

С. Г. Михайлова, И. А. Тихомирова

**Роль ионизированного кальция и механического стресса
в механизмах регуляции клеточных свойств эритроцитов**

*Работа выполнена в рамках реализации Федеральной целевой программы
«Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы.*

Продemonстрировано, что механический стресс мембраны эритроцита при содержании экстрацеллюлярного кальция в среде 50 мМ сопровождается входом Ca^{2+} в клетку. Была показана обусловленность изменения клеточных свойств эритроцитов увеличением внутриклеточного пула свободного кальция и активацией кальциевых каналов мембраны как рецептор-управляемых, так и потенциал-зависимых.

Ключевые слова: эритроциты, деформационный стресс, ионизированный кальций, агрегация, деформируемость, электрокинетический потенциал.

S. G. Mikhailova, I. A. Tikhomirova

Role of Ionized Calcium and Mechanical Stress in Controlling Mechanisms of Erythrocytes' Cellular Properties

It was demonstrated that a mechanical stress of the erythrocyte membrane led to an entry of Ca^{2+} into cell if there is at least 50 μ M of Ca^{2+} concentration in suspending medium. In addition it was shown that modification of the erythrocytes cellular properties were determined by the increase of intracellular content of free calcium and activation of both receptor-operated and potential-dependent calcium channels of cell membrane. Taken together these data clarify an important role of Ca^{2+} in red blood cell mechanical property alterations.

Keywords: erythrocytes, a deformation stress, ionized calcium, aggregation, deformability, electrokinetic potential.

Введение

Клеточные свойства эритроцитов обеспечивают суспензионную стабильность крови, играют важную роль в процессах адсорбции и межклеточной коммуникации. Способность эритроцитов к деформации при прохождении через капилляры, а также их агрегируемость во многом определяют эффективность микроциркуляции и кислородтранспортной функции крови [2, 5, 6].

В условиях циркуляции эритроциты постоянно подвергаются внешним физическим и химическим воздействиям, таким как механический стресс и изменения ионного гомеостаза [7]. Эти факторы могут принимать участие в регуляции функционального состояния красных клеток крови. В кровеносных сосудах даже в условиях физиологических величин напряжения сдвига имеет место деформационный стресс эритроцитов, сопровождающийся повышением проницаемости их мембран для катионов, в частности, для ионов кальция [7, 12]. Ионизированный кальций выступает регулятором множества

физиологических процессов, включая различные виды межклеточных взаимодействий и мембранные перестройки, однако механизмы данного участия остаются недостаточно изученными [1].

Исходя из вышеизложенного, была сформулирована **цель исследования:** оценить влияние ионизированного кальция и механического стресса на клеточные свойства эритроцитов.

Материалы и методы

Исследование было выполнено на образцах венозной крови практически здоровых добровольцев обоего пола (средний возраст 28,6±5,6 лет). Изучали влияние ионизированного кальция и механического стресса на микрореологические и электрофизиологические свойства эритроцитов (n=18) и динамику содержания свободного экстрацеллюлярного кальция в условиях сдвигового стресса (n=9). Кровь стабилизировалась антикоагулянтом гепарином (10 Ед/мл). Эритроциты отделяли от плазмы центрифугированием и триж-

ды отмывали в изотоническом растворе (NaCl 0,154 М) при 1500 об/мин.

В ходе исследования оценивали агрегатные свойства эритроцитов (степень агрегации и средний размер агрегата) методом оптической микроскопии с видеорегистрацией и компьютерным анализом изображения [3] в условиях замены плазмы на стандартную суспензионную среду (138 мМ NaCl, 3 мМ KCl, 1 мМ K₂SO₄, 7,5 мМ Na₂HPO₄, 1 мМ MgSO₄, 5 мМ глюкозы, 3 % декстрана MW 70, 3 % альбумина; рСа 2,65, 300 мосм/л); деформируемость эритроцитов (по фильтруемости через полимерные мембраны с фиксированным диаметром пор 5 мкм [10] и по величине вязкости суспензии эритроцитов с гематокритом 40 % в физиологическом растворе [5]); электрофоретическую подвижность эритроцитов методом клеточного микроэлектрофореза [2].

Уравнение Смолуховского ($V = HD\zeta / 4\pi\eta$) использовали для вычисления ζ -потенциала эритроцитов, определив их электрофоретическую подвижность (V) и зная величины вязкости (η) и диэлектрической постоянной среды (D).

Измерение вязкости суспензий эритроцитов в физиологическом растворе (Ht=40 %) выполняли с помощью полуавтоматического капиллярного вискозиметра [4] при следующих напряжениях сдвига (Па): 0,21; 0,42; 0,64; 0,85; 1,06.

Для оценки влияния свободного кальция на клеточные свойства эритроцитов осуществляли инкубацию красных клеток крови в растворах хлорида кальция 50 мМ и блокатора кальциевых каналов нифедипина 20 мМ в течение 15 минут при 37° С, в объемном соотношении 1:1. Контрольной пробой служила суспензия эритроцитов в физиологическом растворе (Ht=50 %), подвергавшаяся аналогичной по продолжительности инкубации при 37°С.

Для оценки эффекта ионизированного кальция на функциональные свойства красных клеток крови в условиях сдвиговой деформации мембран использовали модель механического стресса эритроцитов [12].

Динамику содержания ионов кальция в эритроцитах оценивали методом флуоресцентной визуализации с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Nikon DIGITAL ECLIPSE C1 plus по интенсивности флуоресценции индикатора Calcium Green-1. В ходе исследования кальциевый зонд ($2,5 \cdot 10^{-5}$ г/л) вводили в 10 % суспензию красных клеток крови в изотоническом растворе хлорида натрия и осуществляли инкубацию в течение 60 мин. при $t=37^\circ\text{C}$. Флуоресцентные изображения эритроцитов ре-

гистрировали при волновой характеристике лазера 488 нм. Для иммобилизации клеток в процессе сканирования под микроскопом применяли кюветы с полилизинным покрытием.

Исследования на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе выполнялись в Центре коллективного пользования ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», НИЛ Физиологии адаптационных процессов.

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием парного t -критерия Стьюдента. За уровень статистически значимых различий принимали изменения при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Известно, что механический стресс мембраны эритроцитов сопровождается входом кальция в клетку и снижением ее деформируемости, причем пик этого снижения наблюдается при концентрации экстрацеллюлярного кальция 50 мМ, что значительно меньше содержания этих катионов в плазме [12, 13]. Полученные нами данные продемонстрировали, что механический стресс сам по себе (в отсутствие ионов кальция в среде) не изменяет ни микрореологических, ни электрофизиологических свойств эритроцитов (рис. 1).

На этапе оценки влияния экстрацеллюлярного ионизированного кальция на клеточные свойства эритроцитов было показано, что присутствие в среде 50 мМ свободного кальция приводит к увеличению степени агрегации эритроцитов на 20,8 %, $p < 0,05$ (рис. 1). При этом возрастает не только степень агрегации, но и среднее число эритроцитов в агрегате (на 7,2 %, $p < 0,05$).

При оценке электрофизиологических параметров красных клеток крови в условиях воздействия свободного кальция 50 мМ было отмечено уменьшение их электрофоретической подвижности и дзета-потенциала на 21,9 %, $p < 0,05$.

Деформационные свойства эритроцитов под влиянием экстрацеллюлярного кальция изменились незначительно (рис. 1), сходные данные были получены Oonishi T. et al. [12].

При действии механического стресса в отсутствие ионов кальция зафиксирована выраженная тенденция к снижению агрегируемости эритроцитов, а при совместном влиянии механического стресса и Ca²⁺ 50 мМ показатели степени агрегации практически не отличались от контрольных значений, по всей видимости, за счет проагрегантного эффекта ионизированного экстрацеллюлярного кальция (рис. 1).

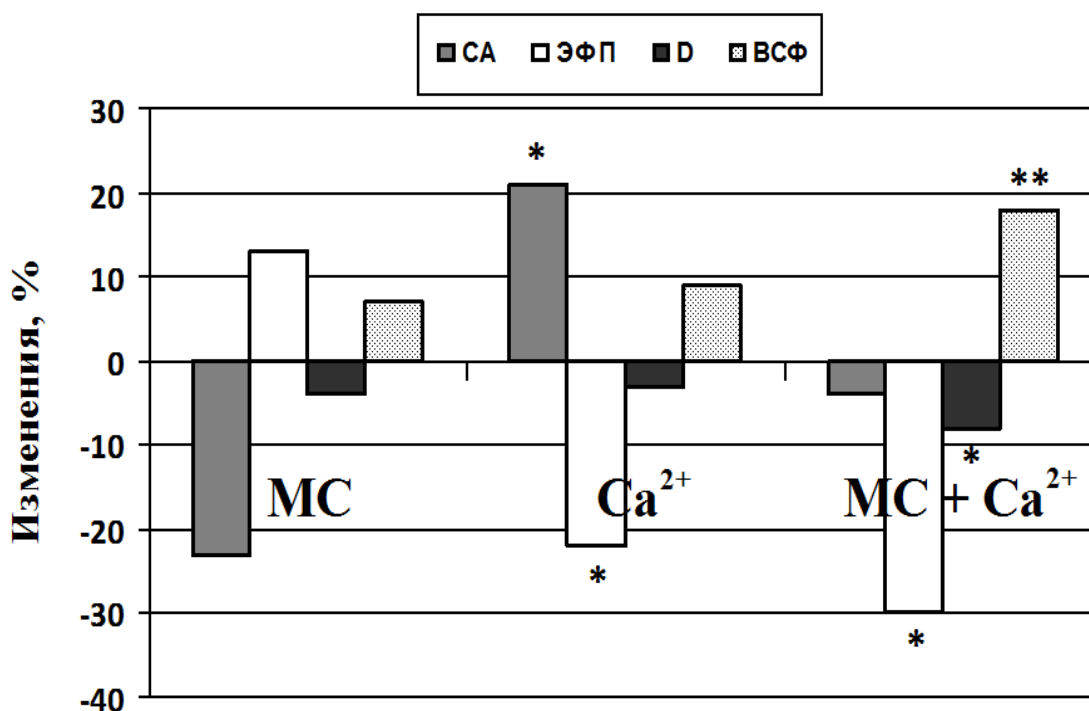


Рис. 1. Изменения микрореологических и электрофизиологических характеристик эритроцитов под влиянием ионов кальция и механического стресса

Обозначения: CA – степень агрегации эритроцитов; ЭФП – электрофоретическая подвижность эритроцитов; D – деформируемость эритроцитов (по фильтруемости); ВСФ – вязкость суспензии эритроцитов в физиологическом растворе с гематокритом 40 % при $\tau = 0,21$ Па; MC – механический стресс; Ca²⁺ – ионизированный кальций 50 μ M; различия достоверны: * – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$.

Совместное воздействие механического стресса и свободного внеклеточного кальция сопровождалось уменьшением электрофоретической подвижности красных клеток крови на 29,7 % ($p < 0,05$) и снижением их деформируемости, что определялось как по снижению фильтруемости эритроцитов на 7,5 % ($p < 0,05$), так и по повышению вязкости суспензии эритроцитов с фиксированным гематокритом в неагрегирующей среде (физиологический раствор) на 18,0 % ($p < 0,01$) (рис. 1).

То, что наблюдаемые изменения деформируемости эритроцитов при сочетанном действии механического стресса и ионизированного кальция обусловлены входом этих катионов в клетку, подтверждают результаты измерения содержания внутриклеточного кальция методом конфокальной микроскопии (в данных условиях отмечен рост содержания Ca²⁺ на 17 %, $p < 0,05$). Однако максимальное увеличение входа ионов кальция зафиксировано при его концентрации 200 μ M, а при более низкой концентрации (50 μ M), соответствующей максимуму падения деформируемости, – лишь выраженная тенденция (табл. 1).

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что в регуляции деформируемости при механическом стрессе задействованы сложные внутриклеточные каскады реакций, обусловленные не только участием ионизированного кальция, но и другими вторичными посредниками, например, цАМФ. Существование нескольких сигнальных путей регуляции деформационных свойств эритроцитов (с участием ионов кальция и цАМФ) было экспериментально доказано в работах Oonishi T. et al. [12]. Эти посредники могут активировать различные киназы и фосфатазы, приводя к фосфорилированию или дефосфорилированию ключевых белков мембранного цитоскелета и влияя тем самым на деформируемость мембраны.

Поскольку при механическом стрессе деформируемость эритроцитов достоверно снизилась в присутствии экстрацеллюлярного кальция и повышение содержания внутриклеточного кальция было зафиксировано методом конфокальной микроскопии, можно предположить, что вход этих катионов был обусловлен активацией механочувствительных каналов мембраны эритроцита.

Таблица 1

Интенсивность флуоресценции Calcium Green-1 в эритроцитах, подвергавшихся воздействию ионизированного кальция и механического стресса (M±σ)

Условия исследования	Интенсивность флуоресценции Calcium Green-1 (усл. ед.)		Изменения (%)
	До механического стресса	После механического стресса	
Контроль	15,54±5,12	15,48±3,88	-0,35
Ca ²⁺ 50 μM	15,27±4,35	17,51±6,50	+14,7
Ca ²⁺ 100 μM	14,97±5,59	16,51±8,24	+10,3
Ca ²⁺ 200 μM	17,94±7,41	21,00±9,72*	+17,0

Обозначения: Ca²⁺ – ионизированный кальций; * – статистически значимые различия со значениями группы «До механического стресса» при p<0,05.

Применение нифедипина (селективного блокатора кальциевых каналов II класса, производного дигидропиридина) не привело к нормализации нарушенной деформируемости и сниженной электрофоретической подвижности красных клеток крови, обусловленных сочетанным воздействием ионов кальция и механического стресса, что согласуется с опубликованными данными о

влиянии производных дигидропиридина на деформационные характеристики эритроцитов [9, 12]. Однако степень агрегации эритроцитов и средний размер агрегата при блокаде потенциал-зависимых кальциевых каналов нифедипином достоверно снизились (на 28,5 % и 14,6 % соответственно, p<0,05) (табл. 2).

Таблица 2

Реологические и электрофизиологические характеристики крови в условиях воздействия нифедипина (M±σ)

Исследуемые параметры	Ca ²⁺ и МС	Нифедипин, Ca ²⁺ и МС	Изменения (%)
СА (отн. ед.)	0,071±0,052	0,051±0,020*	-28,5
РА (отн. ед.)	4,57±0,26	3,90±0,52*	-14,6
D (отн. ед.)	0,637±0,041	0,607±0,049	-4,70
ЭФП (μсек ⁻¹ ·В ⁻¹ ·см)	0,650±0,170	0,626±0,227	-3,67

Обозначения: Ca²⁺ – ионизированный кальций 50 μM; МС – механический стресс; СА – степень агрегации эритроцитов; РА – средний размер агрегата; D – деформируемость эритроцитов (по фильтруемости); ЭФП – электрофоретическая подвижность эритроцитов; * – статистически значимые различия с показателями группы «Ca²⁺ и механический стресс» при p<0,05.

Концентрация кальция в красных клетках крови определяется балансом между его активным транспортом из цитозоля в плазму и пассивным потоком в обратном направлении, последний лимитируется активностью кальциевых каналов мембраны. Учитывая экспериментальные подтверждения рецепторопосредуемых изменений микрореологических свойств эритроцитов с участием ионов кальция [8, 11] и чувствительность мембран красных клеток крови к воздействию антагонистов кальция – производных дигидропиридина, – можно говорить о наличии в

мембранах эритроцитов обоих типов (рецептор-управляемых и потенциал-зависимых) кальциевых каналов. Полученные данные позволяют также заключить, что регуляция деформационных свойств эритроцитов в условиях механического стресса осуществляется посредством активации не потенциал-зависимых, а механо-чувствительных кальциевых каналов; тогда как агрегатные свойства красных клеток крови регулируются, в том числе и с участием дигидропиридин-чувствительных (потенциал-зависимых) кальциевых каналов.

Выводы

Было показано, что присутствие в среде ионизированного кальция 50 μM ведет к снижению электрокинетического потенциала эритроцитов и интенсификации процесса агрегатообразования. Экстрацеллюлярный кальций в указанной концентрации не оказывает значимого влияния на деформационные характеристики красных клеток крови. Модификация мембранных свойств

эритроцитов в условиях сдвигового стресса (снижение электрокинетического заряда и ухудшение деформируемости) обусловлена увеличением внутриклеточного пула свободного кальция. Изменение агрегационных характеристик эритроцитов при деформационном стрессе сопровождается активацией потенциал-зависимых (дигидропиридин-чувствительных) кальциевых каналов.

Библиографический список

1. Авдонин, П. В. Рецепторы и внутриклеточный кальций [Текст] / П. В. Авдонин, В. А. Ткачук. – М. : Наука, 1994. – 288 с.
2. Козинец, Г. И. Клетки крови – современные технологии их анализа [Текст] / Г. И. Козинец [и др.]. – М: Триада-фарм, 2002. – 200 с.
3. Муравьев, А. В. Компьютерная регистрация агрегации эритроцитов при их инкубации с адреналином [Текст] / А. В. Муравьев // Мат. конф. «Методы исследования регионарного кровообращения и микроциркуляции в клинике». – СПб., 2003. – С. 78–80.
4. Муравьев, А. В. Новый капиллярный полуавтоматический вискозиметр [Текст] / А. В. Муравьев, В. Е. Туров, И. В. Колбаско // Мат. междунаrodn. конф. «Гемореология в микро- и макроциркуляции». – Ярославль, 2005. – С. 28.
5. Муравьев, А. В. Гемореология (экспериментальные и клинические аспекты реологии крови) [Текст] / А. В. Муравьев, С. В. Чепоров. – Ярославль : Изд-во ЯГПУ, 2009. – 178 с.
6. Новицкий, В. В. Физиология и патофизиология эритроцита [Текст] / В. В. Новицкий, Н. В. Рязанцева, Е. А. Степовая. – Томск, 2004. – 202 с.
7. Сторожок, С. А. Молекулярная структура мембран эритроцитов и их механические свойства [Текст] / С. А. Сторожок, А. Г. Санников, Ю. М. Захаров. – Тюмень, 1997. – 140 с.
8. Тихомирова, И. А. Роль экстрацеллюлярных, мембранных и внутриклеточных факторов в процессе агрегации эритроцитов [Текст] : дис. ... док. биол. наук / И. А. Тихомирова. – Ярославль, 2006. – 297 с.
9. Fujita J., Tsuda K., Takeda T., Yu L., Fujimoto S., Kajikawa M., Nishimura M. et al. Nisoldipine improves the impaired erythrocyte deformability correlating with elevated intracellular free calcium-ion concentration and poor glycaemic control in NIDDM // Br J Clin Pharmacol. – 1999. – Vol. 47. – № 5. – P. 499–506.
10. Hardeman M.R., Goedhart P.T., Shin S. Methods in hemorheology // Handbook of Hemorheology and Hemodynamics. – IOS Press, 2007. – P. 242–266.
11. Muravyov A., Tikhomirova I. Role Ca^{2+} in mechanisms of red blood cells microrheological changes // Adv Exp Med Biol. – 2012. – Vol. 740. – P. 1017–1038.
12. Oonishi T., Sakashita K., Uyesaka N. Regulation of red blood cell filterability by Ca^{2+} influx and cAMP-mediated signaling pathways // Am J Physiol – 1997. – Vol. 273. – № 6 – P. 1828–1834.
13. Sauer H., Hescheler J., Wartenberg M. Mechanical strain-induced Ca^{2+} waves are propagated via ATP release and purinergic receptor activation // Am J Physiol Cell Physiol – 2000. – № 279. – P. 295–307.