

## ЭРИТРОЦИТАРНЫЙ УРОВЕНЬ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Браже Н. А., Лунева О. Г., Максимова Н. В., Брызгалова Н. Ю.,  
Паршина Е. Ю., Родненков О. В., Максимов Г. В., Рубин А. Б., Чазов Е. И.

*Методами спектроскопии комбинационного рассеяния и спектроскопии электронного парамагнитного резонанса изучали свойства гемоглобина и вязкость плазматической мембраны эритроцитов пациентов с первичной гипертонией и ишемией сердца. Показано, при всех сердечно-сосудистых заболеваниях изменяются кислород-связывающие свойства гемоглобина и вязкость мембраны эритроцитов*

**Введение.** В патофизиологии сердечно-сосудистых заболеваний одно из ключевых мест занимает гипоксия, так как при этом происходит нарушение газотранспортной функции крови и, во многих случаях, снижение эффективности переноса кислорода эритроцитами. Одной из важных причин нарушения кислородтранспортной системы может быть изменение конформации гемопорфирина гемоглобина (Гб) и его сродства к кислороду ( $O_2$ ). Применение спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) уже позволило выявить изменения конформации гемопорфирина у больных с тяжелой формой артериальной гипертонии (Максимов и др., 2001), у пациентов, страдающих недостаточностью кровообращения (Rodnenkov, 2005), и в условиях терапевтической интервальной гипоксии у больных со стабильной стенокардией напряжения (Максимов и др., 2001).

Важную роль в регуляции транспорта  $O_2$  эритроцитами и обмена  $O_2$  в тканях играет оксид азота (NO) (Kosaka, Seyama, 1996; Kosaka, Seyama, 1997). В условиях гипоксии наблюдается увеличение содержания NO в кардиомиоцитах, клетках эндотелия и легких (Faller, 2004; Hobbs et al., 2002; Le Cras et al., 1996). Важно то, что, синтезируясь в одном месте, NO переносится гемоглобином по всему организму (Hobbs, 2002). NO обладает константой сродства к атому железа ( $Fe^{2+}$ ) порфирина на 5-7 порядков выше, чем  $O_2$ , и поэтому конкурирует с ним за связывание на Гб (Stamler, 1992). Связываясь с атомом  $Fe^{2+}$  гемоглобина, NO способен изменять конформацию гемопорфирина гемоглобина и менять сродство гемоглобина к  $O_2$  (Hobbs et al., 2002). Экзогенный NO может увеличивать выделение  $O_2$  из эритроцитов (Kosaka, Seyama 1996; Kosaka, Seyama 1997). Эти данные позволяют предположить, что NO играет важную роль в регуляции транспорта  $O_2$  эритроцитами. NO проникает в эритроцит путем диффузии через плазматическую мембрану клетки, поэтому изменение свойств липидного матрикса мембраны может быть причиной уменьшения или увеличения содержания NO внутри клетки. Кроме того, от свойств липидного матрикса, возможно, зависит активность мембранных белков, в том числе белков, обеспечивающих транспорт ионов через мембрану и поддерживающих водно-солевой баланс эритроцитов. Одним из таких белков является  $Na^+/H^+$  обменник, от активности которого зависит pH внутри клетки.

В данной работе мы исследовали текучесть различных областей мембраны эритроцитов, активность  $Na^+/H^+$  обмена, содержание комплексов гемоглобина с кислородом и относительное содержание различных комплексов гемоглобина с оксидом азота

(Гб-NO) у пациентов, страдающих ишемической болезнью сердца (ИБС) и первичной гипертонией (ПГ).

#### **Материалы и методы.**

**Исследуемые группы.** Было проведено открытое сравнительное исследование института Клинической Кардиологии кардиологического научно-практического комплекса РАМН и кафедры биофизики биологического факультета Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова. В исследование включено 11 мужчин с ИБС и 7 мужчин с первичной гипертонией. Возраст пациентов варьировал от 42 до 63 лет. В качестве контроля использовали группу здоровых доноров (8 человек) с возрастом 38-55 лет. Для изучения использовались образцы цельной крови, взятой из локтевой вены пациентов и доноров в вакуумные пробирки. Забор крови проводили в 9 часов утра, натощак, до приёма препаратов и все измерения проводились в течение 4 часов.

**Определение вязкости плазматической мембраны проводилось методом спектроскопии электронно-парамагнитного резонанса (ЭПР).** В качестве спиновых зондов использовали спин-меченые аналоги стеариновой кислоты, у которых парамагнитный фрагмент находится в различных положениях относительно карбоксильной группы: 5-доксилстеариновая кислота (5-ДС) и 16-доксилстеариновая кислота (16-ДС). Для оценки вязкости мембраны эритроцитов из полученных спектров ЭПР вычисляли:

- для зонда 5-ДС определяли параметр упорядоченности  $S$ , характеризующий подвижность ацильных цепей (Кузнецов, 1976);
- для зонда 16-ДС рассчитывали время корреляции вращений нитроксильного радикала  $\tau$  (Кузнецов, 1976).

Данные параметры характеризуют микровязкость липидного компонента плазматической мембраны эритроцитов.

**Изменение конформации гемопорфирина оценивалось методом спектроскопии комбинационного рассеяния (КР-спектроскопия).** На рис. 1 приводится спектр КР цельной крови человека, отражающий все формы гемоглобина, находящиеся в крови. Для анализа изменений конформации гемопорфирина использовались следующие характеристики КР-спектров (Соловьев и др., 1985; Кери 1985; Максимов и др., 2000; Максимов и др., 2001]:

- Отношение интенсивности полосы  $1375\text{ см}^{-1}$  к полосе  $1355\text{ см}^{-1}$  ( $I_{1375}/I_{1355}$ ), характеризующее относительное число комплексов гемоглобина с лигандами, преимущественно, количество оксигемоглобина (Гб- $O_2$ ) (рис. 2);
- Отношение интенсивностей полос  $1618$  и  $1580\text{ см}^{-1}$  ( $I_{1618}/I_{1580}$ ), отражающее содержание комплексов Hb с NO при наличии связи между атомом  $Fe^{2+}$  и глобином (комплекс-I) (рис. 2);
- Отношение интенсивностей полос  $1668$  и  $1580\text{ см}^{-1}$  ( $I_{1668}/I_{1580}$ ), отражающее содержание в крови комплексов Hb с NO при отсутствии связи между атомом  $Fe^{2+}$  и глобином (комплекс-II) (рис. 2).

**Определение активности  $Na^+/H^+$ -обмена** оценивали как  $Na^+$ -зависимый компонент выхода ионов  $H^+$  из преварительно подкисленных эритроцитов. Подробно метод описан в работах (Orlov et al., 1989). Скорость выхода протонов ( $мкМ\ H^+ / (л\ клеток\ мин)$ ) оценивали по значениям начальной скорости подкисления среды, буферной емкости среды и гематокрита.

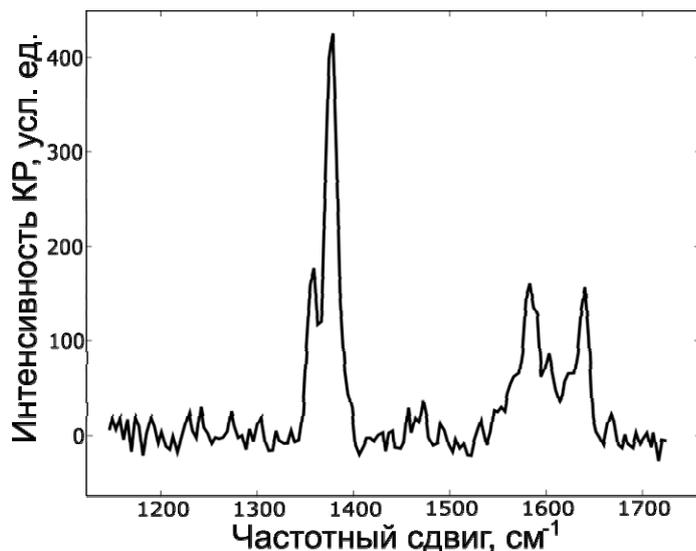


Рис. 1. Спектр комбинационного рассеяние цельной крови человека (здорового донора)

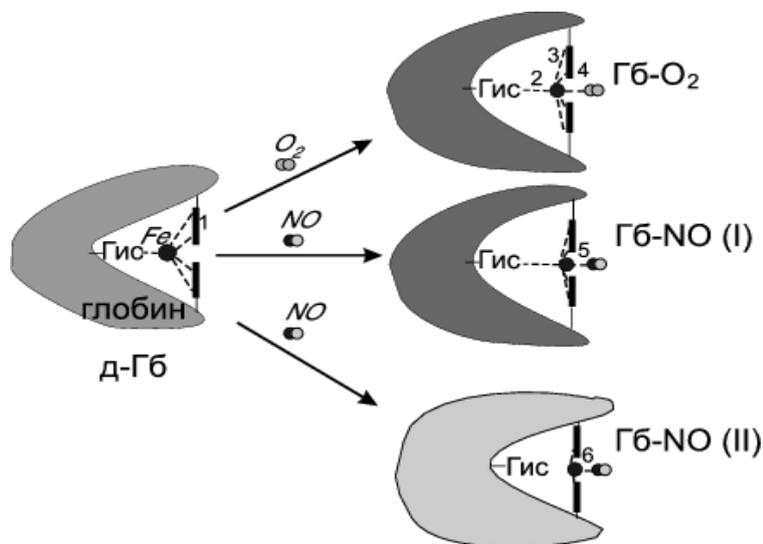


Рис. 2. Схематическое изображение комплексов гемоглобина с  $O_2$  и  $NO$ . 1: порфириновое кольцо (вид сбоку), 2: атом железа, 3, 4 и 5: координационные связи между атомом  $Fe^{2+}$ ,  $O_2$  и  $NO$  в комплексах I и II, соответственно

**Определение максимальной активности  $Ca^{2+}$ -АТФазы** оценивали как скорость  $Na_3VO_4$ -чувствительного компонента выхода  $Ca^{2+}$  из эритроцитов, предварительно нагруженных  $Ca^{2+}$  (Максимова, Петров, 1993).

**Результаты.** Параметр упорядоченности  $S$ , полученный при анализе спектров ЭПР спинового зонда 5-ДС, встроенного в мембрану эритроцитов пациентов с ИБС и ПГ, был значительно выше, чем в контрольной группе (табл. 1). Эти данные показывают, что у больных ИБС и ПГ уменьшается подвижность ацильных цепей липидного бислоя вблизи поверхностей мембраны, а значит, уменьшается и текучесть мембраны эритроцитов. В то же время, мы не наблюдали значимых изменений времени корреляции вращательных движений спинового зонда 16-ДС между контрольной группой и группами больных ИБС и ПГ (табл. 1). Эти данные свидетельствуют о том, что теку-

честь глубоких гидрофобных областей мембраны при данных патологиях не меняется. В наших предыдущих исследованиях было показано, что подобные изменения текучести мембраны эритроцитов наблюдаются и у больных, страдающих недостаточностью кровообращения (группа пациентов с ишемической кардиопатией и дилатационной кардиомиопатией, недостаточностью кровообращения II функционального класса по классификации NYHA в стадии декомпенсации) (Rodnenkov et al., 2005). Известно, что количество холестерина в плазме крови коррелирует с содержанием холестерина в плазматической мембране эритроцитов (Koter et al., 2004). В связи с этим мы предположили, что увеличение вязкости плазматической мембраны эритроцитов в поверхностных слоях связано с увеличением содержания холестерина в мембране. Действительно, была выявлена положительная корреляция между содержанием холестерина в плазме крови и значение параметра  $S$  у пациентов с ИБС и ПГ (коэффициент корреляции Спирмена равен 0,55,  $p < 0,01$ ).

**Таблица 1.** Параметры ЭПР спектров спиновых зондов 5-ДС ( $S$ ) и 16-ДС ( $\tau$ ), встроенных в плазматическую мембрану эритроцитов пациентов с ишемической болезнью сердца и первичной гипертонией. В таблице показаны средние значения  $\pm$  средняя ошибка среднего. NS: различия недостоверны

Группа	Число пациентов, n	$S$	$\tau \times 10^9$
1. Контроль	8	0.650 $\pm$ 0.006	2.27 $\pm$ 0.03
2. Ишемическая болезнь сердца	11	0.687 $\pm$ 0.003	2.35 $\pm$ 0.05
3. Первичная гипертония	7	0.688 $\pm$ 0.005	2.24 $\pm$ 0.07
$p_{1,2}$		<0.01	NS
$p_{1,3}$		<0.01	NS

В наших предыдущих исследованиях у пациентов с недостаточностью кровообращения увеличение вязкости мембраны в поверхностных слоях сопровождалось уменьшением числа комплексов гемоглобина с лигандами, в первую очередь, оксигемоглобина и комплексов гемоглобина с NO (Rodnenkov et al., 2005). В настоящих экспериментах не было обнаружено изменений количества комплексов Гб-NO I-го и II-го типов (КР-соотношения  $I_{1618}/I_{1375}$ ,  $I_{1668}/I_{1375}$ ) (Рис. 2, табл. 2), при этом количество оксигемоглобина уменьшалось (соотношение  $I_{1375}/I_{1355}$ ) (табл. 2).

**Таблица 2.** Свойства гемоглобина эритроцитов у пациентов с ишемической болезнью сердца и первичной гипертонией. В таблице показаны средние значения  $\pm$  средняя ошибка среднего. NS: различия недостоверны

Группа	n	$I_{1375}/I_{1355}$	$I_{1618}/I_{1580}$	$I_{1668}/I_{1580}$
1. Контроль	8	0.591 $\pm$ 0.082	0.492 $\pm$ 0.064	0.135 $\pm$ 0.043
2. Ишемическая болезнь сердца	11	0.448 $\pm$ 0.050	0.439 $\pm$ 0.081	0.166 $\pm$ 0.035
3. Первичная гипертония	7	0.409 $\pm$ 0.086	0.712 $\pm$ 0.202	0.140 $\pm$ 0.114
$p_{1,2}$		<0.05	NS	NS
$p_{1,3}$		<0.05	NS	NS

Нами также была обнаружена отрицательная корреляция между параметром  $I_{1375}/I_{1355}$  и содержанием холестерина в плазме крови: коэффициент корреляции Спирмена равен -0,7,  $p < 0,005$ . Можно предположить, что увеличение количества холестерина в плазме крови и, в следовательно, плазматической мембране эритроцитов, приводит к увеличению вязкости плазматической мембраны и ухудшению диффузии газов, в том числе  $O_2$ , через мембрану. В результате этих изменений уменьшается насыщение эритроцитов

кислородом. Данное предположение согласуется с результатами экспериментов, выполненных на липидных бислоях (Subczynski et al., 1991).

Было обнаружено увеличение активности  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмена у больных ИБС и ПГ по сравнению со здоровыми донорами (табл. 3). В группах больных, страдающих ИБС и ПГ, показана положительная корреляция между активностью  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмена и содержанием холестерина в плазме крови. Коэффициент корреляции между содержанием холестерина в плазме крови (мм) и показателем активности  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмена ( $\mu\text{M Na}^+ / (\text{л клеток мин})$ ) составил 0.85 ( $p < 0.001$ ). Не было обнаружено корреляции между активностью  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмена и содержанием триглицеридов в плазме крови. В отличие от  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмена максимальная активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы уменьшалась в группах пациентов с ИБС и ПГ (табл. 3). Кроме того, была выявлена отрицательная корреляция между активностью  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы и содержанием холестерина в плазме крови (коэффициент корреляции -0,78,  $p < 0,001$ ). Не было выявлено корреляции активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы с содержанием триглицеридов в плазме крови (коэффициент корреляции -0,34). Следует отметить, что обнаруженные изменения в активности  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы не могут повлиять на значение внутриклеточного рН и, таким образом, не могут быть причиной изменения сродства гемоглобина к лигандам и уменьшения количества оксигемоглобина.

**Таблица 3.** Активности  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в эритроцитах пациентов с ишемической болезнью сердца и первичной гипертензией. В таблице показаны средние значения  $\pm$  средняя ошибка среднего. NS: различия недостоверны

Группа	n	$\mu\text{M H}^+ / (\text{л клеток мин})$	$\mu\text{M Ca}^{2+} / (\text{л клеток мин})$
1. Контроль	8	108.5 $\pm$ 10.8	185.2 $\pm$ 20.1
2. Ишемическая болезнь сердца	11	180.6 $\pm$ 18.4	155.7 $\pm$ 18.1
3. Первичная гипертензия	7	193.1 $\pm$ 14.9	134.6 $\pm$ 15.4
$p_{1,2}$		<0.01	<0.05
$p_{1,3}$		<0.01	<0.05

**Заключение.** В представленной работе было показано, что у пациентов с ИБС и ПГ увеличивается вязкость плазматической мембраны эритроцитов в поверхностных слоях, что происходит, вероятно, вследствие увеличения содержания холестерина в мембране. Нами было обнаружено изменение активностей  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы, коррелирующие с содержанием холестерина в плазме крови. Кроме того, уменьшается содержание оксигемоглобина, но не меняется количество комплексов гемоглобина, связанного с оксидом азота. Изменение количества оксигемоглобина может быть вызвано увеличением вязкости плазматической мембраны эритроцитов и, как следствие, ухудшенным поступлением  $\text{O}_2$  в цитоплазму эритроцитов. Выявленные изменения свойств эритроцитов могут усугублять тканевую гипоксию и должны быть более подробно изучены в дальнейших экспериментах.

Работа была частично выполнена при поддержке грантами РФФИ 07-04-00621 и 08-04-00531.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Максимов Г.В., Родненков О.В., Чуринов А.А., Рубин А.Б., Ткачук В.А., Чазов Е.И. // Влияние интервальной гипоксической тренировки на способность гемоглобина связывать кислород у больных с ишемической болезнью сердца. Кардиология. 2001. № 6, С. 8–12.

2. Rodnenkov O.V., Luneva O. G., Ulyanova N. A., Maksimov G. V., Rubin A. B., Orlov S. N., Chazov E. I. //Pathophysiology. 2005. V. 11, P. 209–213.
3. Kosaka H., Seiyama A. // Physiological role of nitric oxide as an enhancer of oxygen transfer from rithrocytes ti tissues. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996. V. 218, P.749–752.
4. Kosaka H., Seiyama A. // Increased oxygen dissociation by nitric oxide from RBC. Adv. Exp. Med. Biol. 1997. V. 428, P. 349–354.
5. Faller D.V. // Endothelial cell responses to hypoxic stress. Clin.Exp.Pharmacol.Physiol. 1999. V. 26, P. 74–84.
6. Hobbs A. I., Gladwin M.T., Patel R.P, Williams D.L.H., Butler A.R. // Haemoglobin: NO transporter, NO inactivator or NOne of the above? TRENDS in Pharmacological Science. 2002. V. 23, P. 406–411.
7. Cras le T.D., Xue C., Rengasamy A., John R.A. // Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. Am. J. Physiol. 1996. V. 270, P. L164–L170.
8. Stamler J.S., Singel D.J., Loscalzo J. // Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. Science. 1992. V. 258. P. 1898–1902.
9. Кузнецов А.Н. // Метод спинового зонда. М.: Наука, 1976.
10. Соловьев К.Н., Гладков Л.Л., Старухин А.С., Шкирман С.Ф.// Спектроскопия порфиринов: колебательные состояния. Минск: Наука и техника, 1985.
11. Керн П. // Применение спектроскопии КР и РКР в биохимии. М.: Мир, 1973.
12. Максимов Г.В., Максимова Н.В., Чуринов А.А., Орлов С.Н., Рубин А.Б. // Исследование изменений конформации порфирина гемоглобина при первичной гипертензии. Биохимия. 2000, Т. 66, Вып. 3. С. 365–370.
13. Orlov S.N., Postnov I.Yu., Pokudin N.I., Kukharensko V.Yu., Postnov Yu.V. // Na<sup>+</sup> /H<sup>+</sup> exchange and other ion transport systems in erythrocytes of essential hypertensives and spontaneously hypertensive rats. J.Hypertens. 1989. V. 7. P. 781–788.
14. Максимова Н.В., Петров В.В. // Регистрация максимальной активности Ca<sup>2+</sup>-АТФазы в интактных человеческих эритроцитах используя Ca<sup>2+</sup>-селективный электрод. Бюлл. Эксп. Биол. Мед. 1993. Т. 116. С. 493–497.
15. Koter M., Franiak I., Strychalska K., Chojonowska-Jezerska M. // Damage to the structure of erythrocyte plasma membrane in patients with type-2 hypercholesterolemi. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2004. V. 36, P. 205–215.
16. Subczynski W.K., Hyde J.S., Kusumi A. // Effect of alkyl chain unsaturation and cholesterol interaction on oxygen transport in membrane: a pulse ESR labeling study // Biochemistry. 1991. V. 30, P. 8578–8590.

## ERYTHROCYTE ASPECT OF CARDIOVASCULAR DISEASES

**Brazhe N. A., Luneva O. G., Maksimova N. V., Bryzgalova N. Yu., Parshina E. Yu.,  
Rodnenkov O. V., Maksimov G. V., Rubin A. B., Chazov E. I.**

*By means of Raman spectroscopy, spectroscopy of electron paramagnetic resonance and ion-selective electrodes we studied hemoglobin properties, fluidity of plasma membrane and activity of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>- exchanger and Ca<sup>2+</sup>-ATPase of erythrocytes in patients with ischemic heart disease and essential hypertension. We have found that these cardiovascular pathologies are accompanied by changes of hemoglobin properties, activities of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>- exchanger and Ca<sup>2+</sup>-ATPase and fluidity of erythrocytic plasma membrane*