

## СВЯЗЬ ПОКАЗАТЕЛЯ СФЕРИЧНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ С МЕМБРАННЫМИ БЕЛКАМИ КРАСНЫХ КЛЕТОК КРОВИ У БОЛЬНЫХ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Сергеева А. С.<sup>1</sup>, Пивоваров Ю. И.<sup>1</sup>, Бабушкина И. В.<sup>1,2</sup>, Дмитриева Л. А.<sup>1</sup>

**Цель.** Исследовать связь между характером изменения показателя сферичности эритроцитов и уровнем структурно-функциональных белков мембраны эритроцитов у больных артериальной гипертензией (АГ).

**Материал и методы.** В исследовании участвовали больные АГ I и II степени (всего 51, средний возраст — 42±1,5 лет), у которых определяли показатель сферичности эритроцитов (ПСЭ) и проводили количественную оценку 10-ти мембранных белков эритроцитов. Анализ полученных данных проводили методами непараметрической и параметрической статистики.

**Результаты.** Все больные АГ были разделены на группу с "нормоцитозом" (ПСЭ ≥3,4 усл. ед.) и группу со "сфероцитозом" (ПСЭ <3,4 усл. ед.), которые достоверно отличались по содержанию α- и β-спектринов. Дискриминантный анализ выявил, что наибольший вклад в разделение этих 2-х групп внесли следующие белки: α-спектрин, АТБ, тропомиозин и Г-3-ФДГ. Те же самые белки были выявлены как предикторы отклонения ПСЭ в модельном плане при регрессионном анализе.

**Заключение.** Было показано, что нарушение количества и соотношения различных как цитоскелетных, так и функциональных белков в мембране эритроцитов при АГ может обуславливать изменение стабильности и деформальности самой мембраны, что, в свою очередь, будет содействовать развитию существенной дисфункции эритроцитов в целом и осложнять течение системной гипоксии у данной категории больных.

**Ключевые слова:** артериальная гипертензия, сферичность эритроцитов, мембранные белки.

<sup>1</sup>ФГБУ Иркутский научный центр хирургии и травматологии, Иркутск; <sup>2</sup>ФГБОУ ВО Иркутский государственный аграрный университет им. А.А. Ежевского, Иркутск, Россия.

Сергеева А.С.\* — к.б.н., с.н.с. лаборатории патофизиологии функциональных систем, Пивоваров Ю.И. — профессор, д.м.н., зав. лабораторией патофизиологии функциональных систем, Бабушкина И.В. — к.б.н., с.н.с. лаборатории патофизиологии функциональных систем, Дмитриева Л.А. — к.м.н., с.н.с. лаборатории патофизиологии функциональных систем.

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): sergeeva1111@yandex.ru

АГ — артериальная гипертензия, ВНОК — Всероссийское научное общество кардиологов, NYHA — Нью-Йоркская кардиологическая ассоциация, ПСЭ — показатель сферичности эритроцитов, АТБ — анион-транспортный белок, Г-3-ФДГ — глицеральальдегид-3-фосфатдегидрогеназа.

Рукопись получена 02.06.2015

Рецензия получена 15.09.2015

Принята к публикации 22.09.2015

Российский кардиологический журнал 2016, 4 (132): 52–58

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2016-4-52-58>

## THE RELATION OF ERYTHROCYTE SPHERICITY WITH MEMBRANE PROTEINS IN ARTERIAL HYPERTENSION

Sergeeva A. S.<sup>1</sup>, Pivovarov Yu. I.<sup>1</sup>, Babushkina I. V.<sup>1,2</sup>, Dmitrieva L. A.<sup>1</sup>

**Aim.** To study the relation of the pattern of erythrocyte sphericity value changes and the levels of structural and functional proteins of erythrocyte membrane in patients with arterial hypertension (AH).

**Material and methods.** Totally, 51 patient participated with AH of 1 and 2 grade (mean age 42±1,5 y.), in whom we assessed sphericity of erythrocytes (SE) and performed quantitative evaluation of 10 membrane proteins of erythrocytes. Analysis of the acquired data was done via non- and parametrical statistics methods.

**Results.** All AH patients were selected to a group with "normocytosis" (SE ≥3,4 U) and "spherocytosis" (SE <3,4 U), that significantly differed by contents of α- and β-spectrines. Discrimination analysis revealed that the main influence on the separation of these 2 groups had the following proteins: α-spectrine, anion transport protein, tropomyosine and G-3-PDG. The same proteins were found as predictors of SE deviations in models under regression analysis.

**Conclusion.** It was shown, that the amount and relation of various cytoskeletal and functional proteins in erythrocyte membrane of AH patients might determine the changes of stability and deformability of the membrane itself, that also promotes the development of significant erythrocyte dysfunction in general and complication of systemic hypoxia in this category of patients.

**Russ J Cardiol 2016, 4 (132): 52–58**

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2016-4-52-58>

**Key words:** arterial hypertension, erythrocyte sphericity, membrane proteins.

<sup>1</sup>Irkutsk Scientific Center for Surgery and Traumatology, Irkutsk; <sup>2</sup>A.A. Ezhevsky Irkutsk State Agricultural University, Irkutsk, Russia.

Известно, что при стойкой артериальной гипертензии (АГ) одной из ведущих компенсаторных реакций, обусловленных системной гипоксией, является усиление эритропоэза. В этой ситуации на фоне повышенного периферического сосудистого сопротивления происходит ухудшение реологических свойств крови, связанное с повышением гематокрита и вязкости крови. С другой стороны, течение гипоксического синдрома может осложняться

в связи с несостоятельностью определённого пула эритроцитов проникать в сосуды микроциркуляторного русла для осуществления эффективного газообмена. Такое явление, несомненно, связано с патологическими изменениями в самой мембране этих клеток. Изменения цитоскелета эритроцитов у больных АГ может проявляться в различных формах отклонения от нормальных клеток, в том числе и в виде сфероцитоза [1]. От состояния структурной

организации мембран эритроцитов во многом зависит их агрегационная активность и деформабильность. Преобладание сфероцитарных клеток красной крови при АГ, в связи с низкой деформабельностью их мембраны, может приводить к дальнейшему ухудшению перфузии микроциркуляторного русла и развитию кислородного голодания тканей.

Деформабильность эритроцитов зависит от многих факторов — в том числе, от характера межмолекулярных взаимодействий между белковыми компонентами плазматической мембраны эритроцитов. Изменение количества и соотношения белков приводит к изменению стабильности и способности мембраны эритроцитов к деформации [2].

Учитывая тот факт, что белки мембраны эритроцита составляют от 40-60% и играют важную роль в транспорте веществ, адгезии клеток крови, выполняют сигнальную функцию и обладают ферментативной активностью, наше внимание было сосредоточено именно на данном компоненте мембраны эритроцитов.

В связи с этим, целью настоящей работы было исследовать связь между характером изменения показателя сферичности эритроцитов и уровнем структурно-функциональных белков мембраны эритроцитов у больных артериальной гипертензией.

### Материал и методы

В исследовании принимали участие 51 больной эссенциальной АГ I и II-степени ( $42 \pm 1,5$  лет). Диагноз АГ устанавливался по данным анамнеза и клинико-инструментального обследования. Дифференциальная диагностика для исключения симптоматических АГ проводилась в соответствии с рекомендациями Всероссийского научного общества кардиологов (ВНОК, 2004, 2008). Критериями исключения больных являлись: наличие у больных хронической стенокардии напряжения выше III-IV стадии по NYHA, острого инфаркта миокарда или нарушения мозгового кровообращения в предшествующие 6 мес., нарушения ритма сердца, обострение интеркуррентных заболеваний. Особое внимание обращали на отсутствие у больных хронических заболеваний почек и легких, а также приступов стенокардии напряжения. При включении в исследование проводили оценку и при необходимости коррекцию медикаментозной терапии с соответствующими рекомендациями. За 24 ч до проведения исследования прекращался прием вазоактивных лекарственных препаратов. Все пациенты были ознакомлены с целями и протоколами исследования. Письменное соглашение являлось обязательным критерием включения в исследование.

Показатель сферичности эритроцитов (ПСЭ) определяли по общепринятой формуле:  $ПСЭ = D/T$ , где  $T = V/S$  ( $D$  — средний диаметр эритроцитов — 7,35 мкм,  $T$  — средняя толщина эритроцитов,  $V$  — сред-

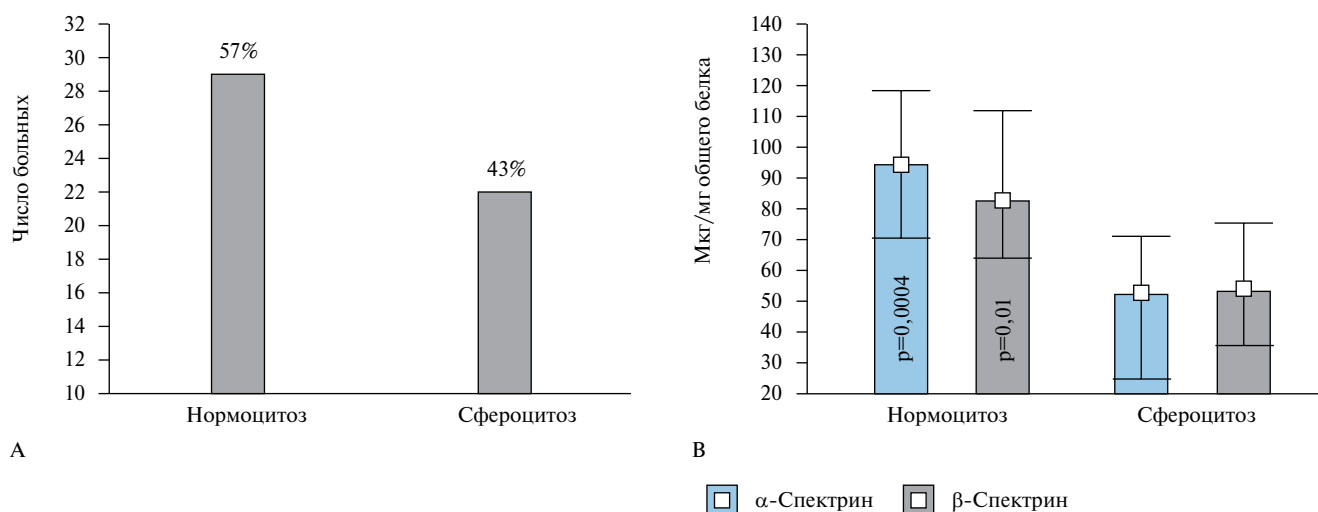
ний объём эритроцитов и  $S$  — средняя площадь основания эритроцитов). В норме ПСЭ составляет 3,4-3,9. Показатель ниже 3,4 означал наличие пула сфероцитарных, шаровидных клеток, выше 3,9 — развитие планоцитоза или приближение формы эритроцитов к плоскому диску.

Для получения препаратов мембран отмытые эритроциты разрушали осмотическим шоком по методу Dodge [3]. Гемолиз эритроцитов и отмывку “теней” проводили трехкратно в 10 mM Na-фосфатном буфере (pH=7.4). По окончании гемолиза “тени” эритроцитов осаждали центрифугированием при 20000g. Конечный осадок мембран ресуспендировали в изотоническом 155 mM растворе NaCl в соотношении 1:1 и хранили при температуре не выше 4° C.

Все операции по выделению и очистке водорастворимой фракции белков проводили на центрифугах Allegra™ 64R (Beckman Coulter, Англия) с охлаждением (-5° C). Замороженные в жидком азоте мембраны гомогенизировали с добавлением PMSF и 0,1 M Трис-HCl-буфера (pH 7.6). Полученный экстракт центрифугировали при 17000 g. Суммарный белок осаждали четырехкратным объемом ацетона. Осажденный белок отмывали двукратным объемом охлажденного ацетона и растворяли в буфере pH 6.8 (0.5 M Tris-HCl, 1 mM ЭДТА, 0,001% бромфеноловый синий, 2,3% SDS (“Sigma”, США); 20% глицерин; 0.1 M 2-меркаптоэтанол (“Merck”, Германия)). Для определения концентрации белка использовали набор Qubit Protein Assay Kit (“Invitrogen”, США) на приборе Qubit Protein, согласно инструкции фирмы-изготовителя.

Одномерный электрофорез проводили на полиакриламидных гелевых пластинах с концентрацией разделяющего геля 7,5% и 15% в присутствии додецилсульфата натрия по методу Лэммли [4]. Для фореа использовали аппаратуру и реактивы фирм “Bio-RAD” и “Sigma”. Электродным буфером служил Трис-глицин, pH 8.3 (0.025M Трис и 0.192M глицин). Окраску гелевых пластинок осуществляли раствором Кумасси R250 (“Sigma”, США). Для определения массы исследуемых белков использовали наборы маркеров фирмы Bio-Rad (#161-0363) и ThermoScientific (#26614).

В результате исследования 204 электрофореграмм белкового спектра (на 7,5% и 15% ПААГ) была проведена количественная оценка 10-ти мембранных белков эритроцитов:  $\alpha$ -спектрина,  $\beta$ -спектрина, анкирина, анион-транспортного белка (АТБ), полосы 4.1, транспортёра глюкозы, актина, глицеральальдегид-3-фосфатдегидрогеназы (Г-3-ФДГ), тропомиозина и глутатион-S-трансферазы. Расчет количественного содержания мембранных белков (в мкг/мг общего белка) проводили с использованием программного обеспечения математической обработки электрофореграмм [5].



**Рис. 1 (А, В).** Характер распределения больных АГ с нормо- и сфероцитозом (А) и содержание у них  $\alpha$ -спектрина и  $\beta$ -спектрина в мембране эритроцитов (В).  
**Примечание:** на рис. 1В: медиана (Q25-Q75), p — критерий Манна-Уитни.

**Таблица 1**

**Модель множественной регрессионной связи между ПСЭ и уровнем белков мембраны эритроцитов у больных АГ**

Описательная статистика (n=51)			
Переменные	Средняя	Стандартное отклонение	p-уровень*
ПСЭ	3,444	0,142	p>0,20
x1 — $\alpha$ -спектрин	76,43	44,55	p>0,20
$\sqrt{x2}$ — АТБ***	9,097	1,573	p>0,20
ln(x3) — Г-3-ФДГ**	3,883	0,439	p>0,20
x4 — тропомиозин	87,58	37,51	p>0,20
Описание модели		Стандартная ошибка	p-уровень
R	0,86	0,075	0,0000
R <sup>2</sup>	0,74		
Свободный член	3,233	0,102	0,0000
Переменные	Регрессионные коэффициенты	Стандартная ошибка	p-уровень
$\alpha$ -спектрин	0,003	0,0003	0,0000
$\sqrt{АТБ}$	-0,137	0,016	0,0000
ln(Г-3-ФДГ)	0,275	0,048	0,0000
тропомиозин	0,002	0,0004	0,0000
Статистика Дарбина-Уотсона	d(2,12)	Сериальная корреляция между остатками (-0,08)	

**Примечания:** \* — критерий согласия Колмогорова-Смирнова на нормальность распределения, \*\* — преобразование извлечением натурального логарифма, \*\*\* — преобразование извлечением квадратного корня, R — коэффициент множественной корреляции, R<sup>2</sup> — общий коэффициент детерминации.

Анализ полученных данных проводили методами непараметрической и параметрической (после проведения оценки нормальности распределения) статистики с использованием программного обеспечения “Statistica 6.0”.

### Результаты и обсуждение

По результатам расчетов ПСЭ у больных АГ были сформированы две группы: больные с “нормоцитозом”, у которых ПСЭ был  $\geq 3,4$  усл. ед. и больные со “сфероцитозом”, ПСЭ которых был  $< 3,4$  усл. ед. (рис. 1А). При сравнительной оценке количества бел-

ков мембраны эритроцитов в этих 2-х группах было установлено достоверное отличие содержания только  $\alpha$ -спектрина и  $\beta$ -спектрина (соответственно  $95,8 \pm 8,4$  и  $87,7 \pm 8,1$  в группе с “нормоцитозом” и  $50,9 \pm 5,9$  и  $56,6 \pm 6,1$  — в группе со “сфероцитозом”) (рис. 1В).

Тем не менее, дискриминантный анализ больных АГ с разными показателями сферичности эритроцитов выявил, что наибольший вклад в разделение этих 2-х групп внесли такие мембранные белки как:  $\alpha$ -спектрин, АТБ, тропомиозин и Г-3-ФДГ (табл. 1). Установлено, что они на 84,3% дискриминировали группы больных с нормо- и сфероцитозом. ( $D^2=5,56$ ;

$p=0,0000$ ). Причем, наиболее существенный вклад в эту дискриминацию вносили АТБ и Г-3-ФДГ, о чём свидетельствовали более высокие расчётные стандартизованные коэффициенты (2,49 и -1,323, соответственно). В то время как у  $\alpha$ -спектрина и тропомиозина эти коэффициенты были более низкими (-1,29 и -0,885). При этом уравнение канонических значений выглядело следующим образом:

$$K = 0,265 - 0,033 \cdot x_1 + 0,088 \cdot x_2 - 0,023 \cdot x_3 - 0,06 \cdot x_4$$

Полученное уравнение канонических величин позволило определить характер распределения больных АГ с нормо- и сфероцитозом (рис. 2). Таким образом, индивидуальные данные по содержанию конкретных белков мембраны эритроцитов у пациента позволяют выяснить вероятность развития у него сфероцитоза. Так, если при расчете данного уравнения каноническая величина (K) станет больше 0,5, то у такого пациента с высокой степенью вероятности будет отмечаться склонность эритроцитов к сфероцитозу.

При изучении межбелковых корреляционных связей в группах со сфероцитозом и нормоцитозом был установлен определенный характер внутренних связей, присущий каждой группе больных АГ (табл. 2 и 3). Как видно из этих таблиц, у пациентов с нормоцитозом количество межбелковых связей было намного больше, чем у пациентов со сфероцитозом. Так, например,  $\alpha$ -спектрин у пациентов с нормоцитозом имел пять достоверных корреляционных связей с другими белками мембраны эритроцитов, в то время как в группе пациентов со сфероцитозом — всего одну достоверную связь с  $\beta$ -спектрином. Обращает на себя внимание тот факт, что белок Г-3-ФДГ мембраны эритроцитов у больных АГ со сфероцитозом утрачивает связь с такими цитоскелетными белками, как  $\alpha$ -спектрин,  $\beta$ -спектрин, анкирин, актин и тропомиозин. Эффективность взаимодействия этих белков в значительной степени обусловлена процессом их фосфорилирования, тесно связанного с уровнем образования АТФ, катализатором которого является фермент Г-3-ФДГ. Отсутствие связей последнего с отмеченными белками у больных АГ убедительно свидетельствует о недостаточном энергетическом обеспечении функции этих структурных белков.

У всех пациентов была исследована множественная связь ПСЭ с мембранными белками. Предикторные свойства мембранных белков были тестированы с помощью многофакторного линейного регрессионного анализа. Для выполнения условий применимости метода все ненормально распределенные признаки были математически преобразованы. В результате анализа получена статистически значимая множественная линейная регрессия, отражающая влияние уровня белков мембраны эритроцитов на ПСЭ (табл. 4). Независимыми факторами, связан-

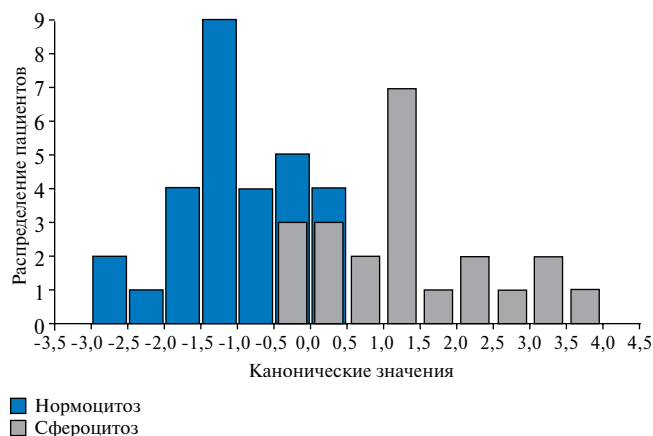


Рис. 2. Диаграмма распределения больных АГ с нормо- и сфероцитозом по данным дискриминантной функции белков мембраны эритроцитов и канонического анализа.

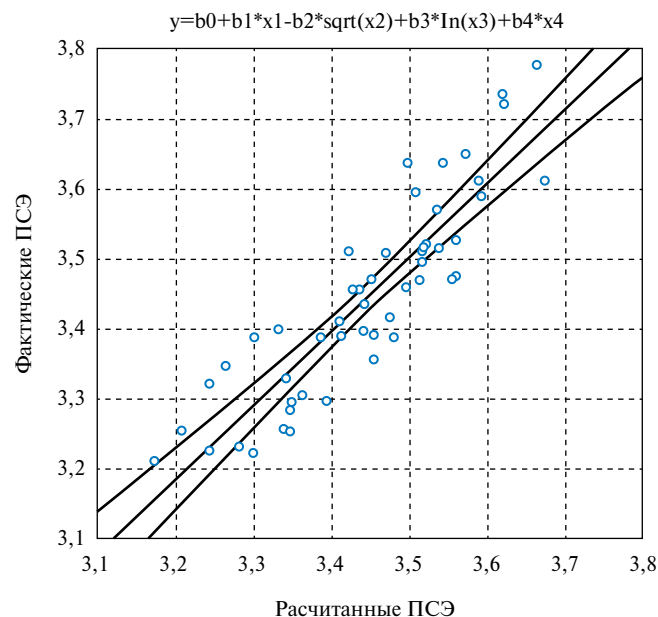


Рис. 3. Диаграмма рассеяния фактических и рассчитанных значений ПСЭ у больных АГ по данным модели множественной регрессии.

Примечание:  $x_1$  —  $\alpha$ -спектрин,  $x_2$  — АТБ,  $x_3$  — Г-3-ФДГ,  $x_4$  — тропомиозин.

ными с величиной ПСЭ, оказались:  $\alpha$ -спектрин, АТБ, Г-3-ФДГ и тропомиозин. Статистика Дарбин-Уотсона указывает на устойчивость регрессионной модели, о чём свидетельствует отсутствие корреляции между остатками для соседних переменных. Множественная регрессионная связь ПСЭ с отмеченными белками мембраны эритроцитов описывается уравнением:

$$\text{ПСЭ} = 3,233 + 0,003 \cdot x_1 - 0,137 \cdot \sqrt{x_2} + 0,275 \cdot \ln(x_3) + 0,002 \cdot x_4$$

Диаграмма фактических и рассчитанных значений ПСЭ по данным модели множественной регрессии у больных артериальной гипертензией представлена на рисунке 3, на котором видна небольшая

Таблица 2

**Матрица корреляционных связей белков мембраны эритроцитов  
у больных АГ с нормоцитозом (ранговая корреляция Спирмена)**

N полосы	1	2	2.1	3	4.1	4.5	5	6	7
2	<b>0,96</b>								
2.1	<b>0,48</b>	<b>0,41</b>							
3	<b>0,57</b>	<b>0,48</b>	<b>0,62</b>						
4.1	<b>0,45</b>	0,33	<b>0,76</b>	<b>0,87</b>					
4.5	0,32	0,27	<b>0,46</b>	<b>0,80</b>	<b>0,75</b>				
5	0,14	0,03	<b>0,43</b>	<b>0,71</b>	<b>0,74</b>	<b>0,65</b>			
6	<b>0,53</b>	<b>0,44</b>	<b>0,50</b>	<b>0,93</b>	<b>0,76</b>	<b>0,89</b>	<b>0,65</b>		
7	-0,24	-0,36	0,31	<b>0,43</b>	<b>0,47</b>	0,25	<b>0,72</b>	0,34	
8	0,29	0,20	<b>0,59</b>	<b>0,79</b>	<b>0,79</b>	<b>0,63</b>	<b>0,69</b>	<b>0,74</b>	<b>0,66</b>

**Примечание:** коэффициенты, выделенные жирным шрифтом —  $p < 0,05$ .

**Сокращения:** 1 —  $\alpha$ -спектрин, 2 —  $\beta$ -спектрин, 2.1 — ангириин, 3 — АТБ, 4.1 — полоса 4.1, 4.5 — транспортёр глюкозы, 5 — актин, 6 — Г-3-ФДГ, 7 — тропомиозин, 8 — гл.-S-трансфераза.

Таблица 3

**Матрица корреляционных связей белков мембраны эритроцитов  
у больных АГ со сфероцитозом (ранговая корреляция Спирмена)**

N полосы	1	2	2.1	3	4.1	4.5	5	6	7
2	<b>0,72</b>								
2.1	0,39	<b>0,52</b>							
3	0,39	<b>0,43</b>	<b>0,62</b>						
4.1	0,19	0,22	<b>0,57</b>	<b>0,92</b>					
4.5	0,18	0,16	<b>0,59</b>	<b>0,81</b>	<b>0,90</b>				
5	0,17	-0,11	0,27	<b>0,56</b>	<b>0,55</b>	<b>0,61</b>			
6	0,06	0,13	0,34	<b>0,74</b>	<b>0,77</b>	<b>0,80</b>	0,34		
7	0,34	-0,06	0,26	<b>0,56</b>	<b>0,51</b>	0,38	<b>0,73</b>	0,29	
8	0,34	0,33	<b>0,60</b>	<b>0,82</b>	<b>0,75</b>	<b>0,73</b>	0,42	<b>0,80</b>	<b>0,51</b>

**Примечание:** коэффициенты, выделенные жирным шрифтом —  $p < 0,05$ .

**Сокращения:** 1 —  $\alpha$ -спектрин, 2 —  $\beta$ -спектрин, 2.1 — ангириин, 3 — АТБ, 4.1 — полоса 4.1, 4.5 — транспортёр глюкозы, 5 — актин, 6 — Г-3-ФДГ, 7 — тропомиозин, 8 — гл.-S-трансфераза.

Таблица 4

**Результаты анализа дискриминантной функции исследуемых белков мембраны эритроцитов  
у больных АГ с нормо- и сфероцитозом**

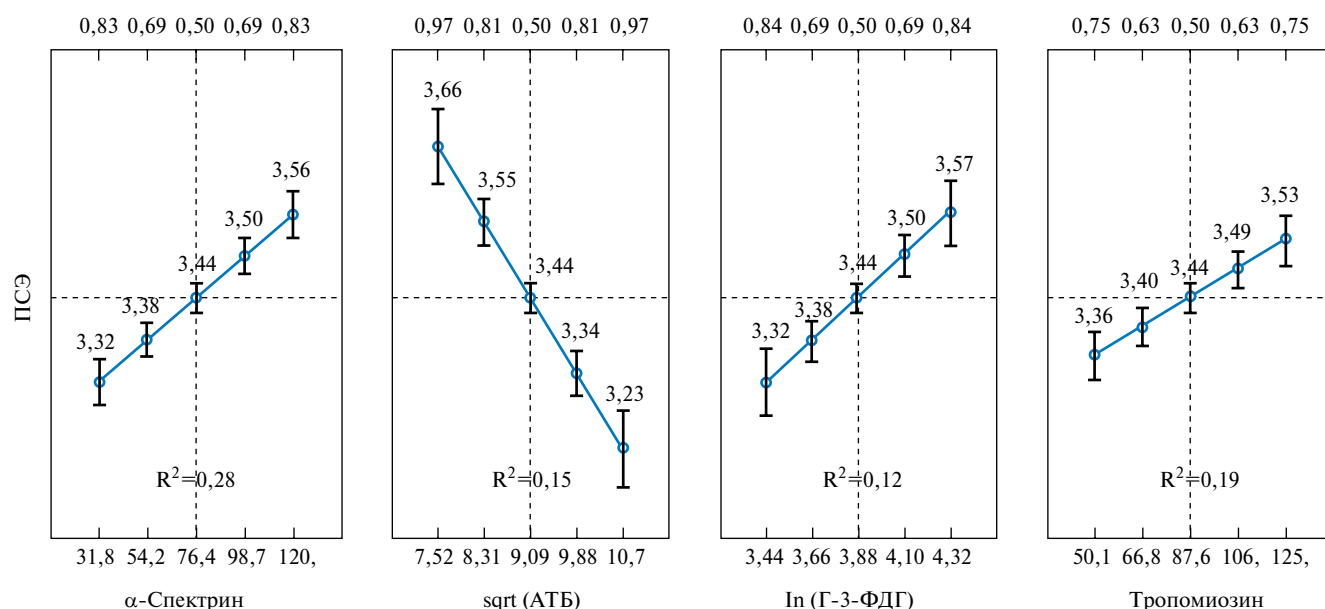
Удаленные корни	Собственное значение	R канонич.	Общая лямбда	Y <sup>2</sup> критерий	p-level
0	1,363	0,76	0,42	40,4	0,0000
Переменные в модели	Частная лямбда	F	p-level	Стандартизованные коэффициенты	
x1 $\alpha$ -Спектрин	0,500	45,94	0,0000	-1,290	
x2 АТБ	0,603	30,23	0,0000	<b>2,490</b>	
x3 Тропомииозин	0,795	11,78	0,0013	-0,885	
x4 Г-3-ФДГ	0,808	10,92	0,0018	<b>-1,323</b>	

**Примечание:** уравнение канонической величины:  $K = 0,265 - 0,033 \cdot x_1 + 0,088 \cdot x_2 - 0,023 \cdot x_3 - 0,06 \cdot x_4$ . Общий процент классификации — 84,3%;  $D^2 = 5,56$ ,  $p = 0,0000$ .

мера рассеяния ПСЭ относительно регрессионной прямой.

Согласованность ПСЭ с отклонением уровня данных мембранных белков определялась достаточно высоким множественным коэффициентом корреляции ( $R = 0,86$ ) и коэффициентом детерминации

( $R^2 = 0,74$ ). Отклонение уровня ПСЭ было наиболее сопряжено с изменением содержания в мембране эритроцитов  $\alpha$ -спектрин ( $R^2 = 0,28$ ;  $p = 0,0000$ ), АТБ ( $R^2 = 0,15$ ;  $p = 0,0007$ ) и тропомиозина ( $R^2 = 0,19$ ;  $p = 0,0000$ ). Графическое отображение полученной регрессионной модели показано на рисунке 4.



**Рис. 4.** Характер отклонения величины переменной ПСЭ при различном уровне белков мембраны эритроцитов у больных АГ по данным модели множественной регрессии.

**Примечание.** По оси абсцисс: наверху — апостериорная вероятность отклонения зависимой переменной при изменении величины предиктора, внизу — величина предиктора (от минимальных до максимальных найденных значений). Пунктирные линии — средние величины зависимой и независимых переменных. Вертикальные линии при маркерах — доверительные интервалы ( $\pm 0,95$ ).  $R^2$  — частные коэффициенты детерминации.

По данным модели можно определить вероятность отклонения ПСЭ при изменении уровня одного из белков мембраны эритроцитов при среднем значении всех остальных мембранных белков. Как видно из графиков, вероятность отклонения ПСЭ при минимальных и максимальных величинах предикторов была в пределах 0,75–0,97.

### Заключение

Известно, что спектрины являются наиболее важными компонентами скелета мембраны эритроцитов. Эластичность мембраны эритроцитов в большой степени зависит от динамической перестройки комплекса димеров спектрина в тетрамеры под влиянием напряжения сдвига в кровотоке [6]. Спектрины формируют ячейки примембранного цитоскелета, с которыми связаны актиновые филаменты [7]. Основными функциями спектринов являются: поддержание формы клеток и обеспечение их устойчивости к деформации, а также контроль латеральной подвижности интегральных мембранных белков. Полученные нами данные о достоверно более низком уровне  $\alpha$ - и  $\beta$ -спектринов у пациентов со сфероцитозом, в сравнении с группой “нормоцитоза”, свидетельствует о снижении деформабельности мембраны эритроцитов при уменьшении количества данных белков.

Как было нами установлено, отклонение уровня ПСЭ было наиболее сопряжено с изменением содержания в мембране эритроцитов не только  $\alpha$ -спектрина, но и АТБ, Г-3-ФДГ и тропомииозина.

АТБ — один из основных транспортных белков (25% клеточной поверхности). АТБ участвует в образовании макромолекулярного комплекса интегральных и периферических белков мембраны эритроцитов, обеспечивает перенос анионов  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ , связывает цитоскелет с мембраной клетки, а также является основным местом, где ферменты гликолиза и гемоглобин связываются с мембраной эритроцита [8, 9]. При деоксигенации эритроцитов происходит смещение анкирина относительно АТБ, что вызывает отделение спектрин-актинового комплекса от мембраны. При продолжительном кислородном голодании этот процесс приводит к образованию и отделению везикул от мембраны [10]. Предполагают, что взаимодействие АТБ с ферментами гликолиза проходит при участии стыковочных белков. С-терминальный участок АТБ связывает карбоангидразу II, что приводит к двум событиям: поглощению углекислого газа и высвобождению кислорода из гемоглобина. В условиях высокой оксигенации связывание гликолитических ферментов с АТБ ингибирует гликолиз и усиливает пентозофосфатный путь. При низкой оксигенации взаимодействие дезоксигемоглобина с АТБ приводит к усилению гликолиза и снижению активности пентозофосфатного пути [11, 12]. Известно, что в вертикальных взаимодействиях между компонентами мембраны участвуют спектрин, АТБ, анкирин и белок 4.2 [2]. Нарушение связей между этими белками при снижении их количества способствует отделению от мембраны эритроцитов везикул, вызывая, тем самым,



уменьшение поверхностной площади, увеличение жесткости клеточной мембраны и образование сфероцитарных клеток. Такие эритроциты не способны сохранять свою целостность длительное время, что приводит к их преждевременному старению [13].

Третий белок, который был сопряжен с изменением ПСЭ и вносил существенный вклад в разделение групп пациентов с АГ, был Г-3-ФДГ. Известно, что этот белок является ферментом гликолиза и, кроме отмеченных выше процессов, принимает участие в регуляции окисления гемоглобина. Не случайно, что при дефиците данного белка эритроциты склонны к гемолизу [14].

Четвертый белок, оказывающий, по нашим данным, влияние на ПСЭ, был тропомиозин — периферический белок мембраны эритроцитов, обладающий сократительной функцией. Предполагают также, что одной из функций тропомиозина является регуляция процесса взаимодействия спектрина с актином [15].

Из всего вышесказанного становится ясно, почему именно эти белки мембраны эритроцитов были спо-

собны в большей степени оказывать влияние на изменение ПСЭ. Хотя, следует отметить, что нами были исследованы лишь основные и довольно крупные белковые компоненты мембраны эритроцитов. Есть данные, что протеом зрелых человеческих эритроцитов включает 340 мембранных белков [16]. Вероятно, что среди всех этих белков найдутся и другие, которые будут оказывать влияние на формирование сфероцитоза.

Таким образом, наши исследования показывают, что изменение взаимоотношений белковых компонентов мембраны эритроцитов способно оказывать влияние на формирование и развитие сфероцитарности. Нарушение как количества, так и соотношения различных цитоскелетных и функциональных белков в мембране эритроцитов при АГ может обуславливать изменение стабильности и деформабельности самой мембраны, что, в свою очередь, будет содействовать развитию существенной дисфункции эритроцитов в целом и осложнять течение системной гипоксии у данной категории больных.

## Литература

1. Pivovarov Jul, Kuril'skaja TE, Sergeeva AS, et al. Spherocytic red blood cells and its relationship with the biochemical, hemostasis and blood rheology in patients with exertional angina pectoris and idiopathic essential hypertension. Bulletin of Eastern-Siberian Scientific Center of SB of RAMS. 2013; 6: 38-45. Russian. (Пивоваров Ю.И., Курильская Т.Е., Сергеева А.С. и др. Сфероцитарность эритроцитов и ее связь с биохимическими, гемостазиологическими и реологическими свойствами крови у больных стенокардией напряжения и гипертонической болезнью. ВШЦ СО РАМН. 2013; 6: 38-45).
2. An X, Mohandas N. Disorders of red cell membrane. Br. J. Haematol. 2008; 141: 367-75.
3. Dodge J, Mitchell C, Hanahan D. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys. 1963; 100(1): 119-30.
4. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature. 1970; 227 (5259): 680-5.
5. Pivovarov Jul, Sergeeva AS, Kuril'skaja TE. A method of processing a set of mathematical protein bands obtained by electrophoresis. Bulletin of Eastern-Siberian Scientific Center of SB of RAMS. 2014; 3(97): 101-4. Russian. (Пивоваров Ю.И., Сергеева А.С., Курильская Т.Е. Способ математической обработки набора белковых полос, полученных с помощью электрофореза. Бюллетень ВШЦ СО РАМН. 2014; 3(97): 101-4).
6. Baines AJ. Evolution of spectrin function in cytoskeletal and membrane networks. J. Biochem. Soc. Trans. 2009; 37: 796-803.
7. Bennett V, Gilligan DM. The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. Annu. Rev. Cell Biol. 1993; 9: 27-66.
8. Bennett V, Baines AJ. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. J. Physiol. Rev. 2001; 81: 1353-92.
9. Tanner MJ. Band 3 anion exchanger and its involvement in erythrocyte and kidney disorders. J. Curr. Opin. Hematol. 2002; 9: 133-9.
10. Stefanovic M, Puchulu-Campanella E, Kodippili G, et al. Oxygen regulates the band 3-ankyrin bridge in the human erythrocyte membrane. Biochem. J. 2013; 449: 143-50.
11. Goodman SR, Kurdia A, Ammann L, et al. The human red blood cell proteome and interactome. J. Exp. Biol. Med. 2007; 232(11): 1391-408.
12. Nunomura W, Takakuwa Y. Regulation of protein 4.1R interactions with membrane proteins by  $Ca^{2+}$  and calmodulin. J. Front Biosci. 2006; 11: 1522-39.
13. Babushkina IV, Pivovarov Jul, Kuril'skaja TE, et al. Protein spectrum of the membrane of erythrocytes and changes in pathology. Biol. Membrans 2015; 3(32): 168-74. Russian. (Бабушкина И.В., Пивоваров Ю.И., Курильская Т.Е. и др. Белковый спектр мембраны эритроцитов и его изменения при патологии. Биол. мембраны. 2015; 3(32): 168-74).
14. Panahova HG, Kichibekov BR, Turgieva DA, et al. Anomalies human erythrocyte membrane proteins in hereditary deficiency of glucose-6-phosphatidehydrogenazy. Biol. Membrans 1995; 12(1): 16-21. Russian. (Панахова Х.Г., Кичибеков Б.Р., Тургиева Д.А. и др. Аномалии мембранных белков эритроцитов человека при наследственном дефиците глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Биол. мембраны. 1995; 12(1): 16-21).
15. Kuznik BI. Cellular and molecular mechanisms of regulation of the hemostatic system in norm and pathology. Chita: N'judiamed; 2010. Russian. (Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. Чита: Ньюдиамед; 2010).
16. Pasini EM, Kirkegaard M, Salerno D, et al. Deep coverage mouse red blood cell proteome. A first comparison with the human red blood cell. J. Molecular&Cellular Proteomics. 2008; 7: 1317-30.