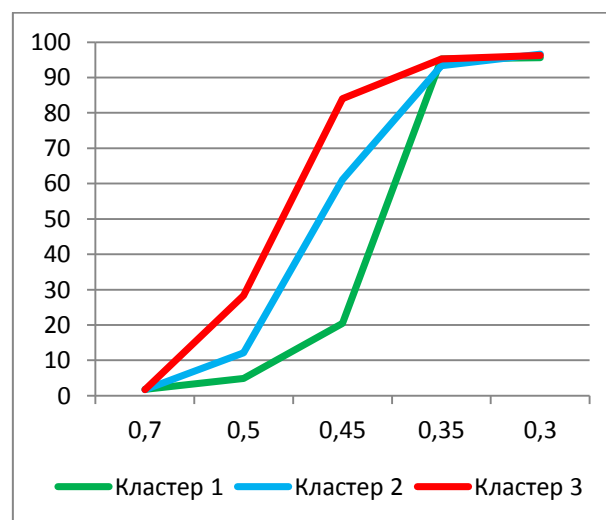


Рисунок 22 – Разделение эритроцитов по осмотической стойкости в группе пациентов с ХГ, ХБП 5 (диализ)

В группе больных хроническим гломерулонефритом, ХБП 4 стадии (рисунок 21) у 50,00 % (21,52 %; 78,48 %) пациентов в крови преобладают

высокостойкие эритроциты, у 37,50 % (13,49 %; 69,62 %) – среднестойкие эритроциты, у 12,50 % (0,11 %; 49,22 %) – низкостойкие эритроциты. Среди больных с диагнозом ХБП 5 стадии хронический гломерулонефрит, проходящих системный гемодиализ (рисунок 22), высокостойкие эритроциты преобладали в крови 28,57 % (13,56 %; 50,21 %) пациентов, среднестойкие эритроциты - в крови 42,86 % (24,44 %; 63,48 %) пациентов, низкостойкие эритроциты преобладали в крови также у 28,57 % (13,56 %; 50,21 %) пациентов.

Таким образом, можно сделать вывод, что в крови здоровых людей преобладают популяции высокостойких и среднестойких эритроцитов. В группах пациентов с хронической болезнью почек имеются больные с преобладанием в их крови популяции низкостойких эритроцитов. Причем у пациентов с ХБП, развившейся на фоне хронического пиелонефрита, с усугублением стадии ХБП увеличивается доля пациентов, в чьей крови преобладают низкостойкие эритроциты, эта закономерность наблюдается до перевода пациентов с ХБП 5 стадии на гемодиализ. У гемодиализных пациентов с хроническим пиелонефритом доля лиц с преобладанием в крови низкостойких эритроцитов заметно снижается. У пациентов с ХБП, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита, невозможно проследить четкую закономерность по увеличению или уменьшению доли больных с преобладанием в крови низкостойких эритроцитов. Наиболее заметные изменения в разделении эритроцитов по осмотической стойкости на различные популяции наблюдаются в группе больных с ХГ, ХБП 2. В этой группе вообще отсутствуют лица, в крови которых преобладают эритроциты высокой гипоосмотической стойкости. Это сопоставимо с тем, что кривая осмотической резистентности эритроцитов, зарегистрированная в данной группе наиболее отличается от кривых, наблюдаемых как у здоровых людей, так и у пациентов с хронической болезнью почек. Исходя из полученных данных, можно сделать предположение, что на осмотическую стойкость эритроцитов влияет не только стадия хронической болезни почек, но и патогенетические аспекты развития исходной нозологии, в результате которой и развилась ХБП.

На рисунках 23 – 34 представлены кривые изменения объема эритроцитов в аммонийной среде. Нулевая точка на оси абсцисс – это исходный объем эритроцитов, замеренный до помещения эритроцитов в аммонийную среду, последующие 8 точек – это замеры показателя MCV в процессе инкубации крови в изотонической аммонийной среде в течение 15 минут.

У здоровых лиц (рисунок 23) эритроциты, помещенные в изотоническую аммонийную среду, увеличиваются в объеме до достижения максимального MCV. Значение максимального MCV достигается в различные временные точки. Так у 15,63 % (6,39 %; 32,23%) здоровых обследованных объем эритроцитов максимален в 1 минуту инкубации, далее происходит разрыв мембраны эритроцита и объем клетки резко снижается. У 59,38 % (42,23 %; 74,51 %) обследованных лиц данной группы наибольший объем эритроциты достигают на 3 минуте инкубации, у 25 % (13,03 %; 42,33 %) обследованных – на 5 минуте.

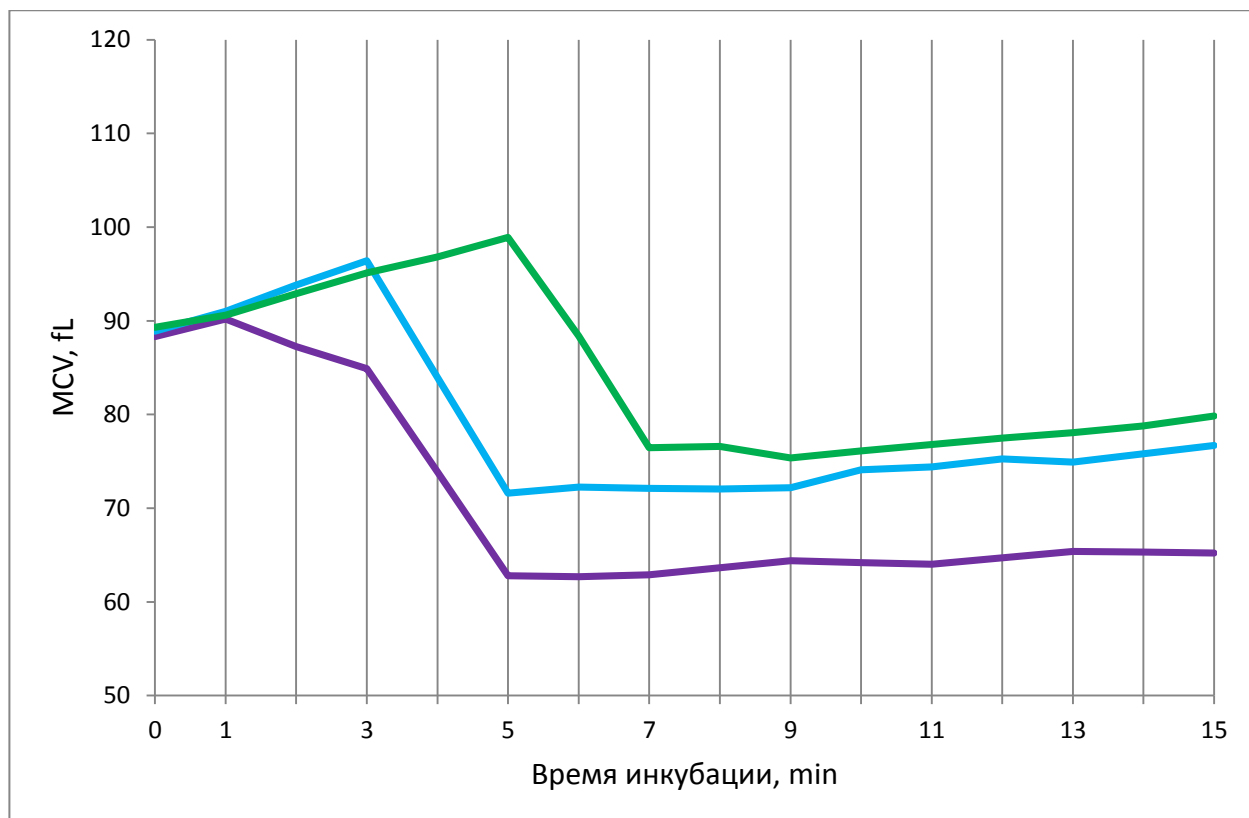


Рисунок 23 - Кривые изменения объема эритроцитов в аммонийной среде в группе контроля

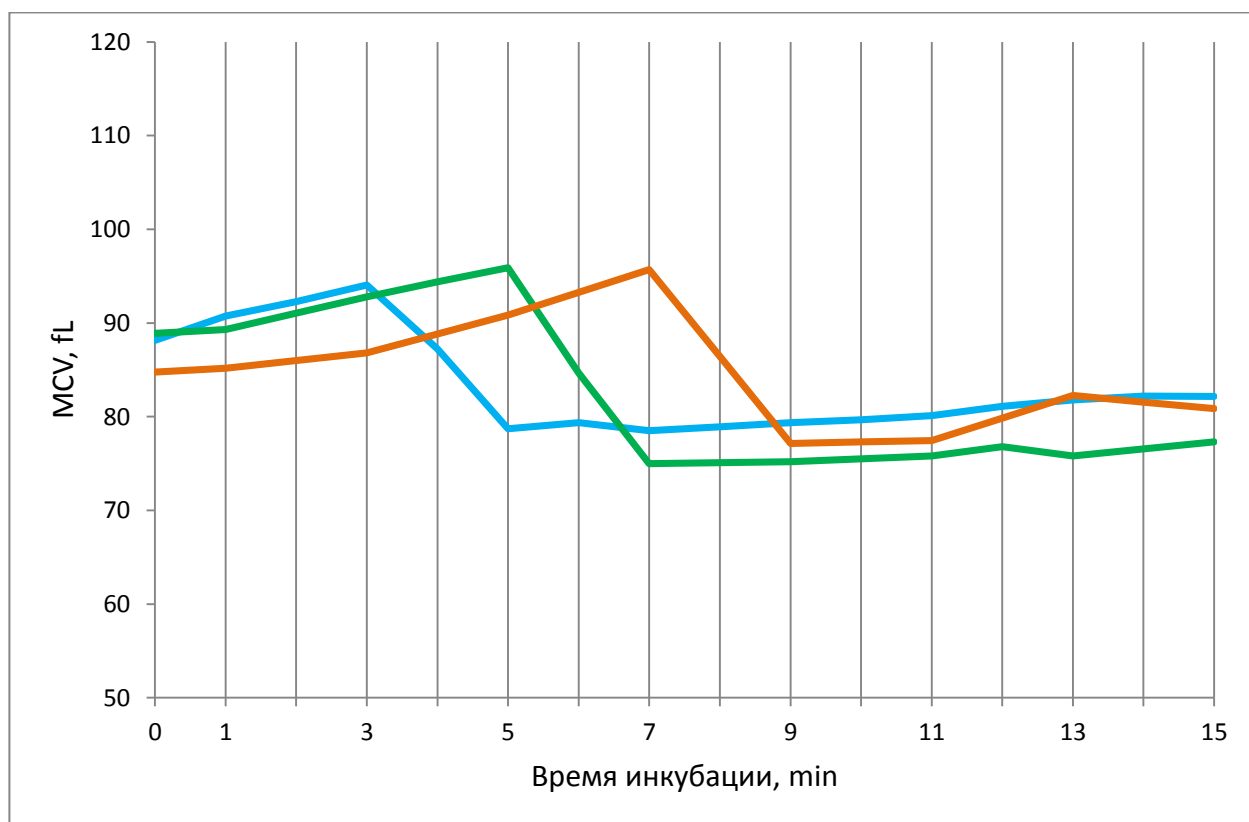


Рисунок 24 - Кривые изменения объема эритроцитов в аммонийной среде в пациентов с XII, ХБП 1

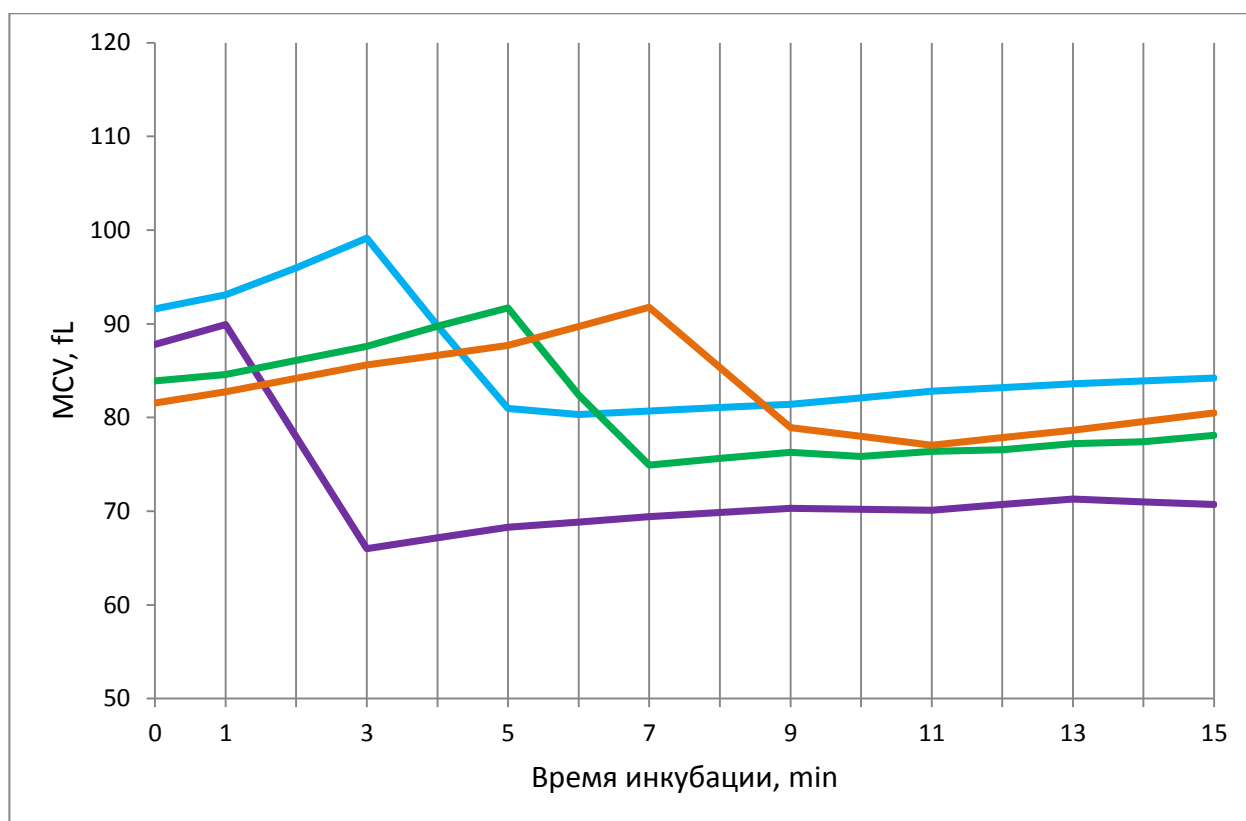


Рисунок 25 - Кривые изменения объема эритроцитов в аммонийной среде в пациентов с ХП, ХБП 2

У пациентов с хроническим пиелонефритом, ХБП 1 (рисунок 24) наблюдается иное по сравнению с контролем распределение кривых изменения объема эритроцитов в аммонийной среде. В данной группе отсутствует кривая с максимальным объемом эритроцитов на 1 минуте инкубации, а помимо кривых с пиками MCV на 3 и 5 минутах, появляется кривая с пиком на 7 минуте. Так, у 47,06 % (26,16 %; 69,04 %) больных ХП, ХБП 1 стадии эритроциты увеличиваются в объеме в течение первых 3 минут инкубации, у 41,18 % (21,26 %; 64,05 %) - в течение первых 5 минут, а у 11,76 % (2,03 %; 35,59 %) - эритроциты увеличиваются в объеме в течение 7 минут инкубации.

В группе больных с хроническим пиелонефритом, ХБП 2 стадии (рисунок 25) наблюдаются четыре типа кривых изменения объема эритроцитов в аммонийной среде. Пики MCV зарегистрированы на 1, 3, 5 и 7 минутах инкубации. У 5 % (0,91 %; 25,41 %) больных кривая изменения MCV имеет пик на 1 минуте инкубации, у 30 % (14,32 %; 52,13 %) - на 3, у 55 % (34,19 %; 74,19 %) - на 5, у 10 % (1,57 %; 31,32 %) – на 7.

Наиболее заметные изменения эритроцитов в ответ на их помещение в аммонийную среду наблюдаются у пациентов с хроническим пиелонефритом ХБП 3, 4 и 5 стадий. В данных группах появляются кривые изменения объема эритроцитов с пиком на 9 минуте инкубации.

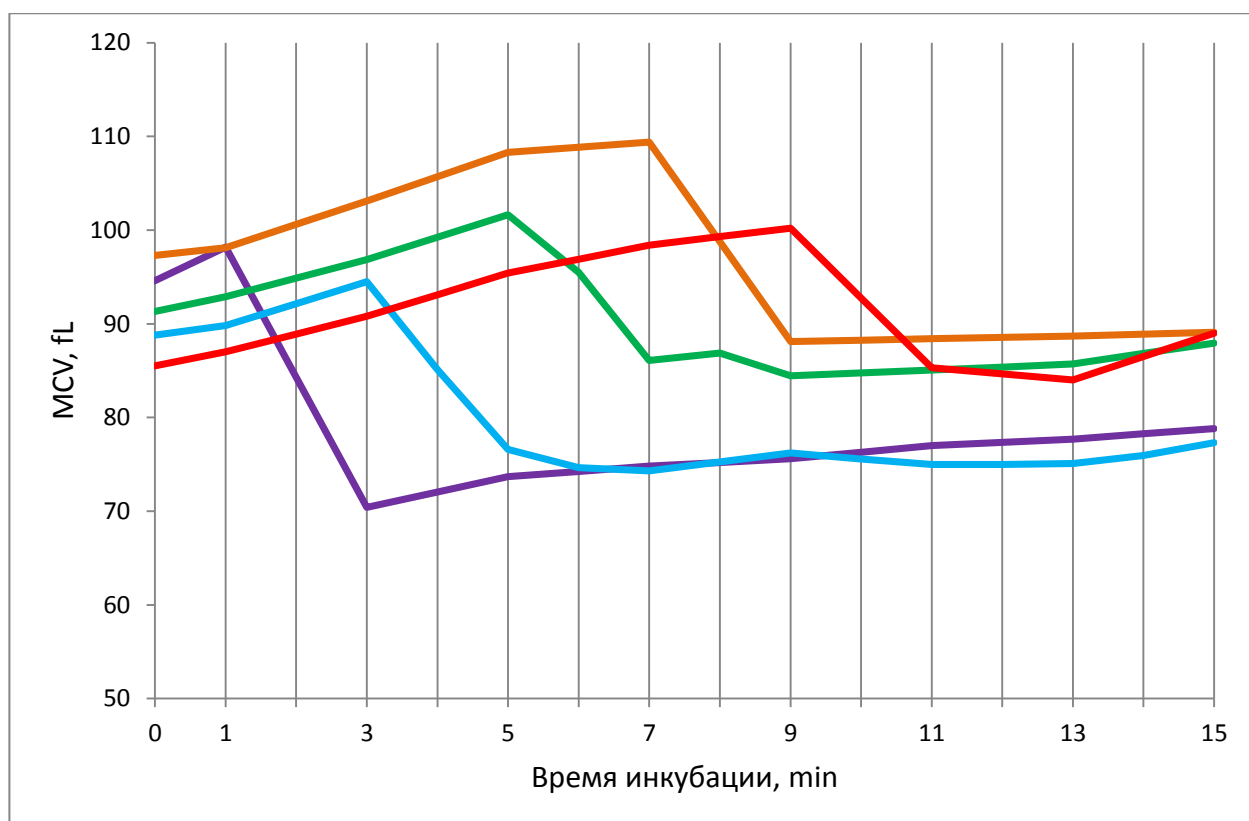


Рисунок 26 - Кривые изменения объема эритроцитов в аммонийной среде в пациентов с ХП, ХБП 3

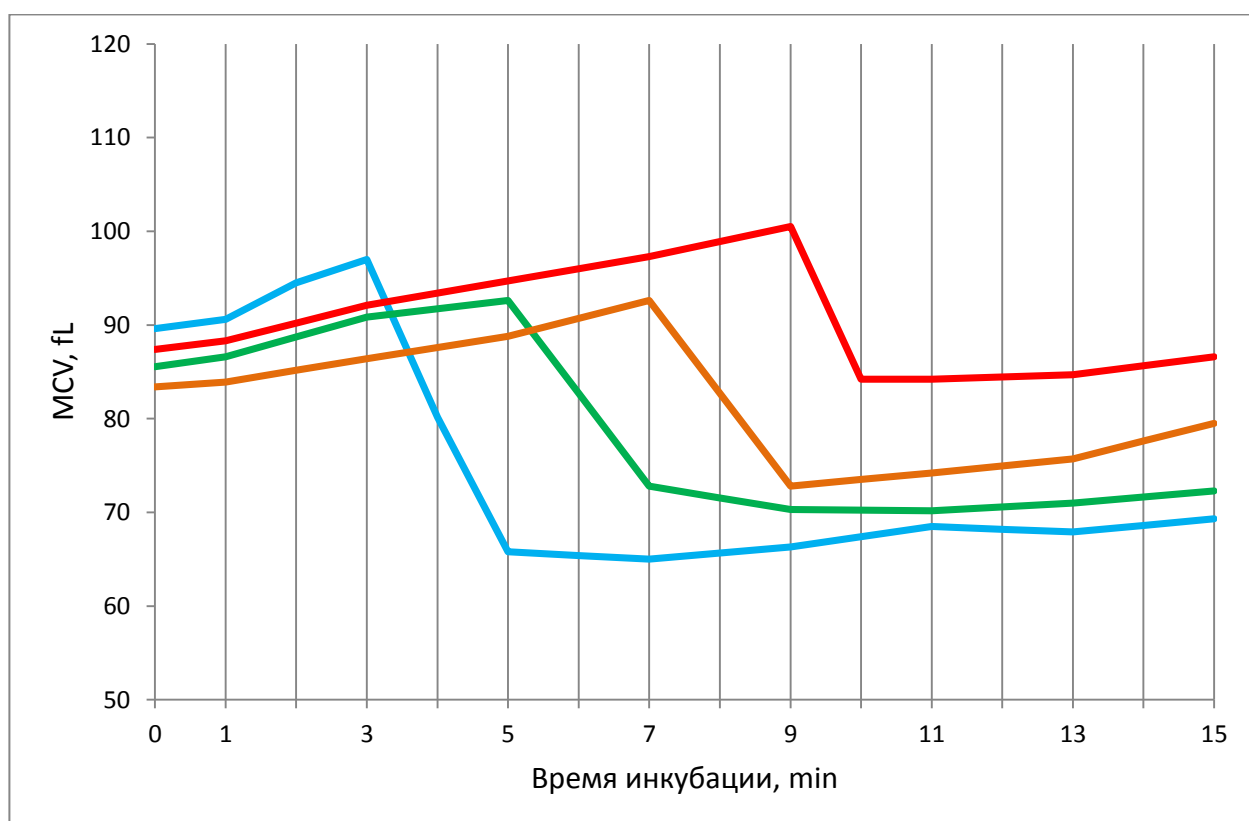


Рисунок 27 - Кривые изменения объема эритроцитов в аммонийной среде в пациентов с ХП, ХБП 4

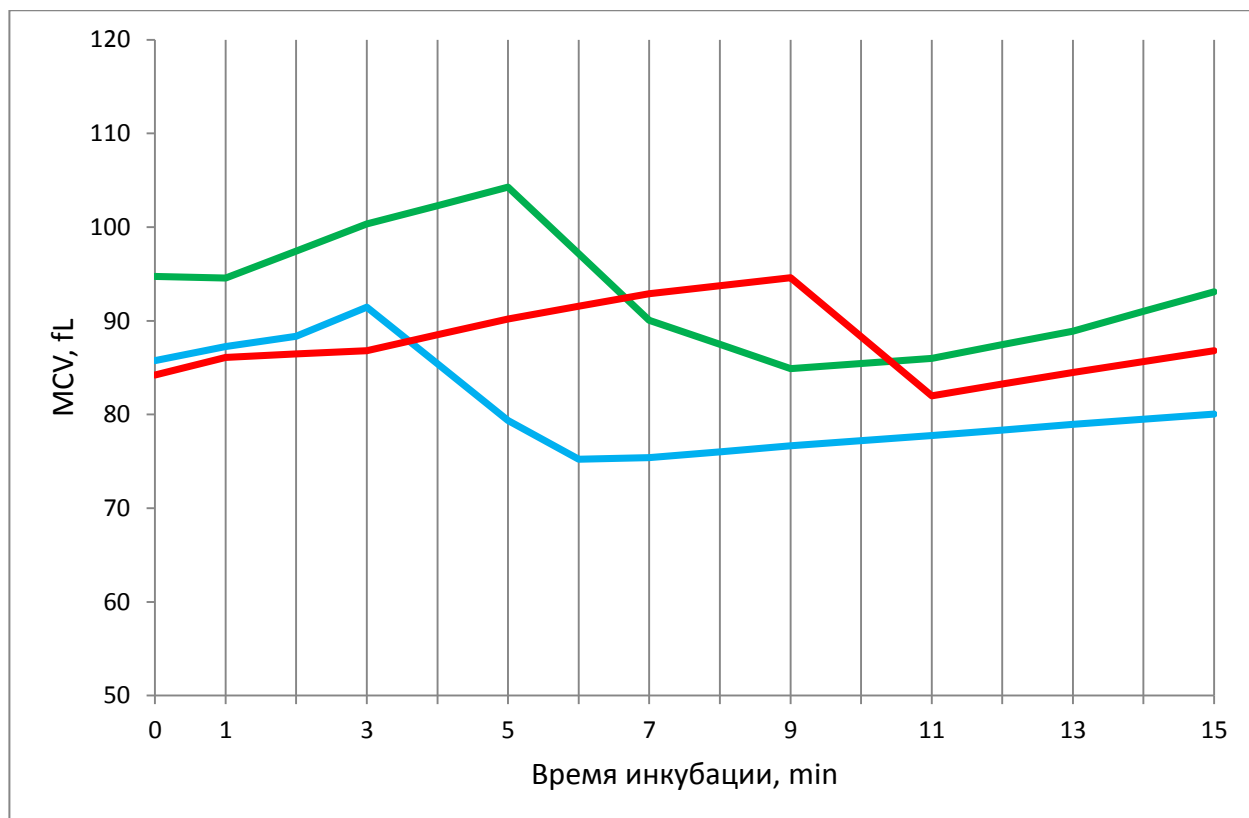


Рисунок 28 - Кривые изменения объема эритроцитов в аммонийной среде в пациентов с ХП, ХБП 5 (до диализа)

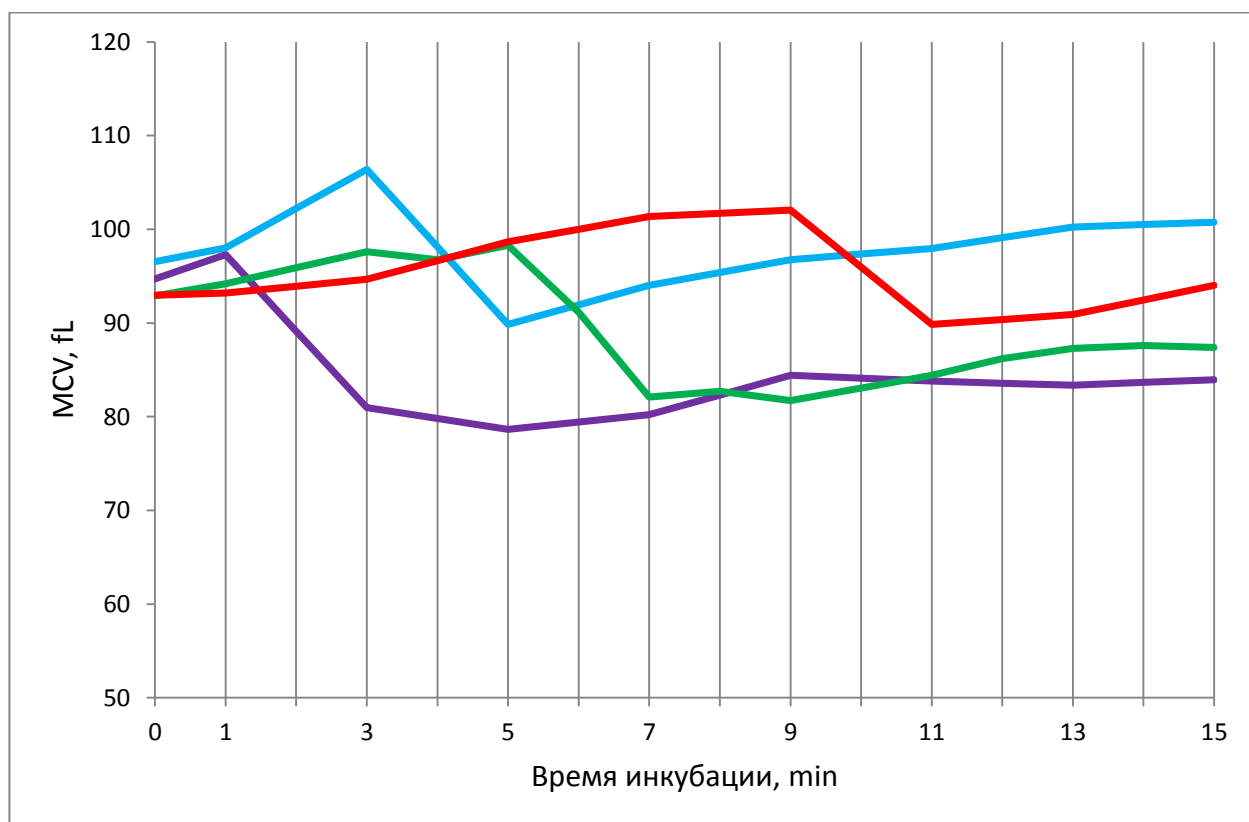


Рисунок 29 - Кривые изменения объема эритроцитов в аммонийной среде в пациентов с ХП, ХБП 5 (диализ)

У больных с ХП, ХБП 3 (рисунок 26) в 8,33 % (0,66 %, 37,53 %) случаев пик эритроцитарного объема в аммонийной среде приходится на 1 минуту инкубации, в 41,46 % (19,26 %; 68,11 %) случаев - на 3 минуту, в 33,33 % (13,55%; 61,20 %) случаев – на 5 минуту, и по 8,33 % (0,66 %, 37,53 %) случаев на 7 и 9 минуты.

В группе пациентов с ХП, ХБП 4 (рисунок 27) пик MCV на 3 минуте инкубации встречался в 55,56 % (26,63 %; 81,16 %) случаев, на 5 минуте – в 22,22 % (5,34 %; 55,72 %) случаев, на 7 минуте – в 11,11 % (0,18 %; 45,67 %) случаев, и на 9 минуте – также в 11,11 % (0,18 %; 45,67 %) случаев. Среди обследованных больных с ХП, ХБП 4 пик MCV ни в одном случае не наблюдался на 1 минуте инкубации.

У пациентов с ХП, ХБП 5 стадии, которые еще не получали гемодиализ (рисунок 28) отсутствуют кривые изменения эритроцитарного объема с пиками на 1 и 7 минутах инкубации. Пик MCV на 3 минуте инкубации эритроцитов в аммонийной среде наблюдается у 57,14 % (24,98 %; 84,25 %) пациентов, на 5 минуте – у 28,57 % (7,56 %; 64,76 %) пациентов, на 9 минуте – у 14,29 % (0,53 %; 53,35 %).

У больных хроническим пиелонефритом ХБП 5 стадии, получающих гемодиализ (рисунок 29), отсутствует кривая изменения MCV с максимумом на 7 минуте инкубации эритроцитов в аммонийной среде. Распределение встречаемости максимумов на других минутах инкубации весьма равномерное, так пик MCV на 1, 3 и 9 минутах встречается в 22,22 % (5,34 %; 55,72 %) случаев, а на 5 минуте - в 33,33 % (11,73 %; 64,91 %) случаев.

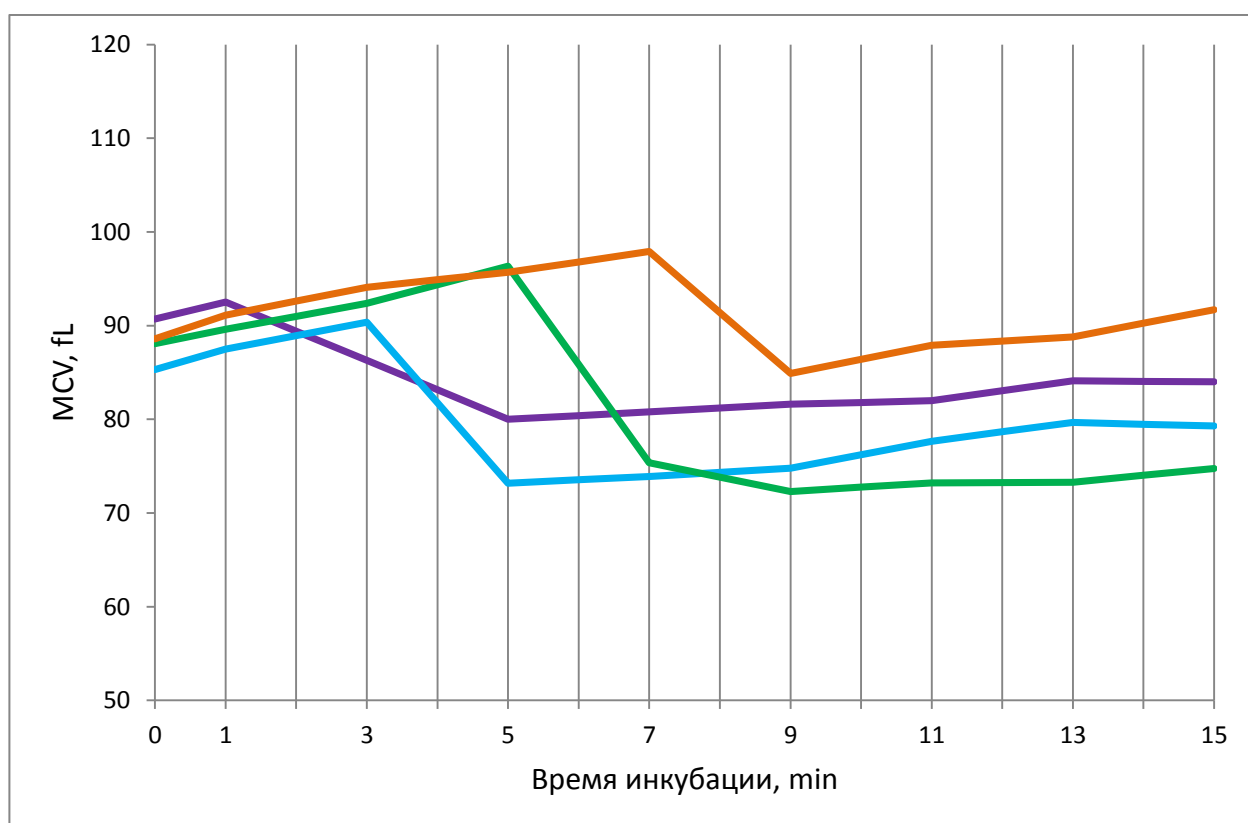


Рисунок 30 - Кривые изменения объема эритроцитов в аммонийной среде в пациентов с ХГ, ХБП 1

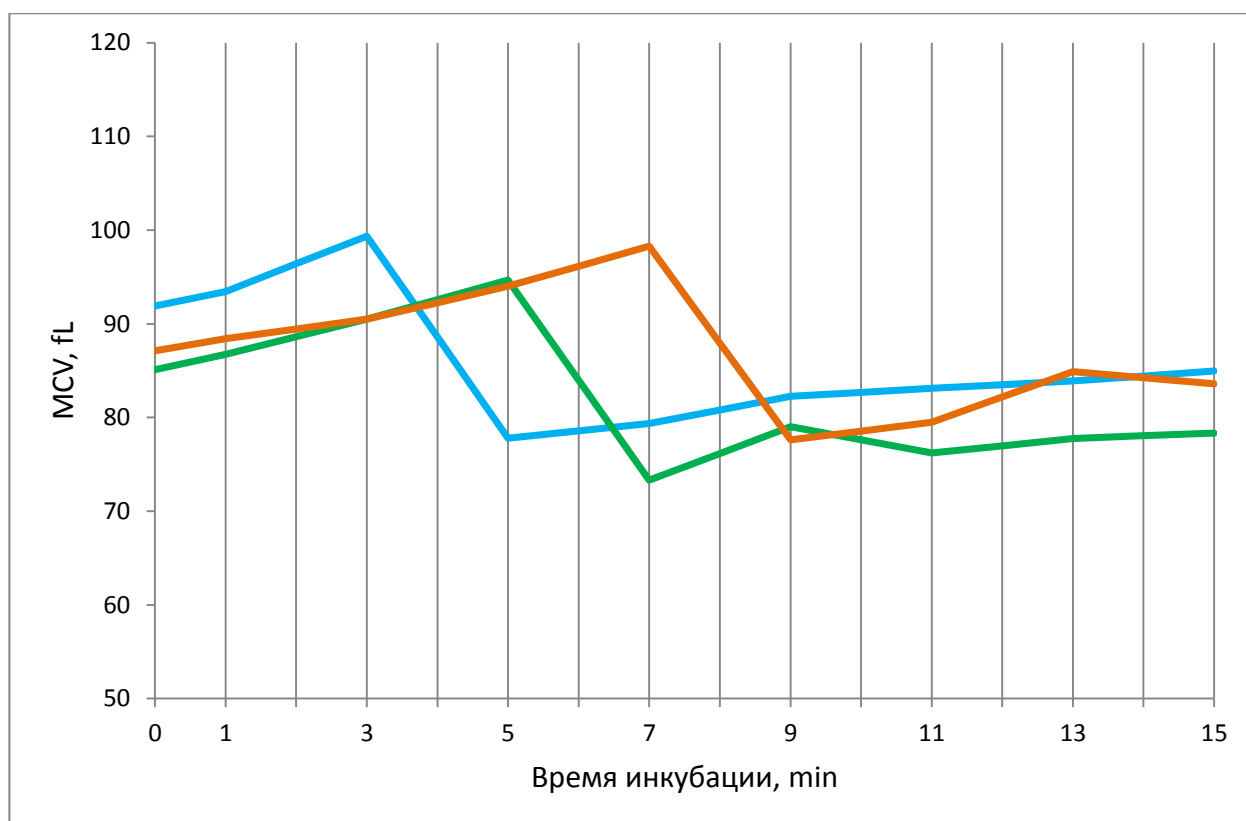


Рисунок 31 - Кривые изменения объема эритроцитов в аммонийной среде в пациентов с ХГ, ХБП 2

В группе больных с хроническим гломерулонефритом, ХБП 1 стадии (рисунок 30) наблюдаются четыре типа кривых изменения MCV в аммонийной среде. У 16,67 % (1,14 %; 58,22 %) больных кривая изменения объема эритроцитов имеет пик на 1 и на 7 минутах инкубации, у 33,33 % (9,25 %; 70,43 %) - на 3 и 5 минутах.

У пациентов с ХГ, ХБП 2 (рисунок 31) в 33,33 % (9,25 %; 70,43 %) случаев пик эритроцитарного объема в аммонийной среде приходится на 3 минуту инкубации, в 50 % (18,76 %; 81,24 %) случаев - на 5 минуту, в 16,67 % (1,14 %; 58,22 %) случаев – на 7 минуту. Среди обследованных больных с ХГ, ХБП 2 максимум MCV ни в одном случае не наблюдался на 1 минуте инкубации.

В группе пациентов с ХГ, ХБП 3 (рисунок 32) пик MCV на 1 и на 7 минутах инкубации встречался в 14,29 % (0,53 %; 53,35 %) случаев, на 3 минуте – в 71,43 % (35,24 %; 92,44 %) случаев, на 5 минуте – в 0 % случаев.

У больных с ХГ, ХБП 4 (рисунок 33) в 25 % (6,31 %, 59,91 %) случаев пик эритроцитарного объема в аммонийной среде приходится на 3 и 7 минут инкубации, в 50 % (21,52 %; 78,48 %) случаев - на 5 минуту.

В группе пациентов с ХГ, ХБП 5 (диализ) (рисунок 34) у 20 % (4,59 %; 52,06 %) больных кривая изменения объема эритроцитов имеет пик на 3 минуте инкубации, у 70 % (39,23 %; 89,67 %) - на 5 минуте, 10 % (0,39 %; 42,60 %) - на 7 минуте.

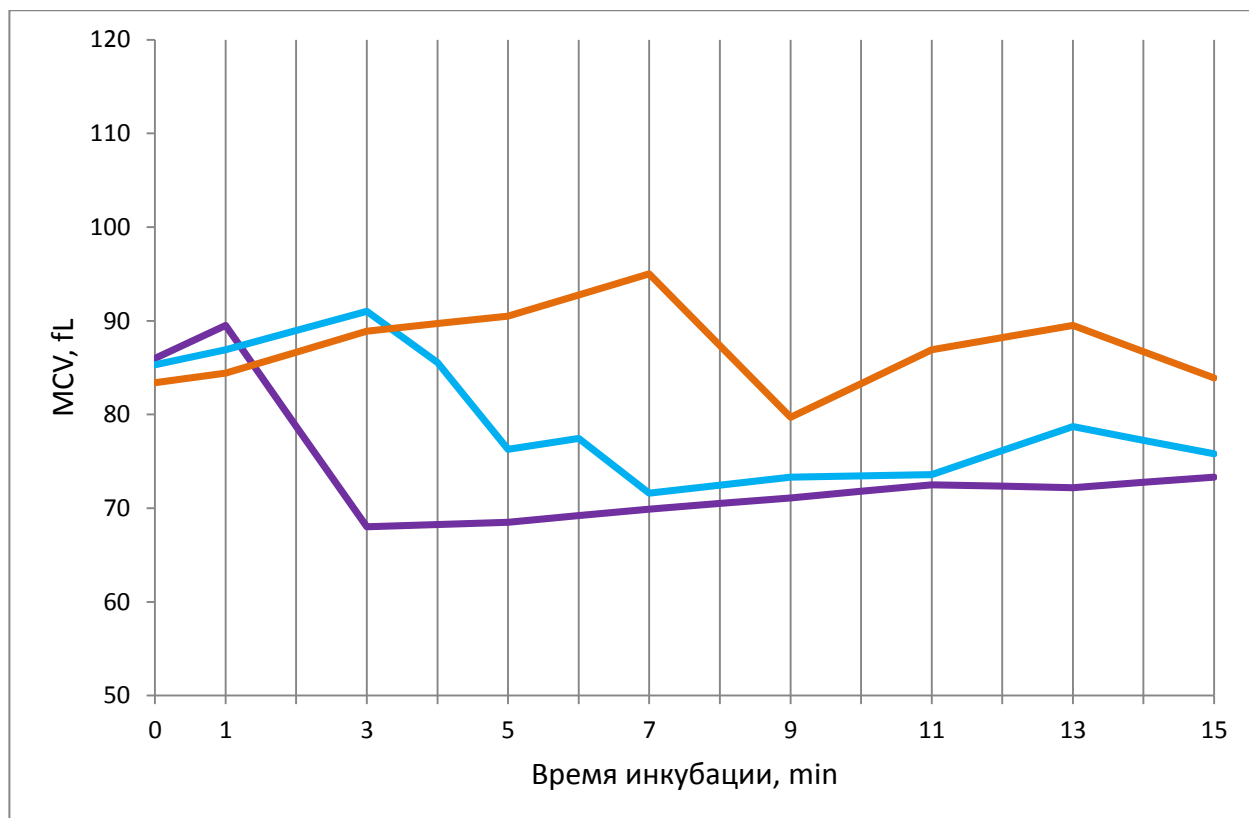


Рисунок 32 - Кривые изменения объема эритроцитов в аммонийной среде в пациентов с ХГ, ХБП 3

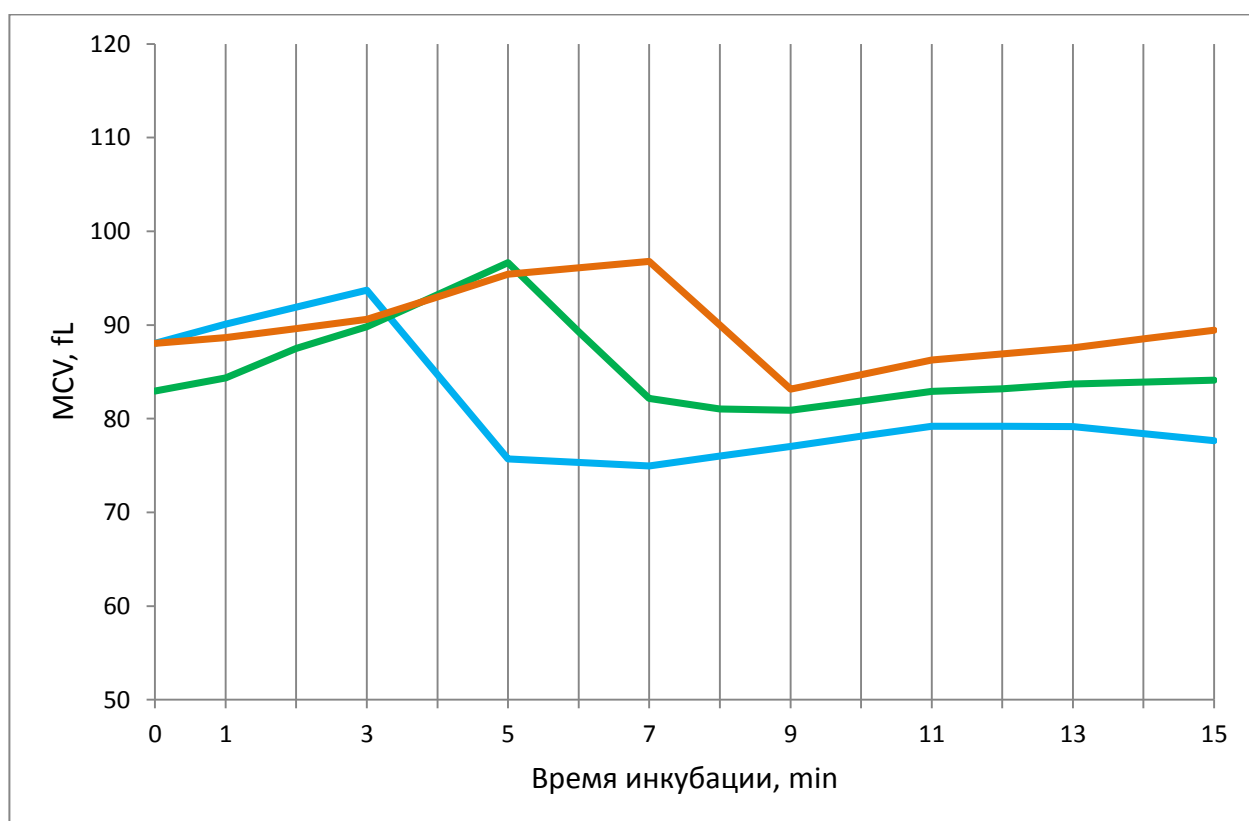


Рисунок 33 - Кривые изменения объема эритроцитов в аммонийной среде в пациентов с ХГ, ХБП 4

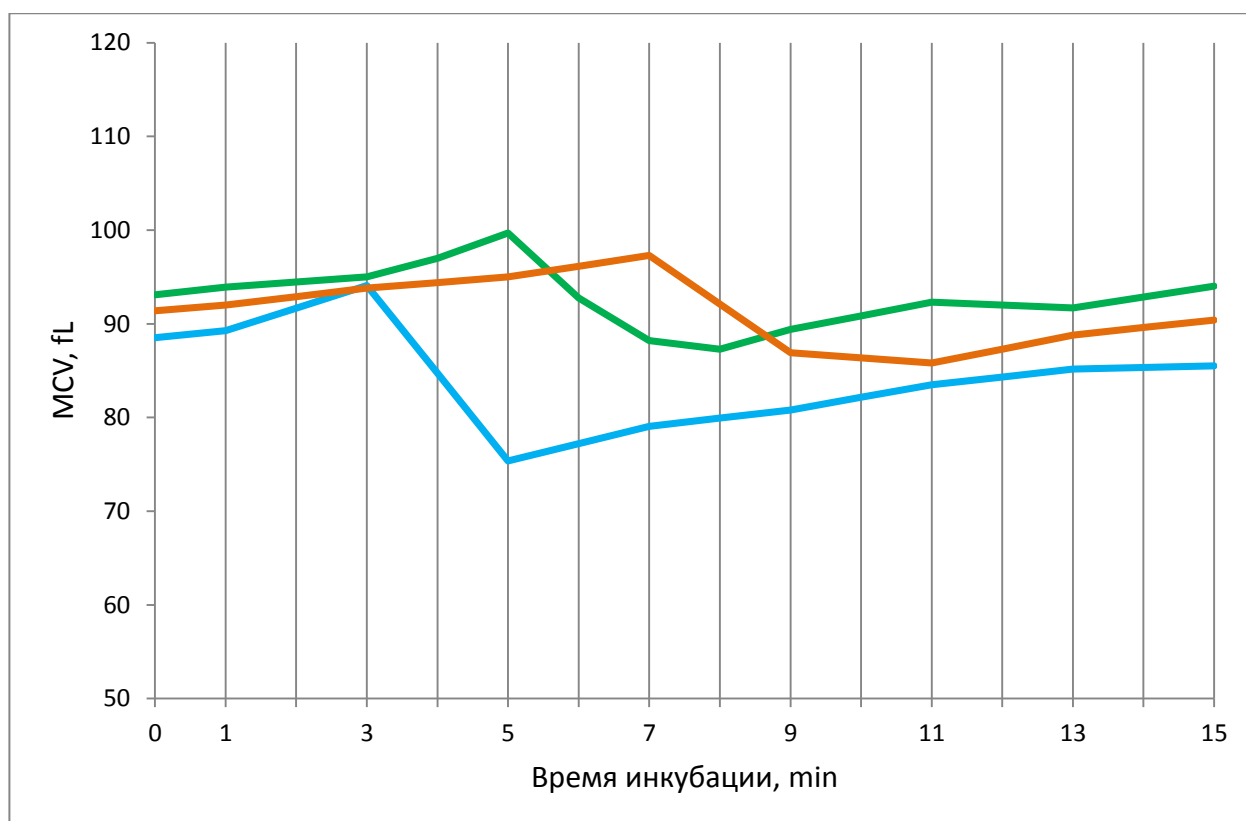


Рисунок 34 - Кривые изменения объема эритроцитов в аммонийной среде в пациентов с ХГ, ХБП 5 (диализ)

Таким образом, у больных ХБП, не зависимо от исходной нозологии, ответ эритроцитов при их помещении в аммонийную среду отличается от ответа эритроцитов здоровых людей. У пациентов с хронической болезнью почек эритроциты увеличиваются в объеме за более длительное время. Так, если в контрольной группе максимумы объема эритроцитов регистрируются на 1, 3 и 5 минутах, то у пациентов с хроническим гломерулонефритом подобные пики также наблюдаются на 7 минуте инкубации, а у пациентов с хроническим пиелонефритом не только на 7 минуте, но и на 9. По нашему мнению основную роль в подобном «запаздывании» в увеличении объема эритроцитов у пациентов с ХБП играет снижение активности мембранных ионных каналов, а в частности белка полосы 3.

В таблице 10 и на рисунках 35 и 36 приведены показатели изменения объема эритроцитов и скорости прироста объема эритроцитов у пациентов с ХБП, развившейся на фоне хронического пиелонефрита.

У пациентов с хроническим пиелонефритом показатель изменения объема эритроцитов (рисунок 35) в разных группах меняется незначительно и бессистемно. Достигнутый уровень p для критерия Краскала-Уоллиса также свидетельствует об отсутствии статистически значимых различий Δ MCV в группах сравнения. На этом фоне, можно проследить тенденцию к уменьшению скорости прироста объема эритроцитов (рисунок 36) у пациентов с хроническим пиелонефритом по сравнению с контролем. При этом наименьшая скорость прироста MCV зарегистрирована у пациентов с хроническим

пиелонефритом, получающих заместительную терапию гемодиализом. Однако данные изменения также статистически не значимы.

Таблица 10 - Показатели изменения объема эритроцитов (Δ MCV) и скорости прироста объема эритроцитов (U MCV) у пациентов с ХБП, развившейся на фоне хронического пиелонефрита

Группа	Δ MCV, fL	U MCV, fL/min
	Медиана (квартили)	
Контроль	7,95 (6,95; 8,73)	2,37 (1,87; 2,66)
ХП, ХБП 1	7,40 (6,10; 8,40)	1,83 (1,48; 2,10)
ХП, ХБП 2	8,40 (6,67; 9,80)	1,77 (1,62; 2,34)
ХП, ХБП 3	7,85 (5,58; 12,15)	2,06 (1,61; 2,62)
ХП, ХБП 4	8,00 (6,10; 9,20)	1,7 (1,46; 2,47)
ХП, ХБП 5 (до диализа)	8,60 (6,85; 10,30)	2,10 (1,32; 2,59)
ХП, ХБП 5 (диализ)	6,90 (4,70; 8,80)	1,46 (1,04; 2,30)
Критерий Краскала-Уоллиса, достигнутый уровень р	0,7458	0,3039
* - статистически значимые различия		

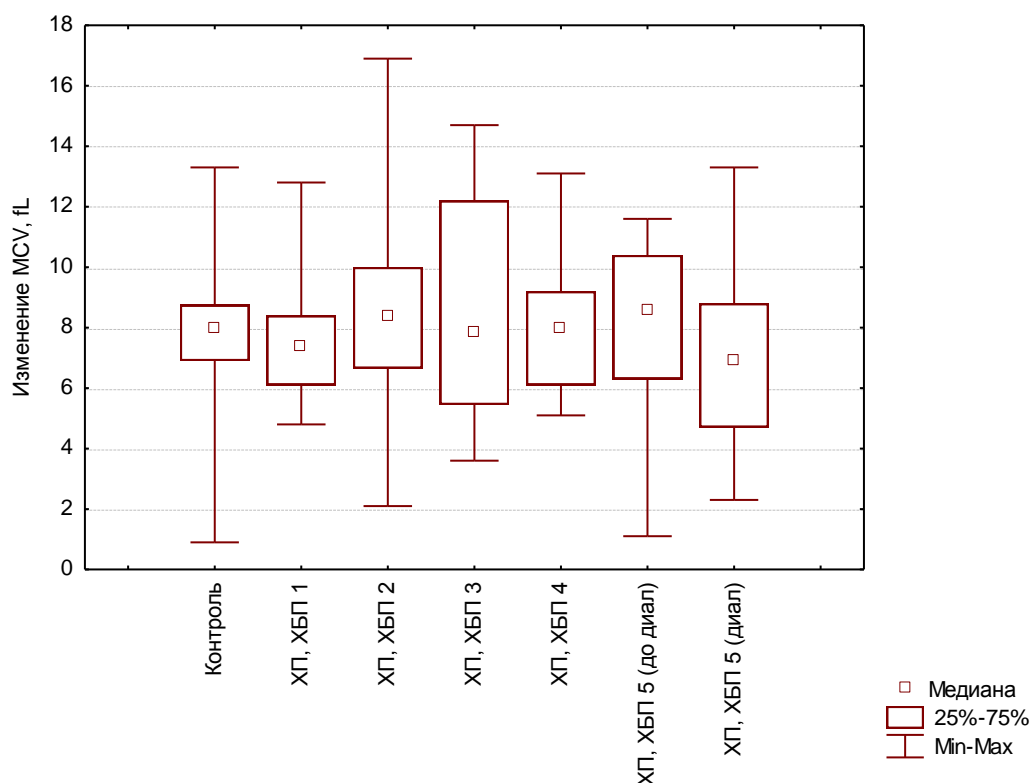


Рисунок 35 – Диаграммы изменения объема эритроцитов (Δ MCV) у пациентов с ХБП, развившейся на фоне хронического пиелонефрита

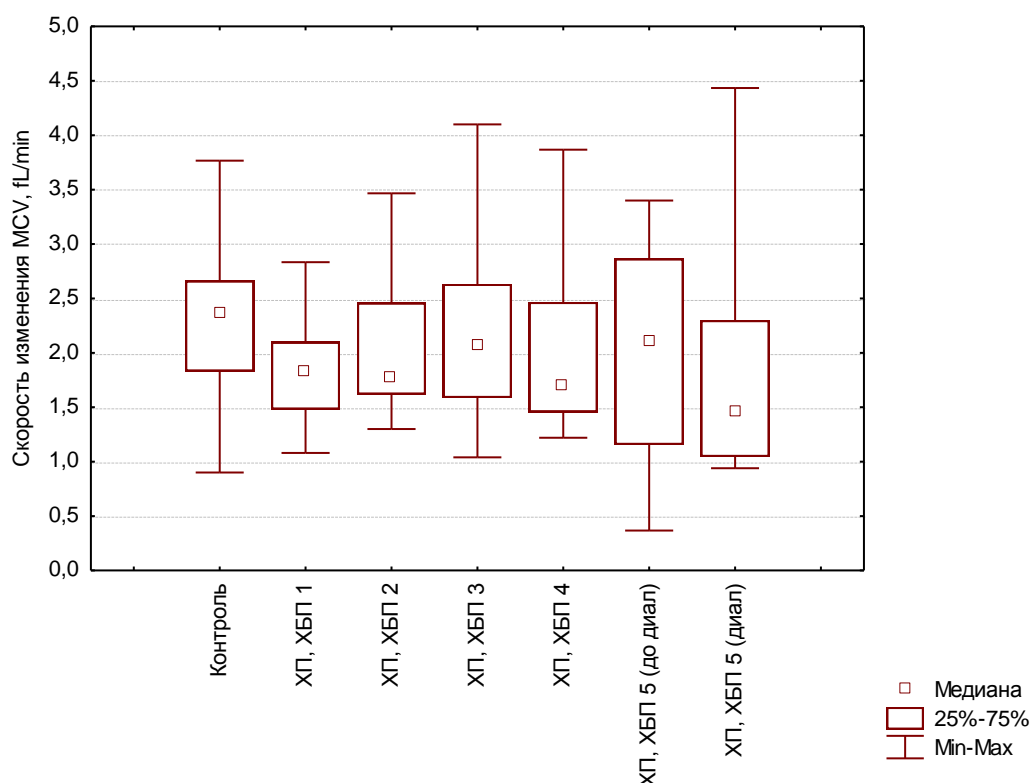


Рисунок 36 – Диаграммы изменения скорости прироста объема эритроцитов (U MCV) у пациентов с ХБП, развившейся на фоне хронического пиелонефрита

В таблице 11 и на рисунках 37 и 38 приведены показатели изменения объема эритроцитов и скорости прироста объема эритроцитов у пациентов с ХБП, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита.

Таблица 11 - Показатели изменения объема эритроцитов (Δ MCV) и скорости прироста объема эритроцитов (U MCV) у пациентов с ХБП, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита

Группа	Δ MCV, fL	U MCV, fL/min
	Медиана (квартили)	
Контроль	7,95 (6,95; 8,73)	2,37 (1,87; 2,66)
ХГ, ХБП 1	8,05 (3,51; 8,50)	1,65 (1,39; 1,78)
ХГ, ХБП 2	9,73 (9,29; 10,05)	1,88 (1,66; 1,96)
ХГ, ХБП 3	6,20 (5,40; 8,45)	2,07 (1,80; 2,82)
ХГ, ХБП 4	10,90 (6,03; 15,18)	2,14 (1,71; 2,75)
ХГ, ХБП 5 (диализ)	6,65 (5,60; 9,03)	1,61 (1,15; 2,05)
Критерий Краскала-Уоллиса, достигнутый уровень p	0,3426	0,0738
*-статистически значимые различия		

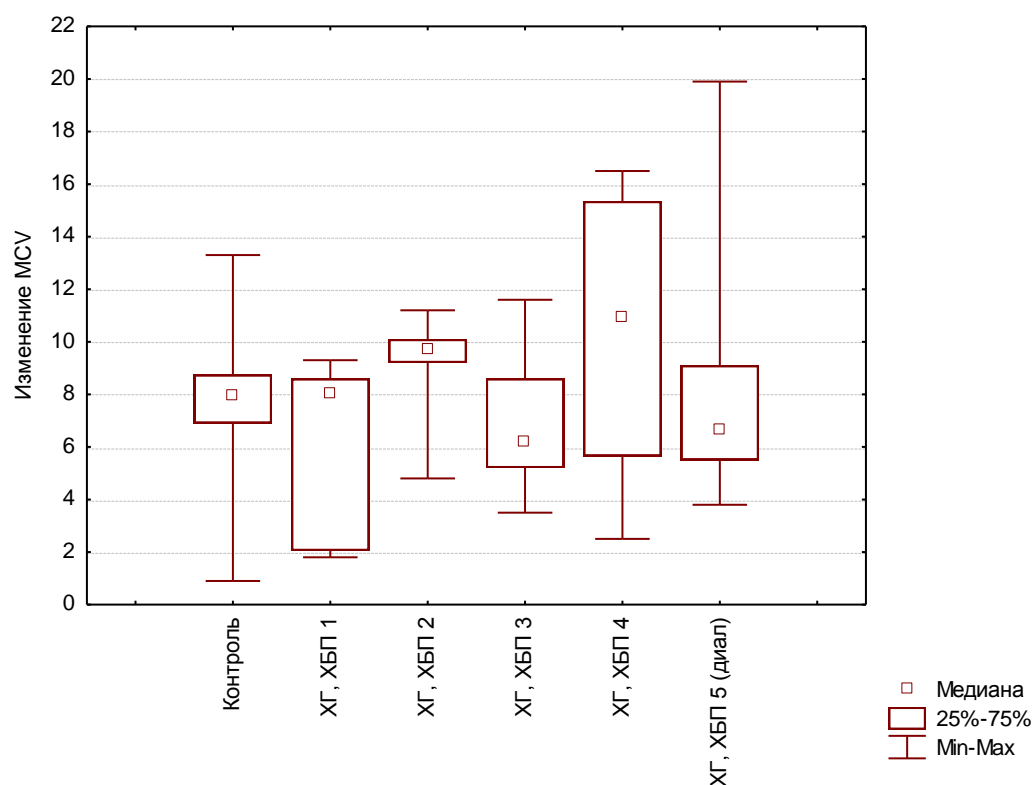


Рисунок 37 – Диаграммы изменения объема эритроцитов (Δ MCV) у пациентов с ХБП, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита

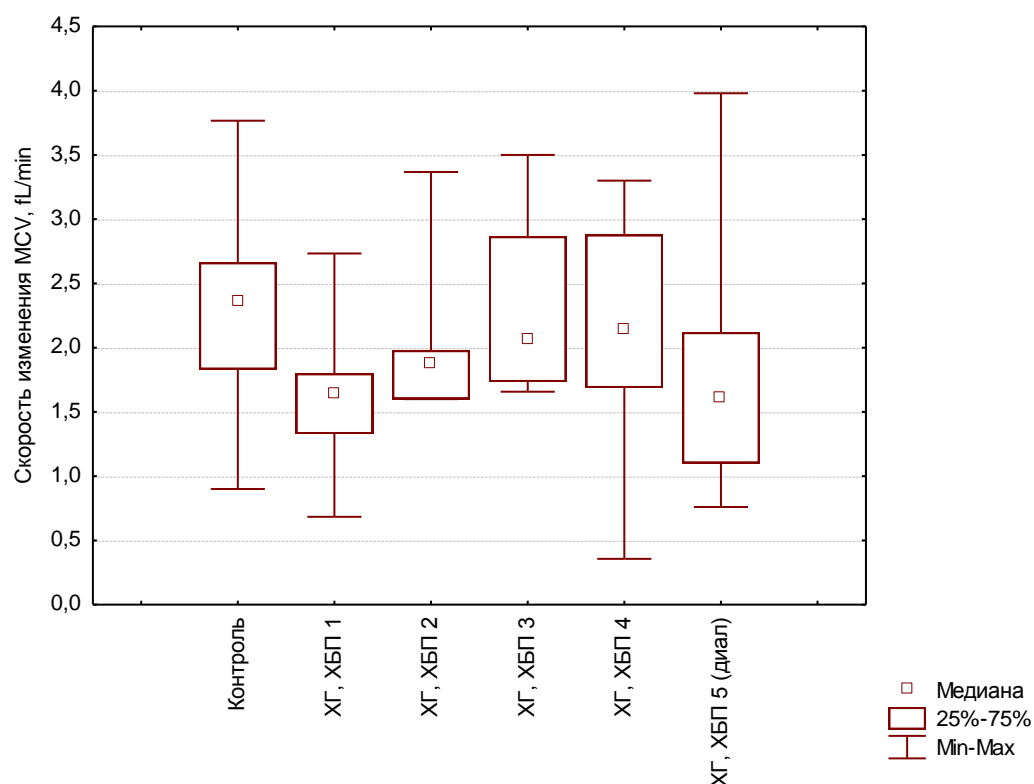


Рисунок 38 – Диаграммы изменения скорости прироста объема эритроцитов (U MCV) у пациентов с ХБП, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита

У пациентов с хроническим гломерулонефритом, как и у пациентов с хроническим пиелонефритом показатель Δ MCV (рисунок 37) меняется разнонаправленно и статистически не значимо. В изменении же показателя U MCV (рисунок 38) можно выделить слабый тренд. Так у пациентов с ХГ, ХБП 1 происходит резкое снижение скорости изменения объема эритроцитов, далее в группах ХГ, ХБП 2; ХГ, ХБП 3 и ХГ, ХБП 4 происходит плавное повышение данного показателя, и а у пациентов с ХГ, ХБП 5 он вновь резко снижается. У пациентов с хроническим гломерулонефритом, как и у больных хроническим пиелонефритом, минимальная скорость изменения объема эритроцитов наблюдается в группе больных, находящихся на гемодиализе.

В общем можно сказать, что снижение скорости изменения MCV у пациентов с хронической болезнью почек по сравнению со здоровыми людьми подтверждает наше предположение о снижении активности мембранных ионных каналов.

В ходе исследования нами выявлено, что при аммонийной нагрузке объем эритроцитов меняется как у здоровых людей, так и у пациентов с ХБП. Однако время и скорость изменения этого показателя в сравниваемых группах весьма различны. Если мы предположим, что объем эритроцитов стабильная величина и существует предел до которого эритроцит может набухать, то увеличение времени, за которое достигается этот предел указывает либо на снижение скорости ионного потока через мембрану, либо на снижение пропускной способности ионных обменников белка полосы 3, которые активируется в условиях аммонийной нагрузки. Снижение активности белков переносчиков рано или поздно приведет к гибели клетки, и в данном случае можно говорить о выживаемости эритроцитов в аммонийной среде.

Анализ выживаемости эритроцитов в аммонийной среде проводился методом Каплана – Мейера. Точкой гибели эритроцитов считалось время, после которого регистрировалось резкое снижение объема эритроцитов. Фактором, влияющим на функции дожития эритроцитов в аммонийной среде, являлись выделенные нами нозологические группы. Во всех исследуемых случаях в течение 15 минутной инкубации наблюдался разрыв мембраны эритроцита и снижение его объема. Таким образом, в анализе отсутствовали цензурированные наблюдения.

Результаты анализа выживаемости эритроцитов пациентов с ХБП, развившейся на фоне хронического пиелонефрита представлены в таблицах 12 и 13 и на рисунке 39.

Согласно таблице дожития у здоровых людей в 15,6 % случаев эритроциты лизировались в период между 1 и 3 минутами инкубации, т.е. не доживали до замера объема эритроцитов на 3 минуте, в 75 % случаев эритроциты подвергались гемолизу между 3 и 5 минутами инкубации, в 100 % случаев - между 5 и 7 минутами. Таким образом, эритроциты здоровых людей максимально могут пережить чуть более 5 минут инкубации в аммонийной среде.

Таблица 12 – Дожитие эритроцитов у пациентов с ХБП, развившейся на фоне хронического пиелонефрита, при инкубации их крови в аммонийной среде в течение 15 минут

Точка гибели эритроцитов (время, после которого регистрировалось резкое снижение объема эритроцитов)	Кумулятивная доля выживших эритроцитов на момент времени	
	Оценка	Станд. ошибка
Здоровые люди		
1 минута	0,844	0,064
3 минута	0,250	0,077
5 минута	0,000	0,000
Пациенты с ХП, ХБП 1		
1 минута	-	-
3 минута	0,529	0,121
5 минута	0,118	0,078
7 минута	0,000	0,000
Пациенты с ХП, ХБП 2		
1 минута	0,950	0,049
3 минута	0,650	0,107
5 минута	0,100	0,067
7 минута	0,000	0,000
Пациенты с ХП, ХБП 3		
1 минута	0,917	0,080
3 минута	0,500	0,144
5 минута	0,167	0,108
7 минута	0,083	0,080
9 минута	0,000	0,000
Пациенты с ХП, ХБП 4		
1 минута	-	-
3 минута	0,444	0,166
5 минута	0,222	0,139
7 минута	0,111	0,105
9 минута	0,000	0,000
Пациенты с ХП, ХБП 5 (до диализа)		
1 минута	-	-
3 минута	0,429	0,187
5 минута	0,143	0,132
7 минута	-	-
9 минута	0,000	0,000
Пациенты с ХП, ХБП 5 (диализ)		
1 минута	0,778	0,139
3 минута	0,556	0,166
5 минута	0,222	0,136
7 минута	-	-
9 минута	0,000	0,000
Примечание - Лог ранговый критерий при оценке линейного тренда для уровней фактора (группы) значим на уровне $p = 0,007$		

Анализ выживаемости эритроцитов пациентов с ХП, ХБП 1 стадий показал, что у 47,1 % пациентов эритроциты лизировались между 3 и 5 минутами инкубации, у 88,2 % - между 5 и 7 минутами, у 100 % - между 7 и 9 минутами. Эритроциты у пациентов с ХП, ХБП 2 стадии в 5 % случаев погибали между 1 и 3 минутами инкубации, в 35 % - между 3 и 5 минутами, в 90 % - между 5 и 7 минутами, в 100 % - между 7 и 9 минутами. В группе больных с ХП, ХБП 3 стадии гемолиз эритроцитов регистрировался между 1 и 3 минутами инкубации у 8,3 % обследованных; между 3 и 5 минутами - у 50 %; между 5 и 7 минутами - у 83,3 %; между 7 и 9 минутами – у 91,7 %; между 9 и 11 минутами – у 100 %. У больных с ХП, ХБП 4 стадии эритроциты подвергались гемолизу между 3 и 5 минутами инкубации в 55,6 % случаев; между 5 и 7 минутами – в 77,8 %; между 7 и 9 минутами – в 88,9 %; между 9 и 11 минутами – в 100 %. В группе больных с ХП, ХБП 5 стадии (до диализа) у 57,1 % пациентов эритроциты лизировались между 3 и 5 минутами инкубации, у 85,7 % - между 5 и 9 минутами, у 100 % - между 9 и 11 минутами. В группе больных с ХП, ХБП 5 стадии (диализ) гемолиз эритроцитов наблюдался между 1 и 3 минутами инкубации у 22,2 % обследованных; между 3 и 5 минутами - у 44,4 %; между 5 и 9 минутами - у 77,8 %; между 9 и 11 минутами – у 100 %. Следовательно, эритроциты пациентов с хроническим пиелонефритом более стабильны, чем в контроле, и максимально могут прожить чуть более 9 минут в аммонийной среде.

Таблица 13 – Средние времени дожития эритроцитов у пациентов с ХБП, развившейся на фоне хронического пиелонефрита, при инкубации их крови в аммонийной среде в течение 15 минут

Группа	Оценка	Станд. ошибка	95% доверительный интервал	
			Нижний	Верхний
Контроль	3,188	0,226	2,744	3,631
ХП, ХБП 1	4,294	0,340	3,627	4,961
ХП, ХБП 2	4,400	0,328	3,758	5,042
ХП, ХБП 3	4,333	0,620	3,119	5,548
ХП, ХБП 4	4,556	0,729	3,127	5,984
ХП, ХБП 5 (до диал)	4,429	0,841	2,780	6,077
ХП, ХБП 5 (диал)	4,556	0,988	2,620	6,491

В среднем во всех группах больных хроническим пиелонефритом время дожития эритроцитов в аммонийной среде больше контрольного. Сравнение функций выживаемости эритроцитов в изучаемых группах показало статистически значимые различия. Таким образом, как это не парадоксально, дисфункция ионных каналов и торможение мембранного транспорта привели к тому, что эритроциты пациентов с хроническим пиелонефритом обладают более высокой выживаемостью в аммонийной среде по сравнению со здоровыми людьми.

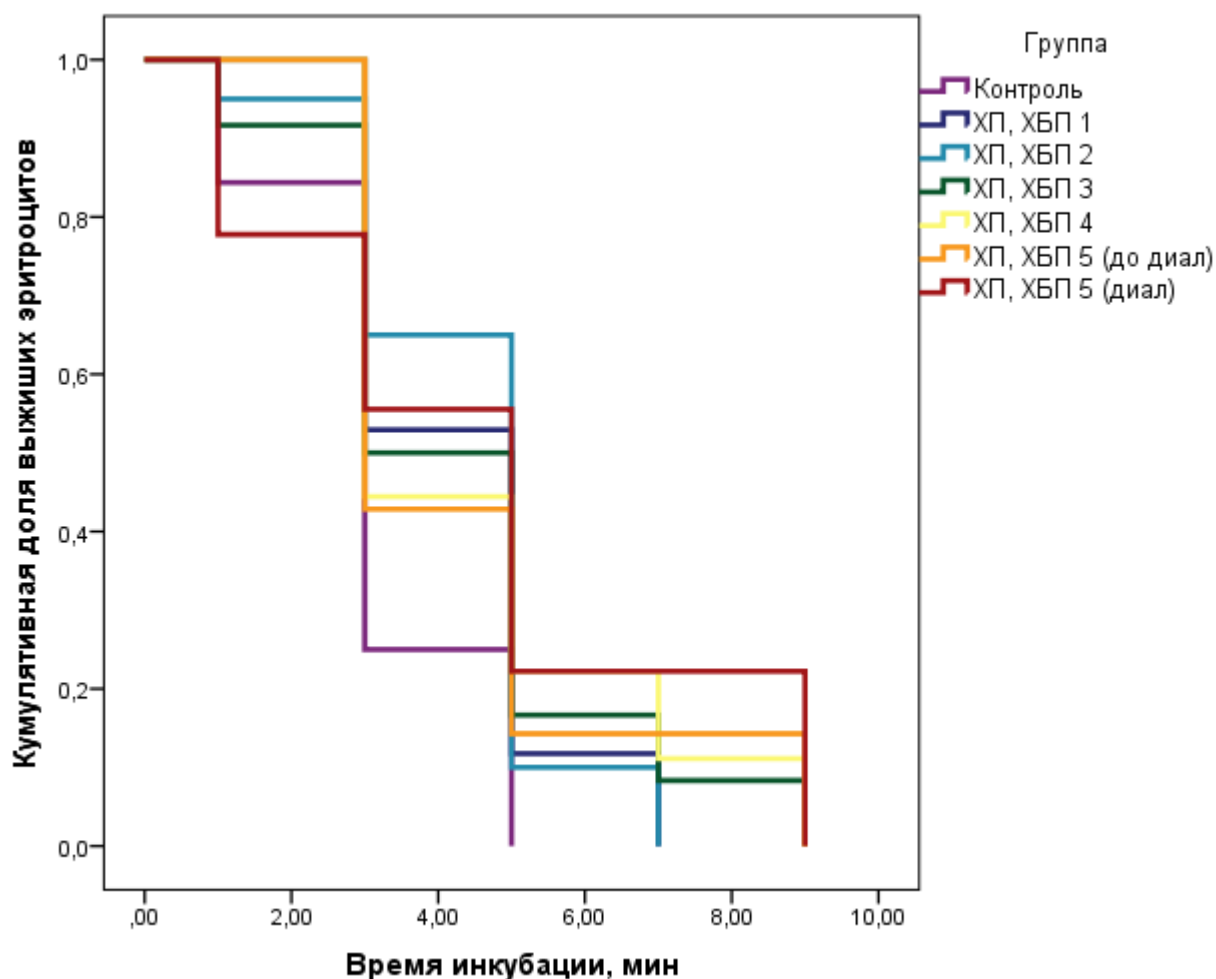


Рисунок 39 - Графики функций дожития эритроцитов у пациентов с ХБП, развившейся на фоне хронического пиелонефрита, при инкубации их крови в аммонийной среде в течение 15 минут

В таблицах 14 и 15 и на рисунке 40 представлены результаты анализа выживаемости эритроцитов пациентов с ХБП, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита.

Эритроциты у пациентов с ХГ, ХБП 1 стадии в 16,7 % случаев погибали между 1 и 3 минутами инкубации, в 50 % - между 3 и 5 минутами, в 83,3 % - между 5 и 7 минутами, в 100 % - между 7 и 9 минутами. В группе больных с ХГ, ХБП 2 стадии гемолиз эритроцитов регистрировался между 3 и 5 минутами инкубации у 33,3 % обследованных; между 5 и 7 минутами - у 83,3 %; между 7 и 9 минутами - у 100 %. У больных с ХГ, ХБП 3 стадии эритроциты подвергались гемолизу между 1 и 3 минутами инкубации в 14,3 % случаев; между 3 и 7 минутами – в 85,7 %; между 7 и 9 минутами – в 100 %. В группе больных с ХП, ХБП 4 стадии у 25 % пациентов эритроциты лизировались между 3 и 5 минутами инкубации, у 75 % - между 5 и 7 минутами, у 100 % - между 7 и 9 минутами. В группе больных с ХП, ХБП 5 стадии (диализ) гемолиз эритроцитов наблюдался между 3 и 5 минутами инкубации у 20 % обследованных; между 5 и 7 минутами - у 90 %; между 7 и 9 минутами - у 100 %.

%. Таким образом, эритроциты пациентов с хроническим гломерулонефритом максимально могут выдержать чуть более 7 минут в аммонийной среде.

Таблица 14 – Дожитие эритроцитов у пациентов с ХБП, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита, при инкубации их крови в аммонийной среде в течение 15 минут

Точка гибели эритроцитов (время, после которого регистрировалось резкое снижение объема эритроцитов)	Кумулятивная доля выживших эритроцитов на момент времени	
	Оценка	Станд. ошибка
Здоровые люди		
1 минута	0,844	0,064
3 минута	0,250	0,077
5 минута	0,000	0,000
Пациенты с ХГ, ХБП 1		
1 минута	0,833	0,152
3 минута	0,500	0,204
5 минута	0,167	0,152
7 минута	0,000	0,000
Пациенты с ХГ, ХБП 2		
1 минута	-	-
3 минута	0,667	0,192
5 минута	0,167	0,152
7 минута	0,000	0,000
Пациенты с ХГ, ХБП 3		
1 минута	0,857	0,132
3 минута	0,143	0,132
5 минута	-	-
7 минута	0,000	0,000
Пациенты с ХГ, ХБП 4		
1 минута	-	-
3 минута	0,750	0,153
5 минута	0,250	0,153
7 минута	0,000	0,000
Пациенты с ХГ, ХБП 5 (диализ)		
1 минута	-	-
3 минута	0,800	0,126
5 минута	0,100	0,095
7 минута	0,000	0,000
Примечание - Лог ранговый критерий при оценке линейного тренда для уровней фактора (группы) значим на уровне $p = 0,001$		

В среднем в группах больных хроническим гломерулонефритом, как и в группах пациентов с хроническим пиелонефритом, время жизни эритроцитов в аммонийной среде больше, чем у здоровых людей. Функции дожития

эритроцитов у пациентов с хроническим гломерулонефритом также значительно отличаются от контрольных. Таким образом, данные о том, что эритроциты пациентов с ХБП обладают более высокой выживаемостью в аммонийной среде по сравнению с контролем подтвердились и в группе пациентов с хроническим гломерулонефритом.

Таблица 15 – Средние времени дожития эритроцитов у пациентов с ХБП, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита, при инкубации их крови в аммонийной среде в течение 15 минут

Группа	Оценка	Станд. ошибка	95% доверительный интервал	
			Нижний	Верхний
Контроль	3,188	0,226	2,744	3,631
ХГ, ХБП 1	4,000	0,856	2,322	5,678
ХГ, ХБП 2	4,667	0,615	3,462	5,871
ХГ, ХБП 3	3,286	0,680	1,953	4,619
ХГ, ХБП 4	5,000	0,535	3,952	6,048
ХГ, ХБП 5 (диал)	4,800	0,359	4,096	5,504

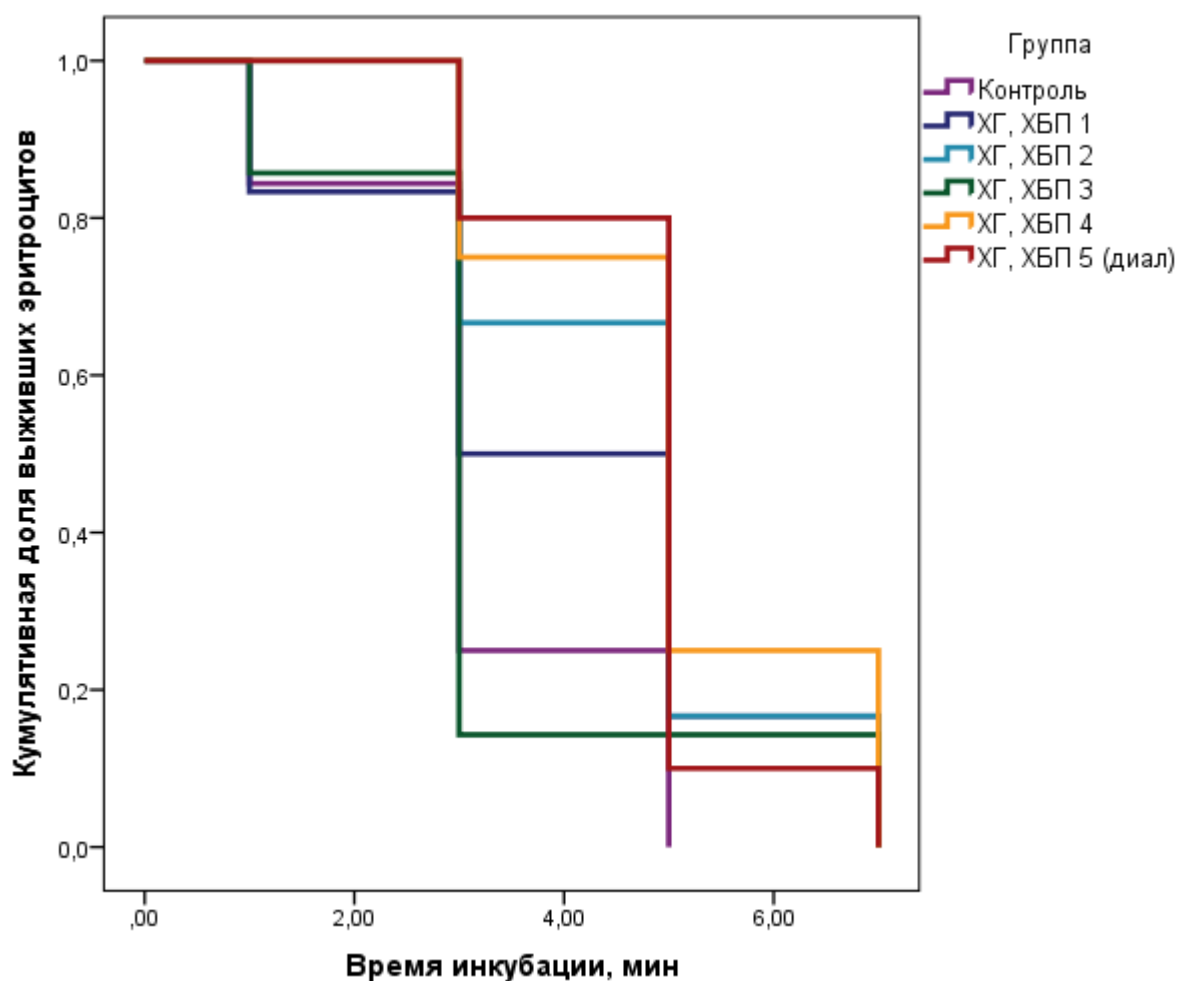


Рисунок 40 - Графики функций дожития эритроцитов у пациентов с ХБП, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита, при инкубации их крови в аммонийной среде в течение 15 минут

3.2 Исследование сорбционных свойств эритроцитов

В таблице 16 и на рисунках 41 - 44 представлены результаты определения сорбционной емкости эритроцитов, количества молекул средней массы и фрагментов внеклеточных нуклеиновых кислот, адсорбированных на мембранах эритроцитов у пациентов с ХБП различной стадии, развившейся на фоне хронического пиелонефрита.

Таблица 16 – Показатели сорбционных свойств эритроцитов пациентов с ХБП различной стадии, развившейся на фоне хронического пиелонефрита

Группа	Статистическая величина	Вещества, адсорбированные на мембранах эритроцитов			
		Метиленовый синий, %	Средние молекулы, отн. ед.	Фрагменты вкРНК, мкг/мл	Фрагменты вкДНК, мкг/мл
Контроль	Медиана	58,91	0,143	0,069	0,050
	Нижний квартиль	52,63	0,127	0,053	0,045
	Верхний квартиль	62,75	0,165	0,086	0,055
ХП 1	Медиана	65,64	0,143	0,070	0,054
	Нижний квартиль	60,34	0,133	0,053	0,050
	Верхний квартиль	67,66	0,158	0,103	0,058
ХП 2	Медиана	64,89	0,144	0,087	0,056
	Нижний квартиль	59,51	0,131	0,055	0,049
	Верхний квартиль	67,11	0,161	0,101	0,059
ХП 3	Медиана	62,99	0,156	0,074	0,058
	Нижний квартиль	58,65	0,150	0,056	0,058
	Верхний квартиль	67,96	0,165	0,108	0,069
ХП 4	Медиана	60,56	0,170	0,079	0,060
	Нижний квартиль	56,93	0,164	0,061	0,054
	Верхний квартиль	64,07	0,178	0,106	0,068
ХП 5.1 (до диализа)	Медиана	67,00	0,187	0,088	0,075
	Нижний квартиль	64,30	0,149	0,066	0,066
	Верхний квартиль	69,19	0,190	0,098	0,078
ХП 5.2 (диализ)	Медиана	61,78	0,176	0,103	0,061
	Нижний квартиль	59,88	0,161	0,076	0,055
	Верхний квартиль	66,83	0,189	0,129	0,069
Критерий Краскала-Уоллиса, достигнутый уровень р		0,0132*	0,0000*	0,0181*	0,0000*
* - статистически значимые различия					

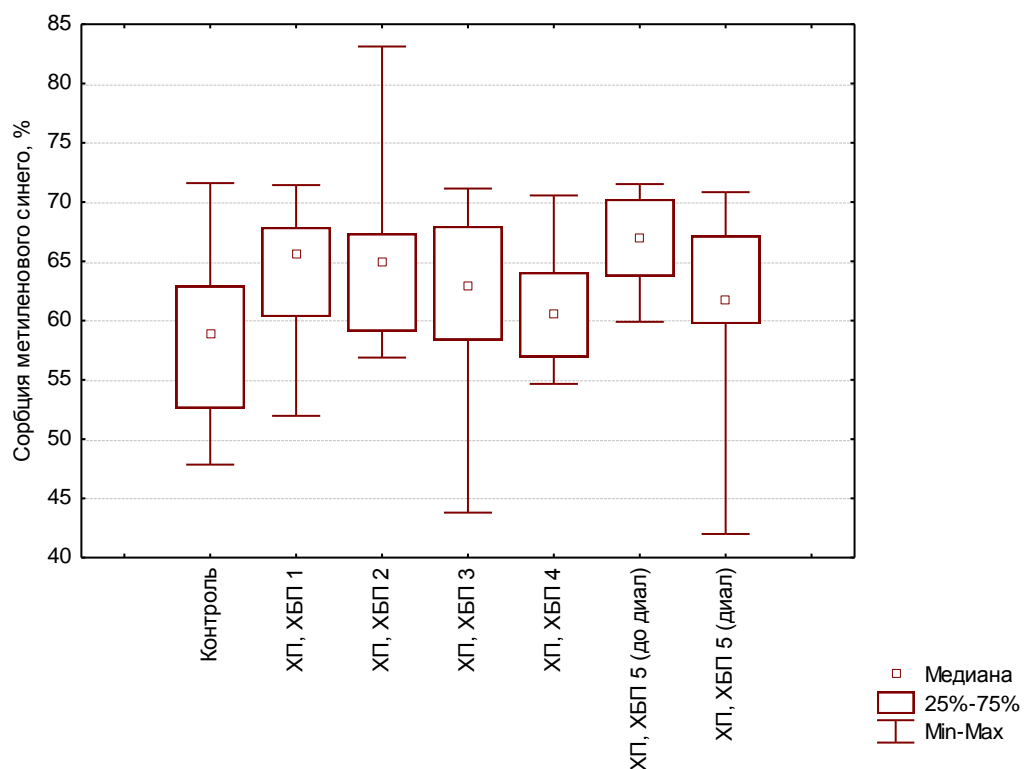


Рисунок 41 – Диаграммы изменения сорбционной емкости эритроцитов пациентов с ХПБ различной стадии, развившейся на фоне хронического пиелонефрита

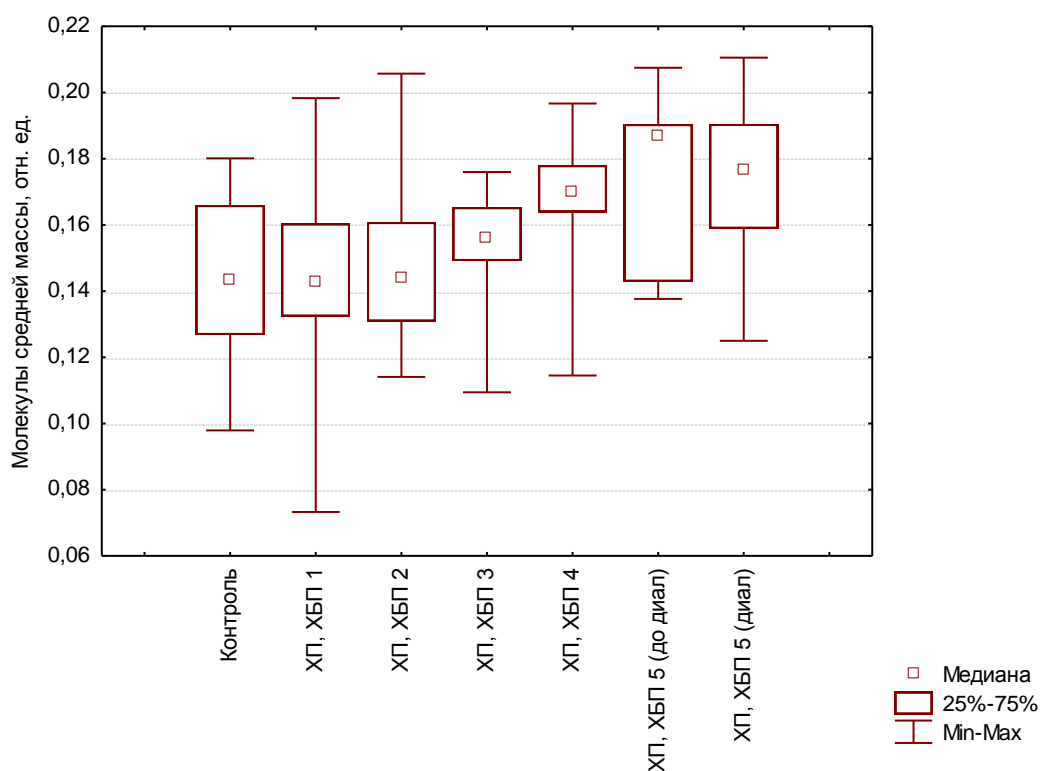


Рисунок 42 – Диаграммы изменения абсорбции молекул средней массы на эритроцитах пациентов с ХПБ различной стадии, развившейся на фоне хронического пиелонефрита

Во всех группах больных хроническим пиелонефритом сорбционная емкость эритроцитов, определяемая по адсорбция метиленового синего на мембранах клеток, выше контрольного значения. Так у пациентов с ХП, ХБП 1 данный показатель выше контрольного на 11,42 %, у пациентов с ХП, ХБП 2 - на 10,15 %, у пациентов с ХП, ХБП 3 - на 6,93 %, у пациентов с ХП, ХБП 4 - на 2,80 %. Заметно, что при прогрессировании ХБП от 1 до 4 стадии сорбционная емкость эритроцитов постепенно снижается, но так и не достигает контрольного значения. Однако у больных ХП, ХБП 5 стадии еще не получающих гемодиализ адсорбция метиленового синего на эритроцитах вновь резко возрастает и превышает контрольное значение на 13,73 %. При переводе пациентов с ХП, ХБП 5 стадии на гемодиализ сорбционная емкость снижется, теперь данный показатель превышает контроль лишь на 4,87 %.

В группах больных ХП, ХБП 1 и ХП, ХБП 2 показатель адсорбции молекул средней массы на мембранах эритроцитов не отличается от контроля. Далее с прогрессированием ХБП увеличивается и количество средних молекул на мембранах эритроцитов. В группе пациентов с ХП, ХБП 3 данный показатель выше контроля на 9,09 %, в группе ХП, ХБП 4 – на 18,88 %, в группе ХП, ХБП 5 (до диализа) – на 30,77 %. У пациентов с ХП, ХБП 5 стадии, получающих гемодиализ, адсорбция молекул средней массы на эритроцитах ниже, чем у таких же пациентов, которые еще не получают гемодиализ, но все же выше, чем у здоровых людей на 23,08 %.

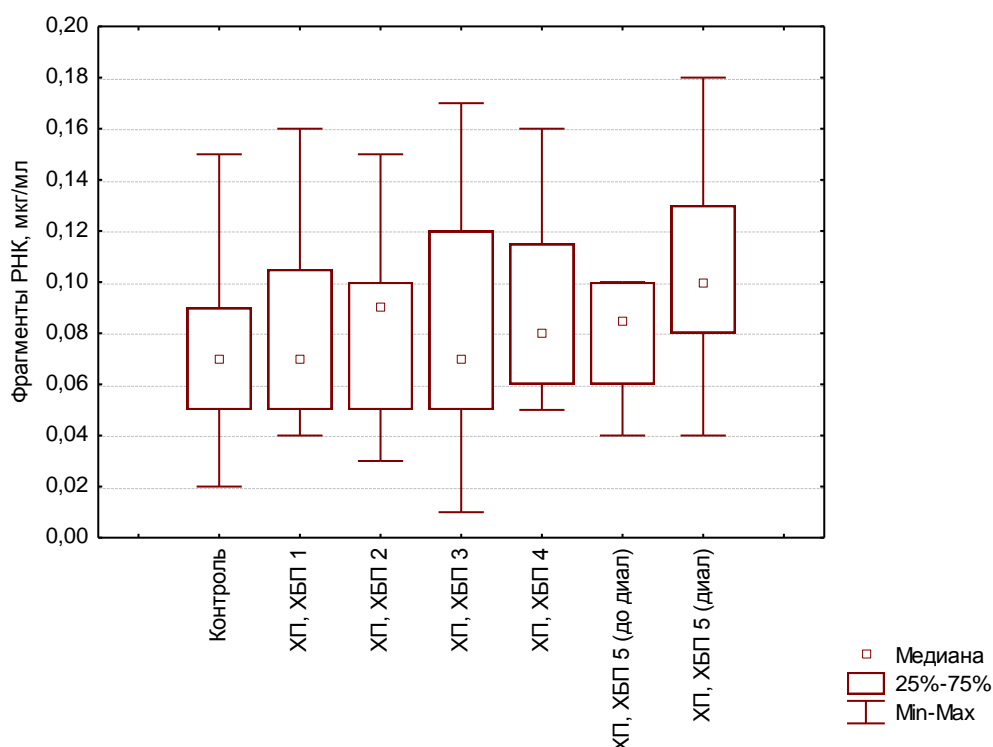


Рисунок 43 – Диаграммы изменения количества внеклеточных фрагментов РНК, сорбированных на мембранах эритроцитов пациентов с ХПБ различной стадии, развившейся на фоне хронического пиелонефрита

На мембранах эритроцитов пациентов с хроническим пиелонефритом сорбируется большее количество внеклеточных фрагментов РНК, чем на мембранах здоровых людей. В группе больных с ХП, ХБП 1 данный показатель практически не отличается от контрольного, в группе больных с ХП, ХБП 2 он превышает контроль на 26,09 %, в группе ХП, ХБП 3 – на 7,25 %, группе ХП, ХБП 4 – 14,49 %, на группе ХП, ХБП 5 (до диализа) – на 27,54 %, группе ХП, ХБП 5 (диализ) – на 49,28 %. Таким образом, можно сделать вывод, что перевод пациентов на гемодиализ не снижает количество внеклеточных фрагментов РНК на мембранах эритроцитов.

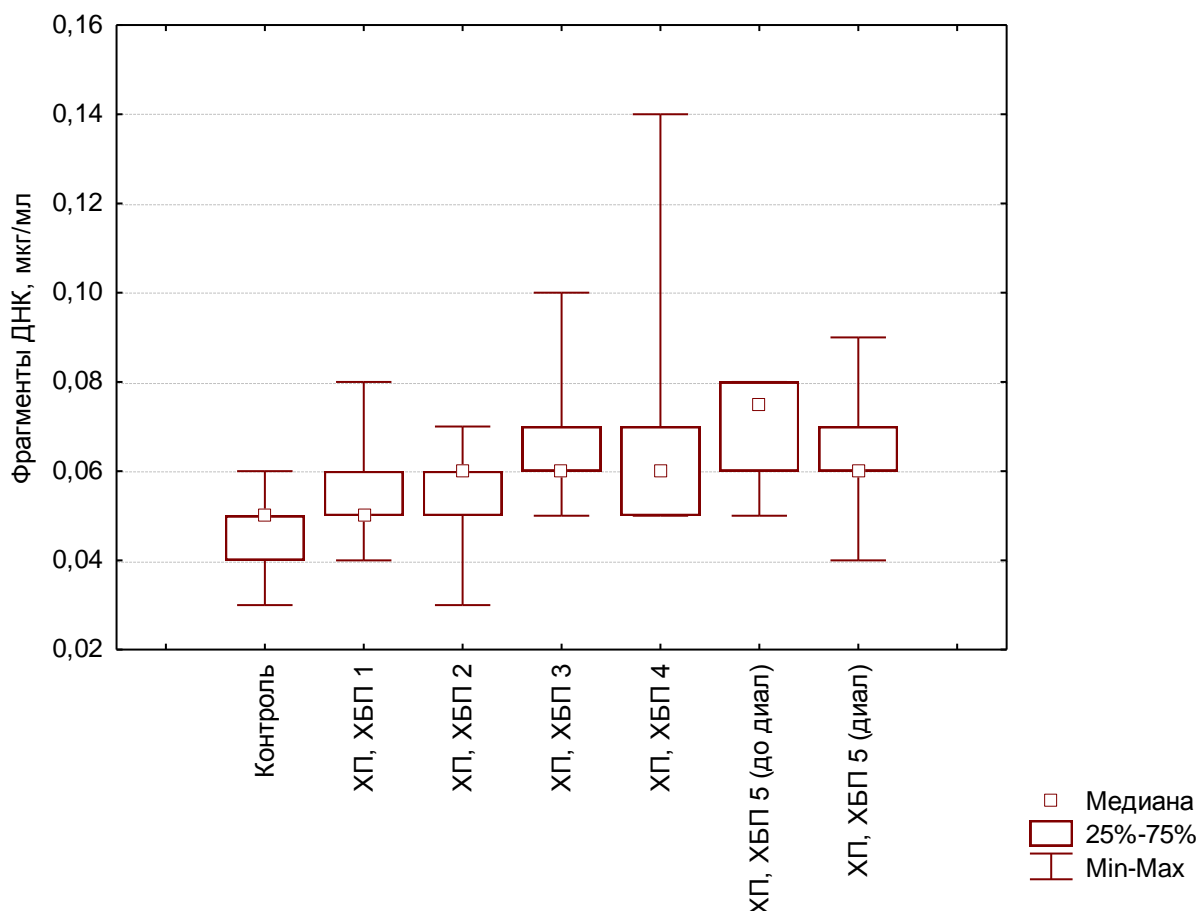


Рисунок 44 – Диаграммы изменения количества внеклеточных фрагментов ДНК, сорбированных на мембранах эритроцитов пациентов с ХПБ различной стадии, развившейся на фоне хронического пиелонефрита

Количество внеклеточных фрагментов ДНК, сорбированных на мембранах эритроцитов у пациентов с хроническим пиелонефритом выше, чем у здоровых людей. У больных ХП, ХБП 1 количество фрагментов ДНК, адсорбированных на мембранах эритроцитов выше контрольного значения на 8 %, у больных с ХП, ХБП 2 – на 12 %, у больных с ХП, ХБП 3 – на 16 %, у больных с ХП, ХБП 4 – на 20 %, у больных с ХП, ХБП 5 (до диализа) – на 50 %, у больных с ХП, ХБП 5 (диализ) – на 22 %. Тенденция изменения данного показателя у пациентов с хроническим пиелонефритом сопоставима с тенденциями изменения сорбционной емкости эритроцитов и количества

молекул средней массы на их мембранах. Таким образом, у пациентов с ХП, ХБП 5 стадии, получающих гемодиализ, количество внеклеточных фрагментов ДНК, сорбированных на мембранах эритроцитов, ниже, чем у пациентов с ХП, ХБП 5 стадии, не получающих заместительную почечную терапию гемодиализом.

В таблице 17 и на рисунках 45 – 48 представлены результаты определения сорбционной емкости эритроцитов, количества молекул средней массы и фрагментов внеклеточных нуклеиновых кислот, адсорбированных на мембранах эритроцитов у пациентов с ХБП различной стадии, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита.

Таблица 17 – Показатели сорбционных свойств эритроцитов пациентов с ХБП различной стадии, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита

Группа	Статистическая величина	Вещества, адсорбированные на мембранах эритроцитов			
		Метиленовый синий, %	Средние молекулы, отн. ед.	Фрагменты вкРНК, мкг/мл	Фрагменты вкДНК, мкг/мл
Контроль	Медиана	58,91	0,143	0,069	0,050
	Нижний квартиль	52,63	0,127	0,053	0,045
	Верхний квартиль	62,75	0,165	0,086	0,055
ХГ 1	Медиана	58,97	0,149	0,085	0,060
	Нижний квартиль	58,21	0,116	0,076	0,051
	Верхний квартиль	65,12	0,156	0,101	0,066
ХГ 2	Медиана	62,04	0,143	0,088	0,055
	Нижний квартиль	51,59	0,139	0,079	0,054
	Верхний квартиль	67,46	0,172	0,112	0,059
ХГ 3	Медиана	62,43	0,162	0,083	0,061
	Нижний квартиль	59,45	0,131	0,035	0,058
	Верхний квартиль	63,63	0,171	0,092	0,061
ХГ 4	Медиана	66,13	0,165	0,122	0,069
	Нижний квартиль	57,22	0,148	0,086	0,064
	Верхний квартиль	67,57	0,185	0,138	0,070
ХГ 5 (диализ)	Медиана	60,92	0,180	0,127	0,061
	Нижний квартиль	55,90	0,164	0,092	0,052
	Верхний квартиль	63,81	0,192	0,137	0,070
Критерий Краскала-Уоллиса, достигнутый уровень р		0,6604	0,0007*	0,0015*	0,0008*
* - статистически значимые различия					

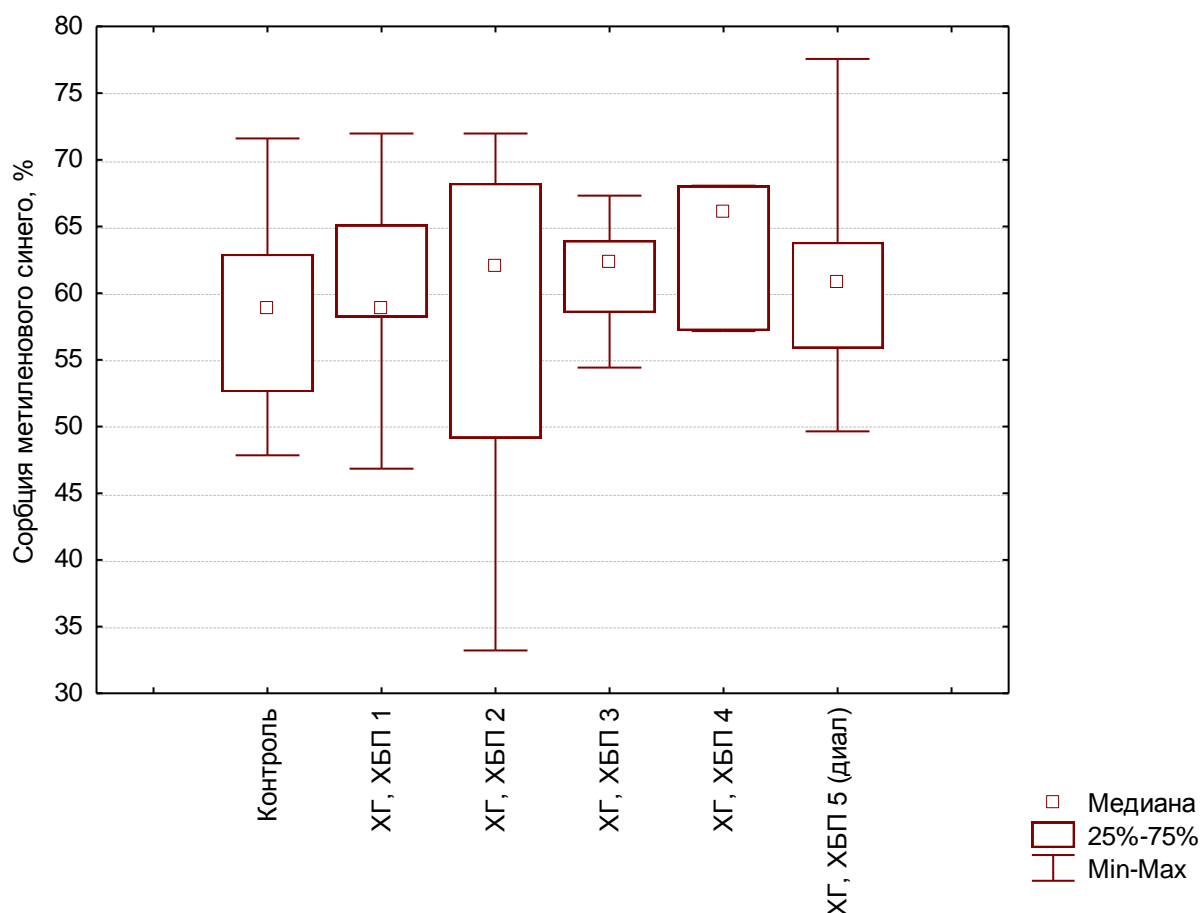


Рисунок 45 – Диаграммы изменения сорбционной емкости эритроцитов пациентов с ХПБ различной стадии, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита

У пациентов с ХГ, ХБП 1 стадии показатель сорбционной емкости эритроцитов практически соответствует контрольному значению. В остальных группах больных хроническим гломерулонефритом этот показатель выше, чем у здоровых людей. Так у пациентов с ХГ, ХБП 2 сорбционная емкость эритроцитов выше, чем в контроле на 5,31 %, у пациентов с ХГ, ХБП 3 - на 5,98 %, у пациентов с ХГ, ХБП 4 - на 12,26 %, у пациентов с ХГ, ХБП 5 (диализ) - на 3,41 %. Таким образом, перевод пациентов с хроническим гломерулонефритом на заместительную почечную терапию приводит к снижению сорбционной емкости эритроцитов.

Также следует отметить, что у больных хроническим гломерулонефритом при прогрессировании ХБП от 1 до 4 стадии сорбционная емкость эритроцитов постепенно повышается. А у пациентов с хроническим пиелонефритом прогрессирование ХБП от 1 до 4 стадии наоборот приводит к постепенному снижению изначально более высокого показателя сорбционной емкости эритроцитов.

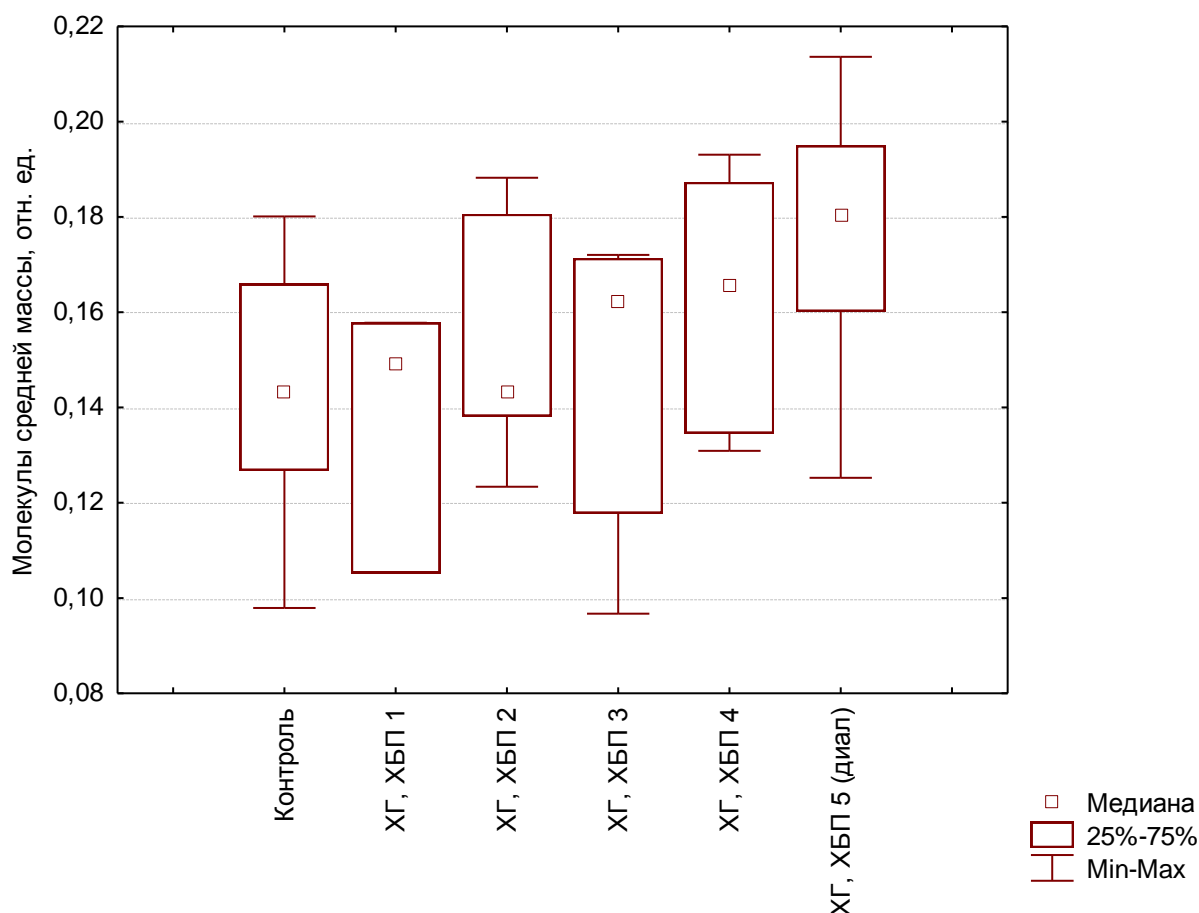


Рисунок 46 – Диаграммы изменения абсорбции молекул средней массы на эритроцитах пациентов с ХПБ различной стадии, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита

У пациентов с ХГ, ХБП 1 количество средних молекул на мембранах эритроцитов практически не отличается от контроля, а у больных ХГ, ХБП 2 данный показатель вообще равен контрольному. При прогрессировании ХБП от 3 до 5 стадии адсорбция молекул средней массы на мембранах эритроцитов увеличивается. У пациентов с ХГ, ХБП 3 данный показатель превышает контрольное значение на 13,29 %, у пациентов с ХГ, ХБП 4 – на 15,39 %, у пациентов с ХГ, ХБП 5 (диализ) – на 25,87 %. Таким образом, у пациентов с хроническим гломерулонефритом наибольшее количество средних молекул на эритроцитах зарегистрировано у диализных пациентов.

Среди больных с хроническим гломерулонефритом отсутствует группа додиализных пациентов с ХБП 5 стадии. И, если сравнить изменения адсорбции молекул средней массы на мембранах эритроцитов в группах пациентов с хроническим гломерулонефритом и хроническим пиелонефритом, без учета группы ХП, ХБП 5 (до диализа), то можно сделать вывод, что тренды, полученные в обеих группах, окажутся абсолютно идентичными.

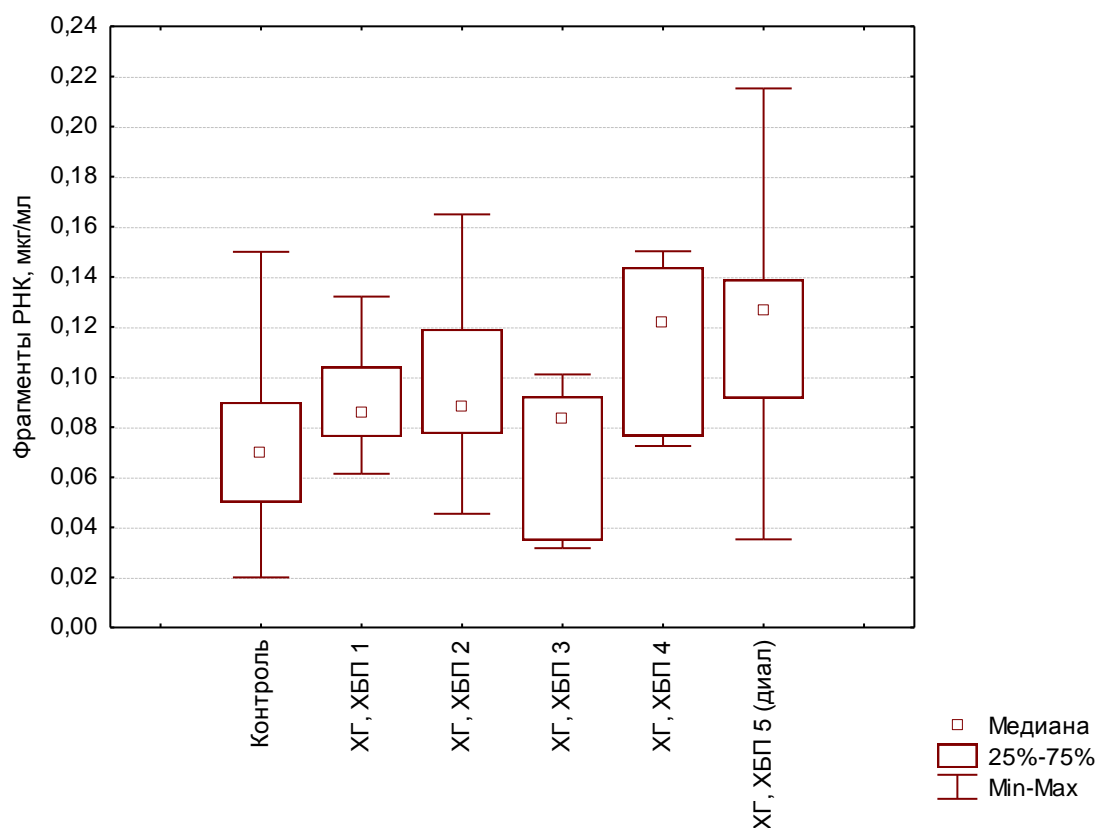


Рисунок 47 – Диаграммы изменения количества внеклеточных фрагментов РНК, сорбированных на мембранах эритроцитов пациентов с ХГБ различной стадии, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита

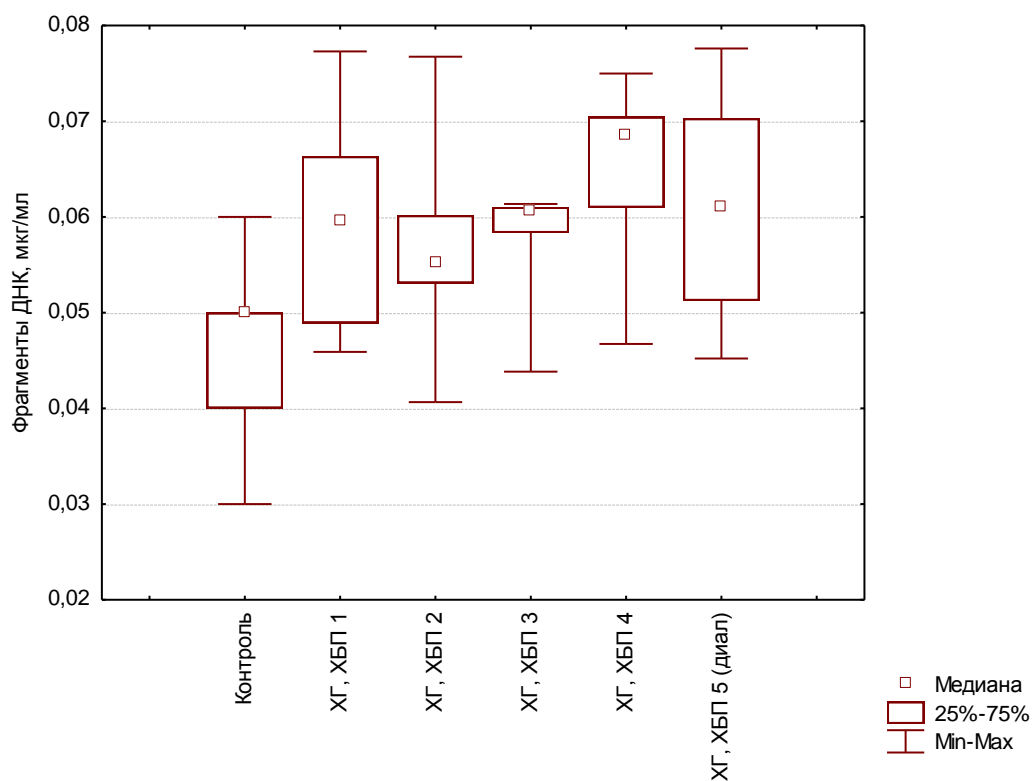


Рисунок 48 – Диаграммы изменения количества внеклеточных фрагментов ДНК, сорбированных на мембранах эритроцитов пациентов с ХГБ различной стадии, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита

У больных с ХГ, ХБП 1 количество внеклеточных фрагментов РНК, сорбированный на мембранах эритроцитов выше контрольного значения на 23,19 %, у больных ХГ, ХБП 2 – на 27,53 %, у больных ХГ, ХБП 3 – на 20,29 %, у больных ХГ, ХБП 4 – на 76,81 %, у больных ХГ, ХБП 5 – на 84,06 %. Направленность изменений данного показателя в группах больных хроническим гломерулонефритом и хроническим пиелонефритом идентична, однако степень увеличения количества фрагментов РНК на мембранах эритроцитов выше в группах пациентов с хроническим гломерулонефритом.

У пациентов с ХГ, ХБП 1 количество внеклеточных фрагментов ДНК, сорбированных на мембранах эритроцитов выше контрольного показателя на 20 %, у пациентов с ХГ, ХБП 2 – на 10 %, у пациентов с ХГ, ХБП 3 – на 22 %, у пациентов с ХГ, ХБП 4 – на 38 %, у пациентов с ХГ, ХБП 5 – на 22 %. Степень повышения данного показателя сопоставима в группах больных с хроническим гломерулонефритом и хроническим пиелонефритом. Однако в группах пациентов с ХП, ХБП 4 и ХП, ХБП 5 (диализ) количество внеклеточных фрагментов ДНК на мембранах эритроцитов практически одинаковое, и резкое повышение сорбции фрагментов ДНК наблюдается у больных с ХП, ХБП 5 (до диализа). В группах же больных с хроническим гломерулонефритом, пик количества фрагментов ДНК на мембранах наблюдается в группе ХГ, ХБП 4 стадии.

В итоге можно сделать вывод, что на мембранах эритроцитов больных с хронической болезнью почек адсорбируются различные низко- и среднемолекулярные вещества. От части подобных молекул позволяет избавиться гемодиализ, но даже в этом случае не происходит полного очищения мембраны эритроцитов от адсорбированной на ней веществ. Это свидетельствует о том, что эндогенные токсины прочно связываются с белковыми и липидными компонентами эритроцитарных мембран. Это, в свою очередь, может приводить и изменению конформации самих мембранных белков, а также менять их липидное окружение. В таком случае неминуемы изменения активности и функциональности транспортных белков. Это гипотеза поддерживает выводы предыдущего пункта данной главы о том, что у пациентов с хронической болезнью почек снижается скорость ионного транспорта через мембрану эритроцитов.

3.3 Исследование показателей окислительного стресса в эритроцитах

В таблице 18 и на рисунках 49 - 41 представлены результаты определения малонового диальдегида, карбонильных производных белков и мембранно-связанного гемоглобина в эритроцитах пациентов с ХБП различной стадии, развившейся на фоне хронического пиелонефрита.

Таблица 18 – Показатели окислительного стресса в эритроцитах пациентов с ХБП различной стадии, развившейся на фоне хронического пиелонефрита

Группа	Статистическая величина	МДА, мкмоль/мл	КПБ, нмоль/мл	МСГ, %
Контроль	Медиана	9,295	16,99	10,31
	Нижний квартиль	8,173	16,50	9,02
	Верхний квартиль	10,385	18,18	12,07
ХП 1	Медиана	7,179	14,57	16,40
	Нижний квартиль	5,513	13,96	13,41
	Верхний квартиль	8,013	15,88	18,07
ХП 2	Медиана	8,141	15,02	16,92
	Нижний квартиль	7,372	13,90	13,83
	Верхний квартиль	8,942	15,02	18,97
ХП 3	Медиана	6,795	17,25	14,99
	Нижний квартиль	5,769	13,45	10,90
	Верхний квартиль	7,308	18,65	15,90
ХП 4	Медиана	7,308	13,27	15,03
	Нижний квартиль	6,923	12,70	11,98
	Верхний квартиль	8,590	13,69	17,40
ХП 5.1 (до диализа)	Медиана	8,205	17,71	16,50
	Нижний квартиль	7,436	16,92	15,85
	Верхний квартиль	11,987	17,71	17,47
ХП 5.2 (диализ)	Медиана	6,603	15,80	12,99
	Нижний квартиль	4,968	11,33	9,06
	Верхний квартиль	8,526	18,65	18,88
Критерий Краскала-Уоллиса, достигнутый уровень р		0,0001*	0,0531	0,0001*
* - статистически значимые различия				

У пациентов с хроническим пиелонефритом концентрация свободного малонового диальдегида в эритроцитах ниже, чем у здоровых людей. У больных с ХП, ХБП 1 стадии данный показатель на 22,76 % ниже, чем в контрольной группе, у больных с ХП, ХБП 2 – на 12,42 %, у больных с ХП, ХБП 3 – на 26,90 %, у больных с ХП, ХБП 4 – на 21,38 %, у больных с ХП, ХБП 5 (до диализа) – на 11,76 %, у больных с ХП, ХБП 5 (диализ) – на 29,96 %. Содержание МДА у пациентов с хроническим пиелонефритом по отношению к стадиям ХБП меняется бессистемно. Наиболее отличное от контроля значение зарегистрировано в группе пациентов с ХП, ХБП 5 (диализ).

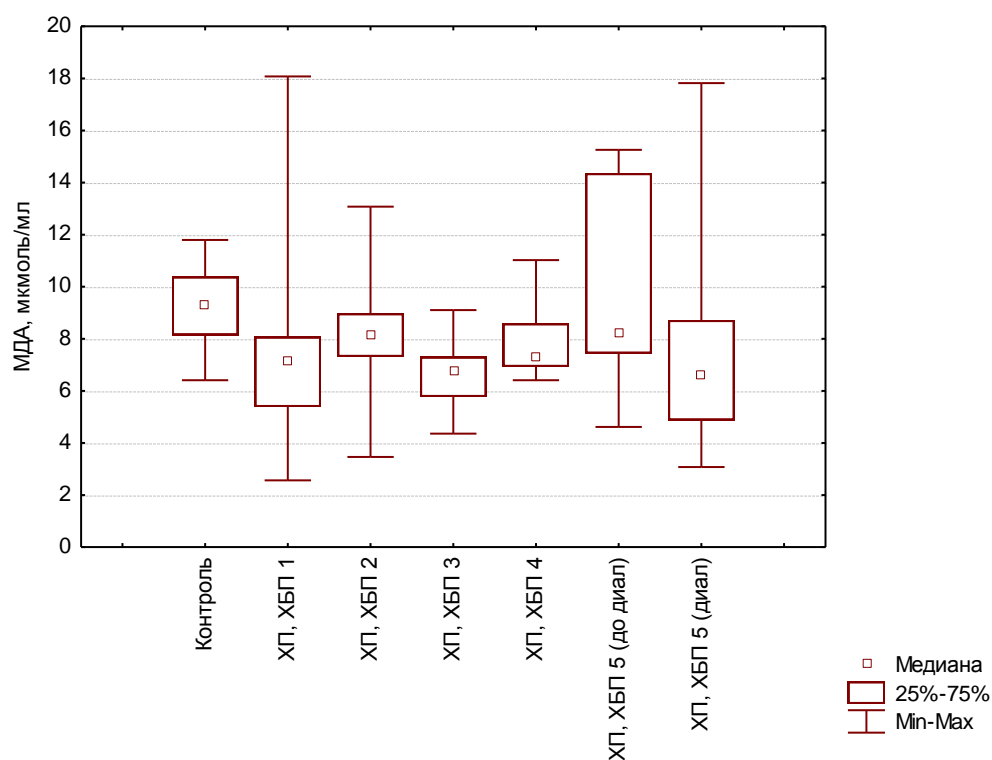


Рисунок 49 – Диаграммы изменения содержания малонового диальдегида в эритроцитах пациентов с ХПБ различной стадии, развившейся на фоне хронического пиелонефрита

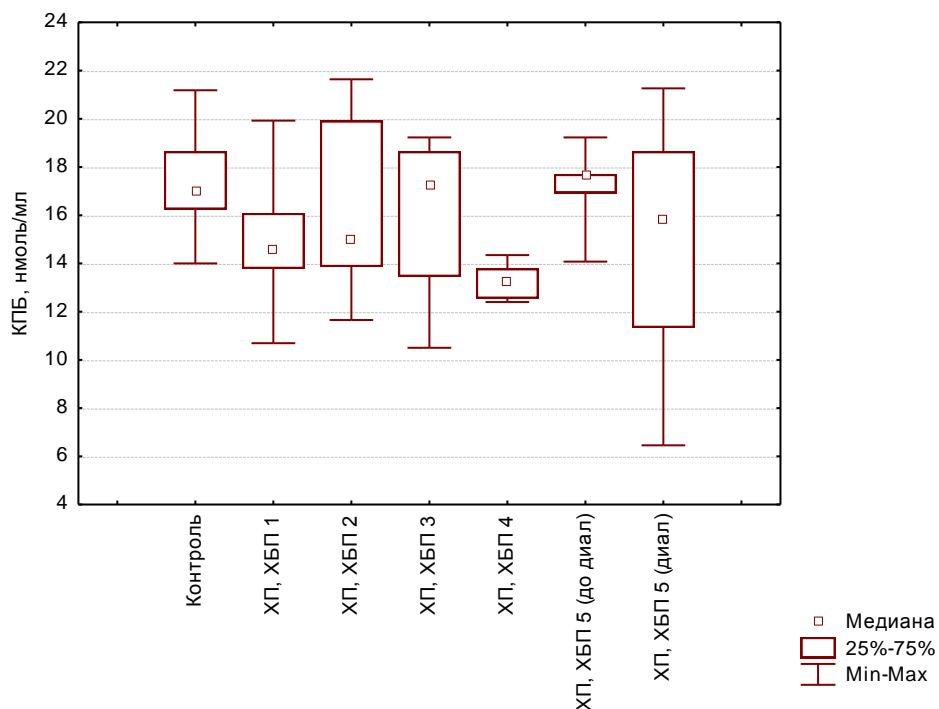


Рисунок 50 – Диаграммы изменения содержания карбонильных производных белков в эритроцитах пациентов с ХПБ различной стадии, развившейся на фоне хронического пиелонефрита

Концентрация карбониловых производных белков в эритроцитах в группах пациентов с хроническим пиелонефритом относительно контрольных значений менялась по-разному. Так, у пациентов из групп ХП, ХБП 1; ХП, ХБП 2; ХП, ХБП 4 и ХП, ХБП 5 (диализ) этот показатель был ниже контрольного на 14,24 %, 11,60 %, 21,90 % и 7 % соответственно. В группе больных с ХП, ХБП 3 концентрация карбониловых производных белков практически такая же, как и у здоровых людей. А у больных ХП, ХБП (до диализа) содержание КБП в эритроцитах выше, чем в контроле на 4,24 %.

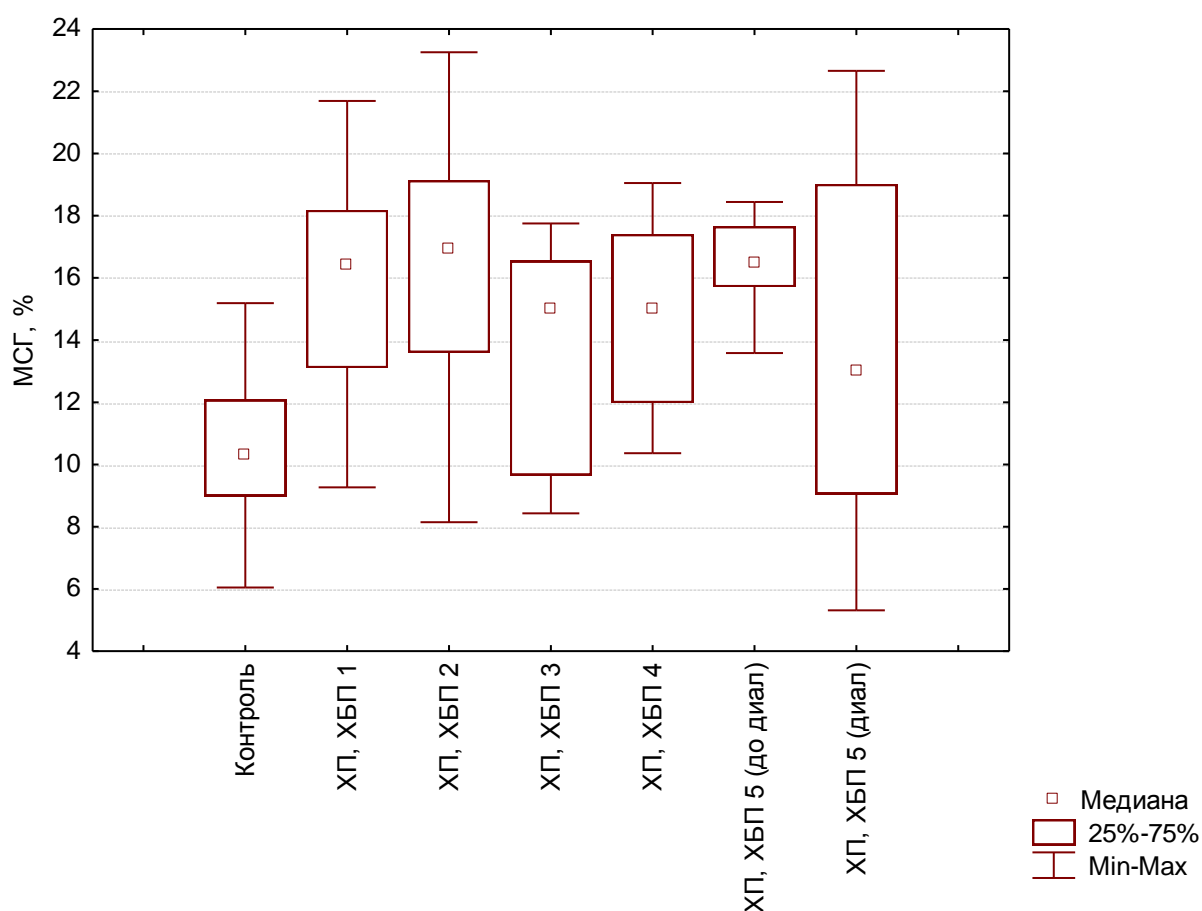


Рисунок 51 – Диаграммы изменения содержания мембранно-связанного гемоглобина в эритроцитах пациентов с ХПБ различной стадии, развившейся на фоне хронического пиелонефрита

Во всех группах пациентов с хроническим пиелонефритом содержание мембранно-связанного гемоглобина в эритроцитах выше, чем у здоровых людей. У больных с ХП, ХБП 1 данный показатель больше, чем в контроле на 59,07 %, у больных ХП, ХБП 2 – на 64,11 %, у больных ХП, ХБП 3 – на 45,39 %, у больных ХП, ХБП 4 – на 75,78 %, у больных ХП, ХБП 5 (до диализа) – на 60,04 %, у больных ХП, ХБП 5 (диализ) – на 25,99 %.

В таблице 19 и на рисунках 52 - 54 представлены результаты определения малонового диальдегида, карбониловых производных белков и мембранно-связанного гемоглобина в эритроцитах пациентов с ХБП различной стадии, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита.

Таблица 19 – Показатели окислительного стресса в эритроцитах пациентов с ХБП различной стадии, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита

Группа	Статистическая величина	МДА, мкмоль/мл	КПБ, нмоль/мл	МСГ, %
Контроль	Медиана	9,295	16,99	10,31
	Нижний квартиль	8,173	16,50	9,02
	Верхний квартиль	10,385	18,18	12,07
ХГ 1	Медиана	4,936	16,76	13,34
	Нижний квартиль	4,151	15,15	12,41
	Верхний квартиль	6,346	19,18	13,74
ХГ 2	Медиана	7,051	14,03	17,88
	Нижний квартиль	6,282	12,57	13,40
	Верхний квартиль	9,872	16,71	19,00
ХГ 3	Медиана	7,308	16,91	12,57
	Нижний квартиль	6,923	15,86	12,28
	Верхний квартиль	8,397	18,10	15,83
ХГ 4	Медиана	7,885	15,80	13,70
	Нижний квартиль	5,545	13,00	12,47
	Верхний квартиль	9,199	18,52	15,29
ХГ 5 (диализ)	Медиана	7,308	15,65	12,58
	Нижний квартиль	6,506	14,12	10,10
	Верхний квартиль	9,071	18,04	19,18
Критерий Краскала-Уоллиса, достигнутый уровень р		0,0023*	0,4595	0,0418*
* - статистически значимые различия				

У пациентов с ХГ, ХБП 1 концентрация МДА ниже контрольного значения на 46,90 %, у пациентов с ХГ, ХБП 2 – на 24,14 %, у пациентов с ХГ, ХБП 3 – на 21,38 %, у пациентов с ХГ, ХБП 4 – на 15,17 %, у пациентов с ХГ, ХБП 5 (диализ) – на 21,38 %. В группах больных с хроническим гломерулонефритом, как и у пациентов с хроническим пиелонефритом, содержание свободной фракции малонового диальдегида в эритроцитах ниже, чем у здоровых людей. Однако среди больных хроническим гломерулонефритом наименьшая концентрация МДА наблюдается при 1 стадии ХБП, а не при 5, как у пациентов с хроническим пиелонефритом.

У пациентов с хроническим гломерулонефритом содержание карбониловых производных белков в эритроцитах либо не отличается от контроля, либо ниже его. У больных ХГ, ХБП 1 и ХГ, ХБП 3 количество КПБ в эритроцитах такое же, как у здоровых людей, у больных с ХГ, ХБП 2 данный показатель меньше контрольного на 17,42 %, у больных с ХГ, ХБП 4 - на 7 %, у больных с ХГ, ХБП 5 (диализ) – на 7,89 %. Если учесть, что среди пациентов с хроническим гломерулонефритом отсутствует группа больных с ХБП 5 стадии на додиализном этапе, то можно отметить, что изменения концентрации карбониловых производных белков в эритроцитах у пациентов с хроническим

гломерулонефритом сопоставимы с подобными изменениями у пациентов с хроническим пиелонефритом.

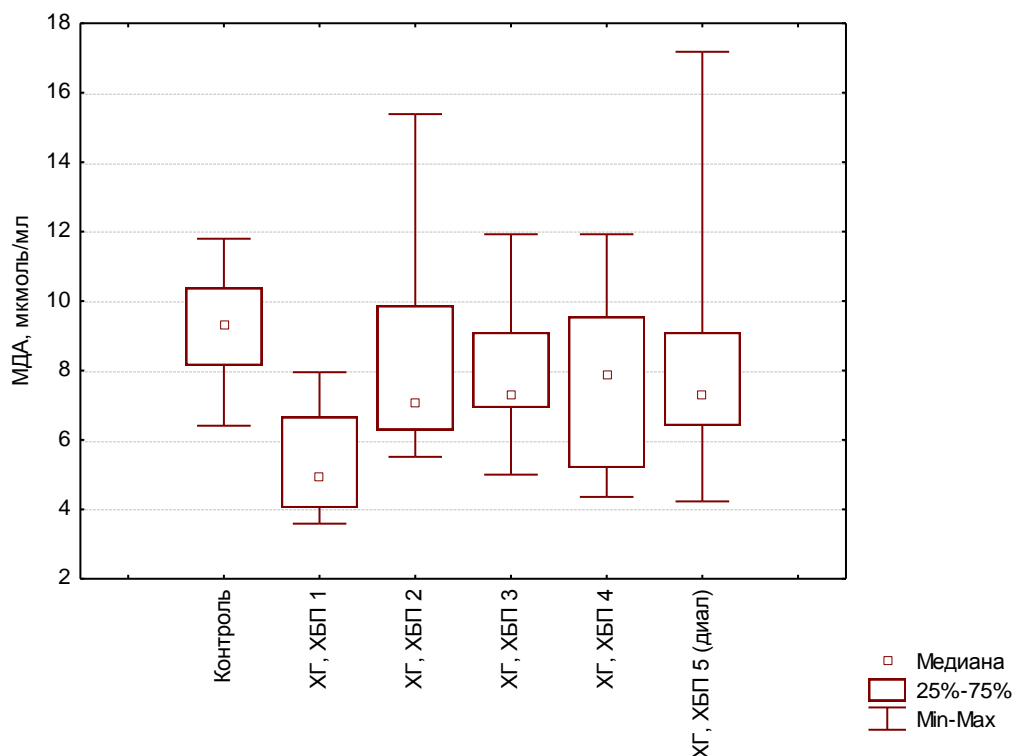


Рисунок 52 – Диаграммы изменения содержания малонового диальдегида в эритроцитах пациентов с ХПБ различной стадии, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита

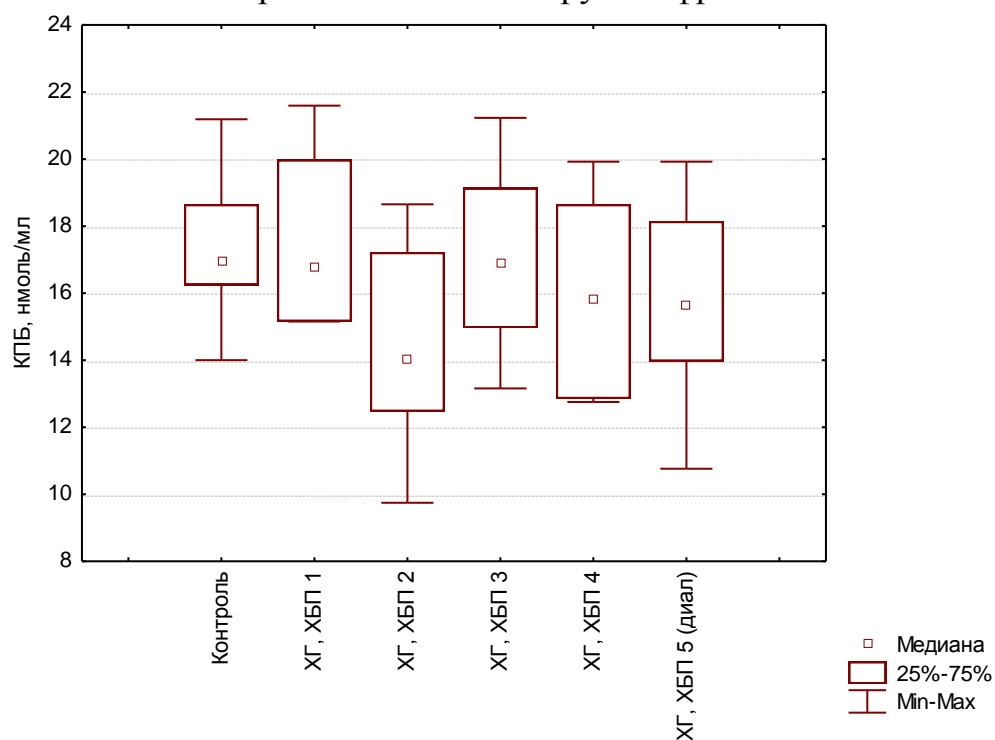


Рисунок 53 – Диаграммы изменения содержания карбонильных производных белков в эритроцитах пациентов с ХПБ различной стадии, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита

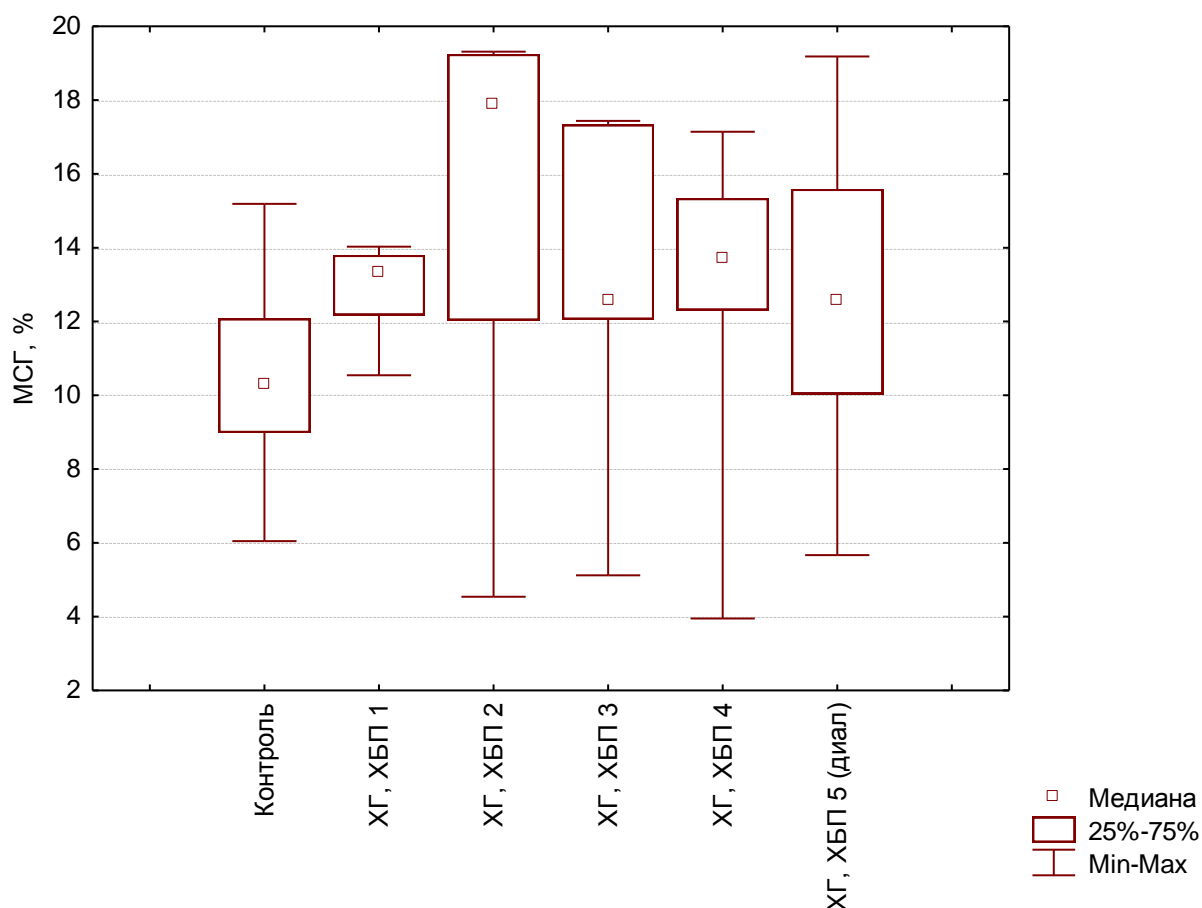


Рисунок 54 – Диаграммы изменения содержания мембранно-связанного гемоглобина в эритроцитах пациентов с ХПБ различной стадии, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита

У больных хроническим гломерулонефритом наблюдается увеличение содержания мембранно-связанного гемоглобина в эритроцитах по сравнению с группой контроля. У пациентов с ХГ, ХБП 1 степень увеличения данного показателя составила 29,36 %, у пациентов с ХГ, ХБП 2 – 73,42 %, у пациентов с ХГ, ХБП 3 – 21,92 %, у пациентов с ХГ, ХБП 4 – 32,88 % у пациентов с ХГ, ХБП 5 (диализ) – 22,02 %. Таким образом, зарегистрирована одинаковая динамика изменения содержания мембранно-связанного гемоглобина у пациентов с хроническим гломерулонефритом и у пациентов с хроническим пиелонефритом.

Исходя из полученных данных, можно выдвинуть предположение, что эритроциты пациентов с хронической болезнью почек подвержены окислительному стрессу. Однако динамика изменения свободного малонового альдегида и карбонильных производных белков в эритроцитах пациентов с ХБП указывает на отсутствие острой реакции клеток на свободно-радикальное окисление. Это скорее всего последствия продолжительного хронического окислительного стресса, который испытывают эритроциты в условиях хронической почечной патологии. Таким образом, происходит накопление не первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов, а

конечных продуктов свободно-радикальных реакций, таких как мембранно-связанный гемоглобин. Накопление мембранно-связанного гемоглобина, который прочно связан с липидами и белками эритроцитарной мембраны с цитоплазматической стороны, позволяет нам еще раз подтвердить нашу гипотезу, что транспортные характеристики мембранных белков переносчиков у пациентов с хронической болезнью почек снижены.

3.4 Исследование зарядового баланса эритроцитов в условиях термоиндукции

У 45 % (25,81 %; 65,81 %) обследованных здоровых людей график изменения рН при нагревании эритроцитарной взвеси от 37 °С до 58 °С имел вид равномерно убывающей кривой (рисунок 55). Максимальные изменения рН относительно контрольной точки в 37 °С лежали в области от -0,295 до -0,424 со средним значением -0,378.

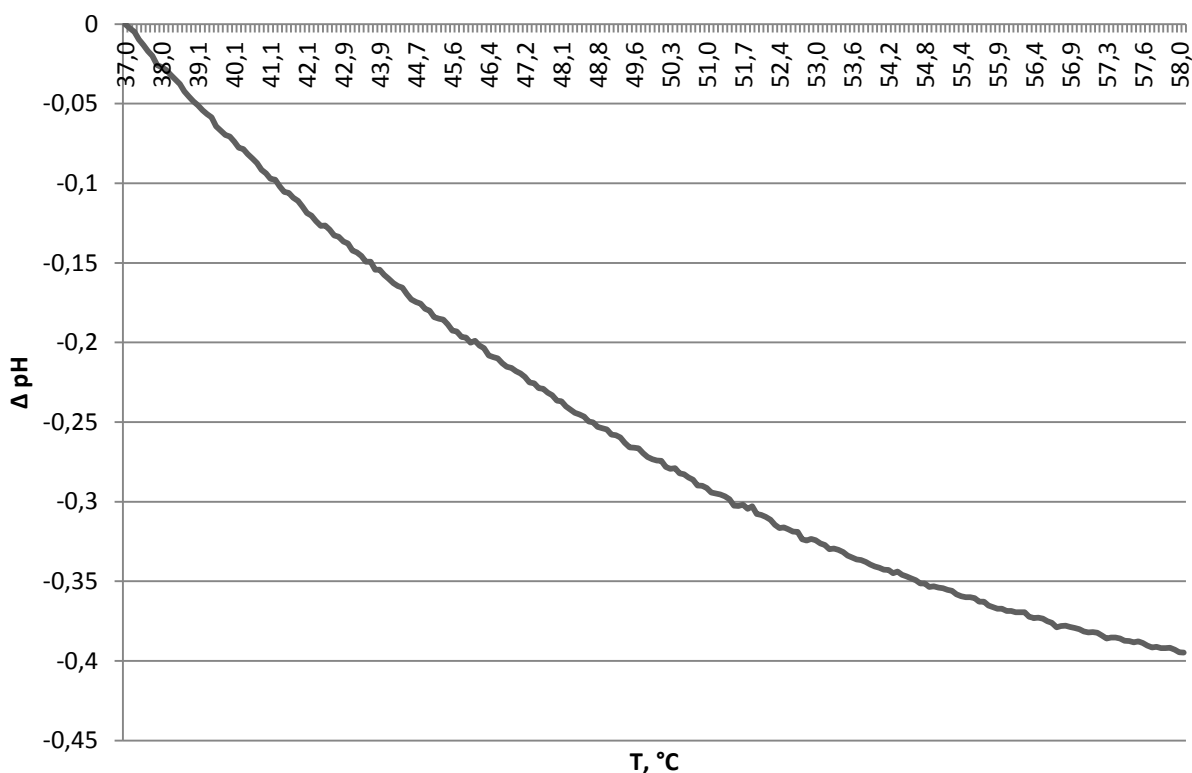


Рисунок 55 – Первый тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у здорового человека

У 20 % (7,49 %, 42,18 %) обследованных здоровых лиц зависимости изменения рН эритроцитарной взвеси от температуры инкубации характеризуются наличием условно прямолинейного отрезка в начале графика, переходящим в равномерно убывающую кривую (рисунок 56). Максимальное Δ рН лежит в интервале от -0,161 до -0,277, со средним значением -0,239. Относительная прямолинейность графика сохраняется до нагревания взвеси до 39 – 42 °С.

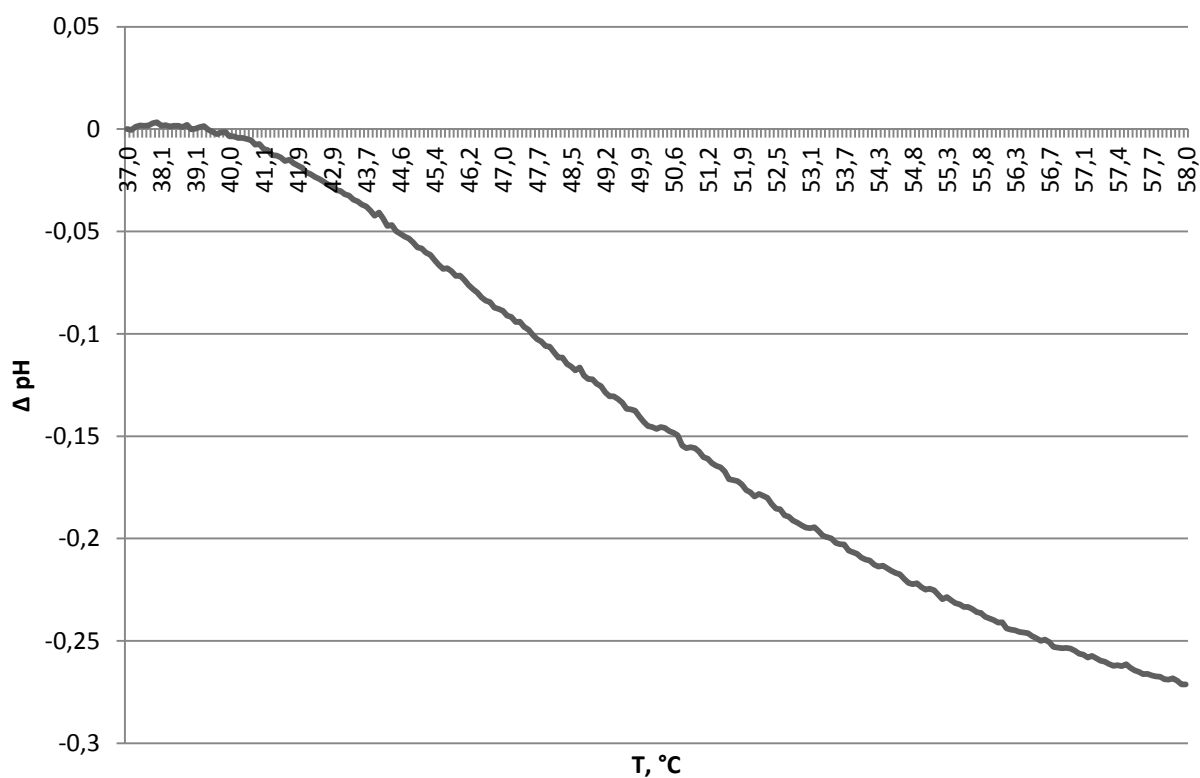


Рисунок 56 – Второй тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у здорового человека

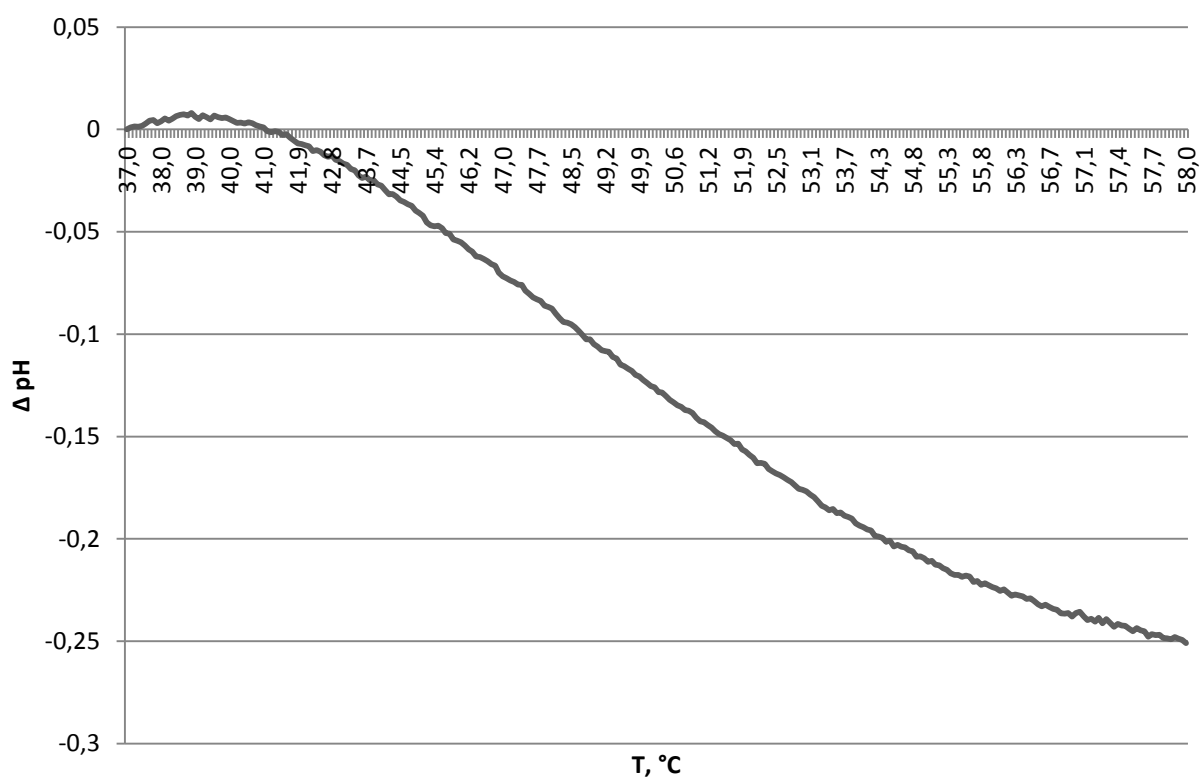


Рисунок 57 – Третий тип (первый подтип) термограмм эритроцитов, зарегистрированный у здорового человека

У 35 % (17,99 %; 56,84 %) обследованных людей из контрольной группы наблюдается третий тип термограмм, записанных при нагревании эритроцитарной взвеси. Данный тип зарядовых кривых имеет общий тренд, который заключается в наличии плавно возрастающего и плавно убывающего отрезков на графике, однако не удастся выделить близких максимумов ΔpH и общих точек перехода между выделенными отрезками.

Так при рассмотрении первого подтипа третьего типа термограмм эритроцитов у здоровых людей были выделены положительные максимумы ΔpH , которые составили 0,007 и 0,008 единиц, отрицательные – 0,252 и -0,251, точки, соответствующие началу снижения pH лежали в области от 38,7 °C до 38,8 °C (рисунок 57).

Зарядовые кривые эритроцитов второй подтип третьего типа, записанные в контрольной группе характеризовались положительными пиками ΔpH 0,034 и 0,038 ,отрицательными -0,160 и -0,170. Точки начала снижения pH 42,3 °C и 41,6 °C (рисунок 58)

Термограммы эритроцитов здоровых людей, относящиеся к третьему подтипу третьего типа имели средний положительный максимум 0,088 (разброс от 0,072 до 0,107), отрицательный -0,074 (от -0,049 до -0,116), точка перехода на 44,6 (43,4 – 45,6) °C (рисунок 59).

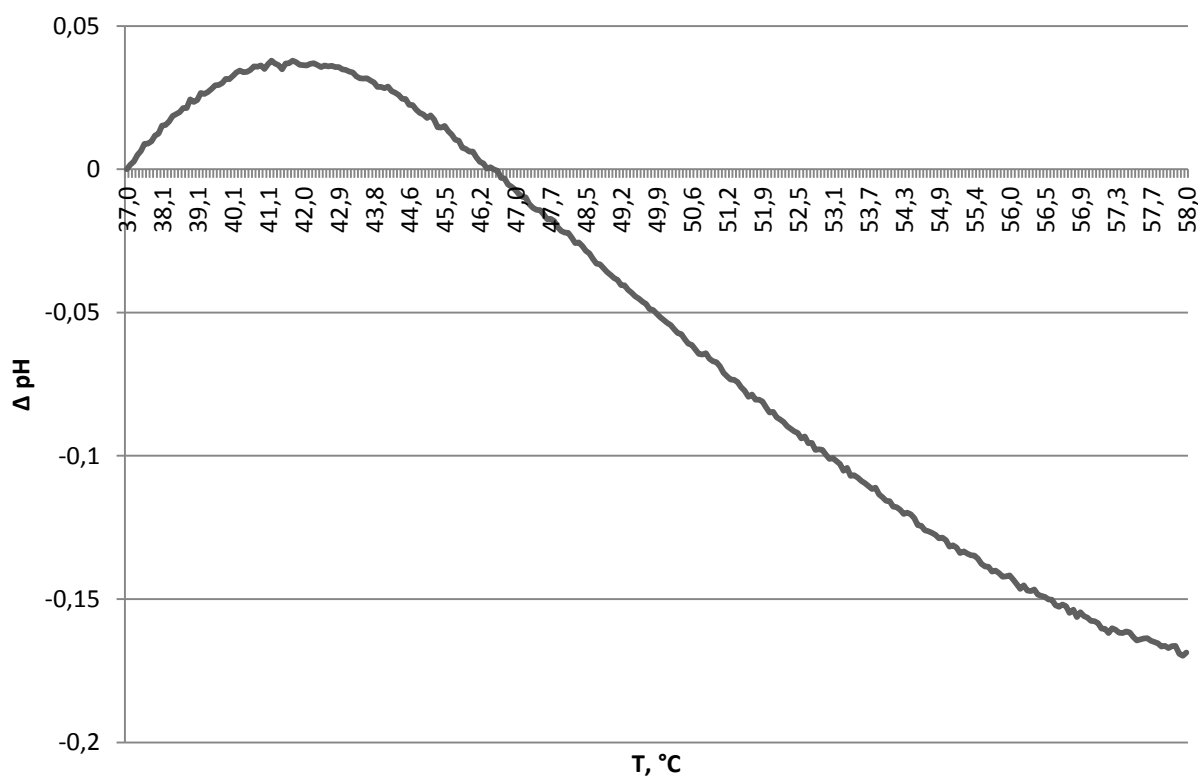


Рисунок 58 – Третий тип (второй подтип) термограмм эритроцитов, зарегистрированный у здорового человека

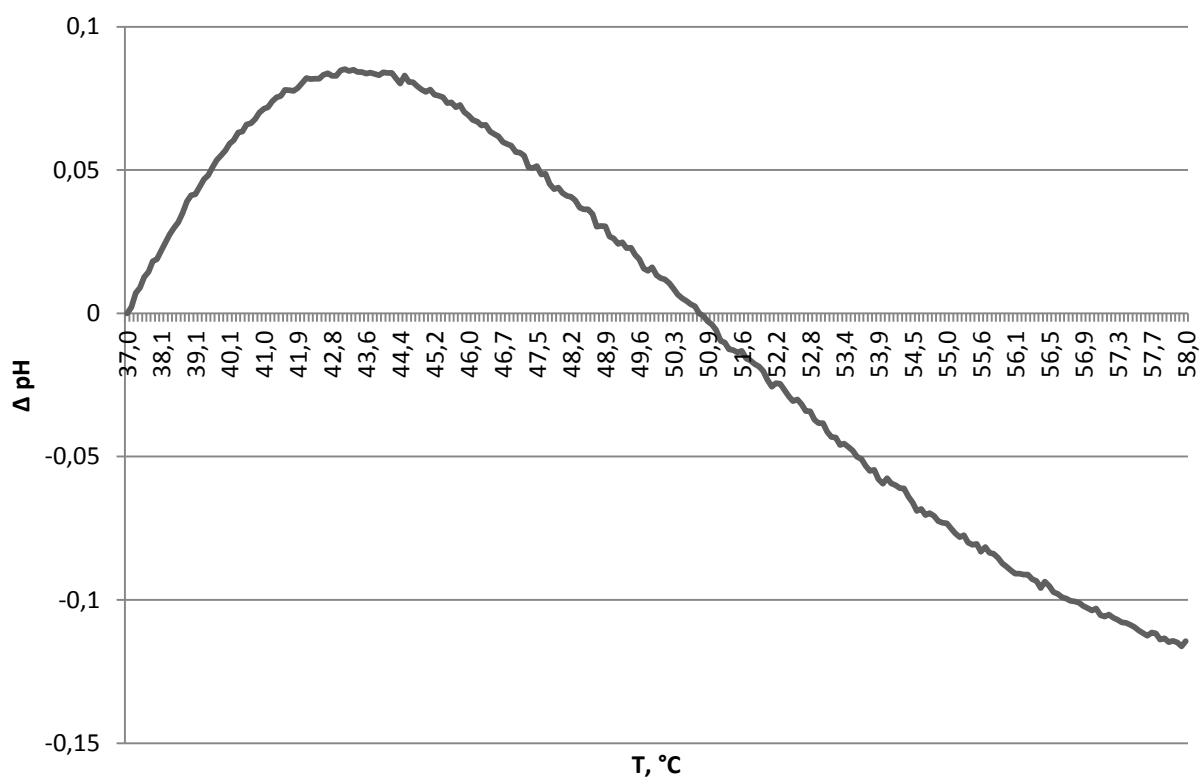


Рисунок 59 – Третий тип (третий подтип) термограмм эритроцитов, зарегистрированный у здорового человека

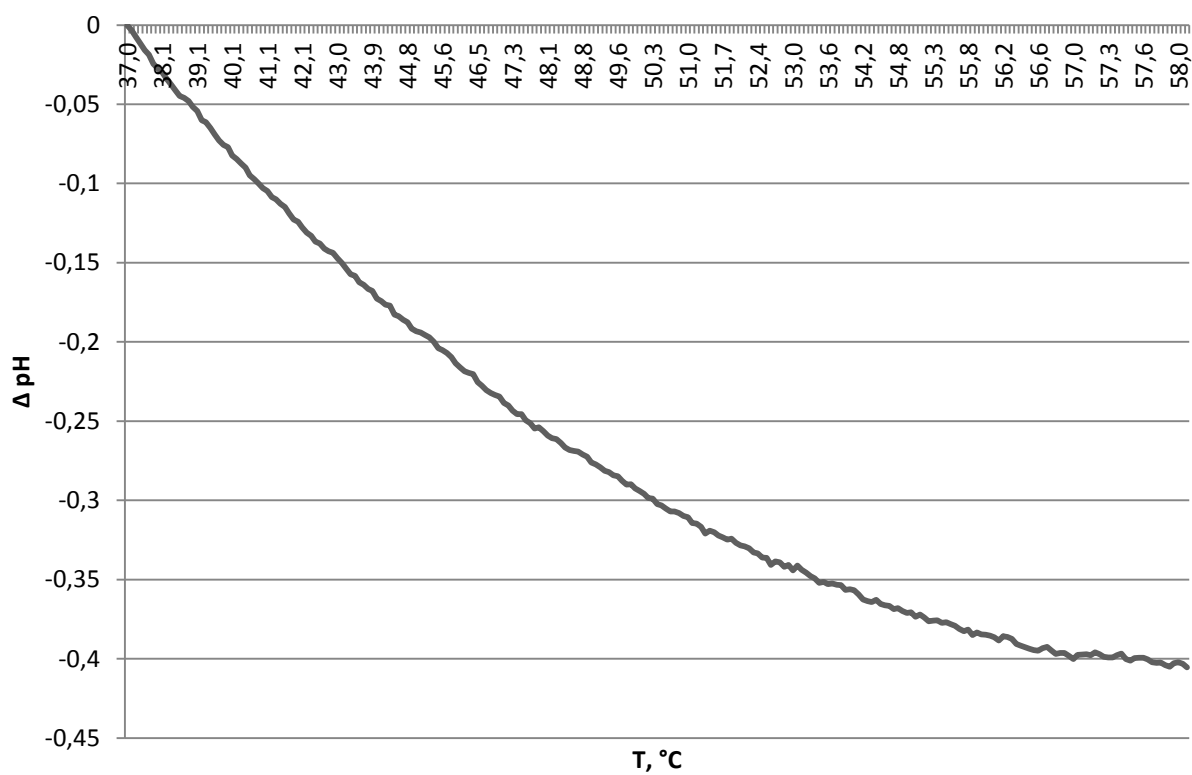


Рисунок 60 – Первый тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим пиелонефритом, ХБП 1

У 61,54 % (35,41 %; 82,40 %) обследованных больных с хроническим пиелонефритом, ХБП 1 график изменения рН при нагревании эритроцитарной взвеси от 37 °С до 58 °С имел вид равномерно убывающей кривой (рисунок 60). Максимальные изменения рН относительно контрольной точки в 37 °С лежали в области от -0,375 до -0,458 со средним значением -0,404.

У 15,38 % (3,10 %; 43,46 %) обследованных пациентов с хроническим пиелонефритом, ХБП 1 зависимость изменения рН эритроцитов от температуры характеризовалась наличием условно прямолинейного отрезка в начале графика, переходящим в равномерно убывающую кривую (рисунок 61). Максимальное Δ рН в интервале от -0,160 до -0,191, со средним -0,175. Относительная прямолинейность графика сохраняется до 41 – 42 °С [110, с. 90].

У 23,08 % (7,50 %, 50,94 %) обследованных больных с хроническим пиелонефритом, ХБП 1 наблюдался плавно возрастающий и плавно убывающий тип зарядовых кривых, записанных при нагревании эритроцитарной взвеси. Положительные максимумы Δ рН лежали в диапазоне от 0,007 до 0,012 единиц, со средним 0,010, отрицательные от -0,139 до -0,210, среднее -0,164, точки, соответствующие началу снижения рН от 40,5 °С до 41,5 °С (рисунок 62) [110, с. 91].

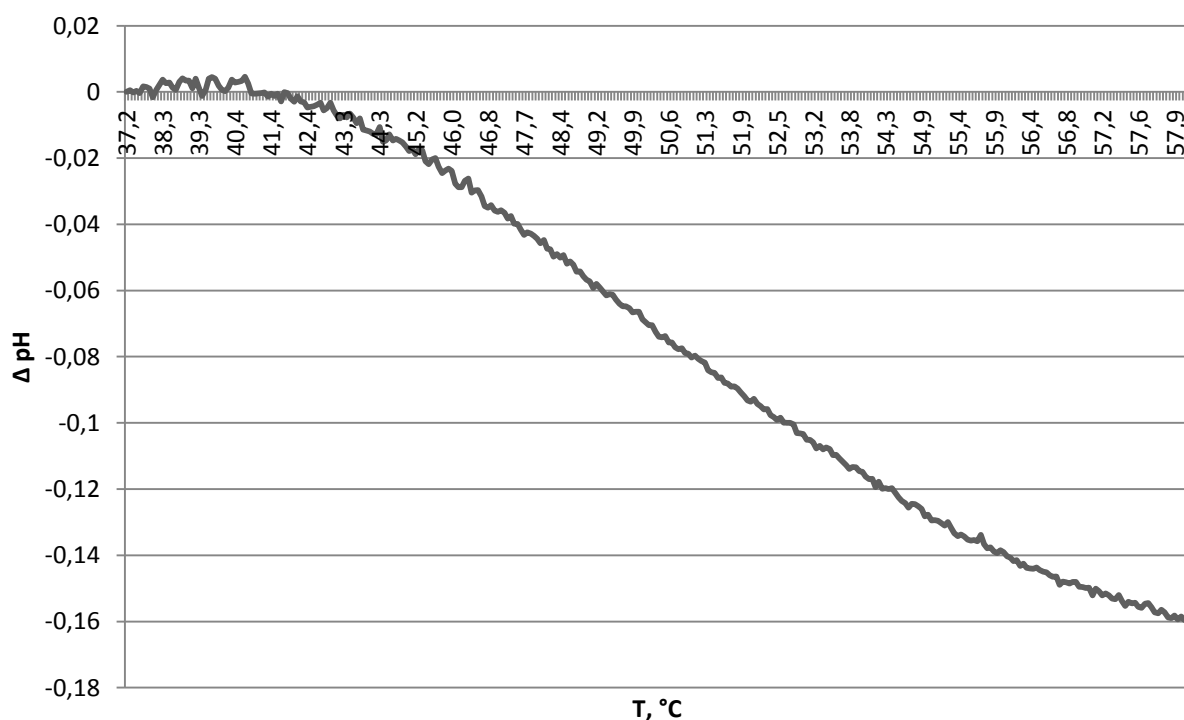


Рисунок 61 – Второй тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим пиелонефритом, ХБП 1

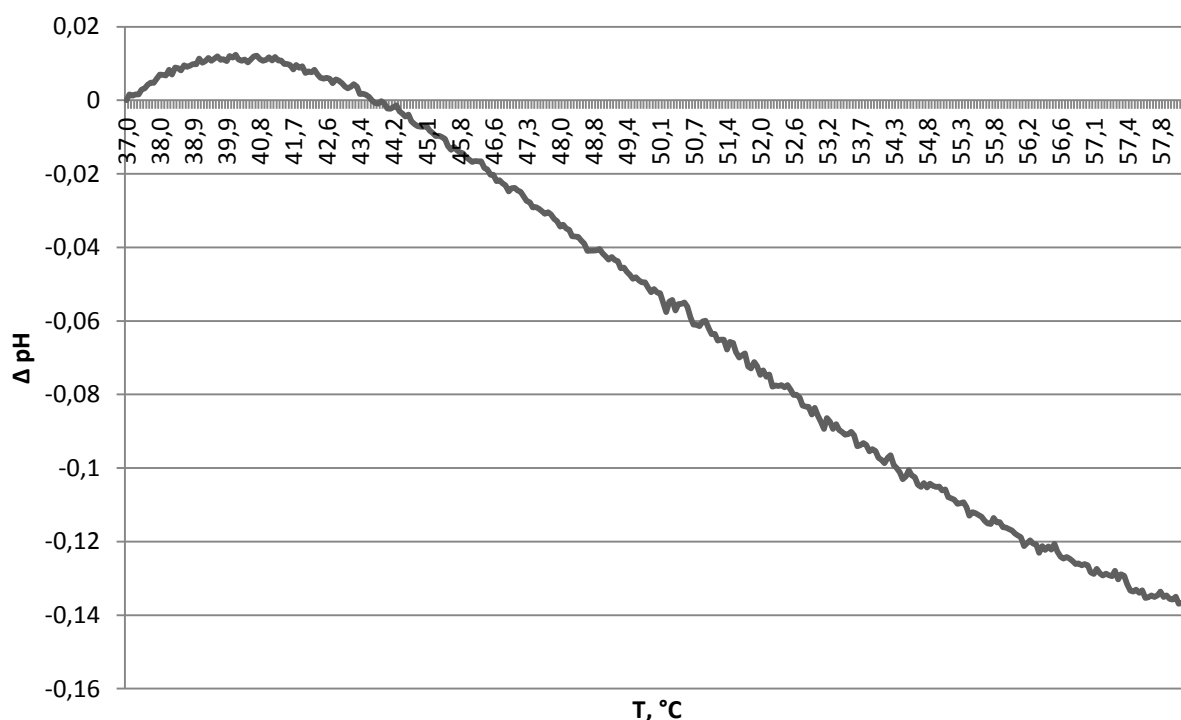


Рисунок 62 – Третий тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим пиелонефритом, ХБП 1

У 66,67 % (41,50 %; 85,04 %) больных из группы пациентов с хроническим пиелонефритом, ХБП 2 график изменения рН при нагревании эритроцитарной взвеси от 37 °С до 58 °С имел вид равномерно убывающей кривой (рисунок 63). Максимальные отрицательные значения Δ рН относительно контрольной точки в 37 °С лежали в области от -0,210 до -0,423 со средним значением -0,369.

Зависимость изменения рН от температуры у 6,67 % (0,84 %; 31,84 %) пациентов с хроническим пиелонефритом ХБП 2 характеризовалась наличием условно прямолинейного отрезка в начале графика, переходящим в равномерно убывающую кривую (рисунок 64). Среднее значение максимального положительного изменения рН составило 0,004 по сравнению с контрольной точкой при 37 °С, отрицательного -0,171. Условная прямолинейность наблюдается в пределах от 37 °С до 41 °С.

У 26,67 % (10,46 %; 52,38 %) пациентов с хроническим пиелонефритом, ХБП 2, термограмма эритроцитов, записанная в диапазоне температур от 37 °С до 58 °С, имела вид кривой с участком плавного повышения рН, который сменялся участком плавного его понижения (рисунок 65). Положительные максимумы Δ рН составили 0,036 и 0,067 единиц (среднее 0,049), отрицательные -0,051 и -0,133 (среднее -0,096), точки, соответствующие началу снижения рН лежали в области от 42 °С до 45 °С [110, с. 91].

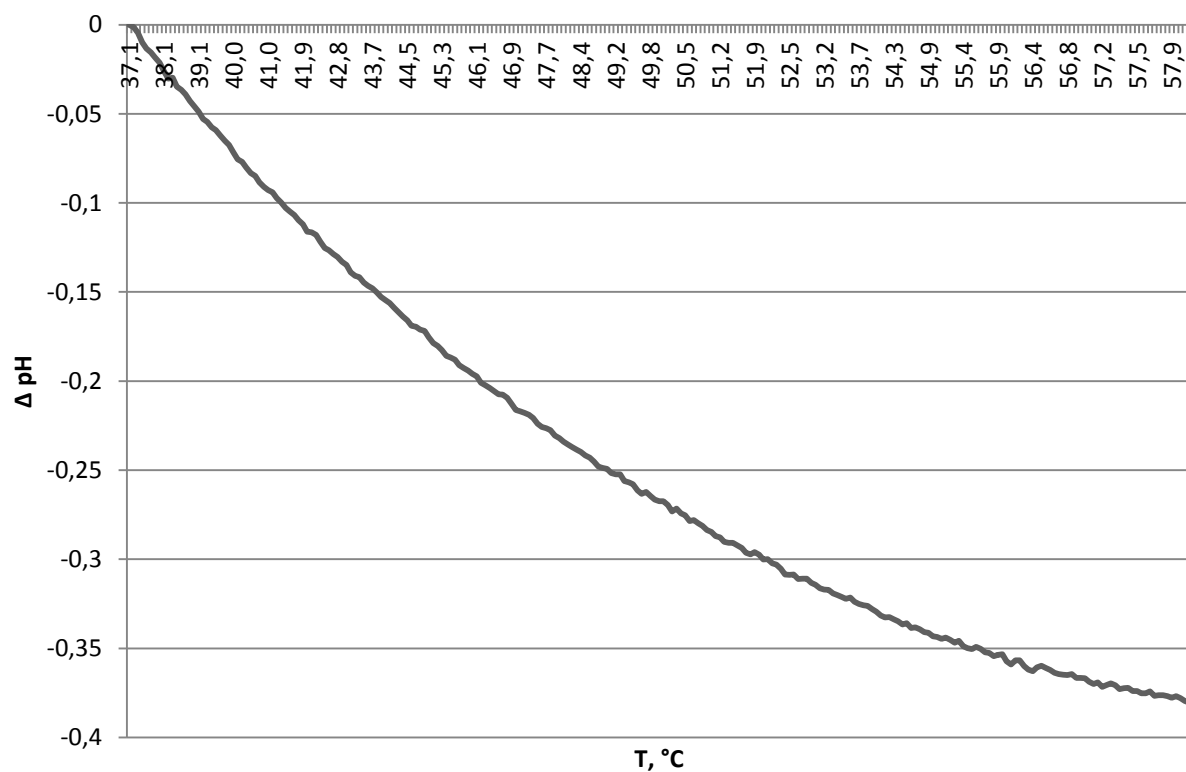


Рисунок 63 – Первый тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим пиелонефритом, ХБП 2

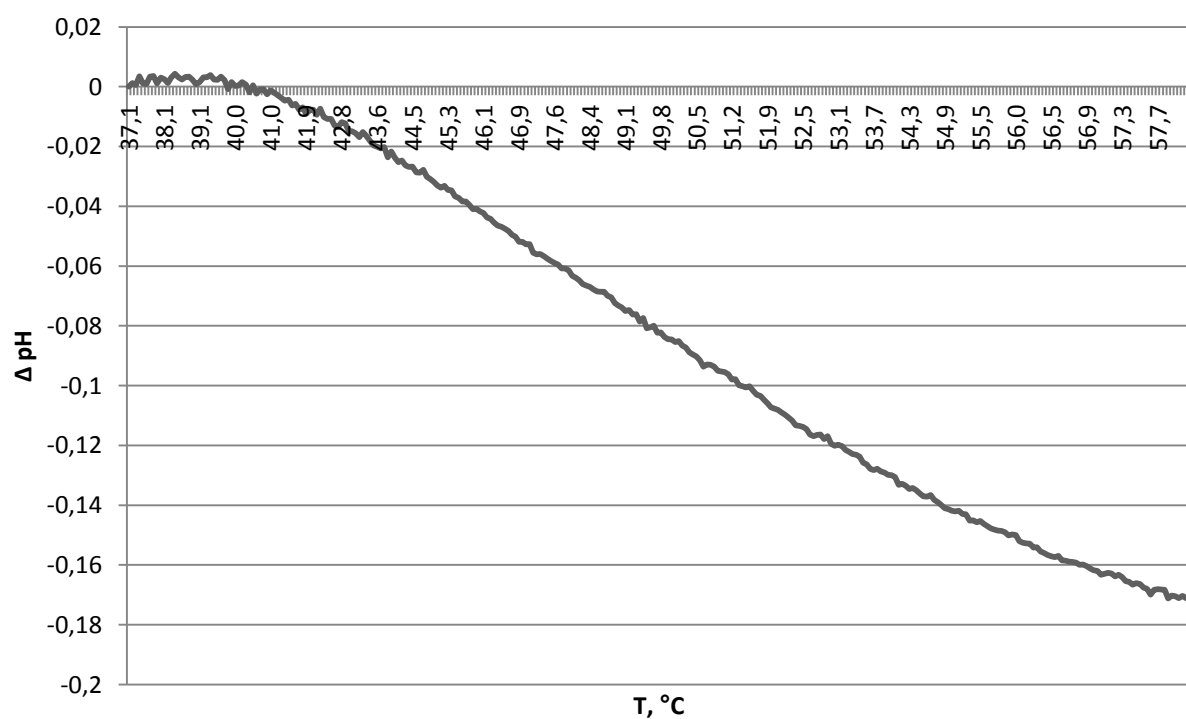


Рисунок 64 – Второй тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим пиелонефритом, ХБП 2

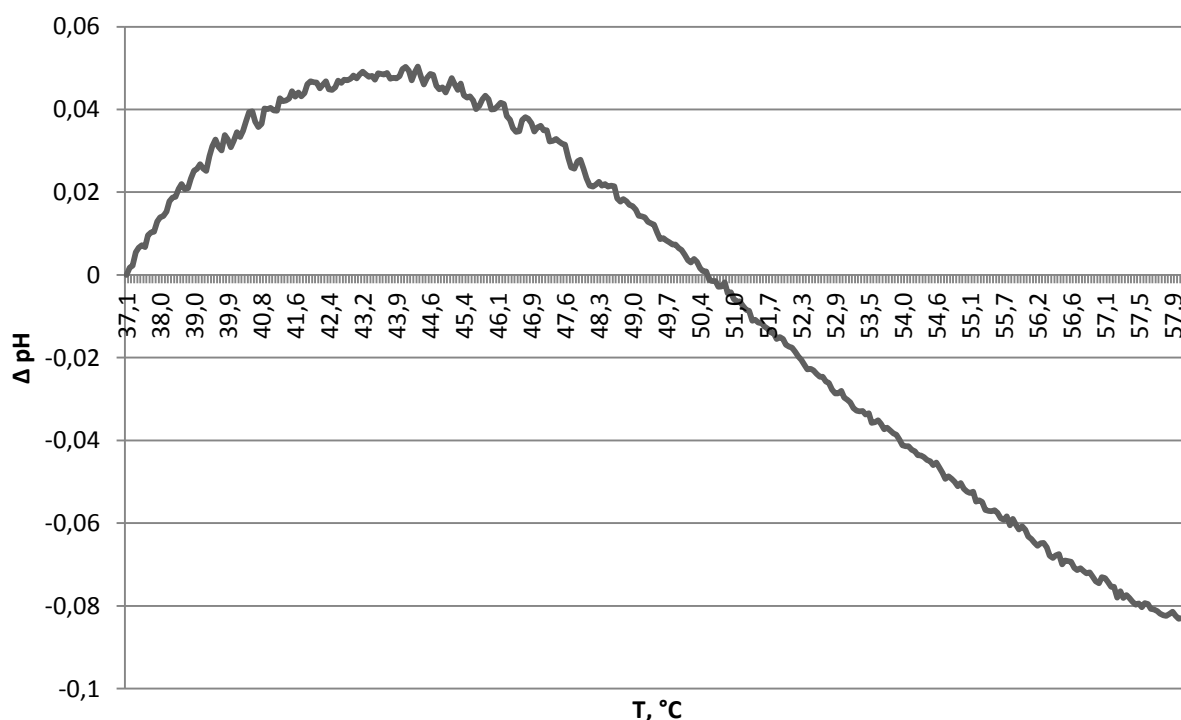


Рисунок 65 – Третий тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим пиелонефритом, ХБП 2

У 80 % (47,94 %; 95,41 %) обследованных больных с хроническим пиелонефритом, ХБП 3 наблюдается равномерно убывающий тип зарядовой кривой эритроцитов (рисунок 66). Максимальные отрицательные значения Δ рН лежат в области от -0,165 до -0,442, среднее -0,353.

У 20 % (4,59 %; 52,06 %) пациентов с хроническим пиелонефритом, ХБП 3 при нагревании эритроцитарной взвеси наблюдался плавно возрастающий и плавно убывающий тип зарядовой кривой (рисунок 67). Максимальные значения положительного пика Δ рН 0,013 и 0,035 (среднее 0,024) в сравнении с контрольной точкой при температуре 37 °С, отрицательного -0,109 и -0,141 (среднее -0,125) соответственно. Точки перехода, соответствующие началу снижения рН лежали в области изменения температуры от 41,7 °С до 43,3 °С [110, с. 93].

У 33,33 % (9,25 %; 70,43 %) обследованных больных с хроническим пиелонефритом, ХБП 4 наблюдался равномерно убывающий тип зарядовой кривой эритроцитов с условиях термоиндукции (рисунок 68). Максимальные отрицательные значения Δ рН лежат в области от -0,382 до -0,393, среднее -0,388.

У 16,67 % (1,14 %; 58,22 %) обследованных пациентов пациента с хроническим пиелонефритом, ХБП 4 при нагревании эритроцитарной взвеси были записаны термограммы, имеющие прямолинейный отрезок, переходящий в равномерно убывающую кривую (рисунок 69). Среднее максимальное изменение рН -0,176. Прямолинейность графика от 37 °С до 41,5 °С.

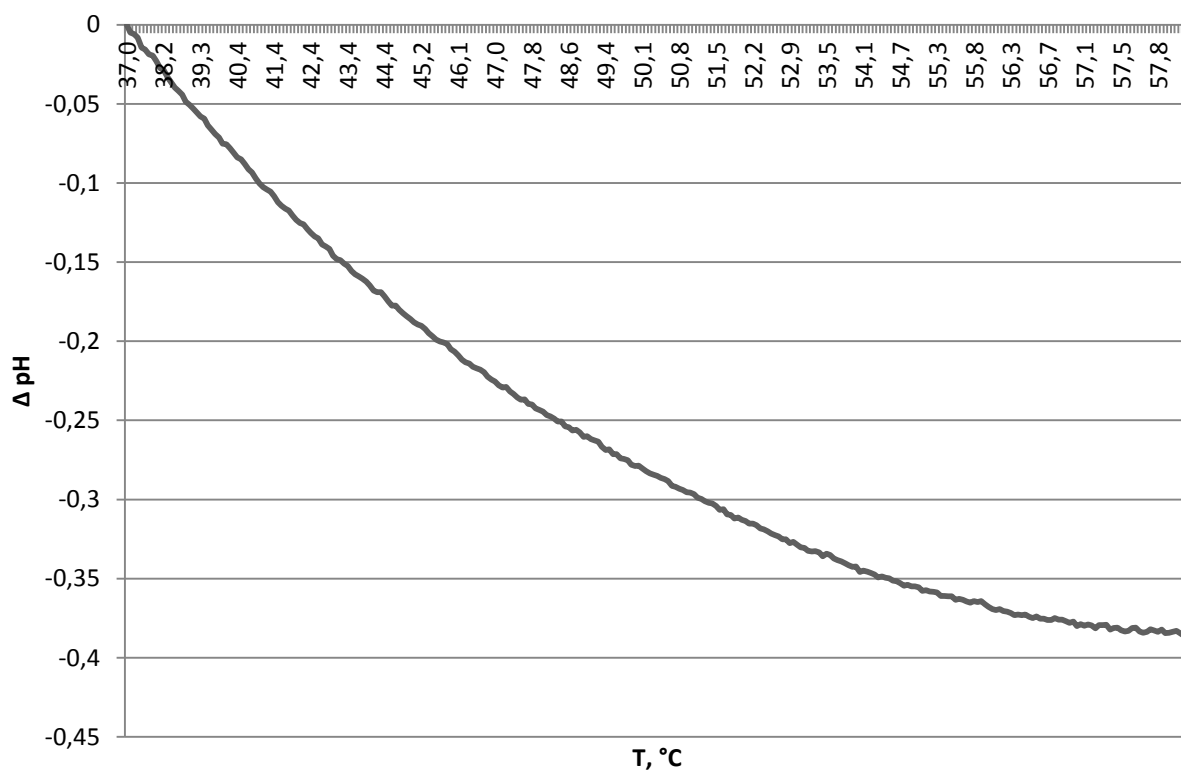


Рисунок 66 – Первый тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим пиелонефритом, ХБП 3

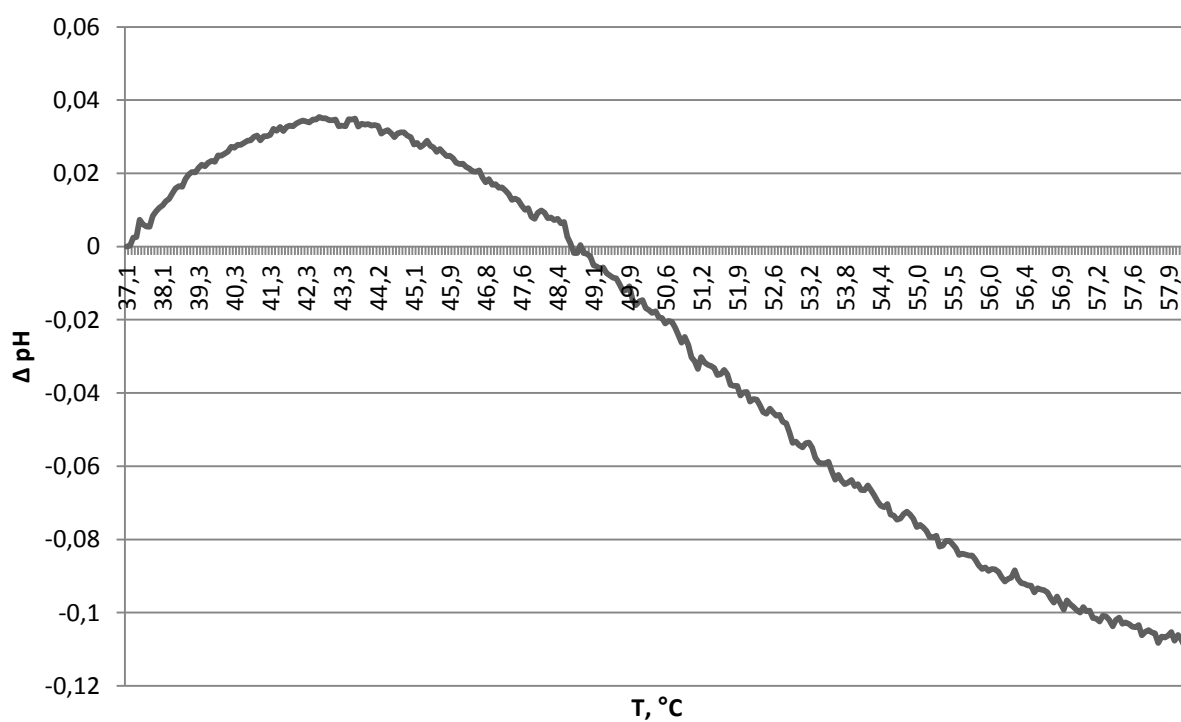


Рисунок 67 – Второй тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим пиелонефритом, ХБП 3

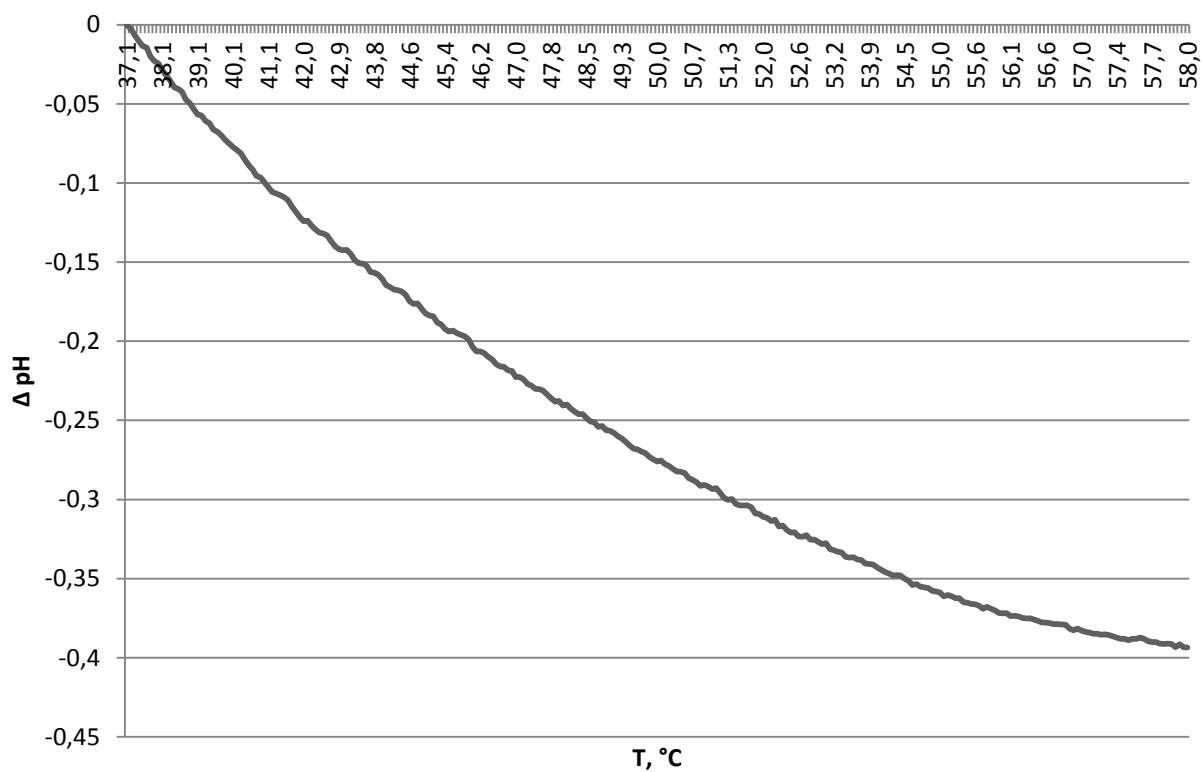


Рисунок 68 – Первый тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим пиелонефритом, ХБП 4

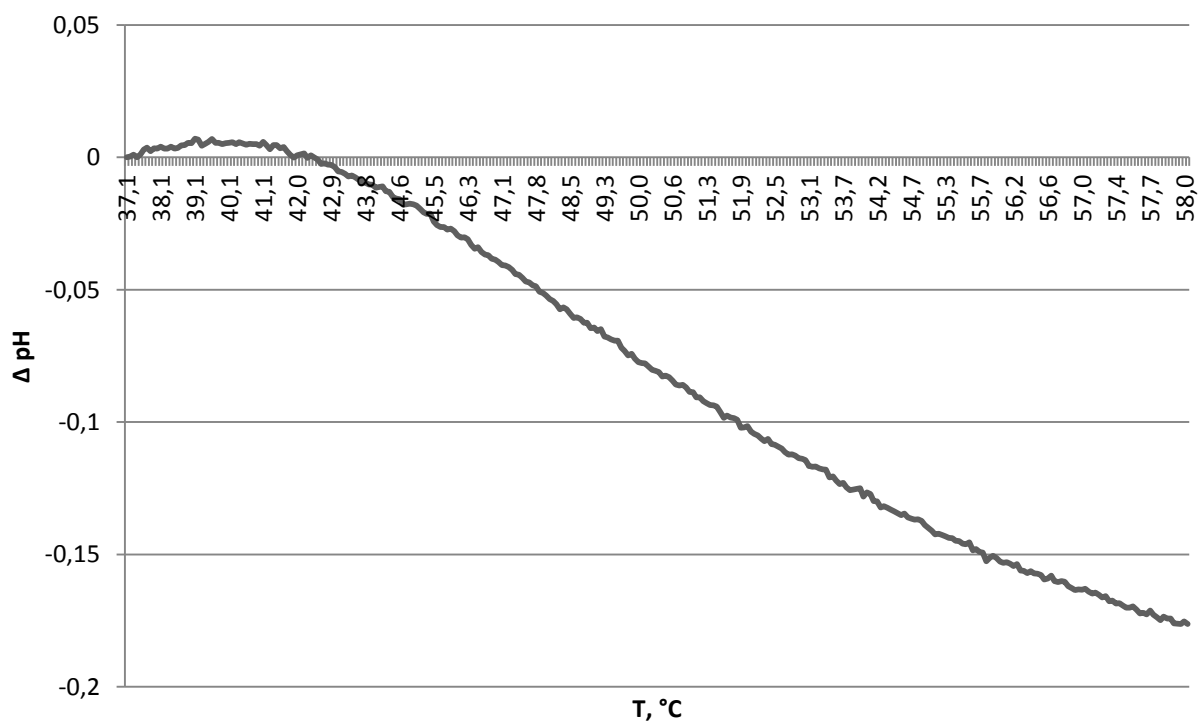


Рисунок 69 – Второй тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим пиелонефритом, ХБП 4

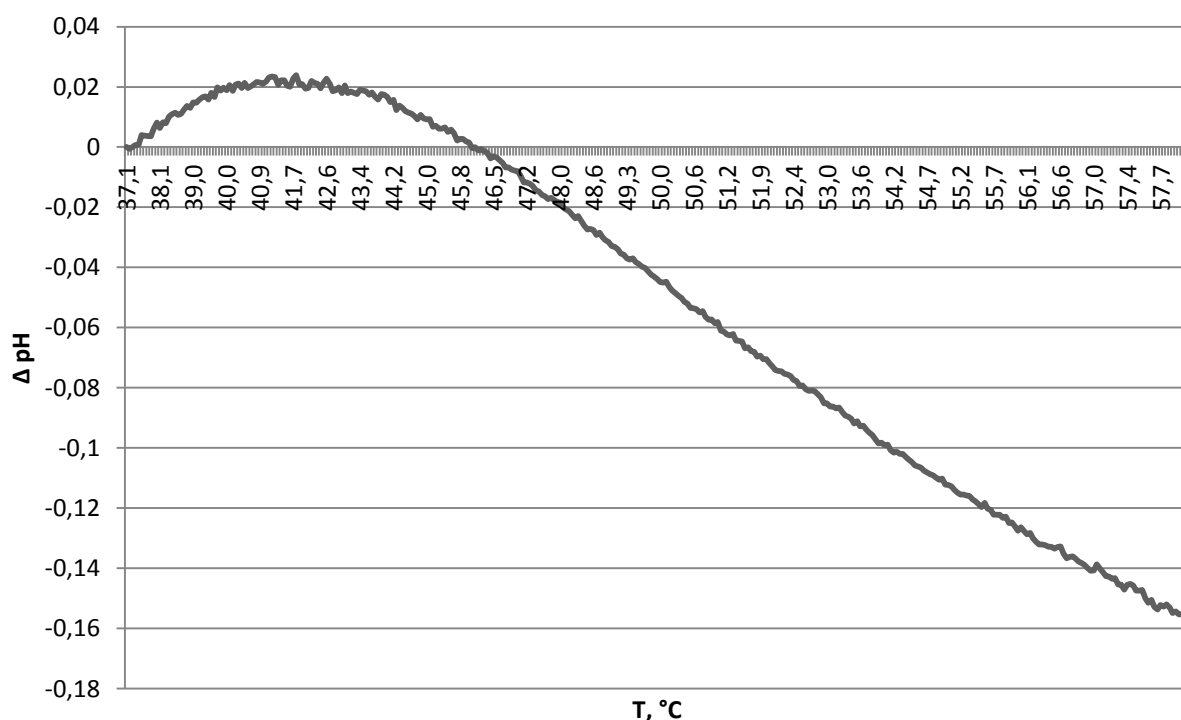


Рисунок 70 – Третий тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим пиелонефритом, ХБП 4

У 16,67 % (1,14 %; 58,22 %) лиц с хроническим пиелонефритом, ХБП 4 наблюдался возрастающе-убывающий тип эритроцитарных термограмм (рисунок 70). Среднее максимальное Δ рН в положительной области 0,024, в отрицательной -0,157. Точки, соответствующие началу снижения рН лежали в области от 42 °С до 43 °С

У 16,67 % (1,14 %; 58,22 %) пациентов с хроническим пиелонефритом, ХБП 4 наблюдался индивидуальный тип зарядовой кривой изменения рН эритроцитов в условиях термоиндукции. Данный тип эритроцитарной термограммы не регистрировался в других группах. В данном случае зарядовая кривая эритроцитов имела несколько отрезков: резко возрастающий, плавно убывающий, и прямолинейный (рисунок 71). Точки максимальных изменений рН 0,089 и -0,017. Точки перехода фаз 44 °С и 56,5 °С.

Индивидуальный тип зарядовой кривой эритроцитов также наблюдался у 16,67 % (1,14 %; 58,22 %) пациентов из группы хронического пиелонефрита, ХБП 4. Данный тип эритроцитарной кривой имел два участка: повышения рН и его понижения, но все эти изменения протекали только в положительной области осей координат (рисунок 72). Максимальное Δ рН 0,125 и температуре 46,6 °С.

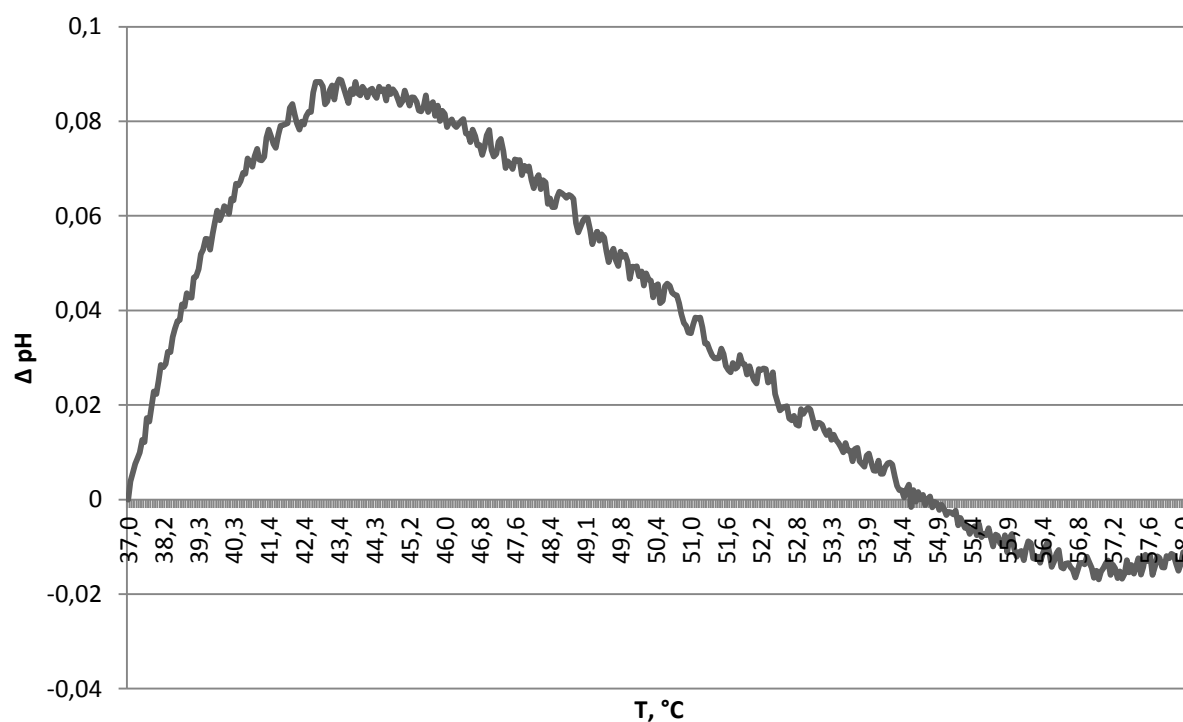


Рисунок 71 – Индивидуальный тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим пиелонефритом, ХБП 4

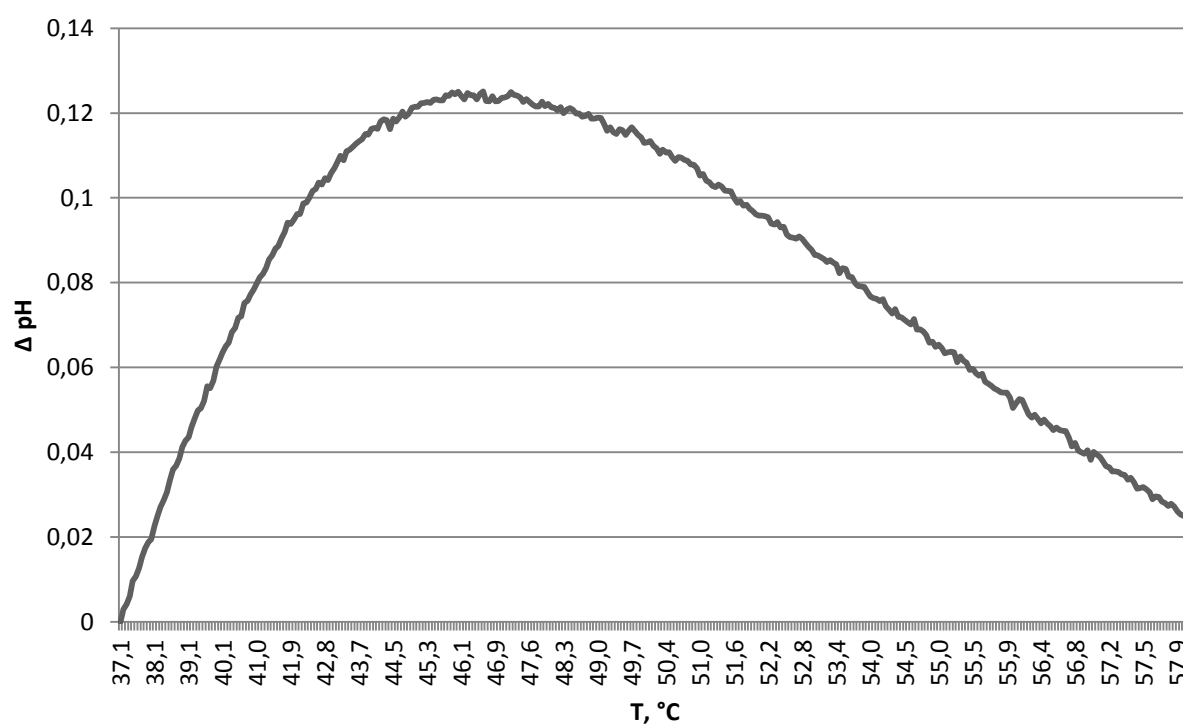


Рисунок 72 – Индивидуальный тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим пиелонефритом, ХБП 4

Термограммы эритроцитов у додиализных пациентов с хроническим пиелонефритом, ХБП 5, записанные при инкубации эритроцитарной взвеси в диапазоне изменения температуры от 37 °С до 58 °С, в 100 % случаях имели вид равномерно убывающей кривой (рисунок 73). Максимальные отрицательные значения Δ рН относительно контрольной точки в 37 °С лежали в области от -0,349 до -0,398 со средним значением -0,379.

У 100 % больных с хроническим пиелонефритом, ХБП 5, которые получают гемодиализ график изменения рН эритроцитов при их нагревании от 37 °С до 58 °С имел вид равномерно убывающей кривой (рисунок 74). Максимальные отрицательные значения Δ рН относительно контрольной точки в 37 °С лежали в области от -0,363 до -0,433 со средним значением -0,391.

У 80 % (35,96 %; 97,97 %) больных из группы пациентов с хроническим гломерулонефритом, ХБП 1 график изменения рН при нагревании эритроцитарной взвеси от 37 °С до 58 °С имел вид равномерно убывающей кривой (рисунок 75). Максимальные отрицательные значения Δ рН относительно контрольной точки в 37 °С лежали в области от -0,348 до -0,451 со средним значением -0,406.

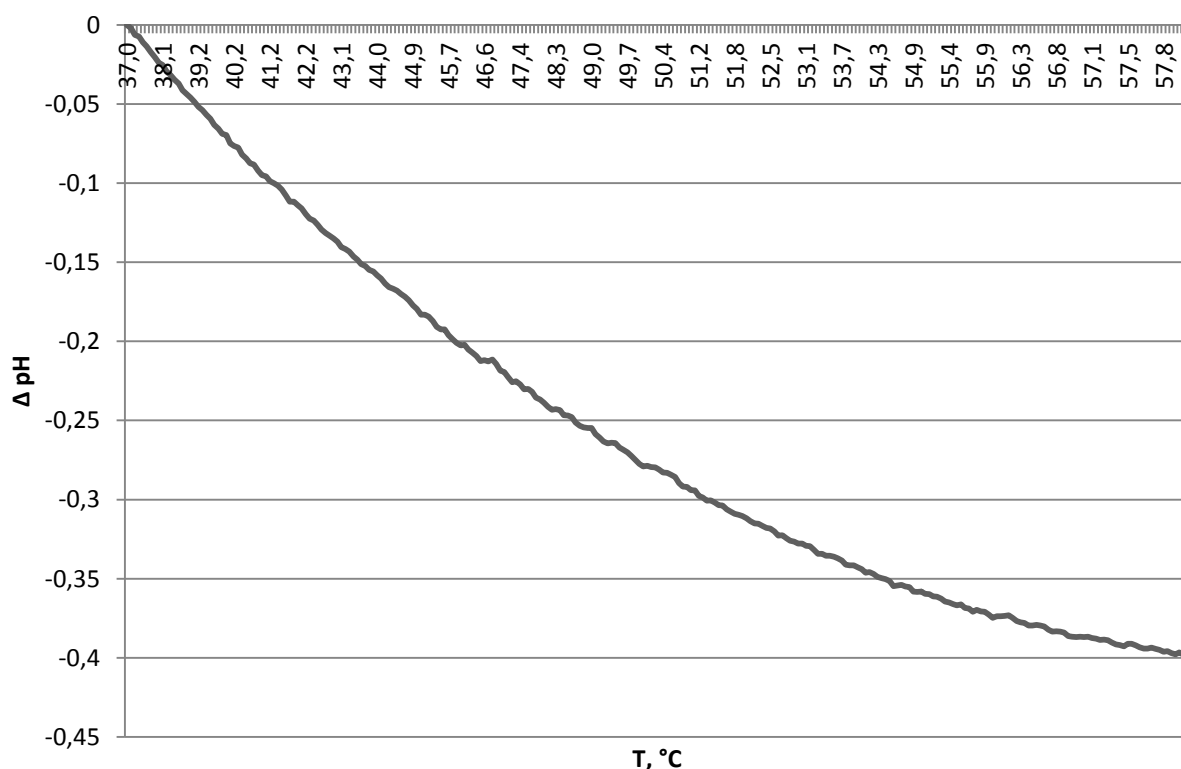


Рисунок 73 – Первый (единственный) тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим пиелонефритом, ХБП 5 (до диализа)

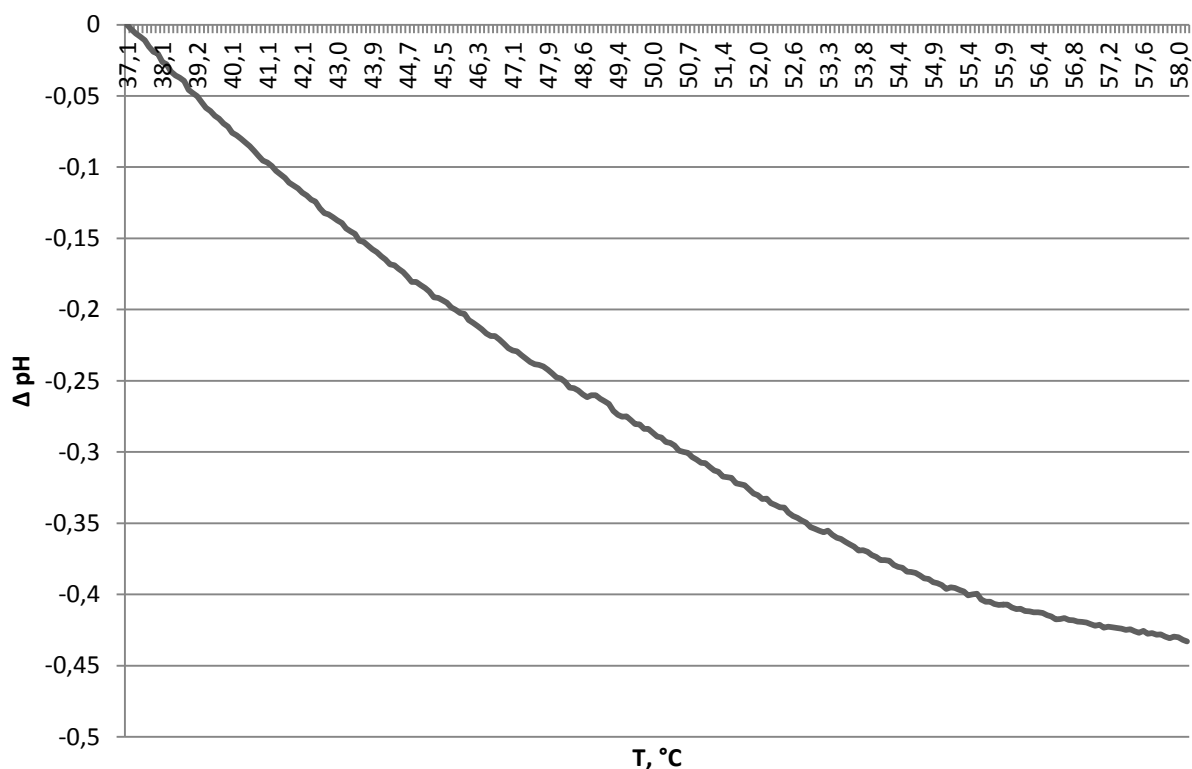


Рисунок 74 – Первый (единственный) тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим пиелонефритом, ХБП 5 (диализ)

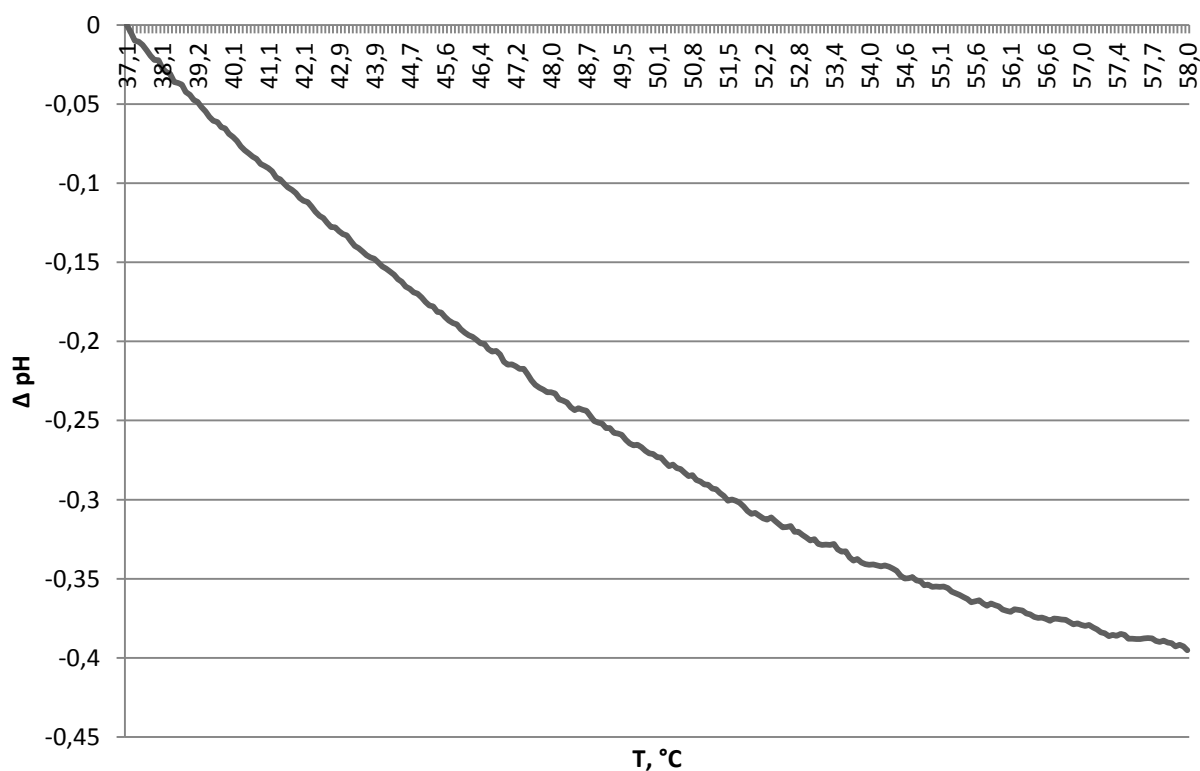


Рисунок 75 – Первый тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим гломерулонефритом, ХБП 1

У 20 % (2,03 %; 64,04 %) пациентов с хроническим гломерулонефритом, ХБП 1 эритроцитарная термограмма, записанная в диапазоне температур от 37 °С до 58 °С, имела вид кривой с участком плавного повышения рН, который сменялся участком плавного его понижения (рисунок 76). Средний положительный максимум Δ рН составил 0,013 единиц, отрицательный -0,152, точки, соответствующие началу снижения рН лежали в диапазоне 40 °С - 41 °С.

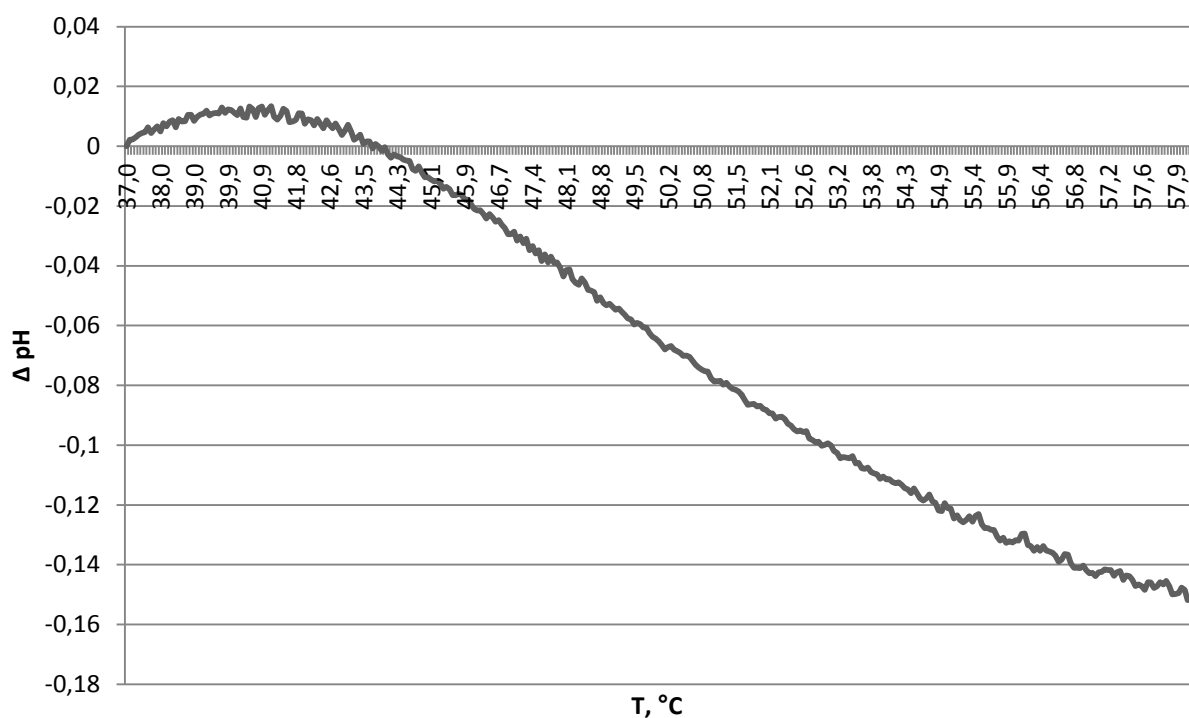


Рисунок 76 – Второй тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим гломерулонефритом, ХБП 1

У 80 % (35,96 %; 97,97 %) обследованных больных из группы пациентов с хроническим гломерулонефритом, ХБП 2 наблюдались равномерно убывающие эритроцитарные термограммы (рисунок 77). Положительное изменение рН при данном типе зарядовых кривых отсутствует, отрицательное варьирует от -0,183 до -0,396, со средним Δ рН -0,302 относительно рН при 37 °С.

У 20 % (2,03 %; 64,04 %) обследованных больных с хроническим гломерулонефритом, ХБП 2 наблюдался плавно возрастающий и плавно убывающий тип зарядовой кривой (рисунок 78). Среднее значение максимального положительного пика изменения рН = 0,031 в сравнении с контрольной точкой при температуре 37 °С. Среднее максимальных отрицательных значений изменения рН = -0,129. Точка перехода, соответствующая началу снижения рН примерно 42 °С.

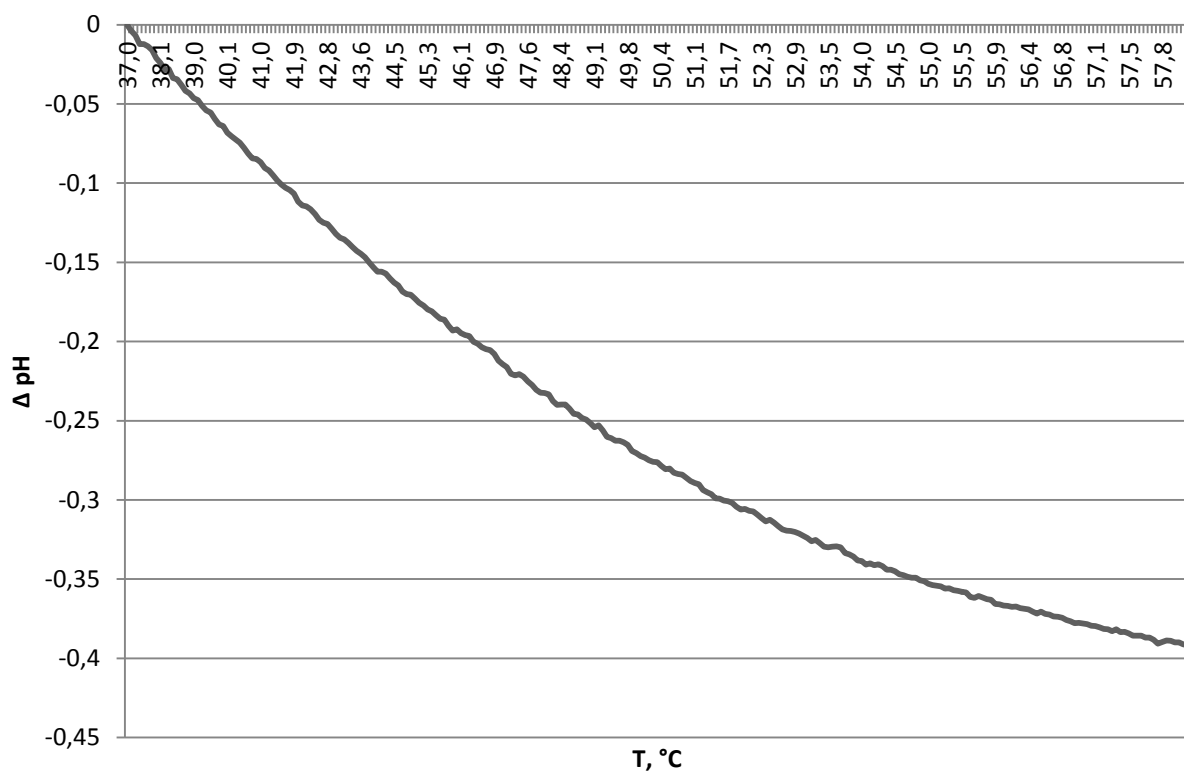


Рисунок 77 – Первый тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим гломерулонефритом, ХБП 2

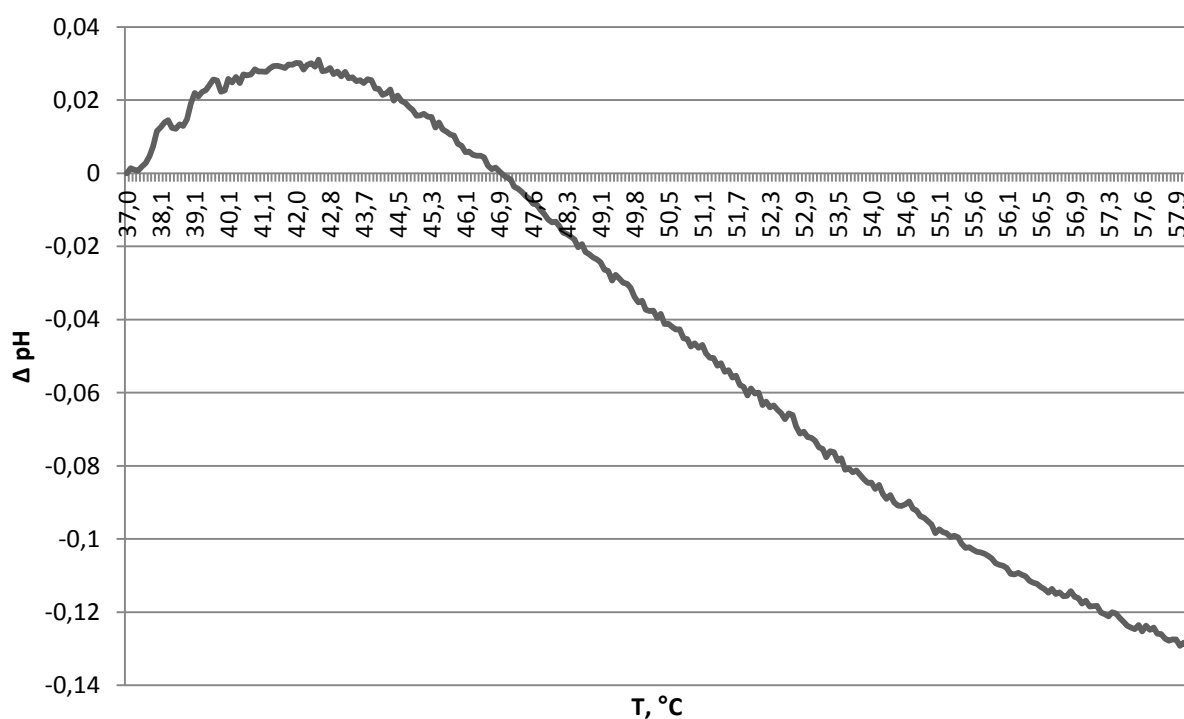


Рисунок 78 – Второй тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим гломерулонефритом, ХБП 2

У пациентов с хроническим гломерулонефритом, ХБП 3 в 50 % (18,76 %; 81,24 %) случаев зависимость изменения рН эритроцитарной массы от температуры имела вид равномерно убывающей кривой (рисунок 79). Среднее отрицательное максимальное значение Δ рН относительно начальной точки отчета при 37 °С равнялось -0,406 единиц (диапазон от -0,382 до -0,420).

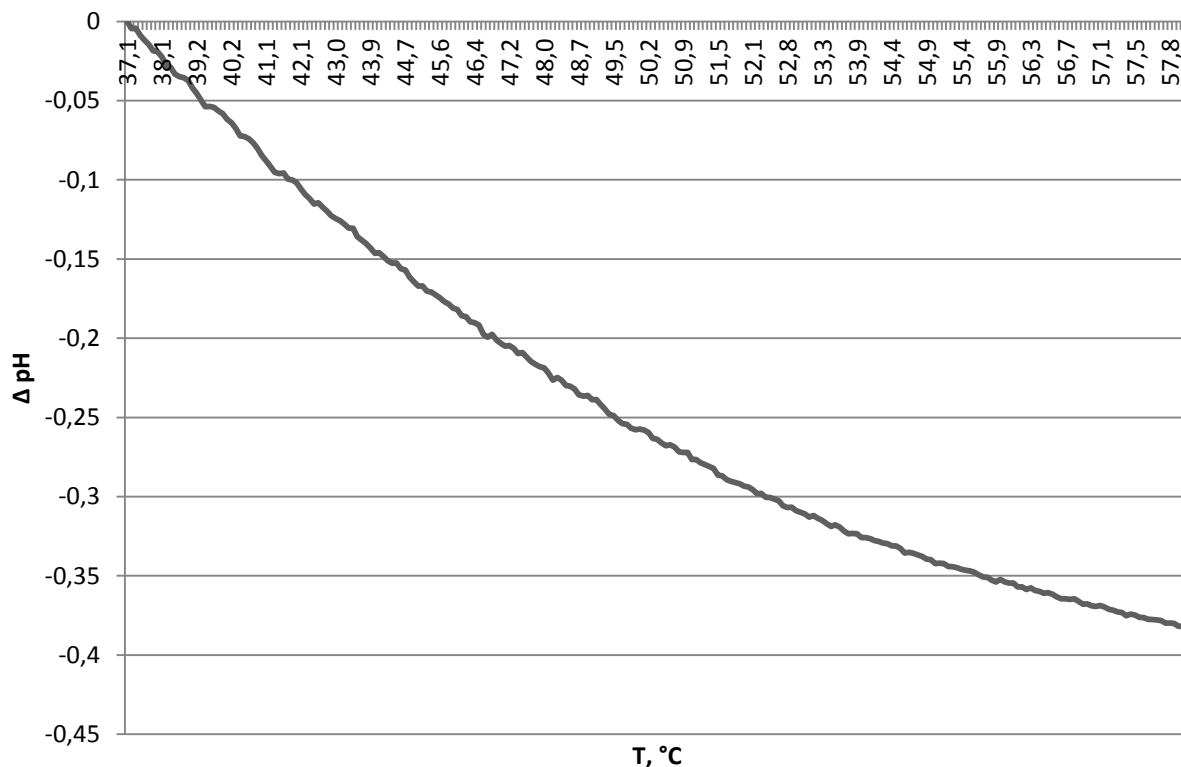


Рисунок 79 – Первый тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим гломерулонефритом, ХБП 3

У 16,67 % (1,14 %; 58,22 %) обследованных больных с ХБП 3, развившейся на фоне хронического гломерулонефрита, зависимость изменения рН эритроцитов от температуры характеризовалась наличием условно прямолинейного отрезка в начале графика, переходящим в равномерно убывающую кривую (рисунок 80). Максимальное отрицательное изменение рН составило -0,213 по сравнению с контрольной точкой при 37 °С. Условная прямолинейность наблюдалась в пределах от 37 °С до 39 °С [110, с. 96].

У 33,33 % (9,25 %; 70,43 %) пациентов с хроническим гломерулонефритом, ХБП 3 наблюдался плавно возрастающий и плавно убывающий тип зарядовой кривой эритроцитов (рисунок 81). Максимальные значения положительного пика Δ рН в сравнении с контрольной точкой при температуре 37 °С регистрировались в диапазоне от 0,022 до 0,035 единиц (среднее 0,029), отрицательного в диапазоне от -0,123 до -0,133 (среднее -0,128) соответственно. Точки перехода, соответствующие началу снижения рН лежали в пределах 41 °С - 42 °С [110, с. 96].

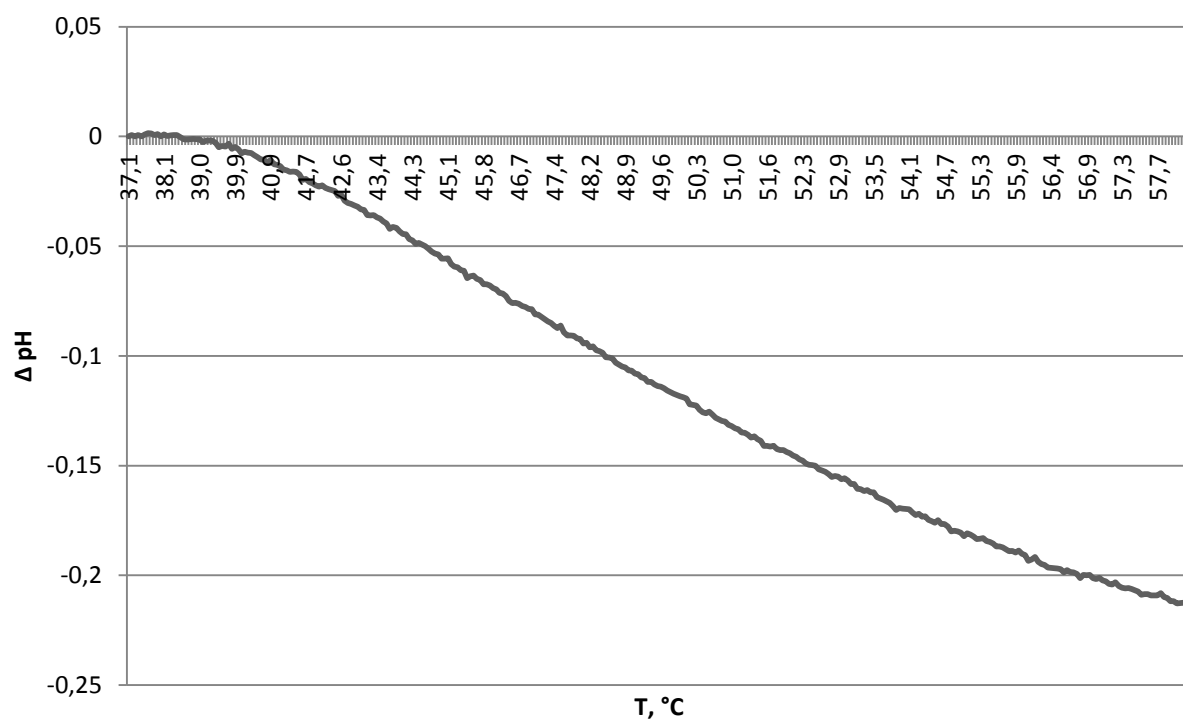


Рисунок 80 – Второй тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим гломерулонефритом, ХБП 3

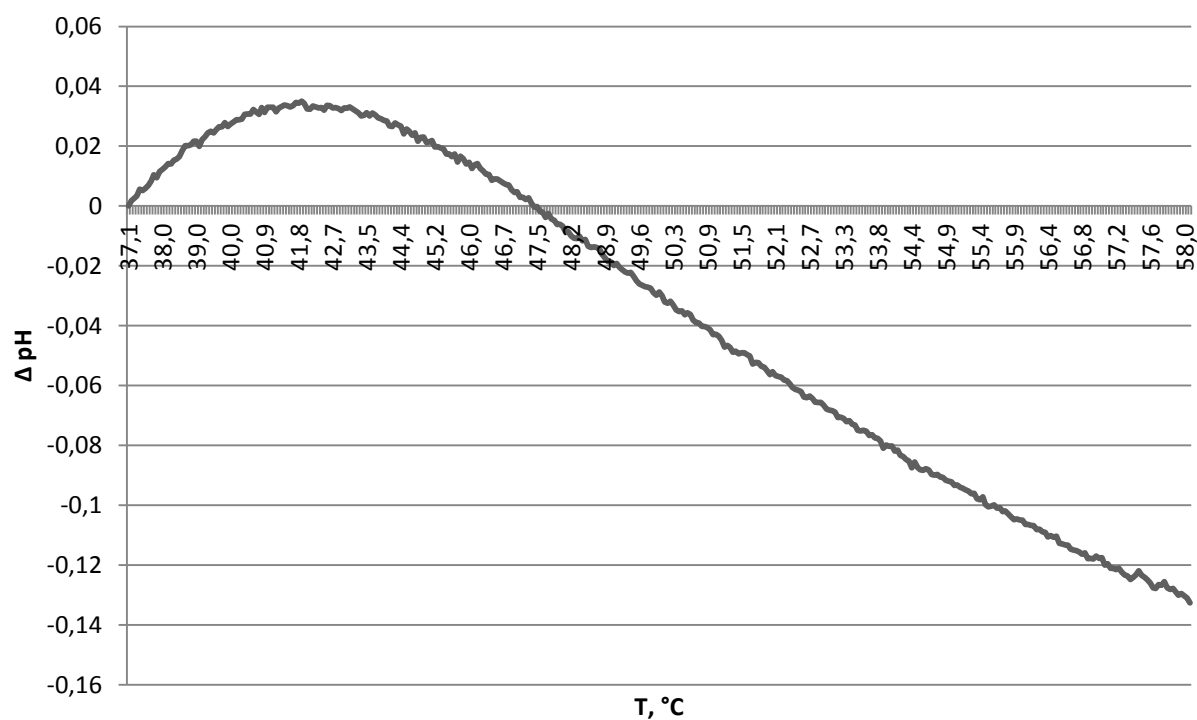


Рисунок 81 – Третий тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим гломерулонефритом, ХБП 3

В группе пациентов с хроническим гломерулонефритом, ХБП 4 в 60 % (22,91 %; 88,40 %) случаев график изменения рН при нагревании эритроцитарной массы от 37 °С до 58 °С имел вид равномерно убывающей кривой (рисунок 82). Максимальные отрицательные значения Δ рН относительно контрольной точки в 37 °С лежали в области от -0,387 до -0,403 со средним значением -0,394.

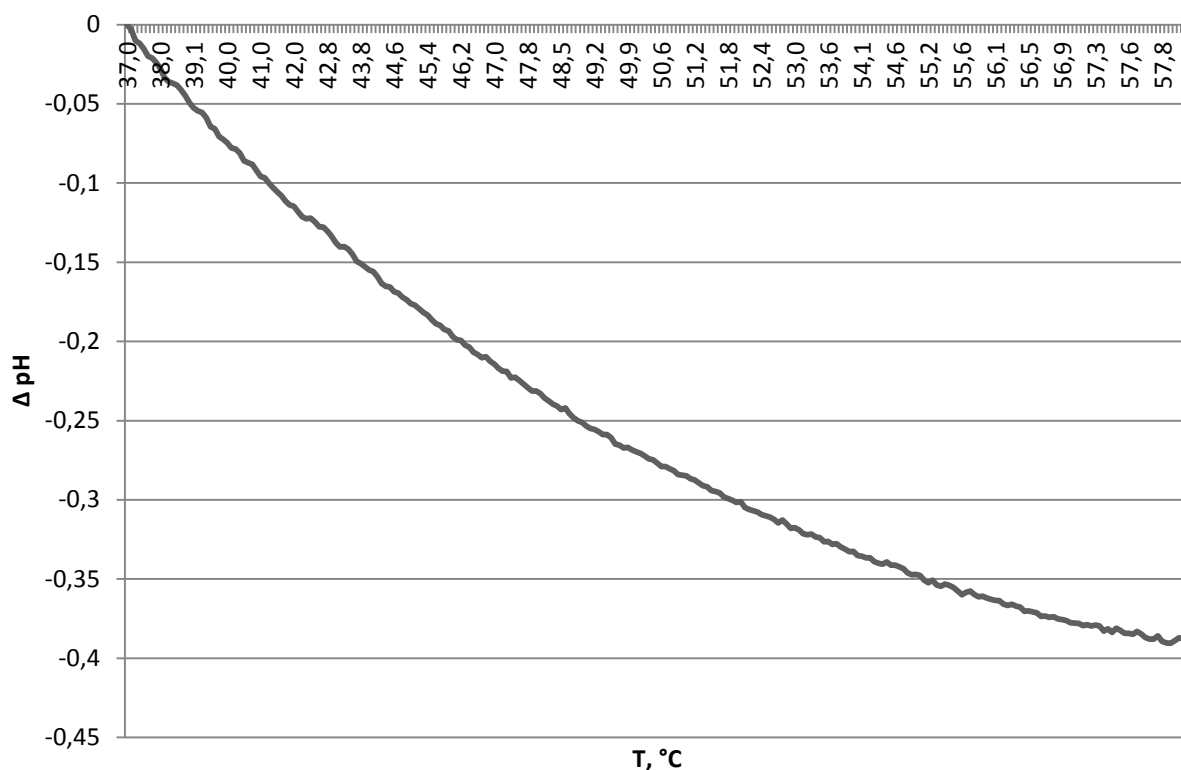


Рисунок 82 – Первый тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим гломерулонефритом, ХБП 4

У 40 % (11,60 %; 77,09 %) пациентов с хроническим гломерулонефритом, ХБП 4 наблюдался плавно возрастающий и плавно убывающий тип эритроцитарной зарядовой кривой (рисунок 83). Среднее значение максимального положительного пика изменения рН = 0,019 (диапазон от 0,020 до 0,019). Среднее максимальных отрицательных значений изменения рН = -0,146 (диапазон от -0,145 до -0,147). Температурная точка перехода, соответствующая началу снижения рН примерно 41 °С.

У всех пациентов с хроническим пиелонефритом, ХБП 5 стадии, проходящих гемодиализ, зависимости изменения рН эритроцитов от температуры инкубации имели вид равномерно убывающей кривой (рисунок 84). Максимальные отрицательные значения Δ рН лежат в диапазоне от -0,251 до -0,277, со средним значением -0,264 [110, с. 96].

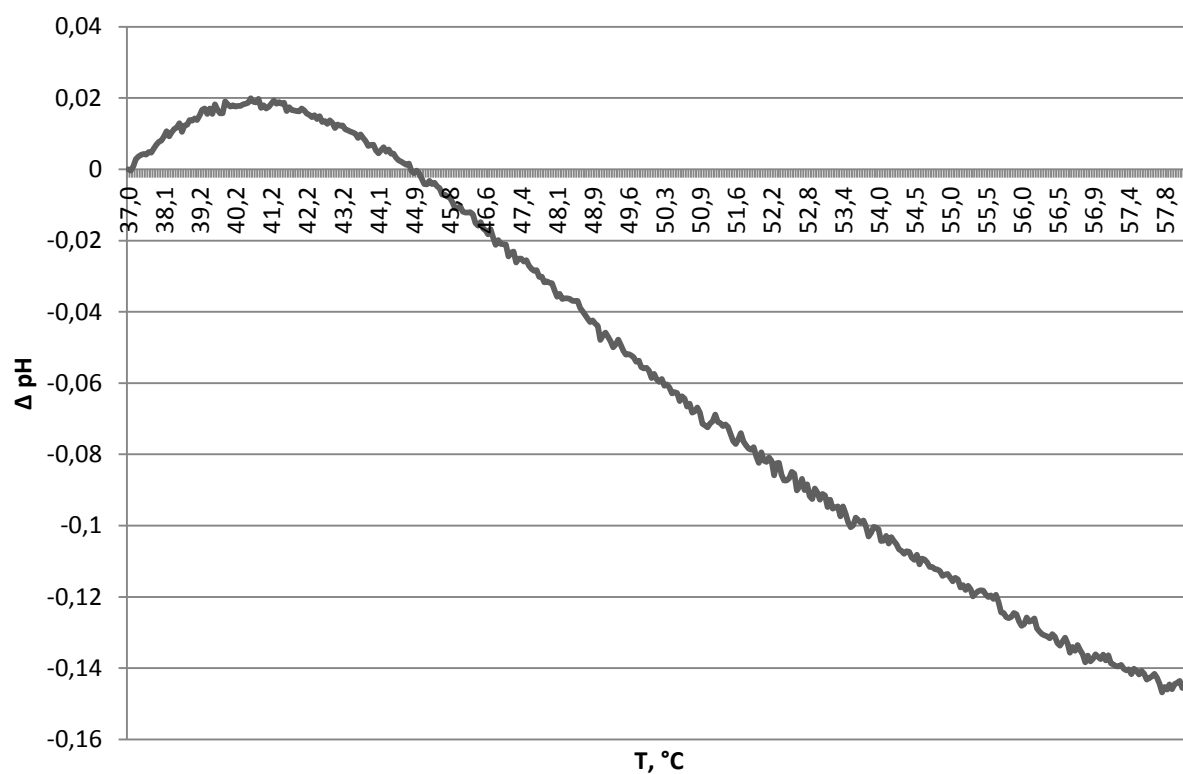


Рисунок 83 – Второй тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим гломерулонефритом, ХБП 4

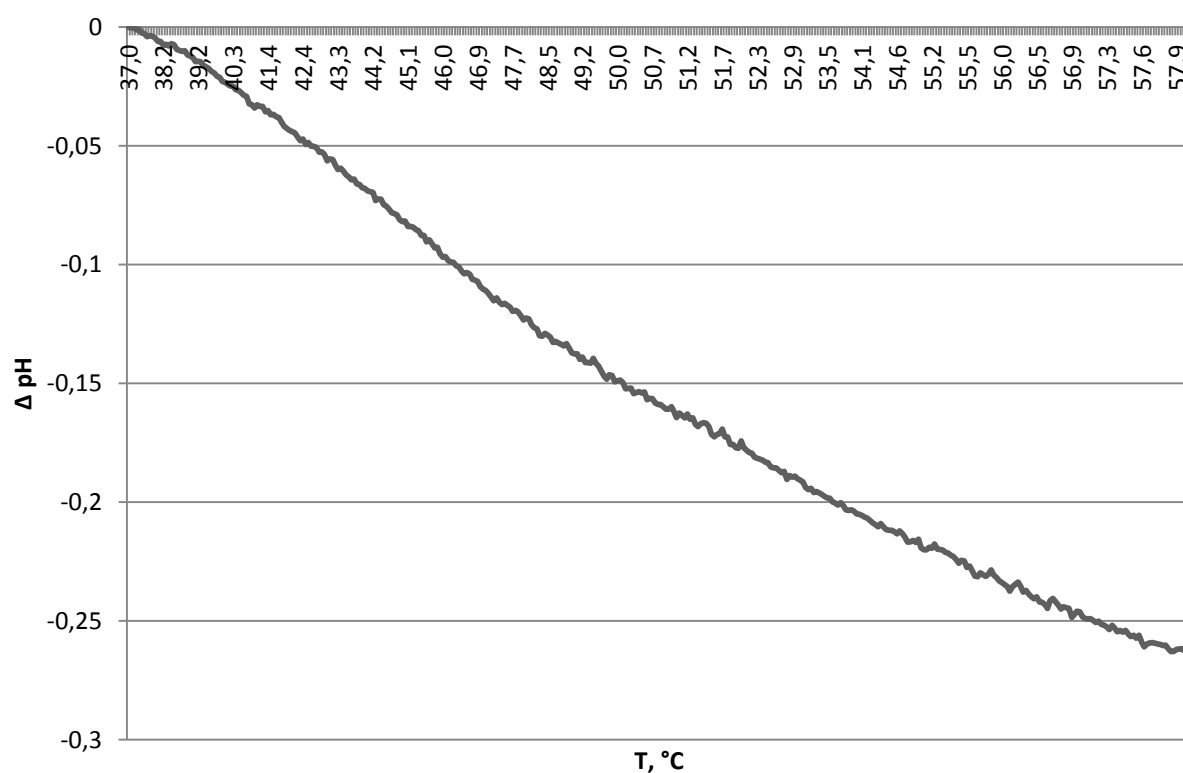


Рисунок 84 – Первый (единственный) тип термограмм эритроцитов, зарегистрированный у пациента с хроническим гломерулонефритом, ХБП 5 (диализ)

Полученные нами данные показали изменение рН эритроцитов в условиях термоиндукции у больных с хронической болезнью почек в зависимости от стадии и этиологической характеристики. Установлен тренд нарушений зарядового баланса эритроцитов у больных при развитии ХБП и изменения выраженности этих нарушений при прогрессировании ХБП. По нашим предположениям, вариабельность данного параметра в пределах одной группы обусловлена неоднородностью пула эритроцитов, что приводит к различной степени выраженности зарядовых изменений клеток, в ответ на изменения свойств клеточных мембран и состава крови вследствие ХБП [110, с. 99].

3.5 Концепция роли изменения физико-химических свойств мембран эритроцитов в прогрессировании хронической болезни почек

В настоящее время окислительный стресс определяется как один из ведущих механизмов развития и прогрессирования ХБП [111, 112]. Окислительный стресс оказывает выраженное воздействие на состояние мембран клеток крови. У больных ХБП модифицирующими факторами окислительного стресса являются МДА, карбониловые производные белков и мембранно-связанный гемоглобин [110, с. 162 - 163]. Увеличение доли мембранно-связанного гемоглобина вносит существенный вклад в прогрессирование окислительного стресса в эритроцитах, так как мембранно-связанный гемоглобин, способен генерировать пероксид водорода [113]. Основными мишенями окислительного стресса в эритроцитах являются белки эритроцитарных мембран и ионообменники. Так перекисное окисление липидов и белков мембран эритроцитов приводит к изменению конформации и липидного окружения трансмембранных переносчиков.

Некротическая и апоптотическая гибель клеток в условиях уремии и окислительного стресса, а также персистирующее бактериальное воспаление приводят к тому, что в плазме крови повышается количество различных метаболитов. Стоит отметить, что источником внеклеточных нуклеиновых кислот, помимо некроза клеток, являются активные нейтрофилы, выбрасывающие внеклеточные ловушки, которые содержат фрагменты ДНК, нейтрофильную эластазу, миелопероксидазу и катепсин G [114]. В норме нуклеиновые кислоты, попавшие в кровоток, быстро разрушаются под действием ДНКаз и РНКаз. Имеются данные, что у пациентов с почечной патологией снижена активность ренальной ДНКазы 1, поэтому есть вероятность того, что у больных с ХБП фрагменты нуклеиновых кислот будут циркулировать в крови более длительное время [115]. Источниками низко- и среднемолекулярных веществ также могут являться еще неповрежденные клетки, которые выпускают различные аллармины [116]. Таким образом, на мембранах эритроцитов у пациентов с ХБП адсорбируется избыточное количество патологических веществ, что также приводит к изменению свойств, конформации и активности трансмембранных белков-переносчиков. В

подобных условиях мембраны становятся более жесткими, уменьшается их текучесть и повышается их хрупкость.

В работе было показано изменение аммонийной стойкости эритроцитов у больных с ХБП по сравнению со здоровыми людьми. Этот показатель отражает изменение активности белка полосы 3. По нашему мнению, у пациентов с ХБП, окислительный стресс и вещества, адсорбированные на мембране эритроцитов, снизили активность белка полосы 3, следовательно, снизился поток анионов через мембрану. Поэтому у больных с ХБП наблюдается феномен увеличения времени выживания эритроцитов в аммонийной среде. С одной стороны подобные изменения белка полосы 3 приводят к критическим последствиям. Так, белок полосы 3 связан с транспортом кислорода, и в условиях его неадекватной работы снижается скорость трансмембранного переноса кислорода, что в свою очередь вносит вклад в развитие системной гипоксии у пациентов с ХБП. Также белок полосы участвует в транспорте и метаболизме глюкозы в эритроците, поэтому его дисфункция может приводить к развитию гипохромированного состояния и к гибели клетки [117]. С другой стороны, снижение активности белка полосы 3 в эритроцитах больных с ХБП может иметь компенсаторное значение, и в условиях уремии приводить к стабилизации мембраны через изменение ее деформационных свойств.

Результаты по исследованию осмотической резистентности эритроцитов показали повышение в популяции среднестойких и низкостойких эритроцитов, что свидетельствует о появлении ригидных форм эритроцитов и об увеличении числа молодых клеток в крови больных ХБП. Эритроциты у пациентов с ХБП созревают в условиях измененной тоничности среды, что также вносит свой вклад в снижение способности эритроцитов к обратимой деформации и в развитие внутрисосудистого гемолиза [110, с. 164].

Между эритроцитами и плазмой крови существует окислительно-восстановительная система [118, 119]. Нарушение данной системы может быть позиционировано как фактор изменения зарядового баланса эритроцитов у пациентов с хронической болезнью почек.

Изменение заряда эритроцитов у больных с ХБП является негативным фактором, поскольку эритроциты способны образовывать агрегаты и микрочастицы в кровотоке. Микрочастицы в настоящее время позиционируются как самостоятельные эффекторы, повреждающие клетки почек и почечного эндотелия [120]. Стойкий окислительный стресс и изменение деформационных свойств эритроцитов приводит к эритроптозу, что создает дополнительные условия для развития анемии у пациентов с ХБП. Повышение жесткости мембраны, снижение ее резистентности и нарушение регуляции объема эритроцитов повышает вероятность внутрисосудистого гемолиза красных клеток крови [110, с. 163]. Внеклеточный гемоглобин обладает выраженным вазоконстрикторным эффектом и прямым токсическим действием на почки [121].

Таким образом, с одной стороны изменение структурно-функциональных свойств мембран эритроцитов усиливается с прогрессированием ХБП, а с другой стороны, само приводит к усугублению течения ХБП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поставленные цель и задачи диссертационного исследования выполнены полностью. Разработаны оригинальные методики определения выживаемости эритроцитов в аммонийной среде и зарядового баланса эритроцитов в условиях термоиндукции. Получены новые данные о физико-химических свойствах эритроцитов у пациентов с хронической болезнью почек на различных стадиях ее развития. Это позволило разработать концепцию о роли изменения физико-химических свойств мембран эритроцитов в прогрессировании хронической болезни почек.

Результаты диссертационного исследования могут быть рекомендованы для разработки новых критериев оценки темпов прогрессирования хронической болезни почек и для использования в учебном процессе на различных образовательных программах медицинских ВУЗов.

Сравнение выполненной работы с лучшими достижениями в области изучения физико-химических свойств мембран эритроцитов при патологических состояниях позволяет утверждать, что проведенное исследование является самостоятельным и оригинальным. Полученные результаты дополняют и расширяют имеющиеся теоретические представления о роли изменения физико-химических параметров эритроцитов в прогрессировании хронической болезни почек.

Выводы

1. У пациентов с хронической болезнью почек снижена осмотическая резистентность эритроцитов, увеличен пул низкостойких и среднестойких эритроцитов. В группе больных с хроническим пиелонефритом наименьшая осмотическая резистентность эритроцитов наблюдается на поздних стадиях развития ХБП. У пациентов с хроническим гломерулонефритом наименьшая осмотическая резистентность эритроцитов наблюдается на ранних стадиях развития ХБП.

2. У пациентов с хронической болезнью почек эритроциты обладают большей стабильностью в аммонийной среде по сравнению с контролем. У пациентов с хроническим пиелонефритом и у пациентов с хроническим гломерулонефритом наибольшее время выживания эритроцитов в аммонийной среде наблюдается в группах больных с ХБП 4 стадии.

3. На мембранах эритроцитов больных с хронической болезнью почек по сравнению с контролем сорбируется большее количество среднемолекулярных веществ и фрагментов внеклеточных нуклеиновых кислот. При прогрессировании ХБП количество метаболитов, сорбированных на эритроцитах, увеличивается. Адсорбция фрагментов РНК на эритроцитах пациентов с хроническим гломерулонефритом превалирует над адсорбцией фрагментов ДНК.

4. У пациентов с хронической болезнью почек в эритроцитах повышен уровень мембранно-связанного гемоглобина – основного показателя

отдаленных продуктов окислительного стресса. При этом максимум мембранно-связанного гемоглобина и у пациентов с хроническим пиелонефритом и у пациентов с хроническим гломерулонефритом наблюдается в группах больных с ХБП 2 стадии.

5. У пациентов с хронической болезнью почек наблюдается изменение зарядового баланса эритроцитов по сравнению со здоровыми людьми. У пациентов с хронической болезнью почек были зарегистрированы индивидуальные типы эритроцитарных термограмм.

6. Изменение структурно-функциональных свойств мембран эритроцитов усиливается с прогрессированием хронической болезни почек с одной стороны и само приводит к усугублению течения хронической болезни почек с другой стороны.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Garcia-Garcia G., Jha V. Chronic kidney disease (CKD) in disadvantaged populations // *Clinical Kidney Journal*. – 2015. – Vol. 8, issue 1. – P. 3 – 6.
- 2 Джунусбекова Г.А. Эпидемиология хронической почечной недостаточности. Новые подходы к классификации почечной патологии: хроническая болезнь почек // *Терапевтический вестник*. – 2010. – №3. – С. 12 – 14.
- 3 Tangri N., Stevens L.A., Griffith J. et al. A predictive model for progression of chronic kidney disease to kidney failure // *JAMA*. – 2011. – Vol. 305, № 15. – P. 1553 – 1559.
- 4 Земченков А., Конакова И., Шостка Г. и др. Темпы прогрессирования хронической болезни почек и своевременность начала диализа // *Врач*. – 2011. – № 6. – С. 17 – 23.
- 5 Милованова Л.Ю., Милованов Ю.С., Козловская Л.В. и др. Значение морфогенетических белков *fgf-23* и *klotho* как предикторов прогноза хронической болезни почек // *Терапевтический архив*. – 2014. – №4. – С. 36 – 44.
- 6 Jha V., Garcia-Garcia G., Iseki K., et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives // *Lancet*. – 2013. – Vol 382. – P. 260–272.
- 7 Смирнов А.В., Шилов Е.М., Добронравов В.А. и др. Национальные рекомендации. Хроническая болезнь почек: основные принципы скрининга, диагностики, профилактики и подходы к лечению // *Нефрология*. – 2012. – Т. 16, № 1. – С. 89 – 115.
- 8 Garcia-Garcia G., Jha V. World Kidney Day Steering Committee Environmental and occupational factors in CKD // *Occup. Environ. Med.* – 2015 – Vol. 72, № 3. – P. 238.
- 9 Tonelli M., Agarwal S., Cass A. et al. How to advocate for the inclusion of chronic kidney disease in a national noncommunicable chronic disease program // *Kidney Int.* – 2014. – Vol. 85, № 6. – 1269 – 1274.
- 10 Канатбаева А.Б., Кабулбаев К.А. Хроническая болезнь почек-глобальная проблема общественного здоровья (Обзор литературы и результаты скрининга в г.Алматы) // *Медицина*. – 2009. – № 1. – С. 9 – 15.
- 11 Нургазина Л.С., Омарова Г.С., Улыбышева О.Т. и др. Хроническая болезнь почек у пожилых // *Терапевтический вестник*. – 2010. – № 2. – С.110.
- 12 Смирнов А.В., Добронравов В.А., Каюков И.Г. и др. Рекомендации научно-исследовательского института нефрологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова: определение, классификация, диагностика и основные направления профилактики хронической болезни почек у взрослых // *Нефрология*. – 2008. – Т. 12, № 2. – С. 75 – 93.
- 13 Шутов А.М. Хроническая болезнь почек - глобальная проблема XXI века // *Клиническая медицина*. – 2014. – № 5. – С. 5 – 10.

- 14 Сигитова О.Н., Архипов Е.В. Хроническая болезнь почек: новое в классификации, диагностике, нефропротекции // Вестник современной клинической медицины. – 2014. – Т. 7, прил. 1. – С. 103 – 106.
- 15 Жданова Т.В., Карпухина М.Н., Плаксина С. и др. Кардиоренальный синдром - актуальная проблема современности. Литературный обзор // Уральский медицинский журнал. – 2015. – № 2 (125). – С. 110 – 116.
- 16 Драпкина О.М., Корнеева О.Н. Статины при хронической болезни почек. Существует ли препарат выбора? // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2015. – № 6. – С. 78 – 82.
- 17 National Kidney Foundation KD: Clinical practice guidelines for chronic Kidney disease: Evaluation, classification and stratifications // Am. J. Kidney Dis. – 2002. – Vol. 39, № 1. – P. 1 – 266.
- 18 Glynn L.G., Reddan D., Newell J. et al. Chronic kidney disease and mortality and morbidity among patients with established cardiovascular disease: a West of Ireland community-based cohort study // Nephrol. Dial. Transplant. – 2007. – Vol. 22, № 9. – 2586 – 2594.
- 19 Levey A.S., de Jong P.E., Coresh J. et al. The definition, classification and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report // Kidney Int. – 2010 // <http://www.kidney-international.org>.
- 20 Levey A.S., Eckardt K.U., Tsukamoto Y. et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) // Kidney Int. – 2005. – Vol. 67, № 6. – P. 2089 – 2100.
- 21 Мухин Н.А., Балкаров И.М., Моисеев В.С. и др. Хронические прогрессирующие нефропатии и образ жизни современного человека // Терапевтический архив. – 2004. – Т. 76, № 9. – С. 5 – 10.
- 22 Мухин Н.А., Моисеев В.С., Кобалава Ж.Д. и др. Кардио-ренальные взаимодействия: клиническое значение и роль в патогенезе заболеваний сердечно-сосудистой системы и почек // Терапевтический архив. – 2004, – № 6. – С. 39 – 46.
- 23 Арьев А.Л., Овсянникова Н.А. Арьева Г.Т. Факторы риска развития и прогрессирования патологии почек, сердечно-сосудистой и цереброваскулярной систем едины (взгляд гериатра) // Нефрология. – 2011. – Т. 15, №1. – С. 76 – 83.
- 24 Смирнов А.В., Каюков И.Г., Добронравов В.А. Концепция факторов риска в нефрологии: вопросы профилактики и лечения хронической болезни почек // Нефрология. – 2008. – Т. 12, №1. – С. 7 – 13.
- 25 Муравлёва Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Ключев Д.А. и др. Белки эритроцитов. Миниобзор // Успехи современного естествознания. – 2013. – № 4. – С. 28 – 31.
- 26 Baines A.J. Evolution of the spectrin-based membrane skeleton // Transfus. Clin. Biol. – 2010. – Vol. 17, № 3. – P. 95 – 103.
- 27 Zhang R., Zhang C., Zhao Q. et al. Spectrin: structure, function and disease // Sci. China Life. Sci. – 2013. – Vol. 56, № 12. – P. 1076 – 1085.

- 28 Bennett V., Baines A.J. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues // *Physiol. Rev.* – 2001. – Vol. 81, № 3. – P. 1353 – 1392.
- 29 Franco T., Low P.S. Erythrocyte adducin: a structural regulator of the red blood cell membrane // *Transfus. Clin. Biol.* – 2010. – Vol. 17, № 3. – P.87–94.
- 30 Nunomura W., Takakuwa Y. Regulation of protein 4.1R interactions with membrane proteins by Ca²⁺ and calmodulin // *Front. Biosci.* – 2006. – Vol. 1, № 11. – P. 1522 – 1539.
- 31 Nunomura W., Takakuwa Y., Parra M. et al. Regulation of protein 4.1R, p55, and glycophorin C ternary complex in human erythrocyte membrane // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol 275, № 32. – P. 24540-24546.
- 32 Gauthier E., Guo X., Mohandas N. et al. Phosphorylation-dependent perturbations of the 4.1R-associated multiprotein complex of the erythrocyte membrane // *Biochemistry.* – 2011. – Vol. 50, № 21. – P. 4561 – 4567.
- 33 Takakuwa Y. Protein 4.1, a multifunctional protein of the erythrocyte membrane skeleton: structure and functions in erythrocytes and nonerythroid cells // *Int. J. Hematol.* – 2000. – Vol. 72, № 3. – P. 298 – 309.
- 34 Hirai T., Yamaguchi T. Structure of human erythrocyte band 3: two-dimensional crystallographic analysis of the membrane domain // *Rinsho Ketsueki.* . – 2015. . – Vol. 56, № 7. – P. 31. – 36.
- 35 Bruce L.J., Beckmann R., Ribeiro M.L. et al. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane // *Blood.* . – 2003. – Vol. 101, № 10. – P. 4180. – 4188.
- 36 Barvitenko N.N., Adragna N.C., Weber R.E. Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2005. – Vol. 15, № 1 – 4. – P. 1 – 18.
- 37 Chu H., Low P.S. Mapping of glycolytic enzyme-binding sites on human erythrocyte band 3 // *Biochem. J.* – 2006. – Vol. 400, № 1. – P. 143 – 151.
- 38 Arakawa T., Kobayashi-Yurugi T., Alguel Y. et al. Crystal structure of the anion exchanger domain of human erythrocyte band 3 // *Science.* – 2015. – Vol. 350, № 6261. – P. 680 – 684.
- 39 Badens C., Guizouarn H. Advances in understanding the pathogenesis of the red cell volume disorders // *Br. J. Haematol.* – 2016 // doi: 10.1111/bjh.14197.
- 40 Pajic-Lijakovic I. Role of band 3 in the erythrocyte membrane structural changes under thermal fluctuations -multi scale modeling considerations // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2015. – Vol. 47, № 6. – P. 507 – 518.
- 41 Montel-Hagen A., Blanc L., Boyer-Clavel M. et al. The Glut1 and Glut4 glucose transporters are differentially expressed during perinatal and postnatal erythropoiesis // *Blood.* – 2008. – Vol. 112, № 12. – P. 4729 – 4738.
- 42 Levine K.B., Cloherty E.K., Fidyk N.J. et al. Structural and physiologic determinants of human erythrocyte sugar transport regulation by adenosine triphosphate // *Biochemistry.* – 1998 – Vol. 37, № 35. – P. 12221 – 12232.
- 43 Blodgett D.M., De Zutter J.K., Levine K.B. et al. Structural basis of GLUT1 inhibition by cytoplasmic ATP // *J Gen Physiol.* – 2007. – Vol. 130, № 2. – P. 157 – 168.

- 44 Concha I.I., Velásquez F.V., Martínez J.M. et al. Human erythrocytes express GLUT5 and transport fructose // *Blood*. – 1997. – Vol. 89, № 11. – P. 4190 – 4195.
- 45 Smith B.L., Preston G.M., Spring F.A. et al. Human red cell aquaporin CHIP. I. Molecular characterization of ABH and Colton blood group antigens // *J. Clin. Invest.* – 1994. – Vol. 94, № 3. – P. 1043 – 1049.
- 46 Kuchel P.W., Benga G. Why does the mammalian red blood cell have aquaporins? // *Biosystems*. – 2005. – Vol. 82, № 2. – P. 189 – 196.
- 47 Endeward V., Musa-Aziz R., Cooper G.J. et al. Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO₂ transport across the human erythrocyte membrane // *FASEB J.* – 2006. – Vol. 20, № 12. – P. 1974 – 1981.
- 48 Blank M.E., Ehmke H. Aquaporin-1 and HCO₃⁽⁻⁾-Cl⁻ transporter-mediated transport of CO₂ across the human erythrocyte membrane // *J. Physiol.* – 2003. – Vol. 550, № 2. – P. 419 – 429.
- 49 Rungaldier S., Oberwagner W., Salzer U. et al. Stomatin interacts with GLUT1/SLC2A1, band 3/SLC4A1, and aquaporin-1 in human erythrocyte membrane domains // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2013. – Vol. 1828, № 3. – P. 956 – 966.
- 50 Bonomini M., Sirolli V., Merciaro G. et al. Red blood cells may contribute to hypercoagulability in uraemia via enhanced surface exposure of phosphatidylserine // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2005. – Vol. 2, № 3. – P. 61 – 66.
- 51 Sirolli V., Cappelli P., Amoroso L. et al. On-line HFR and removal of uremic toxins inducing the loss of phospholipidic asymmetry of the erythrocyte membrane // *G. Ital. Nefrol.* – 2004. – Vol. 21, № 30. – P. 208 – 211.
- 52 Sakthivel R., Farooq S.M., Kalaiselvi P. et al. Investigation on the early events of apoptosis in senescent erythrocytes with special emphasis on intracellular free calcium and loss of phospholipid asymmetry in chronic renal failure // *Clin. Chim. Acta*. – 2007. – Vol. 382, № 1-2. – P. 1 – 7.
- 53 Mihaljević D., Jakić M., Jakić M. et al. Effects of rHuEPO treatment on red blood cell osmotic resistance // *Coll. Antropol.* – 2004. – Vol. 28, № 2. – P. 639 – 646.
- 54 Dolegowska B., Stepniewska J., Ciechanowski K. et al. Does glucose in dialysis fluid protect erythrocytes in patients with chronic renal failure? // *Blood Purif.* – 2007. – Vol. 25, № 5 – 6. – P. 422 – 429.
- 55 Brimble K.S., McFarlane A., Winegard N. et al. Effect of chronic kidney disease on red blood cell rheology // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2006. – Vol. 34, № 3. – P. 411 – 420.
- 56 Piagnerelli M., Zouaoui Boudjeltia K., Brohee D. et al. Assessment of erythrocyte shape by flow cytometry techniques // *J. Clin. Pathol.* – 2007. – Vol. 60, № 5. – P. 549 – 554.
- 57 Brzeczczynska J., Luciak M., Gwozdziński K. Alterations of erythrocyte structure and cellular susceptibility in patients with chronic renal failure: effect of haemodialysis and oxidative stress // *Free. Radic. Res.* – 2008. – Vol. 42, № 1. – P. 40 – 48.

58 Tsuda K. Chronic kidney disease predicts impaired membrane microviscosity of red blood cells in hypertensive and normotensive subjects // *International Heart Journal*. – 2013. – Vol. 54, № 3. – P. 154 – 159.

59 Samoilov M.V., Zakharchenko V.N., Larionov S.M. et al. Blood viscosity and the erythrocyte charge in patients with chronic kidney failure and suppurative intoxication and during the correction of these conditions by hemosorption and hemodialysis // *Урология и Нефрология*. – 1993. – № 4. – С. 34 – 37.

60 Kliche K., Gerth U., Pavenstädt H. et al. Recharging red blood cell surface by hemodialysis // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2015. – Vol. 35, № 3. – P. 1107 – 1115.

61 Yilmaz M.I., Saglam M., Caglar K. et al. The determinants of endothelial dysfunction in CKD: oxidative stress and asymmetric dimethylarginine // *Am. J. Kidney. Dis.* – 2006. – Vol. 47, № 1. – 42 – 50.

62 Вавилова Т.П., Гева О.Н., Пушкина А.В. и др. Диагностическое и прогностическое значение определения ферментов антиоксидантной защиты в клетках крови пациентов с терминальной стадией хронической почечной недостаточности, находящихся на программном гемодиализе // *Биомедицинская химия*. – 2006. – Т. 52, № 2. – С. 219 – 222.

63 Koca T., Berber A., Koca H.B. et al. Effects of hemodialysis period on levels of blood trace elements and oxidative stress // *Clin. Exp. Nephrol.* – 2010. – Vol. 14, № 5. – P. 463 – 468.

64 Dessì M., Noce A., Dawood K.F. et al. Erythrocyte glutathione transferase: a potential new biomarker in chronic kidney diseases which correlates with plasma homocysteine // *Amino Acids*. – 2012. – Vol. 43, № 1. – P. 347 – 354.

65 Lucchi L., Bergamini S., Iannone A. et al. Erythrocyte susceptibility to oxidative stress in chronic renal failure patients under different substitutive treatments // *Artif. Organs*. – 2005. – Vol. 29, № 1. – P. 67 – 72.

66 Da Silva A.C., Rocha J.B., Morsch A.L. et al. Oxidative stress and delta-ALA-D activity in chronic renal failure patients // *Biomed. Pharmacother.* – 2007. – Vol. 61, № 2-3. – P. 180 – 185.

67 Karg E., Papp F., Tassi N. et al. Enhanced methylglyoxal formation in the erythrocytes of hemodialyzed patients // *Metabolism*. – 2009. – Vol. 58, № 7. – P. 976 – 982.

68 Włodek P., Marcykiewicz B., Iciek M. et al. Thiol levels, protein carbonylation and anaerobic sulfur metabolism in erythrocytes of peritoneal dialysis and predialysis patients // *Nephrology (Carlton)*. – 2010. – Vol. 15, № 8. – P. 755 – 761.

69 Goi G., Massaccesi L., Baquero Herrera C.J. et al. Oxidative stress in elderly chronic renal failure patients: effects of renal replacement therapies on cell membrane fluidity // *J. Nephrol.* – 2009. – Vol. 22, № 5. – P. 630 – 636.

70 Stepniewska J., Ciechanowski K. Oxidative stress as a reason of treatment difficulties in chronic renal failure // *Pol. Merkur. Lekarski*. – 2005. – Vol. 19, № 113. – P. 697 – 700.

- 71 Selvaraj N., Bobby Z., Koner B.C. et al. Reassessing the increased glycation of hemoglobin in nondiabetic chronic renal failure patients: a hypothesis on the role of lipid peroxides // *Clin. Chim. Acta.* – 2005. – Vol. 360, № 1 – 2. – P. 108 – 113.
- 72 Saradhadevi V., Sakthivel R., Vedamoorthy S. et al. Alterations in band 3 protein and anion exchange in red blood cells of renal failure patients // *Mol Cell Biochem.* – 2005. – Vol. 273, № 1 – 2. – P. 11 – 24.
- 73 Polak-Jonkisz D., Zwolińska D., Purzyc L. et al. Ca^{2+} - Mg^{2+} -dependent ATP-ase activity and calcium homeostasis in children with chronic kidney disease // *Pediatr. Nephrol.* – 2007. – Vol. 22, № 3. – P. 414 – 419.
- 74 Kaderjakova Z., Lajdova I., Horvathova M. et al. Effects of chronic kidney disease on blood cells membrane properties // *Bioelectrochemistry.* – 2012. – Vol. 87. – P. 226 – 229.
- 75 Costa E., Rocha S., Rocha-Pereira P. et al. Altered erythrocyte membrane protein composition in chronic kidney disease stage 5 patients under haemodialysis and recombinant human erythropoietin therapy // *Blood Purif.* – 2008. – Vol. 26, № 3. – P. 267 – 273.
- 76 Costa E., Rocha S., Rocha-Pereira P. et al. Changes in red blood cells membrane protein composition during hemodialysis procedure // *Ren. Fail.* – 2008. – Vol. 30, № 10. – P. 971 – 975.
- 77 Antonelou M.H., Kriebardis A.G., Velentzas A.D. et al. Oxidative stress-associated shape transformation and membrane proteome remodeling in erythrocytes of end stage renal disease patients on hemodialysis // *Journal of proteomics.* – 2011. – Vol. 74, № 11. – P. 2441 – 2452.
- 78 Antonelou M.H., Georgatzakou H.T., Tzounakas V.L. et al. Blood modifications associated with end stage renal disease duration, progression and cardiovascular mortality: a 3-year follow-up pilot study // *Journal of proteomics.* – 2014. – Vol. 14, № 101. – P. 88 – 101.
- 79 Alvarez-Llamas G., Zubiri I., Maroto A.S. et al. A role for the membrane proteome in human chronic kidney disease erythrocytes // *Transl. Res.* – 2012. – Vol. 160, № 5. – P. 374 – 383.
- 80 Ruskovska T., Bennett S.J., Brown C.R. et al. Ankyrin is the major oxidised protein in erythrocyte membranes from end-stage renal disease patients on chronic haemodialysis and oxidation is decreased by dialysis and vitamin C supplementation // *Free radical research.* – 2015. – Vol. 49, № 2. – P. 175 – 185.
- 81 Tennankore K.K., Soroka S.D., West K.A. et al. Macrocytosis may be associated with mortality in chronic hemodialysis patients: a prospective study // *BMC Nephrol.* – 2011. – № 12. – P. 19 // doi 10.1186/1471-2369-12-19.
- 82 Ly J., Marticorena R., Donnelly S. Red blood cell survival in chronic renal failure // *Am J Kidney Dis.* – 2004. – Vol. 44, № 4. – P. 715 – 719.
- 83 Korell J., Vos F.E., Coulter C.V. et al. Modeling red blood cell survival data // *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* – 2011. – Vol. 38, № 6. – P. 787-801.
- 84 Abed M., Artunc F., Alzoubi K. et al. Suicidal erythrocyte death in end-stage renal disease // *Journal of Molecular Medicine.* – 2014. – Vol. 92, № 8. – P. 871 – 879.

- 85 Ahmed M.S., Langer H., Abed M. et al. The uremic toxin acrolein promotes suicidal erythrocyte death // *Kidney and Blood Pressure Research*. – 2013. – Vol. 37, № 2 – 3. – P. 158 – 167.
- 86 Polak-Jonkisz D., Purzyc L., Szcepańska M. et al. Erythrocyte caspase-3 levels in children with chronic kidney disease // *Clinical biochemistry*. – 2013. – Vol. 46, № 3. – P. 219 – 224.
- 87 Тиктинский О.Л., Калинина С.Н. Пieloneфриты. – СПб.: СПбМАПО, Медиа Пресс, 1996. – 256 с.
- 88 Сейсембеков Т.З. Классификации и диагностические критерии основных заболеваний терапевтического профиля. – Астана, 2007. – 376 с.
- 89 Борисов Н.А. Пieloneфрит и его лечение на современном этапе // *Терапевтический архив*. – 1997. – №8. – 49 – 54.
- 90 Cockcroft D.W., Gault M.H. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine // *Nephron*. – 1976. – № 16 (1). – P. 31 – 41.
- 91 Levey A.S., Bosch J.P., Lewis J.B. et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group // *Ann. Intern. Med.* – 1999. – № 130 (6). – P. 461 – 70.
- 92 Hallan S., Asberg A., Lindberg M. et al. Validation of the Modification of Diet in Renal Disease formula for estimating GFR with special emphasis on calibration of the serum creatinine assay // *Am. J. Kidney. Dis.* – 2004. – № 44 (1). – P. 84 – 93.
- 93 Matsuo S., Imai E., Horio M. et al. Revised equations for estimated GFR from serum creatinine in Japan // *Am J Kidney Dis.* – 2009. – Vol. 53, № 6. – P. 982 – 992.
- 94 Levey A.S., Stevens L.A., Schmid C.H. et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate // *Ann. Intern. Med.* – 2009. – Vol. 150. – P. 604 – 612.
- 95 Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
- 96 Веснина Н.В., Леонова Л.М., Кашуба Э.А. и др. Физико-химические особенности мембран эритроцитов у жителей Среднего Приобья // *Медицинская наука и образование Урала*. – 2008. – № 1. – С. 72 – 73.
- 97 Миндукшев И.В., Кривошлык В.В., Добрылко И.А. и др. Нарушение деформационных и транспортных характеристик эритроцитов при развитии у них апоптоза // *Биологические мембраны*. – 2010. – Т. 27, № 1. – С. 28 – 38.
- 98 Тогайбаев А.А., Кургузкин А.В., Рикун И.В. и др. Способ диагностики эндогенной интоксикации // *Лабораторное дело*. – 1988. – № 9. – С. 22 – 24.
- 99 Копытова Т.В. Исследование сорбционной емкости мембран эритроцитов для оценки характера эндогенной интоксикации при дерматозах // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2006. – № 1. – С. 18 – 19.
- 100 Ковалевский А.Н., Нифантьев О.Е. Замечания по скрининговому методу определения молекул средней массы // *Лаб. дело*. – 1989. – № 10. – С. 35 – 37.

- 101 Маркушева Л.И., Савина М.И., Решина В.М. и др. Ядерные белки хроматина в оценке эффективности лечения больных псориазом // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. – № 7. – С. 18 – 20.
- 102 Гончаренко М.С., Латыпова А.М. Метод оценки перекисного окисления липидов // Лабораторное дело. – 1985. – № 1. – С. 60 – 61.
- 103 Levine R.L., Garland D., Oliver C.N. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins // Method Enzymol. – 1990. – № 186. – P. 464 – 478.
- 104 Токтамысова З.С., Биржанова Н.Х. О мембраносвязанном гемоглобине // Биофизика. – 1990. – Т. 35, № 6. – С. 1019 – 1020.
- 105 Громов А.Е., Куликова А.И., Шостка Г.Д. и др. Физико-химические свойства крови больных с хронической почечной недостаточностью // Вопросы медицинской химии. – 1982. – № 6. – С. 20 – 24
- 106 Пат. 25629 РК. Регистратор электропроводности биологических жидкостей / Д.А. Ключев, Е.А. Колесникова, В.А. Колесников, Л.Е. Муравлева, В.Б. Молотов-Лучанский, Л.Б. Жанбыршеева; опубл. 27.03.12. – 3 с.
- 107 Молекулярно-клеточные механизмы развития патологии почек при артериальной гипертензии: отчет о НИР (заключительный) / РГП на ПХВ КГМУ МЗ РК: рук. Кулмагамбетов И.Р., Телеуов М.К.: отв. испол. Муравлева Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., испол. Танкибаева Н.У., Ключев Д.А., Колесникова Е.А. и др. – Алматы, 2011. – 191 с. - № ГР 0109РК00173. – Инв. № 0211РК01230.
- 108 Свид. о гос. рег. инт. соб. 1092. РК. Программа регистрации рН крови / Д.А. Ключев, В.А. Колесников, Я.Ж. Байсагов, А.Е. Колесникова, Л.Е. Муравлёва, В.Б. Молотов-Лучанский, М.К. Телеуов; опубл 18.06.10. – 2 с.
- 109 Свид. о гос. рег. авт. прав. 1024. РК. Алгоритм обработки кривых изменения зарядового баланса эритроцитов при термостимуляции / Л.Е. Муравлёва, Е.А. Колесникова, Д.А. Ключев, В.Б. Молотов-Лучанский; опубл 12.07.11. – 2 с.
- 110 Молекулярно-клеточные механизмы развития хронической почечной недостаточности: отчет о НИР (заключительный) / РГП на ПХВ КГМУ МЗ РК: рук. Молотов-Лучанский В.Б., Муравлева Л.Е.; испол. Ключев Д.А., Колесникова Е.А., Демидчик Л.А. и др. – Караганда, 2015. – 187 с. - № ГР 0113РК00410. – Инв. № 0215РК01857.
- 111 Kao M.P., Ang D.S., Pall A. et al. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options // J. Hum. Hypertens. – 2010. – Vol. 24, № 1. – P. 1 – 8.
- 112 Tucker P.S., Aaron T., Scanlan A.T. et al. Chronic kidney disease influences multiple systems: describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage and concomitant disease // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2015. Published online. dx.doi.org/10.1155/2015/806358.
- 113 Nagababu E., Mohanty J.G., Bhamidipaty S. et al. Role of the membrane in the formation of heme degradation products in red blood cells // Life Sci. – 2010. – Vol. 86, № 3 – 4. – P. 133 – 138.

- 114 Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria // *Science*. – 2004. – Vol. 303, № 5663. – P. 1532 – 1535.
- 115 Zykova S.N., Tveita A.A., Rekvig O.P. Renal Dnase1 enzyme activity and protein expression is selectively shut down in murine and human membranoproliferative lupus nephritis // *PLoS One*. – 2010. Published online. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012096>
- 116 Bianchi M.E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger // *J. Leukoc. Biol.* – 2007 // <http://www.jleukbio.org/content/81/1/1.abstract>
- 117 Hamasaki N. Band 3 protein as a metabolic sensor-CO₂ regulates the amount of oxygen delivered to tissues from red blood cells // *Rinsho Byori*. – 2006. – Vol. 54 – P. 263 – 269.
- 118 Rizvi S.I., Kumar D., Chakravarti S. et al. Erythrocyte plasma membrane redox system may determine maximum life span // *Medical Hypotheses*. – 2011. – Vol. 76, № 4. – P. 547–549.
- 119 Kennett E.C., Kuchel P.W. Redox Reactions and Electron Transfer Across the Red Cell Membrane // *IUBMB Life*. – 2003. – Vol. 55, № 7. – P. 375 – 385.
- 120 Laurent D., Laetitia D., Yvon B. et al. Circulating microparticles in renal diseases // *Nephrol. Dial. Transplant*. – 2008. – Vol. 23, № 7. – P. 2129 – 2132.
- 121 Buehler P.W., D'Agnillo F. Toxicological consequences of extracellular hemoglobin: biochemical and physiological perspectives // *Antioxid. Redox. Signal*. – 2010. – Vol. 12, № 2. – P. 275 – 291.