УДК 616.1-008.1-071:612.111.6

СФЕРИЧНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ И ГИПЕРТОНИЧЕСКАЯ БОЛЕЗНЬ

Пивоваров Ю.И., Кузнецова Э.Э., Горохова В.И., Дмитриева Л.А., Мухомедзянова С.В., Богданова О.В.

ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», Иркутск, e-mail: viclud2009@mail.ru

Исследование белкового спектра мембраны эритроцитов у пациентов с артериальной гипертензией I и II степени показало, что структурно-функциональные нарушения белковых компонентов обусловлены главным образом, изменением уровня структурных (α и β-спектринов, белков полосы 4.1), транспортных (АТБ) и ферментативных (глюкозо-3-фдг, глюкозо-S-Тр) белков. Наиболее выраженные изменения в мембране эритроцитов наблюдались у пациентов со II степенью АГ. Выявлены особенности в характере взаимосвязей между белковыми компонентами эритроцитарной мембраны. Так, у пациентов с I степенью АГ все структурные белки были связаны с уровнем ферментативного белка (Г-3-ФДГ), у больных со II степенью АГ эта связь была обусловлена содержанием глутатион-S-трансферазы (Гл–S-тр). Можно полагать, что нарушение деформабильности эритроцитов у пациентов АГ связано со снижением уровня спектринов, основная функция которых заключается в поддержании формы клеток и обеспечении устойчивости к деформации. Совокупность изменения уровня спектринов с изменением других мембранных белков (Г-3-ФДГ и АТБ) является одним из предикторов формирования приобретенного сфероцитоза, особенно у пациентов со II степенью АГ. Определены ведущие факторы развития сфероцитоза и способствующие им условия в зависимости от степени АГ.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, белки мембраны эритроцитов, сфероцитоз

ERYTHROCYTUM SPHERICALITY AND HYPERTONIC DISEASE

Pivovarov Yu.I., Kuznetsova E.E., Gorokhova V.I., Dmitrieva L.A., Mukhomedzyanova S.V., Bogdanova O.V.

Irkutsk Scientific Center for Surgery and Traumatology, Irkutsk, e-mail: viclud2009@mail.ru

The study of the protein spectrum of the erythrocyte membrane in patients with arterial hypertension I and II degree showed that the structural and functional disorders of protein components are mainly due to a change in the level of structural (α and β spectra, proteins of band 4.1), transport (ATB) and enzymatic (glucose-3-fdg, glucose-S-Tp) proteins. The most pronounced changes in the erythrocyte membrane were observed in patients with grade II hypertension. The peculiarities in the nature of the interrelations between the protein components of the erythrocyte membrane are revealed. Thus, in patients with I degree of hypertension, all structural proteins were associated with the level of enzymatic protein (G-3-FDH), in patients with grade II AH this association was due to the content of glutathione-S-transferase (Gl-S-tr). It can be assumed that the disturbance of deformability of erythrocytes in AH patients is associated with a decrease in the level of spectrin, the main function of which is to maintain the shape of the cells and to provide resistance to deformation. The combination of changes in the level of spectrin with changes in other membrane proteins (G-3-FDG and ATB) is one of the predictors of the formation of acquired spherocytosis, especially in patients with grade II hypertension. The leading factors in the development of spherocytosis and the conditions conducive to them are determined, depending on the degree of hypertension.

Keywords: arterial hypertension, erythrocyte membrane proteins, spherocytosis

Гипертоническая болезнь (ГБ) относится к самым распространенным патологиям сердечно-сосудистой системы во всем мире [1, 2]. Имеются данные о том, что в патогенезе эссенциальной артериальной гипертензии (ЭАГ) немаловажная роль принадлежит нарушениям структурно-функциональных свойств клеточных мембран [3]. Классической моделью для изучения свойств мембран при различной патологии является мембрана эритроцита, так как ей присущи общие принципы молекулярной организации плазматических мембран. Цитоплазматическая мембрана эритроцита является ключевой в обеспечении и регуляции физиологической активности этих клеток. Сложная структурная организация мембраны, главным компонентом которой являются белки, обеспечивает ее специфические функции. В проведенных ранее исследованиях было установлено, что изменение взаимоотношений белковых компонентов мембраны при ЭАГ оказывает влияние на формирование и развитие сфероцитарных клеток [4]. Такие эритроциты с ослабленной способностью к деформации и сниженной пластичностью не могут эффективно осуществлять газообмен, что приводит к ухудшению кровотока в системе микроциркуляции органов и тканей [5]. Показано, что ведущими факторами формирования приобретенного сфероцитоза у больных с ЭАГ, осложненной метаболическим синдромом, являются структурно-функциональные нарушения взаимосвязей таких мембранных белков, как α-спектрин, анионтранспортный белок, глицеральальцегид-3-фосфатдегидрогеназа. У пациентов с ЭАГ, не осложненной метаболическим синдромом – анионтранспортный белок,

глицеральальцегид-3-фосфатдегидрогеназа и актин. Следовательно, приобретенный сфероцитоз у больных с ЭАГ, осложненной и не осложненной метаболическим синдромом может быть обусловлен нарушением метаболических процессов на мембранном уровне [6, 7]. Вместе с тем, возникла необходимость установить, какие факторы и условия влияют на формирование сфероцитарного пула клеток у пациентов с разной степенью ЭАГ.

Цель работы – установление взаимосвязи между показателем сферичности эритроцитов и уровнем белков их мембраны, а также некоторыми эндогенными факторами природы у больных с эссенциальной артериальной гипертензией I-й и II-й степени.

Материалы и методы исследования

В исследовании принимали участие пациенты мужского пола с ГБ I-й (n = 27) и II-й степенью (n = 24), средний возраст – 42 ± 1,5 лет. Диагноз устанавливался по данным анамнеза и клинико-инструментального обследования. Дифференциальная диагностика АГ проводилась в соответствии с рекомендациями Всероссийского научного общества кардиологов (2008). Критериями исключения больных являлись: наличие стенокардии напряжения, хроническая сердечная недостаточность выше III–IV стадии (по классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации NYHA), острого инфаркта миокарда или нарушения мозгового кровообращения в предшествующие 6 месяцев, нарушения ритма сердца, обострение интеркуррентных заболеваний. Контрольную группу составили 29 клинически здоровых мужчин, средний возраст которых составил 39 ± 1,3 лет. Исследование выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики и принципами Хельсинской декларации. Получено одобрение Комитета по биомедицинской этике ФГБУ НЦРВХ (протокол № 9 от 9.11.2012).

На клинической модели эссенциальной гипертензии I-й и II-й степени оценивали содержание 10-ти белков мембраны эритроцитов: α- и β-спектринов, анкирина, анионтранспортного белка (АТБ), белков полосы 4.1; глицеральальцегид-3-фосфатдегидрогеназы (Г-3-ФДГ), актина, транспортёра глюкозы (GLUT), глутатион-S-трансферазы (Гл–S-тр) и тропомиозина.

Мембраны эритроцитов выделяли по методу Dodge. Очистку водорастворимой фракции белков выполняли на центрифугах «Allegra» 64 R. Концентрацию белков устанавливали с использованием набора Qubit Protein Assay Kit («Invitrogen», США) на приборе Qubit Protein согласно инструкции фирмы-изготовителя.

Одномерный электрофорез осуществляли на полиакриламидных гелевых пластинах с концентрацией разделяющего геля 7,5 и 15% в присутствии додецилсульфата натрия по методу Лэмми. Пластинки окрашивали раствором Кумаси R-250 («Sigma», США). Массу исследуемых белков определяли наборами маркеров фирмы Bio-Rad (N-161-0363) и Thermoscientific (N26614). Количественное содержание мембранных белков (мкг на 1 мг общего белка) рассчитывали с привлечением оригинальной программы математической обработки электрофореграмм в пакете «Mathcad-2001 Pro» [8].

Показатель сферичности эритроцитов (ПСЭ) рассчитывали по общепринятой формуле: $ПСЭ = D/T$, где $T = V/S$ (D – средний диаметр эритроцитов (7,35 мкм); T – средняя толщина эритроцитов; V – средний объем эритроцитов; S – средняя площадь основания эритроцитов). В норме ПСЭ составляет 3,4–3,9. Если величина ПСЭ ниже 3,4, это указывает на тенденцию к сфероцитозу.

Исследовали комплекс биохимических параметров крови: липидный спектр, ЛДГ, уровень мочевины, креатинина, мочевой кислоты, ферритина и глюкозы на автоматическом биохимическом анализаторе «Синхрон-9» фирмы «Bekman» (США). Уровень РФМК и фибриногена крови определяли фотометрическим методом на фотометре V-50 (Германия).

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета программ «Statistica 10.0». Значимость расхождения данных в сравниваемых группах оценивали с учётом характера распределения переменных. Для исследования взаимосвязей переменных использовали корреляционный анализ, множественную и логистическую регрессию. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Сравнительный анализ уровня изучаемых белковых компонентов у пациентов с разной степенью АГ и клинически здоровых лиц показал более высокое содержание белков полосы 4.1, Г-3-ФДГ, Гл-S-Тр и снижение величины АТБ у всех больных ЭАГ по сравнению с контролем. Однако у пациентов с I-й степенью ЭАГ это отличие касалось четырех цитоскелетных белков, а у больных со II-й степенью ЭАГ – шести белков (табл. 1).

Как следует из таблицы, изменения в мембране эритроцитов пациентов со II-й степенью ЭАГ были более значимыми, чем у пациентов с I-й степенью, и касались транспортных (АТБ), ферментативных (Г-3-ФДГ) и структурных белков (спектринов).

Анализ линейных взаимосвязей цитоскелетных белков показал, что у пациентов с I-й степенью ЭАГ все структурные белки были связаны с уровнем ферментативного белка (Г-3-ФДГ), принимающего участие в процессах гликолиза. У больных же со II-й степенью ЭАГ эта связь была обусловлена содержанием Гл-S-Тр, которая обеспечивает антиоксидантную защиту мембраны. В то же время у пациентов обеих групп выявлена тесная связь структурного белка полосы 4.1 с уровнем как транспортных, так и ферментативных белков (табл. 2).

Выявленные существенные межгрупповые различия в содержании белков мембраны эритроцитов и нарушение белок-белковых взаимосвязей могут приводить

к изменению деформабельности эритроцитов и образованию повышенного количества сфероцитарных клеток. Такие эритроциты с ослабленной способностью к деформации и уменьшению пластичности не могут эффективно осуществлять газообмен, что приводит к ухудшению кровотока в системе микроциркуляции органов и тканей [9].

Анализ множественной связи показателя сферичности эритроцитов с цитоскелетными белками показал, что у пациентов с I-й степенью ЭАГ в качестве независимых переменных выступают β-спектрин, АТБ, Г-3-ФДГ и тропомиозин.

$$ПСЭ = 2{,}252 + 0{,}003 \cdot \beta\text{-спектрин} - 0{,}009 \cdot АТБ + 0{,}371 \cdot \ln(Г\text{-}3\text{-}ФДГ) + 0{,}003 \cdot \text{тропомиозин};$$

$$R = 0{,}85,\ R^2 = 0{,}72,\ p = 0{,}0000;$$

где R – коэффициент множественной корреляции, R^2 – общий коэффициент детерминации, а уровень Г-3-ФДГ нелинейно связан с величиной ПСЭ.

При этом изменение величины ПСЭ было наиболее сопряжено с отклонением уровня β-спектрина ($R^2 = 0{,}21$, $p = 0{,}017$), ln(Г-3-ФДГ) ($R^2 = 0{,}24$, $p = 0{,}0025$) и тропомиозина ($R^2 = 0{,}21$, $p = 0{,}0005$).

У пациентов со II-й степенью АГ независимым фактором, связанным с величиной ПСЭ, был α-спектрин, а ПСЭ нелинейно связан с уровнем АТБ и Г-3-ФДГ.

$$ПСЭ = 3{,}274 + 0{,}003 \cdot \alpha\text{-спектрин} - 0{,}112 \cdot sqrt(АТБ) + 0{,}204 \cdot \ln(Г\text{-}3\text{-}ФДГ) + 0{,}002 \cdot \text{тропомиозин};$$

$$R = 0{,}85,\ R^2 = 0{,}72,\ p = 0{,}0000.$$

Таким образом, нарушение деформабельности эритроцитов у пациентов с АГ связано со снижением уровня спектринов, основная функция которых заключается в поддержании формы клеток и обеспечении устойчивости к деформации. Совокупность изменения уровня спектринов с изменением других мембранных белков (Г-3-ФДГ и АТБ) является одним из предикторов формирования приобретенного сфероцитоза, наиболее выраженного у пациентов со II-й степенью ЭАГ.

Таблица 1

Сравнительные данные количественного содержания мембранных белков у лиц контрольной группы и пациентов с разной степенью АГ (M ± m)

Мембранные белки	Контрольная группа, n = 29	I-я степень АГ, n = 27	II-я степень АГ, n = 24	p-level
α-спектрин	99,9 ± 5,6	86,0 ± 9,3	65,6 ± 7,7	$p_{1,3} = 0{,}002$
β-спектрин	98,3 ± 5,9	81,2 ± 8,3	66,5 ± 7,6	$p_{1,3} = 0{,}003$
АТБ	128,4 ± 4,1	92,8 ± 5,7	76,6 ± 5,0	$p_{1,2} = 0{,}0001$; $p_{1,3} = 0{,}0000$; $p_{2,3} = 0{,}041$
полоса 4.1	46,2 ± 1,7	80,2 ± 4,9	70,9 ± 4,3	$p_{1,2} = 0{,}0000$; $p_{1,3} = 0{,}0000$;
Г-3-ФДГ	33,7 ± 2,2	58,1 ± 4,4	47,4 ± 4,0	$p_{1,2} = 0{,}0000$; $p_{1,3} = 0{,}015$; $p_{2,3} = 0{,}042$
Гл-S-Тр	46,0 ± 4,5	76,6 ± 5,2	63,2 ± 4,9	$p_{1,2} = 0{,}0000$; $p_{1,3} = 0{,}006$

Примечание. p – значимость межгрупповых различий (t-критерий).

Таблица 2

Взаимосвязь цитоскелетных белков эритроцитов у пациентов с разной степенью АГ

Мембранные белки	АТБ		GLUT		Г-3-ФДГ		Гл-S-Тр	
	I-я ст.	II-я ст.	I-я ст.	II-я ст.	I-я ст.	II-я ст.	I-я ст.	II-я ст.
α-спектрин	–	–	–	–	0,43	–	–	0,44
β-спектрин		0,45			0,40			0,49
анкирин	0,55	0,62	0,52	0,59	0,53	0,58		0,82
полоса 4.1	0,95	0,89	0,89	0,87	0,89	0,77	0,79	0,84
актин	0,73	0,54	0,68	0,57	0,62		0,76	0,44
тропомиозин	0,64	–	0,53	–	0,46	–	0,80	0,57

Примечание. I-я ст. – пациенты с I-й степенью АГ, II-я ст. – пациенты со II-й степенью АГ. Значимость всех коэффициентов Пирсона: $p < 0{,}05$.

Для оценки влияния комплекса биохимических параметров крови все пациенты с разной степенью ЭАГ были разбиты на две категории: 1 категория – пациенты, у которых показатель был меньше найденной его средней величины, 2 категория – показатель больше найденной его средней величины. В каждой категории были установлены доверительные интервалы соответствующего показателя (± 95 %).

Проведенное исследование с помощью одно- и двухфакторного дисперсионного анализа у двух категорий пациентов с ЭАГ выявило у них разные условия, при которых наблюдались существенные сдвиги в уровне цитоскелетных белков, имеющих наибольшую сопряженность с отклонением ПСЭ. Установлено, что у пациентов с I-й степенью ЭАГ, у которых САД (систолическое артериальное давление) или ЛДГ были ниже их средних показателей, уровень β-спектрина был значительно выше, чем у категории пациентов с более высокими значениями этих переменных (табл. 3). Причем, если у пациентов 2 категории наблюдалось одномоментное превышение средней величины САД и активности ЛДГ, то разница между уровнем β-спектрина у пациентов 1-й и 2-й категорий становилась еще более значительной (p1 = 0,006).

У пациентов 2-х категорий со II-й степенью ЭАГ отмечено изменение уровня α-спектрина под влиянием других эндогенных факторов. Так, если ДАД (диастолическое артериальное давление) превышало среднюю величину, выявленную у всех пациентов данной группы, то средний уровень этого белка достигал 54 мкг/мг общего белка, т.е. был на 40 % ниже, чем у пациентов 1 категории, p = 0,021 (табл. 4). Такая же закономерность отмечалась при снижении уровня мочевины в крови. В этом случае содержание α-спектрина в мембране эритроцитов падало на 43 % в сравнении с пациентами 1-й категории (p = 0,012). Еще более низкая величина данного белка определялась у пациентов 2-й категории при одновременном сочетании отмеченных условий (p1 = 0,013).

Установлено, что на процессы повышения АТБ может оказывать влияние избыточный уровень РФМК или ферритина (табл. 5). Так, превышение РФМК в пределах 9,5–19 мг/дл у пациентов 2-й категории сопровождалось увеличением уровня АТБ на 32 % относительно пациентов 1-й категории (p = 0,026), а повышение ферритина у пациентов категории в пределах 289–460 мкг/л – увеличением уровня АТБ на 28 % (p = 0,036). Тем не менее наибольший уровень АТБ достигался у пациентов 2-й категории при совокупном влиянии этих факторов (p = 0,004).

Таблица 3

Условия, способствующие изменению уровня β-спектрина у разных категорий пациентов с I-й степенью АГ

Категория пациентов	Эндогенные условия отклонения уровня мембранного белка		β-спектрин
1 категория	САД (140–141)	ЛДГ (123–151)	118,8 (90–146)
β-спектрин	101,9 (77,4–126)	98,0 (76,5–119)	
2 категория	САД (150–155)	ЛДГ (172–193)	53,3 (30–77)
β-спектрин	69 (50,1–87,8)	65,5 (44,8–86,3)	p1 = 0,006
p	0,038	0,034	

Примечание. Здесь и далее: p – значимость различных уровней белка между 2-мя категориями пациентов (по данным однофакторного анализа); p1 – значимость различных уровней белка между 2-я категориями пациентов (по данным двухфакторного анализа); LSD-критерий Фишера. В скобках даны доверительные интервалы.

Таблица 4

Условия, способствующие изменению уровня α-спектрина у разных категорий пациентов со II-й степенью АГ

Категория пациентов	Эндогенные условия отклонения уровня мембранного белка		α-спектрин
1 категория	ДАД (90–99)	мочевина (5,7–6,6)	123 (85–123)
α-спектрин	89,0 (65,3–112,6)	83,8 (64,5–103)	
2 категория	ДАД (100–107)	мочевина (3,7–4,1)	43,3 (20–66)
α-спектрин	54 (37,4–70,7)	47,6 (28,6–66,8)	p1 = 0,013
p	0,021	0,012	

Таблица 5

Условия, способствующие изменению уровня АТБ у разных категорий пациентов со II-й степенью АГ

Категория пациентов	Эндогенные условия отклонения уровня мембранного белка		АТБ
1 категория	РФМК (4,0–5,5)	ферритин (96–137)	64 (51–75)
АТБ	69,9 (59,1–80,6)	70,1 (59,7–80,6)	
2 категория	РФМК (9,5–19)	ферритин (289–460)	105 (86–125)
АТБ	92,2 (75,9–108,5)	90 (75,9–108,5)	p1 = 0,004
p	0,026	0,036	

Рис. 1. Факторы и условия, индуцирующие развитие приобретённого сфероцитоза у пациентов с I-й степенью ЭАГ

Рис. 2. Факторы и условия, индуцирующие развитие приобретённого сфероцитоза у пациентов со II-й степенью ЭАГ

На основании результатов регрессионного и дисперсионного анализов определены факторы и условия, индуцирующие развитие приобретенного сфероцитоза у пациентов с ЭАГ I-й (рис. 1) и II-й степени (рис. 2). При этом принимались во внимание отклонения отмеченных мембранных белков от их среднего уровня (ве-

дущие факторы) и способствующие этому процессу условия.

Заключение

Таким образом, вся совокупность полученных данных позволила выявить основные факторы, индуцирующие структурно-функциональные нарушения белковых компонентов в мембране эритроцитов у исследуемых групп пациентов. Эти нарушения были обусловлены главным образом изменением уровня структурных (спектринов, белков полосы 4.1), транспортных (АТБ) и ферментативных (Г-3-ФДГ, Гл-S-Тр) белков, особенностью взаимосвязей белковых компонентов цитоплазматической мембраны, которые могли отражаться на деформабельных свойствах эритроцитов и, следовательно, на показателе сферичности этих клеток. Как показали исследования, этот параметр был тесно связан с отклонением β-спектрина, Г-3-ФДГ и тропомиозина у пациентов с I-й степенью АГ, α-спектрина и АТБ у пациентов со II-й степенью АГ, снижение уровня которых (наряду с повышением уровня АТБ) могло приводить к увеличению пула сфероцитарных клеток красной крови, ухудшая тем самым микроциркуляцию и газообмен в тканях. Исследование с помощью дисперсионного анализа у пациентов с разной степенью ЭАГ позволило выявить у них и разные условия, при которых наблюдались существенные сдвиги в уровне цитоскелетных белков, имеющих наибольшую сопряженность с отклонением ПСЭ.

Список литературы

1. Артериальная гипертензия – основной фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний среди работающего населения до 45 лет / Н.А. Корягина [и др.] // Врач-аспирант. – 2011. – Т. 46, № 3. – С. 87–91.

2. Филлипов Е.В. Факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний: Фокус на артериальную гипертензию / Е.В. Филлипов // Российский кардиологический журнал. – 2014. – № 5 S1 (109). – С. 121–122.

3. Структурно-функциональные свойства эритроцитов в норме и при патологии / А.И. Конопля, Л.Г. Прокопенко, С.А. Долгарева и др. – Курск: Изд-во КГМУ, 2011. – 199 с.

4. Белки мембраны эритроцитов и показатель сферичности у больных эссенциальной артериальной гипертензией, осложненной и не осложненной метаболическим синдромом / О.В. Богданова [и др.] // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2017. – Т 2, № 1(113). – С. 19–23.

5. Деформация эритроцитов: Роль в микроциркуляции / А.В. Муравьев [и др.] // Ярославский педагогический вестник. – 2013. – Т 3, № 2.– С. 93–102.

6. Крайнова Н.Н. Структурные изменения эритроцитарных мембран при метаболическом синдроме / Н.Н. Крайнова, В.В. Внуков, И.И. Волкова // Научная жизнь. – 2011. – № 5. – С. 27–31.

7. Мембраны эритроцитов при метаболическом синдроме / Е.Б. Кравец [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 2009. – Т. 55, № 5. – С. 23–26.

8. Пивоваров Ю.И. Способ математической обработки набора белковых полос, полученных с помощью электрофореза / Ю.И. Пивоваров, А.С. Сергеева, Т.Е. Курильская // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2014. – № 3(97). – С. 101–104.

9. Сторожок С.А. Зависимость стабильности деформабельности мембран эритроцитов от межмолекулярных взаимодействий белков цитоскелета / С.А Сторожок, А.Г Санников, А.В. Белкин // Вестник Тюменского государственного университета. – 2009. – № 3. – С. 3–10.