

УДК 612.111.6

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ УРОВНЕЙ МЕМБРАНОСВЯЗАННОГО ГЕМОГЛОБИНА НА КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ И ИХ ВЗАИМОСВЯЗЬ У БОЛЬНЫХ ГИПЕРТЕНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Кузнецова Э.Э., Пивоваров Ю.И., Бабушкина И.В., Горохова В.Г., Сергеева А.С.

*ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», Иркутск,
e-mail: babushcinai@mail.ru*

Исследовано влияние разных уровней мембраносвязанного гемоглобина (МСГ) на величину белков мембраны эритроцитов и их взаимосвязь у больных гипертонической болезнью (ГБ). Показано, что высокий уровень МСГ оказывает существенное влияние на структурные, интегральные (β -спектрин, анион-транспортный белок) и сократительные (актин, тропомиозин) белки мембраны эритроцитов. В результате количественного изменения этих белков мембраны и их взаимосвязей у больных ГБ возникают нарушения структурной организации и функциональной активности мембраны, нарушаются реологические и гемостазиологические характеристики крови.

Ключевые слова: эритроциты, мембраносвязанный гемоглобин, мембранные белки, артериальная гипертензия

INFLUENCE OF DIFFERENT LEVEL OF MEMBRANE-BOUND HEMOGLOBIN ON THE QUANTITATIVE CONTENT OF THE ERYTHROCYTE MEMBRANE PROTEINS AND THEIR RELATIONSHIP IN HYPERTENSIVE PATIENTS

Kuznetsova E.E., Pivovarov Y.I., Babushkina I.V., Gorokhova V.G., Sergeyeva A.S.

Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, Irkutsk, e-mail: babushcinai@mail.ru

The effect of different levels of membrane-bound hemoglobin (MBH) by the amount of erythrocyte membrane proteins and their relationship in patients with essential hypertension (EH). It has been shown that high levels of MBH has a significant impact on the structural, integral (β -spectrin, anion transport protein) and contractile (actin, tropomyosin) erythrocyte membrane proteins. As a result of the quantitative changes of membrane proteins and their interactions in hypertensive patients there are infringements of structural organization and functional activity of membrane violated the rheological properties of blood and hemostatic.

Keywords: red blood cells, membrane-bound hemoglobin, membrane proteins, hypertension

Гипертоническая болезнь относится к самым часто встречающимся патологиям сердечно – сосудистой системы и распространена во всем мире, особенно в цивилизованных странах. Имеются данные о том, что в патогенезе первичной гипертензии ведущая роль принадлежит мембранным нарушениям [7].

Классической моделью для изучения свойств мембраны при различной патологии служит мембрана эритроцита. Его цитоплазматическая мембрана является ключевой в обеспечении и регуляции физиологической активности этих клеток. Специфические функции мембраны обеспечиваются её сложной структурной организацией, главными компонентами которой являются белки. Наиболее представительными белками в мембране эритроцитов человека являются спектрины, анионтранспортный белок – актин и тропомиозин. И, хотя мембраносвязанный гемоглобин (МСГ) представлен в меньшем количестве, чем остальные белки, он играет важную роль как в образовании и поддержании стабильности цитоске-

лета, так и в механизмах ферментативного катализа и внутриклеточной трансформации энергии [2].

В ряде работ отмечено высокое содержание МСГ у больных ИБС III-го функционального класса, язвой желудка или 12-ти перстной кишки, на лактатной модели гипоксического состояния [3], при остром отравлении монооксидом углерода [8], нитрита натрия и солянокислого фенилгидразина [10]. В наших работах также было выявлено повышение уровня МСГ у больных ИБС и ГБ, что указывало на деструктивные процессы в мембране эритроцитов [5]. Установлено, что образование избыточных ковалентных связей гемоглобина с мембранным скелетом, разрушает её белковую структуру и способствует окислению фосфолипидов через Ca^{2+} -зависимую липооксигеназную активность [10]. Кроме того, автор показал, что изменение взаимодействия мембраны эритроцита с гемоглобином может быть обусловлено повышенным содержанием в ней фосфатидилсерина и сфингомиелина, а также структурным состоянием самого гемоглобина. В монографии Ю.В. Постнова

и С.Н. Орлова [7] показано, что нарушения структурной организации плазматической мембраны при первичной гипертензии вызваны изменениями в белках, образующих её цитоскелет. Тем не менее мы не нашли сообщений о влиянии МСГ на отдельные белки мембраны эритроцитов при сердечно – сосудистой патологии.

Целью нашей работы явилась оценка воздействия разных уровней мембраносвязанного гемоглобина на величину белков мембраны эритроцитов и их взаимосвязь у больных гипертензивной болезнью.

Материалы и методы исследования

В исследовании принимали участие пациенты с гипертензивной болезнью (ГБ) I и II степени (n = 51) в возрасте $42 \pm 1,5$ лет, мужского пола. Диагноз ГБ, а также дифференциальную диагностику для исключения симптоматических артериальных гипертензий проводили в соответствии с рекомендациями ВНОК (2008). Критериями исключения для больных являлись наличие острого инфаркта миокарда или нарушения мозгового кровообращения в предшествующие 6 месяцев, нарушения ритма сердца, наличие приступов стенокардии напряжения, обострение интеркуррентных заболеваний.

В контрольную группу входили клинически здоровые мужчины в количестве 29 человек, средний возраст которых составил $39 \pm 1,3$ лет. Исследование выполнено в соответствии со стандартами надлежа-

щей клинической практики и принципами Хельсинкской декларации. Все пациенты были ознакомлены с целями и основными положениями исследования. До включения в исследование у всех участников было получено письменное информированное согласие.

У всех пациентов определяли основные белки мембраны эритроцитов, мембраносвязанный гемоглобин. Определение МСГ в структурных фрагментах мембраны эритроцитов проводили в гемолизате по убыли гемоглобина до и после центрифугирования при 6000 об/мин на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 536 нм по методике З.С. Токтамысовой и Р.Х. Биржановой [9].

Мембраны эритроцитов выделяли по методу Dodge [11]. Выделение и очистку водорастворимой фракции белков осуществляли на центрифугах «Allegra» 64R. Концентрацию белков определяли с использованием набора Qubit Protein Assay Kit («Invitrogen», США) на приборе Qubit Protein, согласно инструкции фирмы – изготовителя.

Одномерный электрофорез проводился на полиакриламидных гелевых пластинах с концентрацией разделяющего геля 7,5% и 15% в присутствии додецилсульфата натрия по методу Лэммли [12]. Окраска гелевых пластинок проводилась раствором Кумасси R250 («Sigma», США). Для определения массы исследуемых белков использовались наборы маркеров фирмы Bio-Rad (#161-0363) и Thermoscientific (#26614). Расчет количественного содержания мембранных белков (мкг на 1мг общего белка) выполнялся с помощью программы математической обработки электрофореграмм [6].

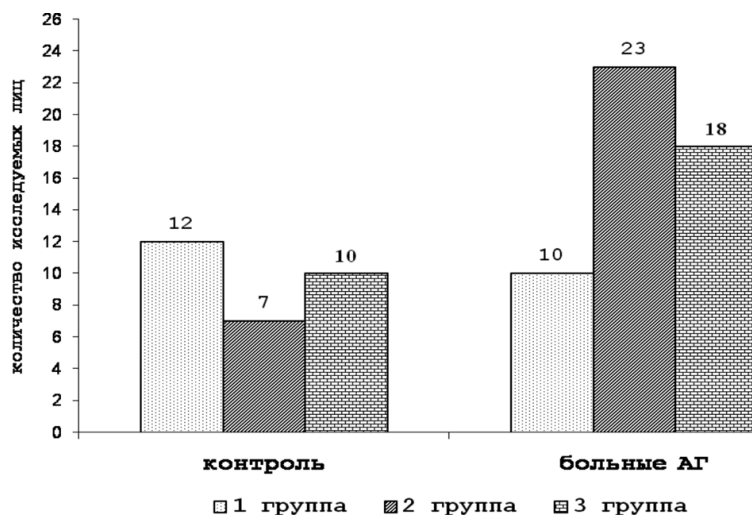


Рис. 1. Распределение лиц контрольной группы и больных АГ по уровню мембраносвязанного гемоглобина. Примечание. * $p < 0,05$ – значимость различий между соответствующими группами контроля и больных АГ; ** $p < 0,05$ – между 1-ой и остальными группами больных АГ, точный критерий Фишера

Данные к рис. 1

	контроль	больные АГ
1 группа	12	10
2 группа	7	23
3 группа	10	18

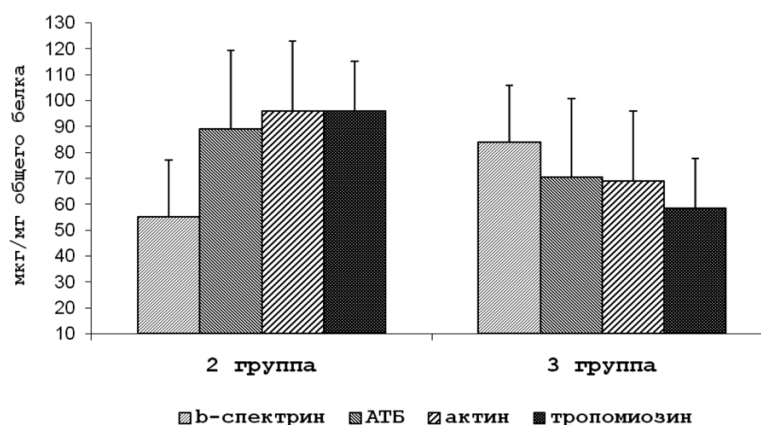


Рис. 2. Количественное содержание белков мембраны эритроцитов у больных АГ с разным уровнем мембраносвязанного гемоглобина. Примечание. Ме (Q25-Q75); p – критерий Манн-Уитни

Данные к рис. 2

	2 группа	3 группа
β-спектрин	55	83,9
АТБ	89	70,3
актин	95,9	69
тропомиозин	95,8	58,5

В результате исследования 320 электрофореграмм белкового спектра была проведена количественная оценка 10-ти мембранных белков эритроцитов: α-спектрина, β-спектрина, анкирина (полоса 2.1), анион-транспортного белка (АТБ), полосы 4.1, трансмитера глюкозы (GLUT), актина, глицеральальдегид-3-фосфатдегидрогеназы (Г-3-ФДГ), тропомиозина и глутатион-S-трансферазы (Гл.-S-Тр.).

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета программ «Statistica 6.0». Полученные данные в сравниваемых группах анализировали, используя критерий Манна-Уитни. Взаимосвязь переменных оценивали путем изучения парной ранговой корреляции (Спирмен). Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

При анализе уровня МСГ выяснилось, что его количество у больных АГ было значительно выше ($p = 0,021$), чем у лиц контрольной группы – соответственно: 9,22 (7,1-11,8) и 6,6 (5,0-9,4). Учитывая значительный разброс данных, все больные АГ и лица контрольной группы были разделены по уровню МСГ на три группы: 1-ая группа – с содержанием МСГ меньше 6%, 2-ая группа – от 6 до 9,0% и 3-я группа – больше 9,0% (рис. 1).

Из представленных данных видно, что в количественном отношении преобладали больные 2-ой группы, а меньший процент составили больные 1-ой группы.

Среди клинически здоровых людей существенных межгрупповых различий выявить не удалось.

Сравнительный анализ изучаемых белков мембраны эритроцитов у контрольных лиц также не выявил межгрупповых различий. Исследование белковых компонентов мембраны эритроцитов у больных АГ (рис. 2) показало, что во 2-ой группе отмечалось меньшее количество β-спектрина и большее – анионтранспортного белка, актина и тропомиозина.

Как известно, основная функция спектринов – поддержание формы клеток и обеспечение их устойчивости к деформации, а также контроль над латеральной подвижностью интегральных мембранных белков [1]. Снижение содержания β-спектрина может приводить к потере эластичности мембраны, уменьшению деформабильных свойств и ухудшению прохождению эритроцитов через обменные капилляры. Большее содержание анионтранспортного белка (АТБ) у больных 2 группы, вероятно, оказывает регулирующее и координирующее влияние на метаболические процессы и структурное состояние мембраны так, как по своей природе он является полифункциональным и действует как сайт связывания мембранных белков. Иная картина наблюдалась при высоком уровне МСГ (3 группа):

здесь отмечалось возрастание содержание β -спектрина, резкое снижение содержания АТБ, актина и тропомиозина, что говорит о повреждении цитоскелета мембраны у этой категории больных. Кроме того, снижение содержания тропомиозина приводит к еще большему изменению формы эритроцитов вплоть до образования эхиноцитов и сфероцитов, от которых отшнуровываются мелкие мембранные везикулы [7], содержащие тканевой фактор активации внешней системы свёртывания крови [4].

Корреляционный анализ межбелковых связей в мембране эритроцита показал, что количество и уровень этих связей у больных ГБ 2-ой и 3-ей групп значительно различались между собой. Так у больных 3-ей группы был существенно меньше уровень и количество межбелковых связей, чем во 2-ой группе. Это касалось α -спектрина, анкирина, АТБ, полосы 4.1, транспорта глюкозы, актина и особенно тропомиозина (таблица).

Нужно отметить, что белкам полосы 2.1 (анкирин) и 4.1 также отводится ключевая роль в образовании цитоскелета мембраны. Оба белка обладают высокой чувствительностью к протеазам, легко фосфорир-

лируются и связываются со спектринами. Именно изменения взаимодействия между спектринами, анкирином и фосфолипидами нарушают условия для поддержания в нормальном состоянии участки липидного бислоя мембраны и способствуют процессу экзоцитоза, приводящего к образованию мембранных везикул [7].

Таким образом, проведённые исследования показали, что высокий уровень мембраносвязанного гемоглобина оказывает существенное влияние на структурные, интегральные (β -спектрин, АТБ) и сократительные (актин, тропомиозин) белки мембраны эритроцитов. В результате количественного изменения этих белков мембраны и их взаимосвязей у больных гипертонической болезнью возникают нарушения структурной организации и функциональной активности мембраны, снижаются буферные свойства эритроцитов, нарушаются реологические и гемостазиологические характеристики крови. Такое состояние, несомненно, ухудшает перфузию крови в микроциркуляторном русле, тканевой газообмен и, тем самым, усиливает системную гипоксию, которая имеет место при данной патологии.

Характер корреляционных связей между количественным содержанием белков мембраны эритроцитов у больных АГ 2-ой и 3-ей групп

2 группа (n = 23)									
	1	2	2.1	3	4.1	4.5	5	6	7
2	0,93								
2.1	0,79	0,68							
3	0,63	0,60	0,55						
4.1	0,57	0,48	0,65	0,92					
4.5	0,49		0,53	0,84	0,93				
5				0,62	0,66	0,73			
6	0,52	0,44	0,56	0,78	0,80	0,86	0,56		
7			0,46	0,57	0,57	0,57	0,68	0,44	
8	0,59	0,44	0,59	0,76	0,72	0,75	0,53	0,84	0,73
3 группа (n = 18)									
2	0,74								
2.1		0,51							
3		0,51	0,62						
4.1		0,48	0,73	0,83					
4.5		0,48		0,80	0,78				
5				0,52	0,59	0,49			
6				0,85	0,74	0,91			
7		-0,74							
8			0,57	0,69	0,68			0,58	

Примечание. 1 – α -спектрин, 2 – β -спектрин, 2.1 – анкирин, 3 – АТБ, 4.1 – полоса 4.1, 4.5 – транспортёр глюкозы, 5 – актин, 6 – Г-3-ФДГ, 7 – тропомиозин, 8 – Гл.-S-Тр. Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена – $p < 0,05$. Тесные связи выделены жирным шрифтом.

Список литературы

1. Боровская М.К., Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г., Корякина Л.Б., Курильская Т.Е., Пивоваров Ю.И. // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. 2010. N 3 (73). С. 334-354.
2. Казеннов А.М., Маслов М.Н. Структурно-биохимические свойства мембран безъядерных эритроцитов. // Физиол. журнал. СССР. – 1987. – Т. 73. № 12. – С. 1587-1594.
3. Кленова Н.А., Фатенков В.Н., Фатенков О.В. Ишемическая болезнь сердца. – Самара: СамГМУ. 2002. – С. 60-73.
4. Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гомеостаза в норме и патологии. Чита: Экспресс-издательство. 2010. С. 832.
5. Пивоваров Ю.И., Курильская Т.Е., Сергеева А.С., Корякина Л.Б. // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. – 2013. – № 6. – С. 38-45.
6. Пивоваров Ю.И., Курильская Т.Е., Сергеева А.С. Способ математической обработки белковых полос, полученных с помощью электрофореза // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. 2014. – № 3 (97). – С. 101-104.
7. Постнов Ю.В., Орлов С.Н. Первичная гипертензия как патология клеточных мембран. – М.: Медицина, 1987. – С. 192.
8. Рогов О.А., Шперлинг И.А., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В. и др. // Токсикологический вестник. – 2006. – № 6. – С. 2-6.
9. Токтамысова З.С., Биржанова Р.Х. О мембранно-связанном гемоглобине // Биофизика. – 1990. – Т. 35. Вып. 6. – С. 1019-1020.
10. Шперлинг И.А., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Ткаченко С.Б. // Вопросы биол., мед. и фарм. химии. 2008. № 1. – С. 14-18.
11. Dodge J., MitcheLL C., Hanahan.D // Arch. Biochem. Biophys. 1963. Vol.100 (1), P. 119-130.
12. Laemmli U.K. // Nature. 1970. Vol. 227 (5259). P. 680-685.