

О.А. Овчинникова, И.А. Тихомирова

Оценка механизмов влияния аденозинергических соединений на реологические свойства крови

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

Действие аденозинергических средств на эритроциты опосредуется через P₂-пуринорецепторы. Показан выраженный позитивный эффект агониста P_{2x}-пуринорецепторов на реологические свойства крови.

Ключевые слова: АТФ, аденозин, P_{2x}-рецепторы, гемореология, мембрана, эритроциты

O.A.Ovchinnikova, I.A.Tikhomirova

Estimation of Mechanisms of Adenosinergic Substance Influence on Rheological Blood Properties

Effect of adenosinergic substances on erythrocytes is mediated by the activation of special P₂purinoreceptors. Our data indicated the apparent positive effect of agonist P_{2x}-purine receptors on rheological blood properties.

Key words: ATP, adenosine, P_{2x}-receptors, Hemorheology, membrane, erythrocytes.

Введение

Действие аденозинергических средств обусловлено как непосредственным взаимодействием с аденозиновыми (пуриновыми) рецепторами, так и опосредованным влиянием на распад и накопление аденозина (один из пуриновых нейромодуляторов). Внеклеточные эффекты пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов опосредуются через специальные, чувствительные к ним P₂ рецепторы, наличие которых доказано во многих тканях и органах животных и человека [1].

Аденозинтрифосфорная кислота (АТФ) в течение длительного времени рассматривалась лишь как внутриклеточный аккумулятор энергии. Однако в начале 70-х годов прошлого века G. Burnstock сформулировал гипотезу о медиаторной роли АТФ, которая к настоящему времени нашла убедительные подтверждения. Было показано, что АТФ, наряду с некоторыми другими пуриновыми и пиримидиновыми нуклеотидами, способна регулировать многие внутриклеточные процессы посредством влияния на специфические рецепторы для них – P₂-рецепторы [1]. Установлено, что в организме животных P₂-рецепторы участвуют в регуляции сосудистого тонуса, гемостаза, функций многих внутренних органов. Однако физиологическая и патофизио-

логическая роль этих рецепторов в организме человека до сих пор остается мало изученной.

Ранее нами было показано, что энергетический баланс эритроцитов и воздействие на них аденозинергических соединений (в частности, АДФ) отражаются на реологических свойствах крови [6]. Чтобы выяснить, является ли такое воздействие специфическим, мы предприняли настоящее исследование, целью которого было определить возможный механизм аденозинергических влияний на гемореологические свойства.

Материалы и методы

Исследование выполнялось на образцах крови практически здоровых доноров-добровольцев, лиц обоего пола (n=26), в возрасте от 19 до 23 лет. Кровь забиралась венопункцией в условиях стационара квалифицированным медицинским персоналом. Эритроциты отделяли центрифугированием и после трехкратной отмывки инкубировали при 37°C в физиологическом растворе (контроль) и в растворах препаратов, взаимодействующих с пуринергическими рецепторами мембраны эритроцитов (эксперимент). В качестве агониста данных рецепторов использовали препарат М7510 (βγ-methyleneadenosine-5'-

triphosphate disodium salt, SIGMA, 10^{-6} M), селективный агонист P_{2X} -рецепторов. В качестве антагониста – MRS 2159 (SIGMA, 10^{-4} M), являющейся антагонистом P_{2X1} -рецепторов мембраны эритроцитов. Затем инкубационный раствор удаляли, а клетки ресуспендировали в аутоплазме при фиксированном значении гематокрита (для измерения степени агрегации эритроцитов) или в неагрегирующей среде – физиологическом растворе (для оценки деформируемости клеток).

Для измерения кажущейся вязкости использовали полуавтоматический вискозиметр. Степень агрегации эритроцитов оценивали методом оптической микроскопии с видеорегистрацией и компьютерным анализом изображения. Это позволило рассчитать отношение числа агрегатов к количеству неагрегированных клеток, которое

рассматривали как показатель агрегации эритроцитов. О деформируемости красных клеток крови судили по индексу элонгации (ИЭ) в проточной микрокамере в сдвиговом потоке при фиксированном напряжении сдвига 0,78 Па. При деформационном сдвиге из клетки вытягивается участок мембраны в той точке, где она прикреплена к поверхности микроканала. Изображение растянутых потоком жидкости эритроцитов передавалось через USB порт в компьютер с использованием цифрового окуляра (рис.1). После записи изображения его анализировали с помощью программы Adobe Photoshop, где определяли длину и ширину деформированных клеток (около 100) и рассчитывали индекс удлинения эритроцитов как показатель их деформации [5].

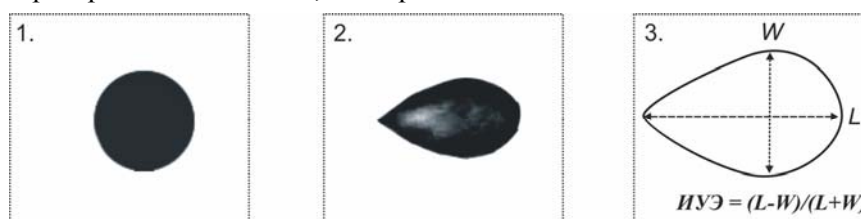


Рис. 1. Недеформированный эритроцит до приложения сдвигового напряжения (1); деформированный эритроцит, закрепленный одной «точкой» ко дну микрокамеры при помощи альбуминового мостика (2); формула расчета индекса удлинения: $ИУЭ = (L-W)/(L+W)$ (3).

Данные, полученные в ходе исследования, были обработаны методами математической статистики, в случае нормального распределения использовали параметрические критерии, при оценке влияния препарата – парный критерий Стьюдента.

При отклонении распределения от нормального закона пользовались непараметрическими

критериями. Для выявления взаимосвязи между изучаемыми параметрами были рассчитаны коэффициенты ранговой корреляции.

Результаты и обсуждение

Основные реологические показатели крови представлены в табл. 1.

Таблица 1

Реологические показатели крови под воздействием агониста и антагониста P_{2X} -пуринергических рецепторов

Показатели	Контроль	Агонист	Антагонист
ВСП ₍₁₎ (мПа·с)	4,54±0,70	3,68±0,64**	4,64±0,82
ВСП ₍₂₎ (мПа·с)	5,67±0,97	4,75±0,75*	5,99±1,12
ВСП ₍₃₎ (мПа·с)	7,58±1,51	6,75±1,10*	8,17±1,56
ВСП ₍₄₎ (мПа·с)	11,28±2,46	9,04±1,77*	12,62±2,34
ВСП ₍₅₎ (мПа·с)	22,62±4,79	19,23±4,29	23,15±4,41
ВCF ₍₁₎ (мПа·с)	3,40±0,68	2,77±0,67*	3,34±0,87
ВCF ₍₂₎ (мПа·с)	4,22±0,83	3,58±0,81*	4,21±0,79
ВCF ₍₃₎ (мПа·с)	5,85±1,13	4,90±1,13*	6,28±1,23
ВCF ₍₄₎ (мПа·с)	8,93±1,76	7,16±1,58*	9,02±2,06
ВCF ₍₅₎ (мПа·с)	15,37±2,31	12,94±2,77*	17,26±2,04
СА (отн.ед.)	0,14±0,04	0,08±0,02**	0,20±0,06
D (отн.ед.)	0,26±0,04	0,33±0,04***	0,26±0,03

Обозначения: ВСП – вязкость суспензии эритроцитов в аутоплазме с гематокритом 40%; ВCF – вязкость суспензии эритроцитов в физиологическом растворе с гематокритом 40%; подстрочные индексы для напряжений сдвига: $1 - 1,06$ Па, $2 - 0,85$ Па, $3 - 0,64$ Па, $4 - 0,42$ Па, $5 - 0,21$ Па; СА – степень агрегации; D – деформируемость; различия достоверны: при * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

После инкубации красных клеток крови с агонистом пуриновых рецепторов мембраны эритроцита было выявлено достоверное снижение текучести суспензий эритроцитов при фиксированном значении $Ht=40\%$ в физиологическом растворе на 16,6% и в плазме на 17,2% по сравнению с контролем. При оценке деформируемости эритроцитов в проточной микрокамере выявлено достоверное повышение этого показателя на 24% ($p<0,01$). Способность эритроцитов

к объединению в агрегаты снижалась на 41% ($p<0,001$). При обработке клеток антагонистом не было выявлено достоверных изменений гемореологических показателей по сравнению с контролем.

Изменения вязкости суспензий эритроцитов в физиологическом растворе и в плазме при фиксированном значении $Ht=40\%$ под влиянием аденозинергических соединений представлены на рис. 2 и 3.

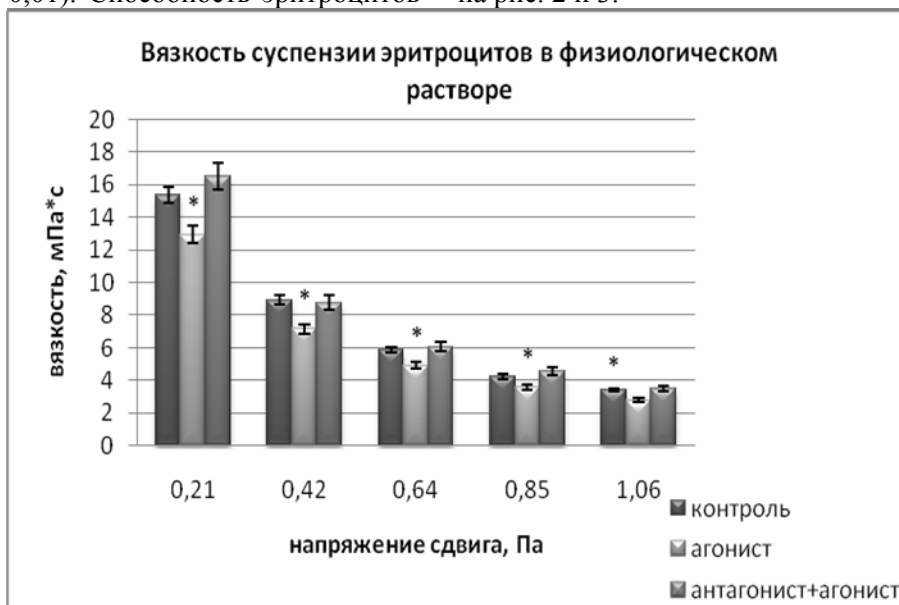


Рис.2. Вязкость суспензии эритроцитов в физиологическом растворе

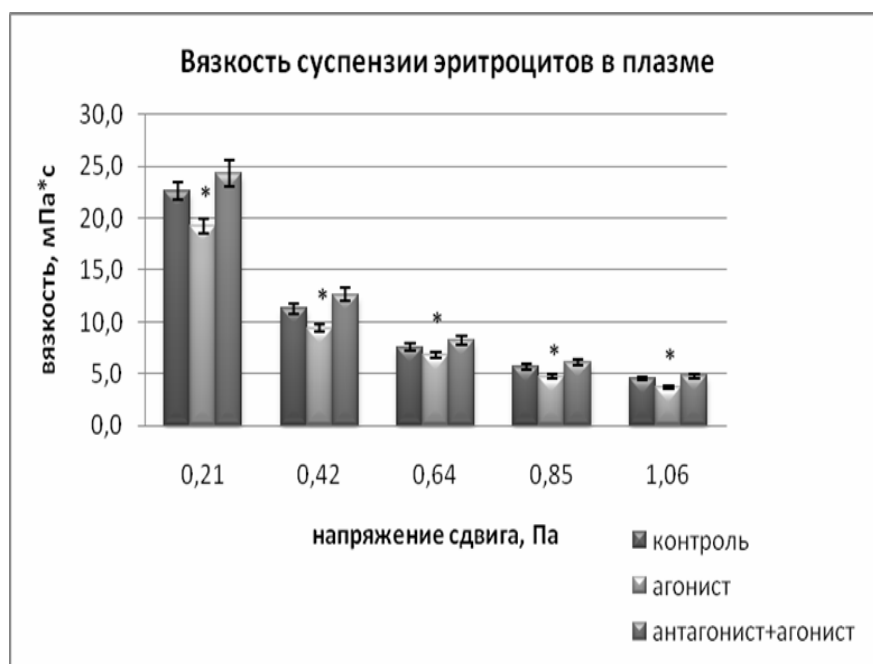


Рис.3. Вязкость суспензии эритроцитов в аутоплазме

Изменения микрореологических свойств эритроцитов под влиянием аденозинергических соединений представлены на рис. 4.

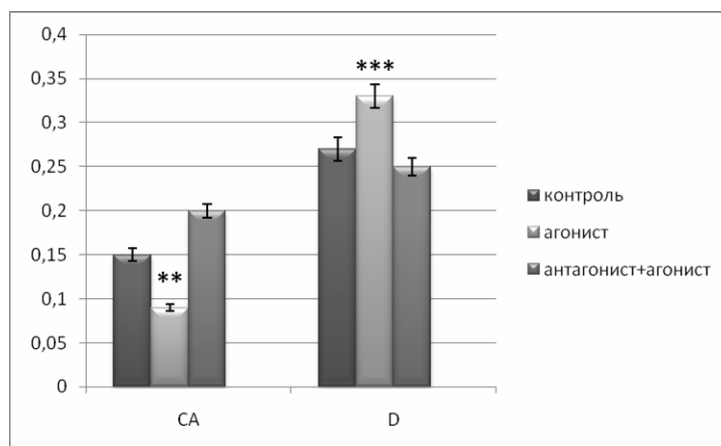


Рис.4. Изменение степени агрегации (CA) и деформируемости (D)

Пурины (аденозин, АДФ и АТФ) и пиримидины (УДФ и УТФ) относятся к важнейшим сигнальным молекулам. С уверенностью можно говорить о том, что в отношении АТФ выполнены все условия, чтобы считать его нейромедиатором, хотя в отношении других веществ пуриновой и пуринергической природы это не столь очевидно [7].

Все промежуточные метаболиты АТФ способны активировать соответствующие рецепторы. В зависимости от того, какое вещество (вещества) выступает в качестве агониста, выделяют два типа пуринорецепторов:

P1-рецепторы - активируются аденозином. Относятся к метабо-тропным рецепторам, ассоциированным с G-белком. Состоят из 320-410 аминокислот и демонстрируют 90-95 % гомологию в пределах разных групп млекопитающих.

P2-рецепторы - активируются АТФ (АДФ), УТФ (УДФ). Принципиальное отличие между двумя семействами P2-рецепторов — их молекулярная структура и механизм внутриклеточного опосредования сигнала, основанный на принадлежности к ионо- или метаботропным рецепторам. P_{2X}-рецептор (ионотропный) представляет собой длинную цепь последовательно связанных аминокислот, объединенную в несколько субъединиц (вероятнее всего три), каждая из которых представлена двумя трансмембранными сегмен-

тами. Цепи аминокислот образуют большие петли снаружи клетки из 10 цистеиновых остатков, связанных дисульфидными мостиками на каждой петле. Обои концами цепи проходит сквозь мембрану так, что оба конечных фрагмента цепи находятся внутри клетки. В цитоплазме находятся N- и C-участки, необходимые для связывания киназ (рис. 5).

Имеются N5 участки для возможной модуляции рецептора/ канала посредством двухвалентных катионов (магния, кальция, цинка и меди) и АТФ-связывающий участок, который может включать экстрацеллюлярные петли. Возбуждение P_{2X}-рецепторов приводит к открытию в мембране клеток каналов, пропускающих ряд ионов (натрий, калий, кальций), в результате чего изменяется электрический заряд на мембране. Именно это вызывает ответ клетки [3,4].

Данная группа весьма гетерогенна - выделяют семь подтипов P_{2X}-рецепторов (P_{2X1-7}), организованных в три группы [1]. Рецепторы первой группы (P_{2X1,3}) характеризуются высоким аффинитетом к АТФ, быстро активируются и десенситизируются [3]. Рецепторы второй группы (P_{2X1,4-6}) обладают низким аффинитетом к АТФ, относительно медленно активируются и десенситизируются. Рецепторы третьей группы (P_{2X7}) обладают очень низким сродством к АТФ и почти не подвержены десенситизации, они не обнаружены в нервной ткани, а локализованы на мембране тучных клеток и макрофагов.

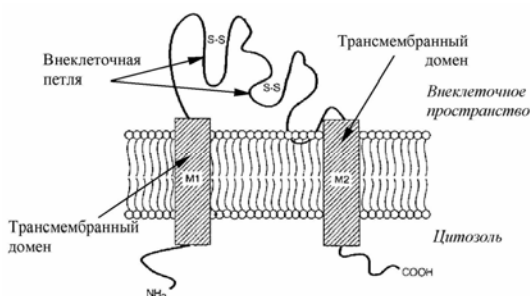


Рис. 5. Трансмембранная топология субъединицы P_{2X}-рецептора (по G. Burnstock, V. Ralevic, 1998)

Все P_{2X}-рецепторы формируют неселективную ионную пору, проницаемую для Ca²⁺ >>Na⁺>K⁺. Быстрый (10 мс) перенос указанных ионов через мембрану вызывает деполяризацию и значительно увеличивает внутриклеточную концентрацию кальция, как прямо, так и опосредованно за счет последующей активации потенциал-зависимых Ca²⁺-каналов. Это особенно важно в случаях межнейронной передачи сигнала и при регуляции сокращения гладких мышц.

P_{2Y}-рецепторы (метаболические): несмотря на то, что сообщалось о клонировании свыше десяти подобных рецепторов, только пять из них признаны истинными P_{2Y}-рецепторами (P_{2Y1,2,4,6}). Они образованы гликопротеинами и широко представлены в ткани головного мозга [7].

P_{2X}- и P_{2Y}-рецепторы широко представлены в органах и тканях млекопитающих, в том числе и человека. В доступной нам литературе нет данных по исследованию P₂-рецепторов на мембране эритроцитов. Например, рецепторы подтипа P_{2X} имеются на гладких мышцах многих внутренних органов — мочевого пузыря, семявыносящих протоков, кишечника — и опосредуют сократительные ответы этих органов. Рецепторы P_{2X5} часто выявляют в клетках тканей, находящихся на стадии интенсивного роста и дифференцировки. Стимуляция P_{2X7}-рецепторов запускает в клетке механизмы апоптоза — запрограммированной гибели. Несколько подтипов P_{2Y}-рецепторов найдены в клетках эндотелия (внутренней выстилки) кровеносных сосудов. Стимуляция этих рецепторов приводит к высво-

бождению оксида азота (NO), что, в свою очередь, вызывает расширение сосудов. Именно с этим механизмом связывают гипотензивный эффект (снижение артериального давления) при внутривенном введении АТФ. В клиническом отношении важны P_{2Y}-рецепторы тромбоцитов — клеток крови, ответственных за ее свертывание: показано, что стимуляция этих рецепторов повышает, а блокада снижает способность тромбоцитов склеиваться друг с другом, образуя внутрисосудистые тромбы. Тромбоз (закупорка) сосудов — одна из наиболее частых причин инфаркта миокарда, инсульта, нарушения кровообращения в нижних конечностях [4].

Результаты обработки красных клеток крови селективным агонистом P_{2X}-пуринорецепторов свидетельствуют о том, что выраженный позитивный эффект этого соединения на реологические свойства крови (уменьшение вязкости крови за счет оптимизации микрореологических характеристик эритроцитов — снижения агрегируемости и роста деформируемости) по всей видимости обусловлен активацией данного типа рецепторов. Наше предположение подтверждается нивелированием этого гемореологического эффекта при блокаде P_{2X}-пуринорецепторов.

Вывод. Таким образом, проведенное исследование продемонстрировало положительное влияние аденозинергических соединений на реологические свойства крови, которое опосредуется активацией P_{2X}-пуринорецепторов эритроцитов.

Библиографический список

1. Burnstock G. P_{2X} receptors in sensory neurons // *British Journal of Anaesthesia*. 2000. V. 84. P. 476-478.
2. DUBYAK G.R. Go it alone no more - P_{2X7} joins the society of heteromeric ATP-gated receptor channels. // *Mol Pharmacol*. 2007. - 72(6).-1447-1456.
3. Kim Y.C. et. al., *Drug Dev. Res.*, 45, 52-66 (1998).
4. Зиганшин, А.У. АТФ: новая роль для старого знакомого [Текст] / А.У. Зиганшин // *Химия и жизнь*. – 2003. - №12. – С.18-21.
5. Муравьев, А.В., Муравьев, А.А., Булаева, С.В., Маймистова, А.А. Методы изучения деформируемости эритроцитов в эксперименте и клинике [Текст] / А.В. Муравьев // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2010. – №1. – С. 28-29.

6. Селезнева, О.А. , Тихомирова, И.А. Взаимосвязь энергетического метаболизма эритроцитов человека и реологических свойств крови [Текст] / О.А. Селезнева // *Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике: материалы IX молодежной научной конференции Института физиологии Коми НЦ УрО РАН*. – Сыктывкар, 2010. – С. 154-157.

7. Сидоров, А.В. Физиология межклеточной коммуникации [Текст] : учебное пособие / А.В. Сидоров. – Минск: БГУ, 2008. – 215 с.