

УДК 612.111.6:612.126.31:577.352.4:616.1:546.215

## ВЛИЯНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА $\text{Ca}^{2+}$ -АКТИВИРУЕМУЮ $\text{K}^{+}$ -ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ НАРУШЕНИЯМИ В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕНИЯ ОБЪЕМА КЛЕТОК

<sup>1</sup>Трубачева О.А., <sup>2</sup>Петрова И.В., <sup>1</sup>Гусакова А.М., <sup>1</sup>Суслова Т.Е.

<sup>1</sup>ФГБНУ «НИИ кардиологии», Томск;

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, Томск, e-mail: otrubacheva@inbox.ru

В настоящем исследовании изучено влияние пероксида водорода на  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую  $\text{K}^{+}$ -проницаемость мембраны эритроцитов в условиях сжатия клеток у больных с ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом 2 типа. Показано что уровень гликозилированного гемоглобина А1, а также показатели липидного обмена были достоверно выше у больных обеих групп по сравнению со здоровыми лицами. Установлено, что  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемая калиевая проницаемость мембраны эритроцитов в изотонической среде инкубации существенно снижена у больных СД 2 типа в сочетании с АГ, но не у больных ИБС. Сжатие клеток вызывает увеличение  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов только у здоровых доноров, но не у обследованных пациентов. Добавление пероксида водорода ( $10^{-5}$  М) в среду с повышенной осмолярностью (520 мосм) вызывает достоверное снижение  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов у здоровых доноров, но не у больных обеих групп. Причиной обнаруженного эффекта может быть гликозилирование белков цитоскелета у больных ИБС и СД 2 типа в сочетании с АГ.

**Ключевые слова:** эритроциты,  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемая  $\text{K}^{+}$ -проницаемость, пероксид водорода, сжатие клеток

## EFFECT OF HYDROGEN PEROXIDE ON $\text{Ca}^{2+}$ -ACTIVATED $\text{K}^{+}$ -PERMEABILITY OF ERYTHROCYTE MEMBRANES IN PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR DISORDERS IN A CHANGING CELL VOLUME

<sup>1</sup>Trubacheva O.A., <sup>2</sup>Petrova I.V., <sup>1</sup>Gusakova A.M., <sup>1</sup>Suslova T.E.

<sup>1</sup>FGBNU «Research Institute of Cardiology», Tomsk;

<sup>2</sup>GER GBOU SSMU Health Ministry of Russia, Tomsk, e-mail: otrubacheva@inbox.ru

The present study elucidated the effects of hydrogen peroxide on  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^{+}$  permeability of membranes in shrunken red blood cells isolated from patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus. Data showed that both the level of glycosylated hemoglobin A1 and all the indicators of lipid metabolism were significantly higher in both groups of patients compared with healthy individuals. Calcium-activated  $\text{K}^{+}$  permeability of erythrocyte membranes, incubated in isosmotic medium, was significantly reduced in patients with concomitant type 2 diabetes mellitus and arterial hypertension unlike patients with coronary artery disease. Cell shrinkage caused an increase in  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  permeability of erythrocyte membranes only in healthy donors, not in patients. Application of hydrogen peroxide ( $10^{-5}$  M) to the hyperosmotic medium (520 mOsm) caused a significant decrease in  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  permeability of red blood cell membranes isolated from healthy donors unlike patients. Observed effect may be caused by an increase in erythrocyte membrane microviscosity and glycosylation of cytoskeletal proteins in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus associated with hypertension.

**Keywords:** red blood cells,  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$ -permeability, hydrogen peroxide, shrinkage of cells

Актуальность проведенного исследования определяется широкой распространенностью ишемической болезни сердца (ИБС) и метаболических нарушений, объединенных развитием состояния инсулинорезистентности, к которым, в частности, относят сахарный диабет 2 типа (СД 2 типа) и артериальную гипертензию (АГ). Выделено более 200 факторов риска ИБС, из которых наиболее существенными являются нарушение липидного обмена, артериальная гипертензия, малоподвижный образ жизни, ожирение, хронический стресс. Комплекс таких нарушений сопровождается изменениями со стороны многих органов и систем, в том числе наблюдается высокая частота

атеросклеротических поражений сосудов сердца, периферических и церебральных сосудов, а также нарушений микроциркуляторного русла [2].

Эритроциты периферической крови являются универсальной моделью для оценки степени и глубины повреждения мембран при патологическом процессе [3]. С другой стороны, нарушения структурно-функционального состояния мембраны эритроцитов могут рассматриваться как одно из звеньев патогенеза ряда заболеваний, в частности, ИБС и СД 2 типа. При этих заболеваниях наблюдаются нарушения липидного и углеводного обмена, повышенная продукция активных форм кислорода, что приводит

к изменению структурно-функциональных свойств мембраны эритроцитов. Одним из важнейших нарушений при СД 2 типа и ИБС является снижение деформируемости эритроцитов и сокращение времени их жизни, что часто связывают с повышением внутриклеточной концентрации ионов кальция.

В изменении деформируемости и программируемой гибели эритроцитов определенную роль играют  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемые калиевые каналы ( $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналы) средней проводимости, или Gardos-каналы этих клеток [5, 8].

Регуляция  $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов эритроцитов осуществляется несколькими путями. Один из них связан с белками цитоскелета эритроцитов без участия протеинкиназ [1], другой опосредован активными формами кислорода [6].

Возможно, в эритроцитах больных ИБС и СД 2 типа нарушена регуляция  $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов, что является одной из причин снижения деформируемости красных клеток крови и сокращения продолжительности их жизни.

В связи с вышесказанным представляется весьма актуальным изучение регуляции  $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов эритроцитов при патологическом процессе, сопровождающемся окислительным повреждением клеток.

**Цель исследования:** изучить влияние пероксида водорода на  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемую  $\text{K}^+$ -проницаемость мембраны эритроцитов больных ИБС и СД 2 типа при изменении объема клеток.

#### Материал и методы исследования

В исследовании использовались упакованные эритроциты, выделенные из венозной крови. Группу больных ИБС составили 20 человек в возрасте от 36 до 62 лет (9 мужчин и 11 женщин). В группу больных СД 2 типа в сочетании с АГ вошли 13 человек в возрасте от 34 до 58 лет (6 мужчин и 7 женщин). Клинический диагноз верифицировали с помощью клиничко-лабораторных методов исследования на базе отделения атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца НИИ кардиологии (руководитель – академик РАМН Р.С. Карпов). В контрольную группу вошли 15 практически здоровых добровольцев, не страдающих ишемической болезнью сердца, сахарным диабетом, ожирением, с нормальным артериальным давлением, без сосудистых и эндокринных заболеваний в анамнезе, сопоставимых по полу и возрасту с группами больных.

Для исследования  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемой  $\text{K}^+$ -проницаемости был применен метод регистрации мембранного потенциала в суспензии эритроцитов по изменениям рН среды инкубации в присутствии протонифора, основанный на том, что в этих условиях распределение протонов зависит от мембранного потенциала [4]. В качестве параметров, характеризующих  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую калиевую проницаемость, использовали амплитуду гиперполяризационного ответа (ГО) (параметр  $\Delta E$ ) – значение мембранного потенциала, соответствующее максимальному уровню гиперполяризации мембраны в ответ на добавление

A23187 (мВ), а также скорость развития гиперполяризации (параметр  $V_p$ ) (мэкВ/мин мл клеток).

Для сжатия клеток упакованные эритроциты помещали в среду, содержащую 150 мМ NaCl, 1 мМ KCl, 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ глюкозы, 10 мкМ CaCl<sub>2</sub> и 200 мМ сахарозы. Кроме того, стандартными методами определяли параметры, характеризующие углеводный и липидный обмен обследованных лиц (таблица).

Математическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ SPSS for Windows 11.5. Для каждого параметра определяли значения медианы (M) и квартилей (Q2-Q3). Достоверность различий между группами определяли по непараметрическому критерию Вилкоксона.

#### Результаты исследования и их обсуждение

Проведенное исследование показало, что ряд параметров, характеризующих углеводный и липидный обмен, достоверно отличается у больных обеих групп и здоровых лиц. В частности, это касалось уровня гликозилированного гемоглобина A1, а также показателей липидного обмена (таблица). Следует отметить, что в большей степени увеличение этих параметров отмечалось у больных СД 2 типа в сочетании с АГ.

Обнаруженные у больных обеих групп нарушения углеводного и липидного обмена закономерно отражаются и на структурно-функциональном состоянии эритроцитарной мембраны [3] и тесно связанных с ней белков цитоскелета, что может изменить функционирование мембранно-связанных белков, в частности транспортных белков.

Действительно, исследование параметров, отражающих активность  $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов эритроцитов, показало существенные изменения в их функционировании у больных по сравнению со здоровыми донорами.

Так, амплитуда ГО, полученного в изотонической среде инкубации, оказалась достоверно ниже по сравнению с контрольными значениями у больных СД 2 типа в сочетании с АГ, но не у больных ИБС (рис. 1).

Сниженная  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемая калиевая проницаемость мембраны эритроцитов у больных СД 2 типа в сочетании с АГ может свидетельствовать о более глубоких повреждениях мембраны клеток и белков цитоскелета при этом заболевании по сравнению с больными ИБС. Известно, что важную роль в регуляции ион-транспортных систем эритроцитов играют белки цитоскелета, в частности спектрин [1]. У больных СД 2 типа отмечается гликозилирование не только гемоглобина, но и основного белка цитоскелета эритроцитов – спектрина [8], что может оказывать влияние на деятельность мембранно-связанных белков ионных каналов. Действительно, содержание гликозилированного гемоглобина выше у больных СД 2 типа в сочетании с АГ, чем у больных ИБС (таблица).

Клинико-лабораторная характеристика больных ишемической болезнью сердца, больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией и здоровых добровольцев

Показатель	Больные ИБС	Больные СД 2 типа в сочетании с АГ	Здоровые добровольцы
Длительность диабета, года		11 ± 3	Не выявлено
Длительность артериальной гипертензии, года	6 ± 2	9 ± 2	Не выявлено
Длительность ИБС, года	7 ± 2	4 ± 1	Не выявлено
<b>Показатели контроля артериального давления</b>			
Систолическое артериальное давление, мм рт.ст.	130 ± 5,60	146 ± 9,80*	121 ± 10,60
Диастолическое артериальное давление, мм рт.ст.	90 ± 6,98	91 ± 2,34*	88 ± 1,98
<b>Показатели углеводного обмена</b>			
Гликозилированный гемоглобин A1, % от общего гемоглобина	6,5 ± 0,54*	8,71 ± 0,39*	5,21 ± 0,39
Глюкоза (базальная концентрация), ммоль/л	5,1 ± 0,26	6,89 ± 0,56*	4,29 ± 0,15
Глюкоза (постпрандиальный уровень), ммоль/л	5,4 ± 0,34	9,50 ± 0,72*	4,40 ± 0,13
<b>Показатели липидного обмена</b>			
Общий холестерин, ммоль/л	5,4 ± 0,06*	6,09 ± 0,21*	4,12 ± 0,19
ЛПНП, ммоль/л	2,81 ± 0,29*	3,81 ± 0,17*	2,5 ± 0,05
ЛПВП, ммоль/л	1,12 ± 0,21	1,02 ± 0,06*	1,34 ± 0,12
Триглицериды, ммоль/л	2,45 ± 0,57*	2,84 ± 0,30*	1,42 ± 0,17
<b>Показатель массы тела</b>			
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup>	28,42 ± 1,34*	32,63 ± 1,79*	24 ± 0,94

Примечание. Отмечены параметры, достоверно отличающиеся от показателей здоровых доноров.

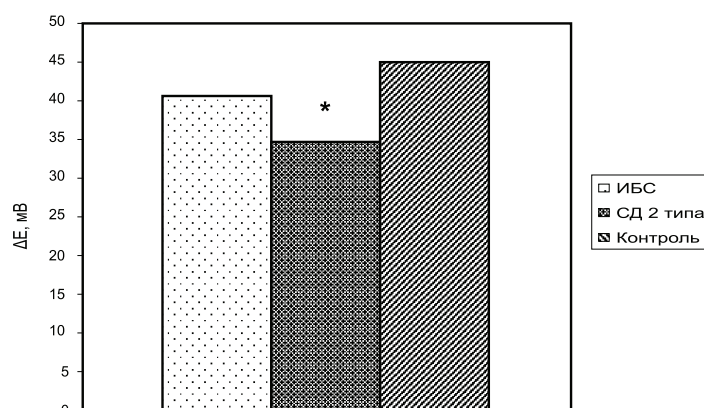


Рис. 1. Амплитуда гиперполяризационного ответа ( $\Delta E$ ) эритроцитов больных ИБС, СД 2 типа в сочетании с АГ и практически здоровых добровольцев (контроль) в условиях изоосмотической среды инкубации. \* отмечены параметры, достоверно отличающиеся от контрольных ( $p < 0,05$ )

Изменение объема эритроцитов сопровождается структурными перестройками белков мембранного каркаса этих клеток, что отражается на активности ионтранспортных систем клеток [1].

Сжатие эритроцитов вследствие помещения их в среду с повышенной осмоляемостью (520 мосм) достоверно не изменяло амплитуду гиперполяризационного ответа у больных ИБС и СД 2 типа, но существенно увеличивало этот параметр у здоровых доноров (рис. 2).

В то же время в этих условиях наблюдалось достоверное увеличение скорости нарастания ГО как у больных ИБС, так и у здоровых доноров (рис. 3). Ранее нами было показано, что активные формы кислорода, в том числе и пероксид водорода, участвуют в регуляции  $K^+(Ca^{2+})$ -каналов эритроцитов [6].

В следующей серии экспериментов в изоосмотическую и гиперосмотическую среду инкубации эритроцитов добавляли  $H_2O_2$  ( $10^{-5}$  М). Оказалось, что в изоосмо-

тической среде амплитуда ГО достоверно снижалась у больных ИБС и здоровых до-

норов, но не больных СД 2 типа в сочетании с АГ (рис. 4).

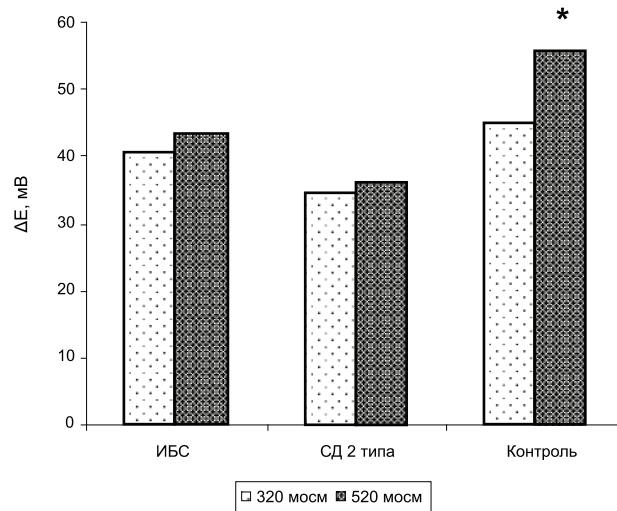


Рис. 2. Амплитуда гиперполяризационного ответа ( $\Delta E$ ) эритроцитов больных ИБС, СД 2 типа и практически здоровых добровольцев (контроль) в условиях повышенной осмолярности (520 мосм). \* отмечены параметры, достоверно отличающиеся от контрольных ( $p < 0,05$ )

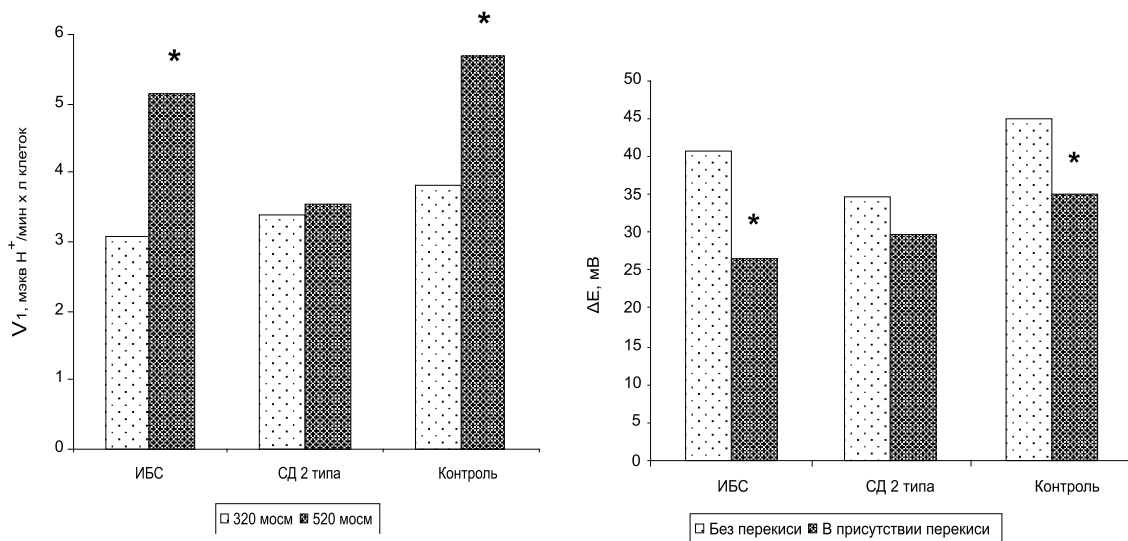


Рис. 3. Скорость развития гиперполяризационного ответа ( $V_p$ ) эритроцитов больных ИБС, СД 2 типа и практически здоровых добровольцев (контроль) в изоосмотической среде (320 мосм) инкубации и в условиях повышенной осмолярности (520 мосм). \* отмечены параметры, достоверно отличающиеся от контрольных ( $p < 0,05$ )

Рис. 4. Влияние пероксида водорода ( $10^{-5} M$ ) на амплитуду гиперполяризационного ответа ( $\Delta E$ ) эритроцитов больных ИБС, СД 2 типа в условиях изоосмотической среды инкубации (320 мосм). \* отмечены параметры, достоверно отличающиеся от контрольных ( $p < 0,05$ )

Добавление пероксида водорода в среду с повышенной осмолярностью (520 мосм) не вызывало достоверных изменений амплитуды ГО эритроцитов больных обеих групп по сравнению со значениями амплитуды ГО

в среде той же осмолярности. В то же время в этих условиях наблюдалось достоверное снижение амплитуды ГО у практически здоровых доноров-добровольцев (рис. 5). Кроме того, у здоровых доноров достоверно

снижалась и скорость развития ГО. Наиболее вероятной причиной обнаруженного эффекта является воздействие пероксида водорода на белки цитоскелета, что приводит к снижению  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов в условиях повышенной осмолярности [7]. Полученные данные свидетельствуют об изменении спекtrin-обусловленной регуляции  $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов эритроцитов у больных обеих групп.

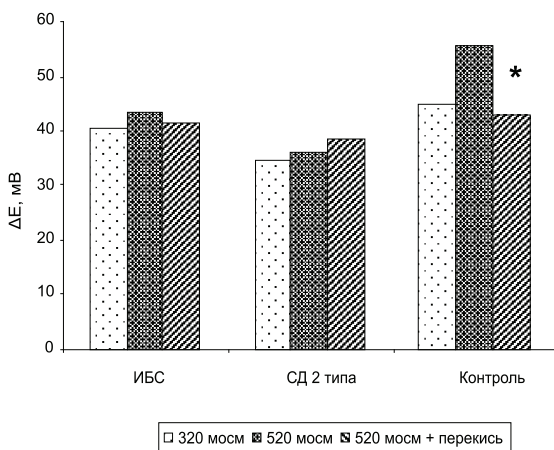


Рис. 5. Влияние пероксида водорода ( $10^{-5}$  М) на амплитуду гиперполяризационного ответа ( $\Delta E$ ) эритроцитов больных ИБС, СД 2 типа и практически здоровых доноров-добровольцев (контроль) в условиях сжатия клеток. \* отмечены параметры, достоверно отличающиеся от значений, полученных в гиперосмотической среде инкубации в отсутствие пероксида водорода. ( $p < 0,05$ )

### Заключение

Таким образом, наиболее существенные изменения  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемой калиевой проницаемости мембраны эритроцитов отмечаются у больных СД 2 типа в сочетании с АГ, что свидетельствует о существенных изменениях в регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых калиевых каналов, связанных с белками цитоскелета.

### Список литературы

1. Гурло Т.Г., Аксентев С.Л., Окунь И.М. и др. Участие мембранного каркаса и интермедиатов фосфолипидного обмена в объемной регуляции  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$ -котранспорта в эритроцитах. // Биол. мембраны. – 1991. – Т. 8. – С. 870–876.
2. Мамедов М.Н. Тканевая инсулинорезистентность: степень выражения и взаимосвязь с факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний / М.Н. Мамедов, А.М. Олферьев, А.Н. Бритов и др. // Российский кардиологический журнал. – 2000. – № 1. – С. 12–15.
3. Новицкий В.В. Физиология и патофизиология эритроцита / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая и др. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2004. – 202 с.
4. Орлов С.Н.  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемые калиевые каналы эритроцитов, исследованные методом регистрации  $\text{Ca}_2^+$ -индуцированных изменений мембранного потенциала / С.Н. Орлов, И.В. Петрова, Н.И. Покудин и др. // Биол. мембраны. – 1992. – Т. 9, № 9. – С. 885–903.

5. Трубачева О.А. Влияние повышенной  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой калиевой проницаемости на деформируемость эритроцитов / Е.В. Шахристова, А.И. Галич, И.В. Петрова // Вестник ТГПУ. – 2011. – № 5. – С. 69–79.

6. Трубачева О.А. Участие активных форм кислорода в регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^+$ -каналов эритроцитов / С.В. Кремено, И.В. Петрова, А.В. Ситожевский, О.В. Груздева, В.В. Иванов, Т.Е. Сулова // Бюллетень сибирской медицины. – Томск, 2009. – № 2. – С. 56–60.

7. Трубачева О.А., Петрова И.В. Влияние перекиси водорода на  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую калиевую проницаемость мембраны эритроцитов человека в условиях сжатия клеток // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 3. – С. 382–385

8. Lang F. Mechanisms and significance of eryptosis / K.S. Lang, P.A. Lang, S.M. Huber, T. Wieder // Antioxid Redox Signal. – 2006. – № 8 (8). – С. 1183–92.

9. Mahindrakar Y.S. Comparison between erythrocyte hemoglobin and spectrin glycosylation and role of oxidative stress in type-2 diabetes mellitus / A.N. Suryakar, R.D. Ankush, R.V. Katkam and K.M. Kumbhar // Indian Journal of Clinical Biochemistry. – 2007. – № 22 (1). – С. 91–94.

### References

1. Gurlo T.G., Aksentev S.L., Okun' I.M. i dr. Uchastie membrannogo karkasa i intermediatov fosfolipidnogo obmena v obemnoj reguljacii  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$ -kotransporta v jericitocitah // Biol. membrany. 1991. T. 8. pp. 870–876.
2. Mamedov M.N. Tkanevaja insulinorezistentnost': stepen' vyrazhenija i vzaimosvjaz' s faktorami riska serdečno-sosudistyh zabojevanij / M.N. Mamedov, A.M. Olfer'ev, A.N. Britov i dr. // Rossijskij kardiologičeskij žurnal. 2000. no. 1. pp. 12–15.
3. Novickij V.V. Fiziologija i patofiziologija jericitocita / V.V. Novickij, N.V. Rjazanceva, E.A. Steповaja i dr. Tomsk: Izd-vo Tom. un-ta, 2004. 202 p.
4. Orlov S.N.  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiviruemye kalievye kanaly jericitocitov, issledovannye metodom registracii  $\text{Ca}_2^+$ -inducirovannyh izmenenij membrannogo potenciala / S.N. Orlov, I.V. Petrova, N.I. Pokudin i dr. // Biol. membrany. 1992. T. 9, no. 9. pp. 885–903.
5. Trubacheva O.A. Vlijanie povyšhennoj  $\text{Ca}^{2+}$ -zavisimoj kalievoj pronicaemosti na deformiruemost' jericitocitov / E.V. Shahristova, A.I. Galich, I.V. Petrova // Vestnik TGPU. 2011. no. 5. pp. 69–79.
6. Trubacheva O.A. Uchastie aktivnyh form kisloroda v reguljacii  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiviruemyh  $\text{K}^+$ -kanalov jericitocitov / S.V. Kremeno, I.V. Petrova, A.V. Sitozhevskij, O.V. Gruzdeva, V.V. Ivanov, T.E. Suslova // Bjulleten' sibirskoj mediciny. Tomsk, 2009. no. 2. pp. 56–60.
7. Trubacheva O.A., Petrova I.V. Vlijanie perekisi vodoroda na  $\text{Ca}^{2+}$ -zavisimuju kalievuju pronicaemost' membrany jericitocitov cheloveka v uslovijah szhatija kletok // Fundamental'nye issledovanija. 2013. no. 3. pp. 382–385.
8. Lang F. Mechanisms and significance of eryptosis / K.S. Lang, P.A. Lang, S.M. Huber, T. Wieder // Antioxid Redox Signal. 2006. no. 8 (8). pp. 1183–92.
9. Mahindrakar Y.S. Comparison between erythrocyte hemoglobin and spectrin glycosylation and role of oxidative stress in type-2 diabetes mellitus / A.N. Suryakar, R.D. Ankush, R.V. Katkam and K.M. Kumbhar // Indian Journal of Clinical Biochemistry. 2007. no. 22 (1). pp. 91–94.

### Рецензенты:

Степовая Е.А., д.м.н., профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии, ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, г. Томск;  
Ласукова Т.В., д.б.н., профессор кафедры медико-биологических дисциплин, ГБОУ ВПО «Томский государственный педагогический университет» Министерства образования и науки Российской Федерации, г. Томск.

Работа поступила в редакцию 14.10.2014.