

С. В. Булаева, М. Ю. Милорадов, А. В. Замышляев

Исследование роли некоторых элементов внутриклеточных путей эритроцитов на их микрореологические свойства в норме и при метаболических расстройствах

Работа поддержана грантом РФФИ No 12-04-31480 мол_a

В статье рассмотрены две внутриклеточные сигнальные системы эритроцита: система циклический аденозинмонофосфат – аденилатциклаза и система кальций – кальмодулин. Проведен сравнительный анализ влияния компонентов этих двух систем эритроцитов на их микрореологические свойства у практически здоровых лиц и лиц с сахарным диабетом 2 типа.

Ключевые слова: агрегация эритроцитов, деформируемость эритроцитов, внутриклеточные сигнальные пути.

S. V. Bulaeva, M. Ju. Miloradov, A. V. Zamyshlyayev

Study of the role of some elements of intracellular ways of erythrocytes on their microrheological properties in norm and metabolic disorders

Two intracellular signal systems of the erythrocyte were observed in this study: adenylyl cyclase – the AMP system and Ca^{2+} – the calmodulin system. The components of erythrocyte intracellular cascades and their effect on the erythrocyte microrheological properties in healthy persons and in persons with diabetes mellitus type 2 were investigated.

Keywords: erythrocyte aggregation, erythrocyte deformability, intracellular signaling pathways.

Введение

Известно, что основная функция крови – это транспорт веществ и энергии в тканевые микрорайоны и удаление из них продуктов метаболизма. Эффективность этого транспорта в значительной степени зависит от состояния микроциркуляции и реологических свойств крови, от ее текучести [1]. Текучесть крови рассматривают как, величину обратную ее вязкости [4]. Последняя определяется композицией ряда факторов, таких как: вязкость плазмы, гематокрит, деформируемость и агрегация эритроцитов [1]. Транспортная система крови является важным элементом метаболизма в организме и при его расстройствах она включается в патогенез нарушений [3, 7]. Так у лиц с сахарным 2 типа по сравнению с практически здоровыми лицами имеется повышенная вязкость крови. Как правило, это сочетается более вязкой плазмой, выраженной агрегацией эритроцитов и их сниженной деформируемостью. Все это приводит к уменьшению транспортного потенциала крови [6, 12, 14]. На мембранах эритроцита человека имеются рецепторы к сигнальным молекулам, таким как гормоны и простагландины, а внутри клетки сохранились элементы сигнальных каскадов реакций [5, 8, 11]. Присутствие регуляторных веществ в крови приводят к изменениям агрегации и деформируе-

мости эритроцитов [9]. В литературе приводятся данные о нарушении сигнальных путей у лиц с метаболическими нарушениями [13]. В связи с этим было предпринято исследование влияния компонентов внутриклеточных сигнальных путей на изменение микрореологических свойств эритроцитов в норме и при сахарном диабете 2 типа.

Материал и методы

Цельную кровь практически здоровых лиц и лиц с сахарным диабетом 2 типа для исследования получали венопункцией, в качестве антикоагулянта использовали гепарин (5 МЕ/мл). Эритроциты от плазмы отделяли центрифугированием (10 мин при 3000 об./мин) и трижды отмывали в изотоническом растворе хлорида натрия.

Для достижения поставленной цели и решения основных задач было сформировано две группы наблюдения: первую группу (контроль) составили практически здоровые лица (40 человек обоего пола, возраст от 35 до 65 лет). Во вторую группу (эксперимент) были включены лица с сахарным диабетом 2 типа (41 человек обоего пола, возраст от 40 до 79 лет).

Регистрировали вязкость суспензии эритроцитов со стандартным гематокритом 40 % на полуавтоматическом капиллярном вискозиметре при напряжениях сдвига от 0,2 до 2,0 мПа. Определе-

ние показателя гематокрита (Hct) цельной крови проводили на специальной микрогематокритной центрифуге СМ-70 (Латвия). Индекс деформируемости эритроцитов определяли в проточной микрокамере. Показатель агрегации эритроцитов регистрировали методами прямой микроскопии с видеорегистрацией и последующей обработкой данных, а также на агрегометре Мугеппе (Германия). Все измерения осуществляли при комнатной температуре $21 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение четырех часов после взятия крови.

При исследовании элементов сигнальной системы «аденилатциклаза – циклический АМФ» инкубировали эритроциты с ингибитором фосфодиэстеразы 3 циклостазолом (10,0 мкМ), со стимулятором аденилатциклазы форсколином (10,0 мкМ), с ингибитором фосфодиэстеразы пентоксифиллином (1,0 мкМ). Для изучения системы Ca^{2+} – кальмодулин – ПКК инкубировали эритро-

циты с кальциевым ионофором А23187 (1,0 мкМ), блокатором кальциевых каналов верапамилом (10 мкМ) и со стимулятором протеинкиназы С форболовым эфиром (3,0 мкМ). Статистическую обработку полученных цифровых материалов и все виды анализа результатов проводили на РС IBM, используя табличный редактор Microsoft Excel, программу «Statistica» (версия 6.0). За уровень статистически значимых принимали изменения при $p < 0,05$ и/или $p < 0,01$.

Результаты и их обсуждение

При стимулировании аденилатциклазы форсколином наблюдали снижение вязкости суспензии клеток на 8 % ($p < 0,05$) в группе контроля и на 3 % у лиц с сахарным диабетом 2 типа (СД2). В этих условиях показатель агрегации снижался в группе контроля на 9,3 %, а в группе СД2 на 38,7 % (Рис. 1).

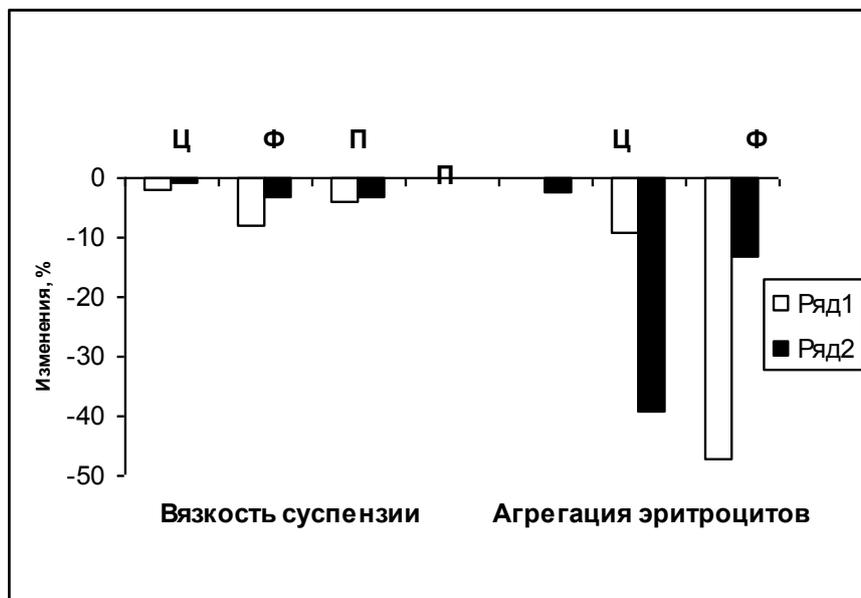


Рис. 1. Влияние изменение активности элементов аденилатциклазного сигнального пути на микрореологические свойства эритроцитов

Обозначения: Ц – циклостазол, Ф – форсколин, П – пентоксифиллин), Ряд 1 – контроль, Ряд 2 – сахарный диабет 2 типа, ПА – показатель агрегации, ВС – вязкость суспензии

Инкубация эритроцитов с ингибитором активности фосфодиэстеразы пентоксифиллином приводила к достоверному снижению агрегации в группе контроля на 47 % ($p < 0,05$), а в группе СД2 на 13 % ($p < 0,05$). Вязкость суспензии под влиянием этого препарата снизилась на 4 % у практически здоровых лиц, сопоставимо изменился этот показатель в группе СД2 (Рис. 1).

Под влиянием селективного ингибитора фосфодиэстеразы 3 циклостазола в обеих группах от-

мечено некоторое улучшение микрореологических свойств эритроцитов (Рис. 1).

Инкубация со стимулятором протеинкиназы С форболовым эфиром приводила к снижению вязкости суспензии как в группе контроля (на 5 %), так и в группе СД2 (на 3 %). Агрегация эритроцитов повышалась под влиянием данного препарата только в группе контроля, на 6 %. В группе СД2 агрегация снизилась на 27 % (Рис. 2).

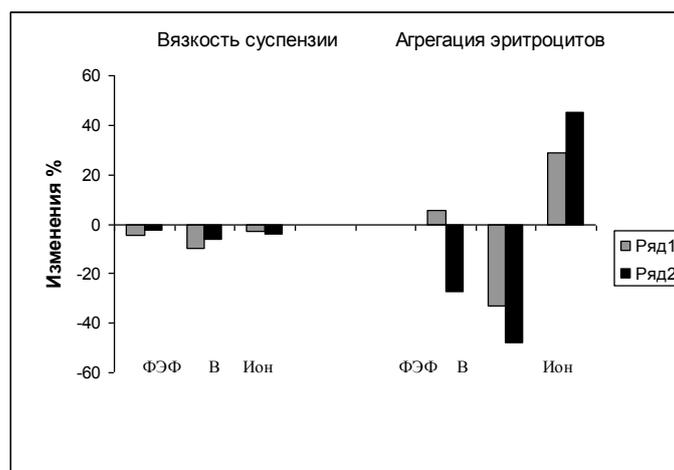


Рис. 2. Изменение микрореологии эритроцитов под влияние стимулирования ПКС и входа Ca²⁺ в клетки

Обозначения: ФЭФ – фенфлурамин, В – верапамил, Ион – ионофор кальция, Ряд 1 – контроль, Ряд 2 – сахарный диабет 2 типа, ПА – показатель агрегации, ВС – вязкость суспензии эритроцитов

Блокатор кальциевых каналов верапамил и кальциевый ионофор умеренно снижали вязкость суспензий эритроцитов в обеих группах (Рис. 2). Под влиянием кальциевого ионофора было отмечено повышение агрегации как в группе контроля (на 29 %), так и в группе СД2, где изменения были наиболее выражены и составили 45 % ($p < 0.05$). При инкубации с верапамилом было обнаружено снижение агрегации в обеих группах. В группе СД2 эти изменения составили 10 % ($p < 0.05$), в группе контроля 6 % ($p < 0.05$).

В результате исследования было установлено, что при стимулировании аденилатциклазного сигнального каскада происходят меньшие изменения микрореологии эритроцитов у лиц с диабетом, чем в контроле. Однако позитивный эффект цилостазола на агрегацию эритроцитов был более выражен в группе с метаболическими расстройствами, а эффект пентоксифиллина напротив в меньшей степени снижал агрегацию у лиц с диабетом, чем у здоровых лиц. Таким образом, результаты, полученные в контрольной группе, согласуются с литературными данными [2, 10]. Важно заметить, что стимулятор аденилатциклазы форсколин у лиц с сахарным диабетом 2 типа снижал агрегацию эритроцитов до значений практически здоровых лиц.

Блокирование входа кальция в клетку, повышение кальция внутри клетки и стимулирование протеинкиназы С умеренно снижали вязкость

суспензии эритроцитов, что вероятно свидетельствует об отсутствии участия системы Ca²⁺ – кальмодулин – ПКС в изменении деформируемости эритроцитов.

Был обнаружен более сильный эффект блокатора каналов Ca²⁺ на снижение агрегации эритроцитов у лиц с сахарным диабетом 2 типа. Повышение внутриклеточного уровня Ca²⁺ приводило к приросту агрегации эритроцитов, показатель агрегации эритроцитов при этом был выше у лиц с метаболическими нарушениями. Однако существенно не сказывалось на текучести и деформируемости эритроцитов.

Выводы

1. Исследуемые компоненты системы аденилатциклаза – циклический АМФ, повышающие уровень цАМФ, имели менее выраженный положительный эффект на текучесть суспензии эритроцитов у лиц с метаболическими расстройствами, чем у практически здоровых лиц. Селективный ингибитор фосфодиэстеразы3 цилостазол и стимулятор аденилатциклазы форсколин приводили в большей степени снижали агрегацию эритроцитов у лиц с диабетом, чем у здоровых лиц.

2. Изменение внутриклеточной концентрации Ca²⁺ и стимулирование кальцийзависимой протеинкиназы С заметно увеличивали агрегацию эритроцитов, но менее существенно влияло на их текучесть и деформируемость.

Библиографический список

1. Левтов, В. А., Регирер, С. А., Шадрина, Н. Х. Реология крови [Текст] / В. А. Левтов, С. А. Регирер, Н. Х. Шадрина. – М.: Медицина, 1982. – 272 с.
2. Муравьев, А. В. Роль активации аденилатциклазной системы эритроцитов в изменении микрореологиче-

ских свойств их мембран [Текст] / А. В. Муравьев, С. В. Булаева, В. Б. Кошелев, О. Е. Фадюкова, И. А. Тихомирова, А. А. Маймистова // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. – 2011. – Т. 28. – № 3. – С. 174–180.

3. Babu N., Singh M. Analysis of aggregation parameters of erythrocytes in diabetes mellitus. // *Clin Hemorheol Microcirc.* – 2005. – Vol. 32. – № 4. – P. 269–277.
4. Baskurt O. K., Hardeman M. R., Rampling W., Meiselman H. J. Handbook of hemorheology and Hemodynamics. – IOS Press, 2007. – 456 p.
5. Gambhir K. K., Archer J. A., Bradley C. J. Characteristics of human erythrocyte insulin receptors. // *Diabetes.* – 1978. – № 27. – P. 701–708.
6. Garnier M., Attali J. R., Valensi P., Delatour-Hanss E., Gaudey F., Koutsouris D. Erythrocyte deformability in diabetes and erythrocyte membrane lipid composition. // *Metabolism.* – 1990. – Vol. 39. – № 8. – P. 794–798.
7. Le Dévéhat C., Vimeux M., Khodabandehlou T. Blood rheology in patients with diabetes mellitus // *Clin Hemorheol Microcirc.* – 2004. – Vol. 30. – № 3–4. – P. 297–300.
8. Minetti G., Ciana A., Balduini C. Differential sorting of tyrosine kinases and phosphotyrosine phosphatases acting on band 3 during vesiculation of human erythrocytes. // *Biochem. J.* – 2004. – Vol. 377. – P. 489–497.
9. Muravyov A. V., Bulaeva S. V., Maimistova A. A., Tikhomirova I. A., Mikhailov P. V., Muravyov A. A. Role of protein kinases of human red cell membrane in

deformability and aggregation changes. // *Human Physiology.* 2012. – Т. 38. – № 2. – С. 200–205.

10. Muravyov A. V., Yakusevich V. V., Maimistova A. A., Chuchkanov F. A., Bulaeva S. V. Hemorheological efficiency of drugs, targeting on intracellular phosphodiesterase activity: in vitro study. // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2007. – Vol. 24. – P. 19–23.

11. Oonishi T., Sakashita K., Uysaka N. Regulation of red blood cell filtrability by Ca²⁺ influx and cAMP-mediated signaling pathways. // *Am. J. Physiol.* 1997. – Vol. 273. – P. 1828–1834.

12. Shin S., Ku Y., Babu N., Singh M. Erythrocyte deformability and its variation in diabetes mellitus. // *Indian J Exp Biol.* – 2007. – Vol. 45. – № 1. – P. 121–128.

13. Shpakov A. O., Kuznetsova L. A., Plesneva S. A., Kolychev A. P., Bondareva V. M., Chistyakova O. V., Pertseva M. N. Functional defects in adenylyl cyclase signaling mechanisms of insulin and relaxin action in skeletal muscles of rat with streptozotocin type 1 diabetes. // *Cent. Eur. J. Biol.* – 2006. – V. 1. – № 4. – P. 530–544.

14. Singh M., Shin S. Changes in erythrocyte aggregation and deformability in diabetes mellitus: a brief review. // *Indian J Exp Biol.* – 2009. – Vol. 47. – № 1. – P. 7–15.

Bibliograficheskij spisok

1. LevtoV, V. A., Regirer, S. A., Shadrina, N. H. Реология крови [Текст] / V. A. LevtoV, S. A. Regirer, N. H. Shadrina. – М. : Medicina, 1982. – 272 с.
2. Murav'jov, A. V. Rol' aktivacii adenilatciklaznoj sistemy jeritrocitov v izmenenii mikroreologicheskikh svojstv ih membran [Текст] / A. V. Murav'jov, S. V. Bulaeva, V. B. Koshelev, O. E. Fadjukova, I. A. Tihomirova, A. A. Majmistova // *Biologicheskie membrany: Zhurnal membrannoj i kletочноj biolo-gii.* – 2011. – Т. 28. – № 3. – С. 174–180.
3. Babu N., Singh M. Analysis of aggregation parameters of erythrocytes in diabetes mellitus. // *Clin Hemorheol Microcirc.* – 2005. – Vol. 32. – № 4. – P. 269–277.
4. Baskurt O. K., Hardeman M. R., Rampling W., Meiselman H. J. Handbook of hemorheology and Hemodynamics. – IOS Press, 2007. – 456 p.
5. Gambhir K. K., Archer J. A., Bradley C. J. Characteristics of human erythrocyte insulin receptors. // *Diabetes.* – 1978. – № 27. – P. 701–708.
6. Garnier M., Attali J. R., Valensi P., Delatour-Hanss E., Gaudey F., Koutsouris D. Erythrocyte deformability in diabetes and erythrocyte membrane lipid composition. // *Metabolism.* – 1990. – Vol. 39. – № 8. – P. 794–798.
7. Le Dévéhat C., Vimeux M., Khodabandehlou T. Blood rheology in patients with diabetes mellitus. // *Clin Hemorheol Microcirc.* – 2004. – Vol. 30. – № 3–4. – P. 297–300.
8. Minetti G., Ciana A., Balduini C. Differential sorting of tyrosine kinases and phosphotyrosine phosphatases

acting on band 3 during vesiculation of human erythrocytes. // *Biochem. J.* – 2004. – Vol. 377. – P. 489–497.

9. Muravyov A. V., Bulaeva S. V., Maimistova A. A., Tikhomirova I. A., Mikhailov P. V., Muravyov A. A. Role of protein kinases of human red cell membrane in deformability and aggregation changes. // *Human Physiology.* 2012. – Т. 38. – № 2. – С. 200–205.

10. Muravyov A. V., Yakusevich V. V., Maimistova A. A., Chuchkanov F. A., Bulaeva S. V. Hemorheological efficiency of drugs, targeting on intracellular phosphodiesterase activity: in vitro study. // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2007. – Vol. 24. – P. 19–23.

11. Oonishi T., Sakashita K., Uysaka N. Regulation of red blood cell filtrability by Ca²⁺ influx and cAMP-mediated signaling pathways. // *Am. J. Physiol.* 1997. – Vol. 273. – P. 1828–1834.

12. Shin S., Ku Y., Babu N., Singh M. Erythrocyte deformability and its variation in diabetes mellitus. // *Indian J Exp Biol.* – 2007. – Vol. 45. – № 1. – P. 121–128.

13. Shpakov A. O., Kuznetsova L. A., Plesneva S. A., Kolychev A. P., Bondareva V. M., Chistyakova O. V., Pertseva M. N. Functional defects in adenylyl cyclase signaling mechanisms of insulin and relaxin action in skeletal muscles of rat with streptozotocin type 1 diabetes. // *Cent. Eur. J. Biol.* – 2006. – V. 1. – № 4. – P. 530–544.

14. Singh M., Shin S. Changes in erythrocyte aggregation and deformability in diabetes mellitus: a brief re-view. // *Indian J Exp Biol.* – 2009. – Vol. 47. – № 1. – P. 7–15.