

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

УДК 612.111.6-071:616.1

Э.Э. Кузнецова, В.Г. Горохова, Л.Б. Корякина, И.В. Бабушкина

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ОЦЕНКИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В МЕМБРАНЕ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИИ

ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН (Иркутск)

В статье при сердечно-сосудистой патологии дана оценка структурно-функциональным перестройкам в эритроцитарной мембране, сопровождающиеся изменением активности различных ферментов, определяющих нормальное функционирование эритроцитов, изменением проницаемости мембраны, нарушением функции мембранных гликопротеидов. Изменение липид-белковых и белок-белковых взаимодействий вызывает перераспределение зарядов на поверхности эритроцитов и снижение общего заряда клетки, приводя к увеличению агрегации эритроцитов и изменению реологических свойств крови, что в конечном итоге отражается на эффективности транспорта кислорода, транкапиллярной диффузии и перфузии крови в микроциркуляторном русле.

Ключевые слова: эритроцит, мембрана, гликопротеиды, гликокаликс

SOME ASPECTS OF THE ESTIMATION OF STRUCTURAL-FUNCTIONAL CHANGES IN MEMBRANE OF ERYTHROCYTES AT THE CARDIOVASCULAR PATHOLOGY

E.E. Kuznetsova, V.G. Gorokhova, L.B. Koryakina, I.V. Babushkina

Scientific Center of Reconstructive and Restorative Surgery SB RAMS, Irkutsk

The article presents the estimation of structural-functional changes in erythrocytic membranes accompanied with the change of activity of different enzymes that determine normal functioning of erythrocytes. Change of lipid-protein and protein-protein interactions causes the reapportionment of charges on the surface of erythrocytes and the decrease of total charge of cell and leads to the increase of aggregation of erythrocytes and the change of rheological properties of blood. In the end it reflects on the effectiveness of oxygen transportation, transcapillary diffusion and perfusion of blood in microcirculation channel.

Key words: erythrocyte, membrane, glycoproteids, glycocalyx

Известно, что кровь является единственной подвижной тканью организма, которая предопределяет ее значительное участие в обмене веществ через плазму и форменные элементы и во многом отражает системный характер патофизиологических изменений в организме. Поэтому общеклинический анализ крови не потерял актуальности и в наши дни. При этом количественные и качественные изменения, наблюдаемые в системе красной крови, нередко являются важными диагностическими и прогностическими показателями течения различных патологических процессов и заболеваний.

Однако данные, полученные с помощью общеклинических методов исследования красной крови, дают лишь косвенное представление о процессах, происходящих в цитоплазматической мембране эритроцитов могут свидетельствовать не только о степени повреждения самих эритроцитов, но и выраженности патологических сдвигов в органах и системах.

Важнейшими компонентами мембраны эритроцитов являются белки, которые осуществляют их специфические функции. На электрофореграммах белки, образующие цитоскелет эритроцита,

разделяются на несколько полипептидных полос, имеющих свою номенклатуру. Так полосу 9 составляет белок глобин, который является частью мембранносвязанного гемоглобина.

О содержании мембранносвязанного гемоглобина (МГ) в эритроцитах судят по снижению уровня гемоглобина до и после центрифугирования гемолизата эритроцитов [20].

Взаимодействие гемоглобина с мембраной эритроцита является обратимым процессом. Изменение содержания МГ связывают с изменением липидных компонентов мембраны эритроцита. В модельных опытах было установлено, что повышение содержания холестерина в крови и отрицательно заряженные фосфолипиды (фосфатидилсерин, фосфатидная кислота и др.) приводят к значительному увеличению связывания гемоглобина с мембраной [21]. В наших исследованиях было отмечено повышение мембранносвязанного гемоглобина у больных ИБС и ГБ [2]. У пациентов с сердечно-сосудистой патологией Г.В. Максимов и соавторы [11, 12, 13], также наблюдали повышение уровня МГ, изменение в гемоглобине конформации порфирина и глобина и связывали это с увеличением вязкости плазматической мембраны эритроцита

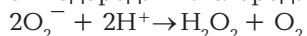
(следовательно, с уменьшением деформируемости) и действием оксида азота (NO), проникающим снаружи, преимущественно на примембранный гемоглобин.

Включению гемоглобина в мембраны способствует повышение в мембране содержания фосфолипидов, таких как фосфатидилсерина и сфингомиелина [16, 21]. И.А. Шперлинг [23] наблюдал увеличение содержания фракции фосфатидилсерина и сфингомиелина, сопровождающееся значительным возрастанием уровня МГ в эксперименте на крысах после однократного внутривенного введения нитрита натрия и солянокислого фенилгидразина. Автор констатировал, что это увеличение свидетельствовало о нарушении целостности мембраны. Привлекая данные литературы, и собственные исследования он пришел к заключению, что в условиях интенсификации свободно-радикального окисления гемоглобин, ковалентно связываясь с мембранным скелетом, разрушает белковую структуру и способствует окислению фосфолипидов через Ca^{2+} -зависимую липооксигеназную активность. Лимитирующей стадией для гемолиза может быть окисление гема SH-группы мембранных белков. При этом гемоглобин в денатурированном состоянии более легко реагирует с мембраной, вызывая агрегацию белка полосы 3 и разрушение эритроцита.

По данным А.Л. Петрова [14] у больных со стенокардией с наличием признаков хронической недостаточности кровообращения также было выявлено достоверное повышение осмотической устойчивости эритроцитов, в то время как у больных со стенокардией без сопутствующей недостаточности кровообращения этот показатель не изменялся. Вероятно, это могло быть связано, с активацией разных типов адренорецепторов, находящихся на мембране эритроцита. Так при активации β -адренорецептора осмотическая стойкость эритроцитов повышалась, а при активации α -адренорецепторов — снижалась [1].

Представление о состоянии биохимических процессов в эритроците дает исследование активности ферментов антиоксидантной защиты. Наиболее распространенными и доступными для определения в клинической практике из ферментов этой системы являются супероксиддисмутаза (СОД) и каталаза.

СОД — фермент, катализирующий реакцию дисмутации супероксидного радикала с образованием перекиси водорода и кислорода:



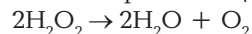
СОД является мощным ингибитором свободно радикального окисления, защищая биополимеры и мембраны от окислительной деструкции.

В норме активность СОД составляет $1,04 \pm 0,3/\text{мг Hb}$ [19]. Снижение активности СОД наблюдается при ишемической болезни сердца, атеросклерозе сосудов головного мозга, при отравлении окисью углерода, соединениями свинца, кадмия, при септикопиемии. Низкие показатели активности данного фермента следует рассматри-

вать как неблагоприятный прогностический признак, указывающий на снижение резистентности эритроцита.

Повышение активности СОД наблюдается при отравлении четыреххлористым углеродом, фосфорорганическими соединениями, инфаркте миокарда. Длительное назначение пациентам кортикостероидов, инсулина также приводит к повышению активности СОД, тогда как большие дозы пенициллина, напротив, провоцируют снижение.

Определение СОД целесообразно проводить с одновременным исследованием каталазы. Каталаза — является гемопротеидом и катализирует реакцию разложения перекиси водорода:



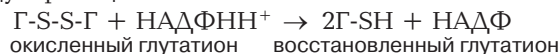
В норме активность каталазы составляет $15,31 \times 10^4 \pm 2,39 \times 10^4 \text{ ME/г Hb}$ [19]. Повышение активности этого фермента наблюдается при гемолитических состояниях, ревматоидном артрите, тиреотоксическом зобе. Снижение активности характерно для инфекционных заболеваний, хронических отравлений фосфором, мышьяком, свинцом, ртутью, длительной антибиотикотерапии.

Для оценки жизнеспособности эритроцита важно иметь представление о соотношении активности СОД и каталазы, поскольку продуктом супероксиддисмутазной реакции является субстрат каталазной реакции — H_2O_2 . Резкое повышение активности СОД без соответствующей активности каталазы является цитотоксичным.

Другой важной антиоксидантной системой защиты является система глутатиона (GSH) — внутриклеточного трипептида, выполняющего многообразные и важные функции. Глутатион защищает эритроцит от активных форм кислорода, восстанавливает и изомеризует дисульфидные связи, поддерживает функции мембран, участвует в транспорте аминокислот через мембраны.

Внутриклеточный пул глутатиона включает восстановленную (GSH) и окисленную (GSSG) формы. Глутатион (GSH), глутатионпероксидаза (ГПО), глутатионредуктаза (ГР), глутатионтрансфераза (ГТ) и НАДФН составляют антиоксидантную систему, в которой ГР и НАДФН необходимы для восстановления окисленного глутатиона. Особенно эта система важна при окислительном стрессе, когда накапливаются активные формы кислорода и другие пероксиданты [9].

Глутатионредуктаза (ГР) катализирует следующую реакцию:



окисленный глутатион восстановленный глутатион

ГР является лимитирующим звеном в системе глутатионредуктаза-глутатионпероксидаза, поэтому при оценке эффективности работы глутатионовой системы чаще всего определяют активность ГР.

В эритроцитах ГР, помимо предотвращения окисления гемоглобина в метгемоглобин, окислительного повреждения мембран и других компонентов эритроцитов, играет важную роль в сохранении целостности эритроцита, обеспечивает возможность сохранения сульфгидрильных

групп ферментов в восстановленном состоянии. В норме активность ГР составляет $7,18 \pm 1,09$ мкмоль НАДФН/г Нб (реакция без добавления ФАД) [19].

Активность ГР возрастает при гепатитах, при остром инфаркте миокарда, при недостаточности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, после введения никотиновой кислоты и после физической нагрузки. Снижение уровня ГР может быть обусловлено недостаточным поступлением в организм витамина В₂.

Глутатионпероксидаза (ГПО) катализирует реакцию окисления глутатиона перекисью водорода или гидроперекисями ROOH, образующимися в результате ПОЛ.

Вклад ГПО в качестве «ловушки» перекиси водорода, по сравнению с каталазой, более значителен, в силу большего сродства к H₂O₂, которую этот фермент разлагает даже в небольших концентрациях.

В норме ГПО составляет $30,8 \pm 4,73$ МЕ/г Нб (при использовании ЭДТА в качестве антикоагулянта) [19].

Повышение активности ГПО наблюдается при дефиците глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, остром лимфоцитарном лейкозе, добавлении в пищу полиненасыщенных жирных кислот. Пониженная активность имеет место при железодефицитной анемии, отравлении свинцом, дефиците селена.

Известно, что пероксидация липидов мембраны клеток ведет к резкому снижению уровня полиненасыщенных жирнокислотных остатков, определяющих ригидность липидного бислоя. При этом происходит ограничение подвижности всей толщи мембраны, диффузия части фосфолипидов (фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина, головки которых несут отрицательные заряды) из внутреннего слоя мембраны в наружный и их переориентация в сторону водной фазы, что находит свое отражение в изменении поверхности клеток и их формы [10]. Усиление процессов ПОЛ в эритроцитах индуцирует гидролиз фосфолипидов, образующиеся при этом высокополярные соединения (лизофосфолипиды, свободные жирные кислоты) вызывают трансформацию дискоцитов в эхиноциты и стоматоциты [17, 18]. Эти же процессы сопровождаются усилением образования микровезикул — фрагментов цитоплазматической мембраны [7].

Подобные нарушения также были отмечены у наблюдаемых нами больных ИБС. У них имела место интенсификация процессов ПОЛ с накоплением кетодиеновых и триеновых конъюгатов, увеличением содержания фосфатидилэтаноламина, снижением количества дискоцитов и увеличением числа эхиноцитов, появлением везикуляции [12, 13]. По нашему мнению, все это свидетельствовало о глубоких нарушениях метаболических процессов в эритроците.

Оценить состояние структуры клеточной поверхности эритроцитов позволяет метод количественной цитохимии. Он основан на способности компонентов гликокаликса (гликопротеины,

гликолипиды, кислые мукополисахариды) образовывать комплексы с катионным сорбционным красителем — альциановым синим. Повышение сорбции данного красителя поверхностью эритроцита свидетельствует о частичной деструкции мембраны.

По нашим предварительным это явление было отмечено у пациентов с ишемической болезнью сердца и гипертонической болезнью, причем наиболее выраженное повреждение гликокаликса было установлено при ИБС [2]. Изменение углеводного состава рецепторов мембраны эритроцитов у больных нестабильной стенокардией также отмечено в работе И.В. Воскобой [3].

При исследовании у больных ИБС супернатанта плазмы и суспензии эритроцитов были обнаружены аномальные гликопротеиды, в которых углеводная цепочка оканчивалась не остатком сиаловой кислоты, как в норме, а остатком галактозы. Известно, что в физиологических условиях, гликопротеиды с «сиаловыми хвостами» должны разрушаться в лизосомах специализированных клеток плазмалеммы печени, имеющих рецепторы для «узнавания и захвата» нормальных гликопротеидов. Вероятно, наличие аномальных гликопротеидов способствует повреждению гликокаликса эритроцита.

Сложный состав крови определяется не только наличием форменных элементов, но и содержанием в ней низко-, средне- и высокомолекулярных соединений различной химической природы. Снижение pH крови, повышенное содержание фибриногена, лизолецитина, свободных жирных кислот, катехоламинов, появление окисленных белков, усиление пероксидации оказывает большое влияние на эритроциты, вызывая изменение в белковой и липидной компонентах мембран и деформацию эритроцитов [3, 8]. В связи с чем определение суммарного метаболического пула (СМП) плазмы и эритроцитов, по нашему мнению, имеет важное диагностическое значение.

Метод определения СМП основан на осаждении высокомолекулярных соединений с последующим снятием обзорной спектрограммы супернатантов плазмы и эритроцитов в области длин волн 210 — 300 нм [10].

Обзорная спектрограмма супернатантов плазмы и эритроцитов обычно отражает общую картину метаболического пула и идентична для исследуемых биосубстратов. Она имеет вид двугорбой кривой с преобладающими пиками в области 210 — 230 и 260 — 290 нм. Вид кривой свидетельствует о том, что в исследуемых биосубстратах представлены разнообразные классы химических соединений и близки по качественным характеристикам. Однако обзорная спектрограмма не дает информации ни о групповой идентификации органических соединений, содержащихся в биосубстратах, ни о структуре соединений. Для интерпретации спектрограмм нами был использован экспресс-метод реакционной бумажной хроматографии, высокоэффективная ионообменная и сорбционная хро-

матогграфия [6, 15]. При этом молекулярную массу низкомолекулярных веществ определяли методом мембранной ультрафильтрации.

Использование вышеперечисленных физико-химических методов позволило подойти к групповой расшифровке спектрограмм супернатантов плазмы и эритроцитов. Так, было установлено, что в области длин волн 210 – 230 нм содержались пептиды молекулярной массы до 3 кД. Среди них были выделены: нейротензин, субстанция Р, глюкагон, гастрин, соматостатин, лейцин- и мет-энкефалины, брадикинин и другие.

В группах соединений, поглощающих в интервале 230 – 260 нм, были идентифицированы фосфолипиды, некоторые метаболиты арахидоновой кислоты, продукты ПОЛ. В области 260 – 290 нм обнаружены нуклеотиды, окислительно-восстановительные ферменты, представленные пиридинзависимыми дегидрогеназами, для которых кофактором служит НАД или НАДФ. При этом преобладали окисленные формы этих соединений, максимум поглощения которых при 260 – 265 нм, тогда как восстановленные формы поглощают ультрафиолетовые лучи при 340 нм. Превалирование окисленных соединений свидетельствует об изменении энергетических и пластических процессов в эритроцитах. В этой же области спектрограммы были идентифицированы соединения, относящиеся к группе пуриновых и пиримидиновых оснований, образующихся при распаде нуклеиновых кислот под действием нуклеаз.

Известно, что конечным продуктом распада пуринов является мочевая кислота, увеличение уровня которой отмечалось в обследованных группах больных ИБС и ГБ. Идентификация повышенного содержания ксантина и особенно гипоксантина, образующихся при распаде пуринов, в ксантиноксидазной реакции при ишемии, указывает на избыточное продуцирование супероксидных анион-радикалов и других активных форм кислорода. Последнее является одним из факторов, провоцирующих развитие сердечно-сосудистой патологии.

В связи с вышеизложенным, увеличение СМП и его компонентов супернатантов эритроцитов в наших исследованиях у больных ИБС и ГБ, вероятно, можно связать с повышенной сорбцией эритроцитами избыточных продуктов метаболизма, за счет снижения поверхностного заряда эритроцитов.

Таким образом, описанные выше структурно-функциональные перестройки в эритроцитарной мембране сопровождаются изменением активности различных ферментов, определяющих нормальное функционирование эритроцитов, изменением проницаемости мембраны, снижением скорости переноса кислорода, нарушением функции мембранных гликопротеидов. Изменение липид-белковых и белок-белковых взаимодействий вызывает перераспределение зарядов на поверхности эритроцитов и снижение общего заряда клетки, приводя к увеличению агрегации эритроцитов и изменению реологических свойств крови, что в ко-

нечном итоге отражается на эффективности транспорта кислорода, транскапиллярной диффузии и перфузии крови в микроциркуляторном русле.

Идентичные спектрограммы супернатантов плазмы и эритроцитов мы наблюдали и у больных с воспалительными заболеваниями кишечника [22]. Их расшифровка также выявила наличие разнообразных классов химических соединений, близких по структуре к соединениям в спектрограммах больных ИБС и ГБ, но отличающихся по количественному содержанию. Очевидно, что присутствие близких компонентов органических соединений не является специфическим признаком конкретного заболевания, а отражает тяжесть патологического процесса, в том числе и уровень свободнорадикального окисления при патологиях разного генеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белева С.В., Вершинина Е.Ю., Корчемкина Е.В. и др. Влияние адреналина и лизофосфатидилохолина (ЛФХ) на осмотическую резистентность эритроцитов // Успехи совр. естеств. — 2006. — № 8. — С. 69 – 70.
2. Боровская М.К., Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г., Корякина Л.Б. и др. Структурно-функциональная характеристика мембран эритроцита и ее изменения при патологиях разного генеза // Бюл. НЦРВХ СО РАМН. — Иркутск, 2010. — № 3 (73). — С. 334 – 354.
3. Бышевский А.Ш., Умутбаева М.К., Алборов Р.Г. Антиоксиданты в коррекции гемокоагуляционных сдвигов. — М.: Мед.книга, 2004. — С. 74 – 76.
4. Горохова В.Г., Кузнецова Э.Э., Горохов А.Г. и др. Изучение свободнорадикальных процессов у больных ИБС // Дальневост. мед. науч.-практич. ж. «Здоровье. Медицинская экология. Наука». — 2005а. — № 1 (21). — С. 56 – 57.
5. Горохова В.Г., Кузнецова Э.Э., Горохов А.Г. и др. Состояние метаболических процессов в эритроцитах больных ИБС // Клиническая медицина. — Великий Новгород — Алматы, 2005. — Т. 11. — С. 86 – 89.
6. Горохова В.Г. Жидкостная хроматография растительных фенольных соединений: автореф. дисс. ... канд. хим. наук. — Иркутск, 1983. — 23 с.
7. Зубаирова Л.Д., Зубаиров Д.А., Андрушко И.А. Клеточные микровезикулы в динамике экспериментальной эндотоксемии // Бюл. экспер. биол. и мед. — 2006. — № 11. — С. 517 – 520.
8. Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. — Чита, 2010. — 827 с.
9. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Биологическая роль глутатиона // Успехи совр. биол. — 1990. — Т. 110, Вып. 1 (4). — С. 20 – 33.
10. Малахова М.Я. Методы биохимической регистрации эндогенной интоксикации // Эфф. терапия. — 1995. — Т. 1, № 1. — С. 61 – 64.
11. Максимов Г.В., Максимова Н.В., Чурин А.А. и др. Исследование изменений конформации

порфирина гемоглобина при первичной гипертензии // Биохимия. — 2001. — Т. 66, Вып. 3. — С. 365–370.

12. Максимов Г.В., Орлов С.Н. Влияние объема эритроцита на структуру протопорфирина гемоглобина // Биофизика. — 1993. — Т. 3, Вып. 5. — С. 804–808.

13. Максимов Г.В., Родников О.Г., Лунева О.Г. и др. Изучение роли плазматической мембраны эритроцитов в формировании гипоксии у больных с хронической сердечной недостаточностью // Тер. архив. — 2005. — № 9. — С. 70–73.

14. Петров А.А. Клиническая оценка изменений проницаемости эритроцитарных мембран у больных с различными формами ИБС // Новые методы в клинической кардиологии: сб. науч. трудов под ред. проф. А.Ф. Подлевского. — Л., 1985. — С. 46–49.

15. Плотников М.Б., Тюкавкина Н.А., Плотникова Т.М. Лекарственные препараты на основе диквертина. — Томск: изд-во Томского ун-та, 2005. — 228 с.

16. Рогов О.А. Механизмы повреждения эритроцитов при остром отравлении монооксидом углерода: автореф. дисс. ... канд. мед. наук. — Иркутск, 2006. — С. 25.

17. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Типовые нарушения молекулярной организации эритроцита

при соматической и психической патологии // Успехи физиол. наук. — 2004. — № 1. — С. 53–65.

18. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Степоява Е.А. и др. Эритроцит при патологии: размышления у электронного микроскопа // Архив патологии. — 2004. — № 3. — С. 53–61.

19. Справочник по лабораторным методам исследования / под ред. Л.А. Даниловой. — СПб.: Питер, 2003. — С. 74–76.

20. Токтамысова З.С., Биржанова Н.Х. О мембраносвязанном гемоглобине // Биофизика. — 1990. — Т. 35, Вып. 6. — С. 1119–1120.

21. Ушакова И.А., Васильева С.А., Серебряникова Р.П. и др. Изучение взаимодействия метгемоглобина с фосфолипидными бислоями мембранами методом флюоресценции // Биоорг. химия. — 1981. — Т. 7, № 4. — С. 613–619.

22. Чашкова Е.Ю., Коротаева Н.С., Горохова В.Г., Кузнецова Э.Э. и др. Повреждение клеточных мембран у пациентов с язвенным колитом // Колопроктология. — 2010. — № 2 (32). — С. 30–35.

23. Шперлинг И.А. Патоморфоз и патофизиология эритроцита при воздействии гемотропных ксенобиотиков: автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. — Томск, 2006. — 46 с.

24. Smith J.E. Erythrocyte membrane structure, function and pathophysiology // Vet. Pathol. — 1987. — N 6. — P. 471–476.

Сведения об авторах

Кузнецова Эмма Эфраимовна — к.м.н., с.н.с. лаборатории биохимии ФБГУ «НЦРВХ» СО РАМН (664074, г. Иркутск, ул. Добролюбова, 3-12; тел.: 38-29-11)

Горохова Виктория Григорьевна — к.х.н., с.н.с. лаборатории биохимии ФБГУ «НЦРВХ» СО РАМН (664047, г. Иркутск, ул. А. Невского, 61-40; тел.: 54-83-32)

Корякина Лариса Борисовна — к.м.н., с.н.с. лаборатории микробиологии и гемостаза ФБГУ «НЦРВХ» СО РАМН (664050, г. Иркутск, пр. Жукова, 102-55; тел.: 8-9148780169; e-mail: koryakina-asld@rambler.ru)

Бабушкина Инна Викторовна — к.б.н., н.с. отдела коронарного атеросклероза ФБГУ «НЦРВХ» СО РАМН, г. Иркутск