

А.А. Маймистова, В.Б. Кошелев, С.В. Булаева, А.В. Муравьев

### Изменение агрегации и деформируемости эритроцитов при активации внутриклеточных сигнальных путей

*Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант №09-04-00436а*

Проблема адекватного кровоснабжения органов и тканей во многом связана с особенностями кровотока на уровне микрососудов, который существенно зависит от способности эритроцитов к агрегации (АЭ) и к деформации (ДЭ). Эти свойства клеток могут изменяться при активации внутриклеточных сигнальных путей. Настоящее исследование проведено, чтобы изучить роль системы протеинкиназ и фосфатаз, аденилатциклазного каскада, а также элементов  $Ca^{2+}$  сигнального пути в изменениях АЭ и ДЭ.

**Ключевые слова:** деформируемость и агрегация эритроцитов, аденилатциклаза, циклический АМФ, фосфодиэстеразы, протеинкиназа А, протеинкиназа С, тирозиновые протеинкиназы и фосфатазы.

A.A. Maymistova, V.B. Koshelev, A.A. Bulaeva, A.V. Muravyov

### The Change of Erythrocytes Deformability and Aggregation under Activation of Intracellular Signaling Transduction Pathways

The problem of sufficient blood supply and tissues is connected with the microcirculation features, which essentially depends on red blood cell deformability (RBCD) and aggregation (RBCA). These microrheological properties (RBCD and RBCA) can change under activation of intracellular signaling transduction pathways. The present study was designed to investigate the role of tyrosine protein kinase and phosphatase system, adenylyl cyclase-cAMP-dependant signaling pathway and  $Ca^{2+}$  signaling mechanism in RBCD and RBCA changes.

**Keywords:** erythrocytes deformability, red blood cell aggregation, adenylyl cyclase, cAMP, phosphodiesterases, protein kinase A, protein kinase C, protein tyrosine kinases and phosphatases

#### Введение

При ряде патологических состояний наблюдается значительный прирост вязкости цельной крови, обусловленный не только высоким гематокритом и подъемом вязкости плазмы [1–3], но и низкой деформируемостью эритроцитов и их выраженной агрегацией [2, 8]. По данным ряда авторов, снижение пластичности эритроцитов и их высокая агрегация могут являться ведущим звеном расстройств микроциркуляции [5, 6]. Это ставит вопрос о механизмах срочной регуляции АЭ и ДЭ, что может быть осуществлено при участии внеклеточных эндо- пара- и аутокринных механизмов, а также при активации внутриклеточных сигнальных путей в эритроцитах. С учетом всего вышесказанного, целью данного исследования был анализ изменений агрегации и деформируемости эритроцитов при активации внутриклеточных сигнальных путей.

#### Материал и методы исследования

Цельную кровь получали венопункцией (доноры-добровольцы, возраст – 20-30 лет, n=36). В

качестве антикоагулянта использовали гепарин. Эритроциты отделяли от плазмы центрифугированием (15 мин при 2750 об/мин). Затем их трижды отмывали в холодном изотоническом растворе хлорида натрия, содержавшем глюкозу (5,0 мМ).

Для изучения молекулярных механизмов изменения АЭ и ДЭ проводили несколько серий исследований, в которых эритроциты инкубировали с препаратами, влияющими на элементы внутриклеточных молекулярных сигнальных каскадов. В частности, для анализа роли аденилатциклазного сигнального пути в изменениях АЭ и ДЭ применяли: а) стимулятор аденилатциклазы (АЦ) – *форсколин* (10  $\mu$ М); б) проникающий аналог циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) – *дБ-цАМФ* (50  $\mu$ М); в) неселективный ингибитор фосфодиэстераз (ФДЭ) – *изобутилметилксантин* (100  $\mu$ М); г) ингибитор ФДЭ 1 – *винпоцетин* (10  $\mu$ М); д) ингибитор ФДЭ 4 – *ролипрам* (10  $\mu$ М).

Для исследования возможного участия кальциевого сигнального пути в изменениях микро-

реологии эритроцитов клетки обрабатывали: а) блокатором  $\text{Ca}^{2+}$  каналов – *верапамил* (100  $\mu\text{M}$ ); б) хелатором  $\text{Ca}^{2+}$  в среде – ЭГТА (1  $\mu\text{M}$ ); в) ингибитором  $\text{Ca}^{2+}$  зависимых калиевых каналов – клотримазолом (100  $\mu\text{M}$ ); г) кальциевым ионофором – А 23187 (кальцимицином, 10  $\mu\text{M}$ ).

Для уточнения роли системы протеинкиназ и фосфатаз в изменениях АЭ и ДЭ эритроциты инкубировали: а) со стимулятором протеинкиназы С (ПКС) – форболовым эфиром (3  $\mu\text{M}$ ); б) неселективным ингибитором ПКС – стауроспорином (3  $\mu\text{M}$ ); в) селективным ингибитором ПКС – БИМХГ (3  $\mu\text{M}$ ); г) активатором JAK-киназ – эритропозитином (10,0 М.Е./мл); д) стимулятором тирозинных протеинкиназ (ТПК) – цисплатином (3 нМ); е) ингибитором тирозинных протеинфосфатаз (ТПФ) – ортованадатом натрия (100  $\mu\text{M}$ ).

Суспензии эритроцитов, приготовленные в изотоническом растворе NaCl, инкубировали с указанными препаратами при 37<sup>0</sup>С в течение 15 мин, после этого регистрировали АЭ и ДЭ. В качестве контроля исследовали суспензии эритроцитов в изотоническом растворе без добавления препаратов.

*Деформируемость* клеток оценивали с помощью метода проточной микрокамеры. Регистрировали индекс удлинения эритроцитов (ИУЭ) [5].

*Агрегацию* эритроцитов изучали при помощи метода оптической микроскопии с последующим компьютерным анализом изображения. Этот метод позволял рассчитать отношение числа агрегатов к числу неагрегированных клеток, которое рассматривали как показатель агрегации эритроцитов (ПА).

Статистическую обработку полученных цифровых материалов проводили, используя программу «Statistica» (версия 6.0). Проверку выборочного распределения на нормальность проводили с помощью теста Шапиро-Уилка. Если выборка подчинялась закону нормального распределения, достоверность различий в исследуемых группах определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Когда параметры не соответствовали критерию нормального распределения, то оценку статистической значимости различий в группах наблюдения проводили с использованием непараметрических критериев Манна-Уитни, Вилкоксона. За уровень статистически значимых принимали изменения при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

Анализ результатов исследования показал, что стимулирование АЦ форсколином увеличило деформируемость эритроцитов на 17% ( $p < 0,05$ ) (рис. 1) и вызвало снижение их агрегации (рис. 2).

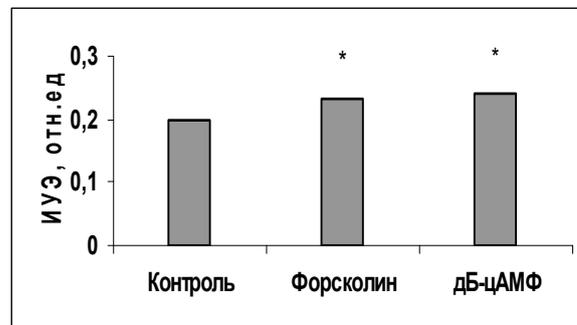


Рис. 1. Изменение индекса удлинения эритроцитов под влиянием инкубации с препаратами, обладающими аденилатциклазной активностью

Повышение уровня цАМФ в эритроцитах и как следствие – активация ПКА при введении в среду инкубации его производного аналога - дБ-цАМФ существенно снизило агрегацию эритроцитов (рис. 2;  $p < 0,05$ ) и способствовало приросту пластичности клеток на 22% (рис. 1;  $p < 0,05$ ).

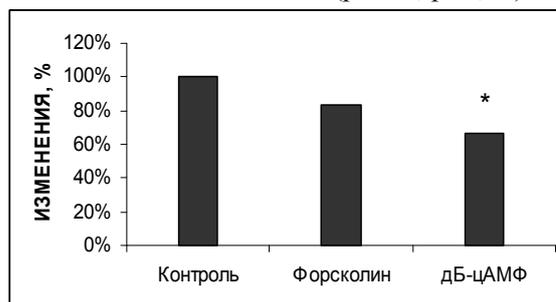
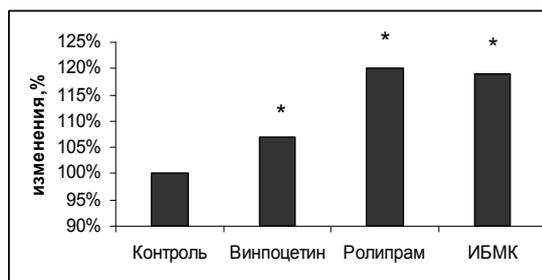


Рис. 2. Изменение показателя агрегации эритроцитов (в % по сравнению с контролем) под влиянием инкубации с препаратами, обладающими аденилатциклазной активностью

При ингибировании фосфодиэстеразы-1 (ФДЭ-1) в эритроцитах путем инкубации клеток с винпоцетином наблюдали достоверное повышение ДЭ на 7% (рис. 3) и снижение АЭ, которое составило 50%. Ингибитор ФДЭ-4 – ролипрам не оказал заметного влияния на агрегацию, однако существенно повышал ДЭ (рис. 3;  $p < 0,05$ ).



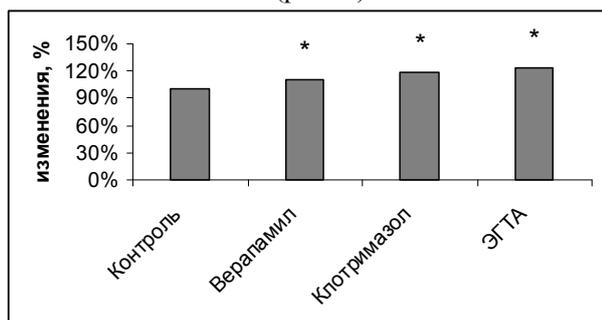
**Рис. 3.** Изменение индекса удлинения эритроцитов (в % по сравнению с контролем) под влиянием инкубации с ингибиторами активности фосфодиэстераз в эритроцитах

На это указывал прирост ИУЭ до  $0,226 \pm 0,022$ , что составило 20% (рис. 3;  $p < 0,05$ ). Ингибитор активности ФДЭ – ИБМК умеренно снижал АЭ и достоверно повысил ДЭ на 19% (рис. 3).

Следовательно, можно заключить, что повышение уровня цАМФ путем ингибирования активности ФДЭ, а также при введении стабильного аналога цАМФ – дБ-цАМФ изменяет микрореологическое поведение эритроцитов.

При блокировании кальциевых каналов верапамилом было отмечено достоверное повышение пластичности эритроцитов, о чем свидетельствовал прирост ИУЭ на 11%. (рис. 4). Что касается агрегации эритроцитов, то под влиянием верапамила наблюдалась лишь тенденция к ее снижению.

Связывание кальция в среде с помощью хелатора  $Ca^{2+}$  – ЭГТА сопровождалось снижением агрегации на 63% ( $p < 0,01$ ) и достоверным повышением на 23% ИУЭ (рис. 4).



**Рис. 4.** Изменение индекса удлинения эритроцитов (в % по сравнению с контролем) под влиянием инкубации с препаратами, оказывающими влияние на элементы  $Ca^{2+}$  сигнального пути

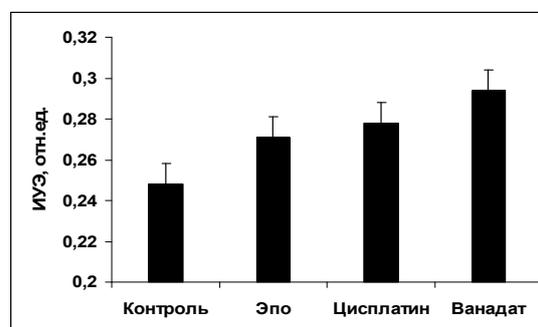
Повышение уровня  $Ca^{2+}$  в эритроцитах в результате инкубации клеток с ионофором А 23187 несколько снижало деформируемость эритроцитов и существенно стимулировало агрегацию клеток. Прирост интенсивности агрегации составил 50% ( $p < 0,05$ ).

Повышение входа  $Ca^{2+}$  в эритроциты, как известно, сопровождается Гардош-эффектом, т.е. компенсированным выходом  $K^+$  из клетки [9]. Считается, что ионы  $K^+$  в эритроцитах играют важную роль в регуляции и поддержании формы клеток [7].

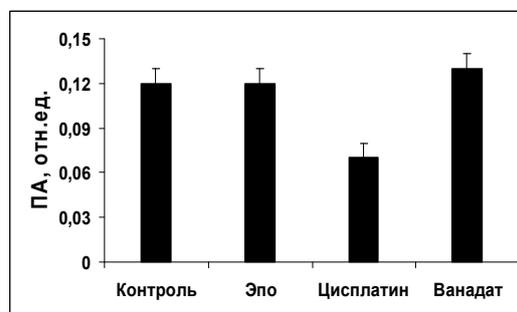
Инкубация эритроцитов с клотримазолом привела к заметному приросту эластичности клеток. На это указывало достоверное повышение индекса удлинения на 18% (рис. 4). Вместе с тем существенного изменения агрегации эритроцитов при инкубации клеток с этим препаратом отмечено не было.

Стимулирование протеинкиназы С (ПКС) форболовым эфиром ( $3,0 \mu M$ ) сопровождалось небольшим приростом на 4% ИУЭ по сравнению с контролем. При этом агрегация эритроцитов под влиянием форболового эфира достоверно не изменялась.

Добавление в среду инкубации неселективного ингибитора ПКС – стауроспорина не оказало заметного влияния на агрегацию, а что касается деформируемости клеток, то наблюдалась тенденция к ее повышению. При инкубации эритроцитов с селективным ингибитором ПКС – БИМХГ ( $3 \mu M$ ) агрегация эритроцитов изменялась незначительно. Вместе с тем наблюдался небольшое увеличение их индекса эластичности (на 4%).



А



Б

**Рис. 5.** Изменения (в % по сравнению с контролем) микрореологических свойств эритроцитов: А - индекса удлинения клеток; Б – агрегации эритроцитов под влиянием инкубации с препаратами, обладающими протеинкиназной и фосфатазной активностью.

При инкубации эритроцитов с эритропоэтином было получено увеличение на 9% ИУЭ ( $p < 0,05$ ). Величина агрегации под действием эритропоэтина не изменялась (рис. 5 Б). Активация тирозиновых протеинкиназ (семейства Lin-киназ) путем инкубирования эритроцитов с цисплатином привела к достоверному повышению ИУЭ на 12% и снижению показателя агрегации на 42% (рис. 5 ;  $p < 0,05$ ).

Увеличение деформируемости было зарегистрировано при инкубации эритроцитов с ингибитором тирозиновых фосфатаз – ортованадатом натрия, где прирост индекса их удлинения составил 19% (рис. 5 А;  $p < 0,05$ ). Агрегация эритроцитов под действием ортованадата натрия существенно не изменялась (рис. 5 Б)

### Заключение

Полученные данные позволяют заключить, что повышение активности аденилатциклазной системы эритроцитов: 1) при прямом стимулировании аденилатциклазы форсколином, 2) введением в среду инкубации клеток стабильного аналога цАМФ, 3) ингибированием (в том числе селективным) фосфодиэстераз эритроцитов – приводит к достоверному приросту их деформируемости и снижению агрегации клеток.

При стимулировании цАМФ-зависимой протеинкиназы А в эритроцитах наблюдается статистически достоверное и существенное повышение деформируемости эритроцитов и снижение их агрегации, тогда как стимулирование протеинкиназы С с помощью форболового эфира и кальциевого ионофора дает меньший микрореологический эффект. Активация тирозиновых протеинкиназ при помощи ванадата натрия, эритропоэтина и цисплатина сопровождается достоверным приростом деформируемости эритроцитов и меньшим изменением их агрегации.

Блокирование входа  $Ca^{2+}$  в эритроциты при помощи верапамила и его связывание в среде инкубации при помощи хелатора ЭГТА сопровождается достоверным увеличением деформируемости клеток и снижением их агрегации, тогда как повышение внутриклеточного  $Ca^{2+}$  путем инкубации клеток с кальциевым ионофором (A23187) сочетается с выраженным приростом агрегации эритроцитов и некоторым снижением их деформируемости.

### Библиографический список

1. Гушин, А.Г. Гемореологическая эффективность применения плазмафереза в сочетании с гемодилюцией и лейкоцитосупрессией [Текст] / А.Г. Гушин, С.В. Майнугин, В.А. Шабалин, И.Е. Виноградов, С.В. Сажина // Мат. междунаrodn. конф. по гемореологии и микроциркуляции. – Ярославль, 2003. – С. 58.
2. Замышляев, А.В. Реологические свойства крови у больных системной красной волчанкой и системной склеродермией [Текст] / А.В. Замышляев: автореф. дис... канд. биол. наук. – Ярославль, 2002. – 22 с.
3. Киричук, В.Ф. Изменения микроциркуляторного гомеостаза и реологии крови при сахарном диабете [Текст] / В.Ф. Киричук, Н.В. Болотова, Н.В. Николаева // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2004. – № 4. – С. 12–19.
4. Муравьев, А.В. Методы изучения деформируемости эритроцитов в эксперименте и клинике [Текст] / А.В. Муравьев, И.А. Тихомирова, А.А. Муравьев, С.В. Булаева, А.А. Маймистова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. – № 1. – С. 28–32.
5. Соколова, И.А. Изменение реологических свойств крови при острых экспериментальных нарушениях мозгового кровообращения и их коррекции [Текст] / И.А. Соколова, А.А. Шахназаров, Н.А. Савина, О.А. Георгинова, О.А. Миронова, Н.Н. Фирсов, В.Г. Ионова // Гемореология в микро- и макроциркуляции: Мат. междунаrodn. конф. – Ярославль, 2005. – С. 38.
6. [Baskurt O.K.](#) Handbook of hemorheology and hemodynamics [Text] / O.K. [Baskurt](#), M.R. Hardeman, M.W. Rampling, H.J. [Meiselman](#); IOS Press. – 2007. – 455 p.
7. Miller C. An overview of the potassium channel family [Text] / C. Miller // Genome Biology. – 2000. – Vol. 1. – N 4. – P. 41–45.
8. [Shin S.](#) Erythrocytes deformability and its variations in diabetes mellitus [Text] / S. [Shin](#), Y. [Ku](#), N. [Babu](#), M. [Singh](#) // [Indian J. Exp. Biol.](#) – 2007. – Vol. 45, N 1. – P. 121–128.
9. Vestergaard-Bogind B. Calcium-induced oscillations in  $K^+$  conductance and membrane potential of human erythrocytes mediated by the ionophore A23187 [Text] / B. Vestergaard-Bogind, P. Bennekou // Biochim. Biophys. Acta. – 1982. – Vol. 688. – N 1. – P. 37–44.