

### Библиографический список

1. Галенок, В.А., Гостинская, Е.В., Диккер, В.Е. Гемореология при нарушениях углеводного обмена [Текст] / В.А. Галенок, Е.В. Гостинская, В.Е. Диккер. – Новосибирск: Наука, 1987. – 258 с.
2. Джонсон, П. Периферическое кровообращение [Текст] / П. Джонсон. – М.: Медицина, 1982. – 396 с.
3. Каро, К., Педли, Т., Шротер, Р., Сид, У. Механика кровообращения [Текст] / К. Каро, Т. Педли, Р. Шротер, У. Сид. – М.: Мир, 1981. – 623 с.
4. 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.
5. Уилкинсон, У.Л. Неньютоновские жидкости [Текст] / У.Л. Уилкинсон. – М.: Мир, 1964. – 216 с.
6. Dintenfass L. Clinical Applications of Hemorheology [Текст] / L. Dintenfass In.: The Rheology of blood, blood vessels and associated tissues. – Oxford Press, 1981. – P. 22-50.
7. Mohandas, N., Chasis, J.A., Shohet, S.B. The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape [Текст] / N. Mohandas et al. – Semin Hematol. – 1983. – Vol. 20 (3). – P. 225-242.
8. Manno, S., Takakuwa, Y., Nagao, K. and Mohandas, N. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by beta-spectrin phosphorylation and dephosphorylation [Текст] / S. Manno et al, J Biol Chem., 1995. – Vol. 270 (10). – P. 5659-5665.
9. Nash, G.B., Meiselman, H.J. Effect of Dehydration on the Viscoelastic Behavior of Red Cells [Текст] / G.B. Nash, H.J. Meiselman Blood Cells, 1991. – Vol. 17. – P. 517-522.
10. Secomb, T.W. Flow – Dependent Rheological properties of blood in capillaries [Текст] / T.W. Secomb. – Microvasc.Res., 1987. – Vol. 34. – P. 46-58.
11. Chien, S., Usami, S., Skalak, R. Blood flow in small tubes [Текст] / S. Chien et al. – Handbook of physiology. Bethesda, 1984. – Sec.2. – Vol. 4. – Pt. 1. – P. 217-246.

**А.В. Муравьев, И.А. Тихомирова, С.В. Булаева,  
А.А. Маймистова, П.В. Михайлов, Е.В. Круглова**

### АНАЛИЗ ОСНОВНЫХ ФАКТОРОВ, СВЯЗАННЫХ С МЕХАНИЗМАМИ ИЗМЕНЕНИЯ ДЕФОРМИРУЕМОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ

Эффективная оксигенация перфузии тканевых микрорайонов зависит в значительной степени от оптимальной деформируемости эритроцитов. Анализ механизмов изменения микрореологических характеристик эритроцитов показал, что проявление разной степени деформируемости клеток связано с активацией и ингибированием вне- и внутриклеточных сигнальных путей, ассоциированных с плазматической мембраной.

Red blood cell deformability (RBCD) plays a critical role in tissue perfusion. It was shown that RBC microrheological control mechanisms were associated with an activation or inhibition of extracellular signaling pathways. The most probably they are: adenylyl cyclase – cAMP cascade and calcium one. In addition intracellular signaling cascades can include a system of protein tyrosine kinases and phosphatases, that expressed in red cell membrane.

#### Введение

Исследованиями, проведенными в последние десятилетия, показано, что важнейшим свойством эритроцитов, обуславливающим их способность выполнять транспортные функции в системе сосудов микроциркуляции, является деформируемость [1, 7, 9]. Она зависит от функциональной геометрии клетки, ее мембранной вязкоэластичности и цитоплазматической вязкости [6, 15, 20]. Внутренняя среда эритроцита представляет собой ньютоновскую жидкость, и ее вязкость в основном зависит от концентрации гемоглобина [8]. Вместе с тем, вязкость внутреннего содержимого эритроци-

тов вносит существенный вклад в деформируемость клетки только при высоких концентрациях гемоглобина > 50 г/дл [15], тогда как при его нормальных концентрациях деформация эритроцитов в основном связана с эластичностью мембраны клетки [10, 11, 16].

В связи с рассмотрением мембраны эритроцитов как наиболее ответственной за клеточную деформируемость структуры, важно иметь в виду, что имеется большое число фактов, свидетельствующих о ведущей роли фосфорилирования интегральных белков мембраны и спектринового цитоскелета клетки в изменении ее стабильности и пластичности в целом [12,

13, 14]. Однако значительно меньше известно о начальных и промежуточных звеньях сигнальных каскадов (о первичных и вторичных мессенджерах), связанных с изменениями деформируемости эритроцитов в нормальных и патологических условиях.

С учетом вышесказанного целью настоящей работы явилось исследование клеточных и молекулярных механизмов, ответственных за изменение деформируемости эритроцитов.

#### **Материал и методы исследования**

На первом этапе настоящего исследования регистрировали величину деформируемости эритроцитов у лиц в нормальных (здоровые испытуемые и тренированные спортсмены) и патологических условиях (пациенты с хронической артериальной недостаточностью сосудов нижних конечностей, с диабетом II типа и со злокачественными опухолями). Были сформированы несколько групп наблюдений:

- первая группа – контроль – 14 здоровых мужчин, в возрасте от 20 до 38 лет лиц, не имеющих регулярных физических нагрузок;
- вторая группа – спортсмены – 12 здоровых мужчин (кандидатов и мастеров спорта) в возрасте от 18 до 32 лет, регулярно получающих аэробные физические нагрузки;
- третья группа – больные (мужчины, возраст – от 36 до 65 лет, n=16), страдающие хронической артериальной недостаточностью сосудов нижних конечностей (ХАН).

Цельную кровь получали венопункцией. В качестве антикоагулянта использовали гепарин. Эритроциты отделяли от плазмы центрифугированием (20 мин при 3000 об/мин.). Затем эритроциты отмывали трижды в изотоническом растворе хлорида натрия, содержащем глюкозу (5,0 мМ).

Был проведен анализ механизмов изменения деформируемости эритроцитов. Для этого клетки разделяли в градиенте плотности на молодые (10% - верхняя фракция) и старые эритроциты (10% - нижняя фракция плотных клеток) и регистрировали степень их деформируемости. Кроме того, оценивали влияние на деформируемость эритроцитов разной величины приложенного напряжения сдвига. Для этого в проточной микрокамере создавали три уровня сдвигового напряжения: 0,40 Н·м-2, 0,78 Н·м-2 и 1,20 Н·м-2 и регистрировали степень удлинения эритроцитов в сдвиговом потоке. Для исключения роли цитоплазматической вязкости регистрировали степень деформации вос-

становленных теней эритроцитов, заполненных изотоническим раствором известной вязкости.

Для анализа молекулярных механизмов изменения деформации эритроцитов их инкубировали с внеклеточными сигнальными молекулами – агонистом бета-адренорецепторов изопротеренолом (10-6 М); внутриклеточными сигнальными молекулами – стимулятором аденилатциклазы форсколином (10-5 М), проникающим аналогом циклического АМФ (10-5 М), блокатором кальциевых каналов верапамилом (10-5М).

Суспензии эритроцитов, приготовленные в изотоническом растворе NaCl (Hct= 40%), инкубировали с препаратом в течение 15 мин при 37°C. В этих сериях исследования в качестве контроля использовали суспензии эритроцитов, в изотоническом растворе без добавления препаратов.

Деформируемость эритроцитов регистрировали и оценивали двумя методами: 1) регистрировали вязкость суспензий эритроцитов с Hct=40% на полуавтоматическом капиллярном вискозиметре при шести напряжениях сдвига (от 0,20 до 2,00 Нм-2). Все измерения выполнены при комнатной температуре. 2) определяли индекс удлинения эритроцитов (ИУЭ; [4]) в проточной микрокамере. Ее заполняли суспензией эритроцитов (0,5%) в изотоническом растворе NaCl, содержащем 0,1% альбумина, и помещали на предметный столик микроскопа. В микрокамеру подавали давление, которое создавало в ней определенную величину напряжения сдвига (длина микрокамеры – 3,5 см, ширина – 0,95 см, а высота – 120 мкм). Величина напряжения сдвига ( $\tau$ ) в камере рассчитывалась по формуле:

$$\tau = \frac{6\eta Q}{Wh^2},$$

где  $\eta$  – вязкость суспензии (примерно – 1,0 мПа·с), Q – объемная скорость в микрокамере, W – ширина проточного канала микрокамеры, h – высота канала (от 100 до 120 мкм).

Изображение растянутых потоком жидкости прикрепленных одной точкой к поверхности микроканала эритроцитов передавалось через USB порт в компьютер с использованием цифрового окуляра (модель DCM500). После «захвата» и записи изображения его анализировали в программе Photoshop, где определяли длину и ширину деформированных клеток

(около 100) и рассчитывали индекс удлинения как показатель деформации:

$$ИУЭ = \frac{L - W}{L + W},$$

где L- длина деформированной клетки, W – ее ширина.

Гематокрит определяли путем центрифугирования на гематокритной центрифуге СМ-70.

Статистическую обработку, цифрового материала проводили, используя табличный редактор Microsoft Excel.

### Результаты

#### 1. Изменение деформируемости эритроцитов в нормальных и патологических условиях

Анализ величин деформируемости эритроцитов в разных группах показал, что она существенно различалась (рис. 1). Регистрация вязкости суспензии эритроцитов и определение индекса их удлинения показали, что в группе спортсменов параметры деформируемости достоверно выше, чем в контроле. Различия составили от 12 до 22% и были статистически достоверными ( $p < 0,05$ ).

В патологических условиях, особенно в группе с диабетом, деформируемость эритроцитов была ниже, чем в контроле. Различия составили: 14% ( $p < 0,05$ ) для вязкости суспензий клеток и на 19% меньше была величина индекса удлинения эритроцитов (рис. 1;  $p < 0,01$ ).

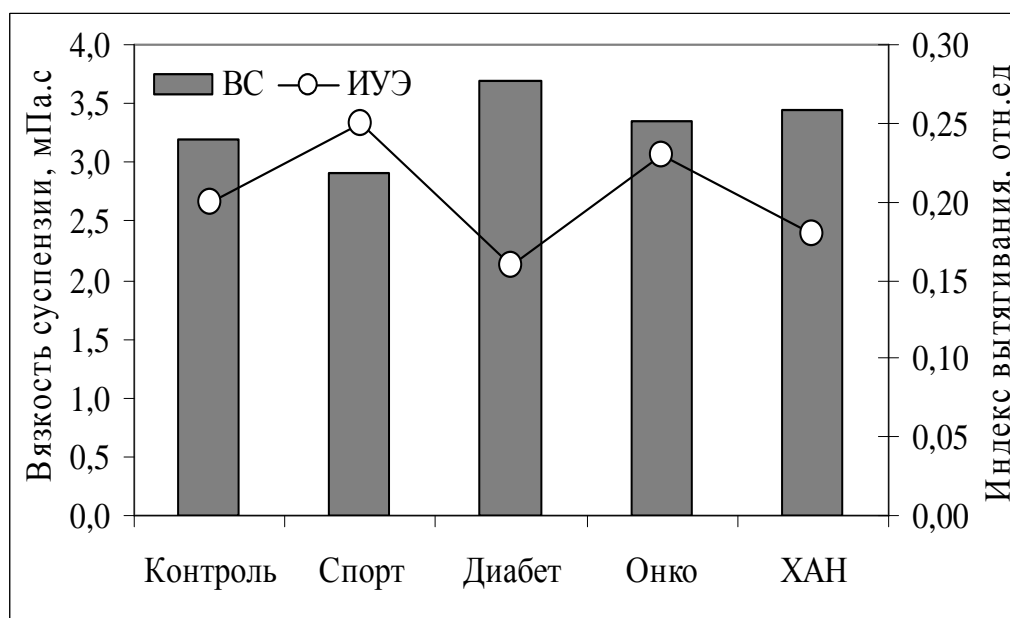


Рис. 1. Сравнительные данные вязкости суспензии эритроцитов и индекса их удлинения (ИУЭ) в разных группах наблюдений в нормальных и патологических условиях

Умеренное снижение степени деформируемости эритроцитов по обеим характеристикам было выявлено и в группе лиц с ХАН. Здесь различия с контролем составили от 6 до 14%, соответственно для вязкости суспензии и для ИУЭ ( $p < 0,05$ ).

#### 2. Анализ механизмов изменения деформируемости эритроцитов

Полученные данные позволили выполнить сравнение показателей вязкости суспензии эритроцитов со стандартным гематокритом и при постоянной вязкости суспензионной среды

с индексом удлинения эритроцитов в сдвиговом потоке в микрокамере. Было показано, что имеется выраженная отрицательная корреляция между этими двумя показателями с величиной коэффициента корреляции,  $r = -0,917$  ( $p < 0,01$ ). Активизация внутриклеточных сигнальных путей может сопровождаться изменением мембранной эластичности. Было получено, что стимулирование аденилатциклазы (АЦ) путем инкубирования эритроцитов с форсколином (10 мкМ) на 12% снижало вязкость суспензий эритроцитов и на 33% ( $p < 0,05$ ) увеличивало степень их деформации (рис. 2).

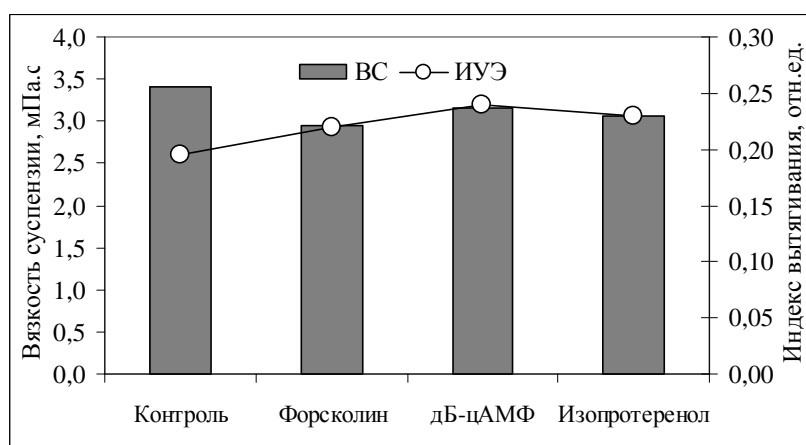


Рис. 2. Изменение вязкости суспензий эритроцитов и индекса их удлинения под влиянием стимуляторов аденилатциклазы (форсколин, 10 мкМ, дБ-цАМФ, 100 мкМ, изопроterenол, 1,0 мкМ)

Сходный эффект наблюдали при инкубации эритроцитов со стабильным аналогом цАМФ (дибутирильным производным цАМФ, 100 мкМ). При этом индекс удлинения клеток возрастал с  $0,184 \pm 0,009$  (контроль) до  $0,232 \pm 0,006$  отн. ед. (дБ-цАМФ), что составило 26% и было статистически достоверным ( $p < 0,05$ ; рис. 2).

Из внеклеточных сигнальных молекул, активирующих АЦ, использовали бета-агонист изопроterenол. После инкубации эритроцитов с этим препаратом наблюдали снижение вязкости суспензий эритроцитов на 10% ( $p < 0,05$ ), а индекс удлинения возрос на 22% ( $p < 0,05$ ; рис. 2).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о заметном повышении деформируемости эритроцитов при стимулировании аденилатциклазного сигнального пути.

### Обсуждение результатов

Полученные данные позволили установить, что в физиологических условиях у спортсменов имелась относительно высокая деформируемость и текучесть суспензий эритроцитов. Адаптивная роль этих микрореологических изменений понятна – в условиях напряженной мышечной деятельности требуется интенсифицировать доставку кислорода в тканевые микрорайоны. Известно, что высокая степень деформируемости эритроцитов коррелирует с приростом эффективности транспорта и доставки кислорода, а также и с аэробной работоспособностью [5].

В патологических условиях, при метаболических нарушениях и сосудистых расстройствах, деформируемость эритроцитов была ни-

же, чем у здоровых лиц. Одной из причин снижения этой характеристики эритроцитов может быть избыток ионов кальция в среде [3, 4, 7]. Было показано, что при повышении концентрации  $Ca^{2+}$  в сыворотке крови при ряде патологических состояний наблюдается снижение деформации эритроцитов [19]. В модельных опытах с повышением входа  $Ca^{2+}$  в эритроциты, при механическом стрессе, было зарегистрировано выраженное уменьшение фильтруемости эритроцитов через 5 мкм поры [18]. С другой стороны, повышение активности аденилатциклазы (АЦ) эритроцитов сочеталось с приростом текучести их суспензий и достоверным увеличением индекса деформации. Две внутриклеточные сигнальные системы – «аденилатциклаза – цАМФ – протеинкиназа А» и « $Ca^{2+}$  – кальмодулин» могут находиться в антагонистических взаимоотношениях [2]. Следовательно, стимулирование АЦ в эритроцитах форсколином или дБ-цАМФ может не только повышать активность протеинкиназы А и способствовать фосфорилированию белков мембранного цитоскелета, но и блокировать вход  $Ca^{2+}$  в клетку [12]. В то же время фосфорилирование мембранных белков эритроцитов полосы 4,1 и анионного транспортера – полосы 3 сочетается с повышением пластичности клетки в целом [13, 17]. Следовательно, эффекторами, ответственными за повышение пластичности мембраны в целом могут быть, наряду со спектрином [11], указанные выше интегральные белки.

Эритроциты млекопитающих являются простым типом клеток, лишенных ядра и аппарата для синтеза белков и многих сигнальных путей. Несмотря на эту простоту конструкции клетки, зрелые эритроциты сохранили большое

число молекулярных компонентов сигнальных и/или регуляторных путей [14].

Таким образом, полученные в исследовании данные свидетельствуют о том, что в физиологических условиях (при длительной адаптации к мышечным нагрузкам аэробного характера) происходит повышение деформируемости эритроцитов, что должно обеспечить более эф-

фективную перфузию тканей и их оксигенацию. Эти адаптивные изменения могут быть связаны с активацией аденилатциклазной системы в эритроцитах. В условиях патологии выявленное снижение деформируемости эритроцитов может быть обусловлено нарушениями баланса внутриклеточных сигнальных систем.

### Библиографический список

1. Галенок, В.А., Гостинская, Е.В., Диккер, В.Е. Гемореология при нарушениях углеводного обмена [Текст] / В.А. Галенок, Е.В. Гостинская, В.Е. Диккер. – Новосибирск: Наука, 1987. – 258 с.
2. Фаллер, Д., Шилдс, Д. Молекулярная биология клетки [Текст] / Д. Фаллер, Д. Шилдс. – М.: БИНОМ-Пресс, 2003. – 272 с.
3. Barbone, F.P., Johnson D.L., Farrell, F.X., et al. New epoetin molecules and novel therapeutic approaches [Текст] / F.P. Barbone et al. – *Nephrol Dial Transplant*, 1999. – Vol.14. – Suppl 2. – P. 80-88.
4. Chien, S. Rheology of Sickle Cells and Erythrocyte Content [Текст] / S. Chien. – *Blood Cells*, 1977. – Vol. – 3. – P. 283-303.
5. Dormandy, J.A. Blood viscosity and cell deformability [Текст] / J.A. Dormandy – In.: *Methods in Angiology*. – London, 1980. – P. 214-266.
6. Fischer, D.J., Torrence, N.J., Sprung, R.J., Spence, D.M. Determination of erythrocyte deformability and its correlation to cellular ATP release using microbore tubing with diameters that approximate resistance vessels in vivo [Текст] / D.J. Fischer et al. – *Analyst*, 2003. – Vol. 128 (9). – P. 1163-1168.
7. Hochmuth, R.M., Waugh, R.E. Erythrocyte membrane elasticity and viscosity [Текст] / R.M. Hochmuth, R.E. Waugh. – *Ann. Rev. Physiol.* – 1987. – Vol. 49. – P. 209-219.
8. Ling, E., Danilov, Y.N., Cohen, C.M. Modulation of red cell band 4.1 function by cAMP-dependent kinase and protein kinase C phosphorylation [Текст] / E. Ling et al. – *J Biol Chem*, 1988. – Vol.15. – 263(5). – P. 2209-2216.
9. Manno, S., Takakuwa, Y. and Mohandas, N. Modulation of Erythrocyte Membrane Mechanical Function by Protein 4.1 Phosphorylation [Текст] / S. Manno et al. – *Biol. Chem.*, 2005. – Vol. 280. – Issue 9. – P. 7581-7587.
10. Mallozzi, C., Di Stasi, A.M. and Minetti, M. Peroxynitrite modulates tyrosine-dependent signal transduction pathway of human erythrocyte band 3 [Текст] / C. Mallozzi et al. – *FAS EB.*, 1997. – Vol. 11. – P. 1281-1290.
11. Nash, G.B., Meiselman, H.J. Effect of Dehydration on the Viscoelastic Behavior of Red Cells [Текст] / G.B. Nash, H.J. Meiselman. – *Blood Cells*, 1991. – Vol. 17. – P. 517-522.
12. Nunomura, W., Takakuwa, Y. Regulation of protein 4.1R interactions with membrane proteins by Ca<sup>2+</sup> and calmodulin [Текст] / W. Nunomura, Y. Takakuwa. – *Front Biosci.*, 2006. – Vol. 11. – P. 1522-1539.
13. Oliveira, S., Silva-Herdade, A.S. and Saldanha, C. Modulation of erythrocyte deformability by PKC activity [Текст] / S. Oliveira et al. – *Clin. Hemorheol. and Microcirculation*, 2008. – Vol. 39. – P. 363-373.
14. Oonishi, T., Sakashita, K., Uysaka, N. Regulation of red blood cell filterability by Ca<sup>2+</sup> influx and cAMP – mediated signaling pathways [Текст] / T. Oonishi et al. – *Am. J. Physiol.*, 1997. – V.273. (Cell. Physiol. 42). – P. 1828-1834.
15. O’Rear, E.A., Udden, M.M., Farmer, J.A., et al. Increased intracellular calcium and decreased deformability of erythrocytes from prosthetic heart valve patients [Текст] / E.A. O’Rear et al. – *Clin.Hemorheol.*, 1984. – Vol. 4. – P. 461-471.
16. Sandhagen, B. Red cell fluidity in hypertension [Текст] / B. Sandhagen. – *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 1999. – Vol. 21. – N. 3-4. – P. 179-181.
17. Stuart, J., Nash, G.B. Red cell deformability and haematological disorders [Текст] / J. Stuart, G.B. Nash. – *Blood Rev.*, 1990, 4 (3): 141-147.
18. Takakuwa, Y. Mohandas, N. Ishibashi, T. Regulation of red cell membrane deformability and stability by skeletal protein network [Текст] / Y. Takakuwa. – *Biorheology*, 1990. – Vol.27(3-4). – P. 357-65.
19. Takakuwa, Y. Protein 4.1, a multifunctional protein of the erythrocyte membrane skeleton: structure and functions in erythrocytes and nonerythroid cells [Текст] / Y. Takakuwa. – *Int J. Hematol.*, 2000. – Vol. 72 (3). – P. 298-309.
20. Yoshimura, A., Arai, K. Physician Education: The Erythropoietin Receptor and Signal Transduction [Текст] / A. Yoshimura, K. Arai. – *Oncologist*, 1996. – Vol. 1. – P. 337-339.

Работа поддержана грантом РФФИ № 07-04-12244офи