

DOI: 10.15593/RZhBiomech/2016.1.02
УДК 616.314-08



МИКРОМЕХАНИЧЕСКИЕ ОТВЕТЫ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА НА СТИМУЛИРОВАНИЕ МЕМБРАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ, ИОННЫХ КАНАЛОВ И ФЕРМЕНТОВ

А.В. Муравьев¹, И.А. Тихомирова¹, А.А. Ахапкина¹, С.В. Булаева¹,
П.В. Михайлов¹, А.А. Муравьев²

¹ Ярославский государственный педагогический университет имени К.Д. Ушинского, Россия, 150000, Ярославль, ул. Республиканская, 108, e-mail: alexei.47@mail.ru

² Ярославский государственный университет имени П.Г. Демидова, Россия, 150000, Ярославль, ул. Советская, 14, e-mail: anton@yspu.yar.ru

Аннотация. Эритроциты – высокоспециализированные клетки, основной функцией которых является транспорт кислорода. Они лишены ядра и митохондрий, однако сохранили многие элементы молекулярных сигнальных путей. При выполнении транспортной функции эритроциты изменяют свои механические свойства и в том числе деформируются и объединяются в комплексы – агрегаты. Имеются отдельные свидетельства того, что изменение механических свойств эритроцитов происходит под влиянием сигнальных молекул, таких как рецепторы, ферменты и ионные каналы. С учетом вышесказанного целью исследования было изучение микромеханических ответов эритроцитов на стимулирование мембранных рецепторов, ионных каналов и ферментов. Для этого эритроциты инкубировали с агонистами адренорецепторов, стимуляторами и ингибиторами ферментов и ионных каналов мембраны с последующей регистрацией их деформируемости и агрегации. Было показано, что адреналин умеренно повышает деформируемость эритроцитов вместе с выраженным подъемом их агрегации (на 34 %), агонист альфа-1-адренорецепторов фенилэфрин мало изменял деформируемость эритроцитов, но сильно стимулировал их агрегацию, прирост составил 53 %. Напротив, стимулирование бета-адренорецепторов изопроterenолом привело к выраженному приросту деформируемости эритроцитов на 19 % и лишь умеренному снижению их агрегации. Более существенные и позитивные сдвиги деформируемости эритроцитов наблюдали в условиях изменения активности ферментов. В среднем прирост деформируемости составил 14 %. Стимулирование входа Ca^{2+} в эритроциты или блокирование ионных каналов достоверно изменяло их деформируемость и агрегацию, особенно под влиянием блокатора Ca^{2+} -каналов верапамила. Наиболее сильный эффект Ca^{2+} наблюдали в отношении агрегации, она изменялась в среднем на 44 %. Полученные данные позволяют заключить, что механические свойства эритроцитов и их транспортные возможности статистически достоверно изменяются под влиянием активации или ингибирования элементов молекулярных сигнальных каскадов клеток (рецепторов, ферментов и ионных каналов).

Ключевые слова: эритроциты, механические свойства, деформируемость, агрегация, мембрана, рецепторы, ионные каналы, ферменты.

© Муравьев А.В., Тихомирова И.А., Ахапкина А.А., Булаева С.В., Михайлов П.В., Муравьев А.А., 2016
Муравьев Алексей Васильевич, д.б.н., профессор кафедры медико-биологических основ спорта, Ярославль

Тихомирова Ирина Александровна, д.б.н., доцент, заведующая кафедрой основ медицинских знаний и охраны здоровья детей, Ярославль

Ахапкина Анна Александровна, аспирант кафедры медико-биологических основ спорта, Ярославль

Булаева Светлана Владимировна, к.б.н., с.н.с. лаборатории прикладной физиологии, Ярославль

Михайлов Павел Валентинович, к.б.н., доцент кафедры медико-биологических основ спорта, Ярославль

Муравьев Антон Алексеевич, к.б.н., доцент кафедры физической культуры, Ярославль

ВВЕДЕНИЕ

Механические свойства мембраны человеческих эритроцитов регулируются белками подмембранного цитоскелета, основными компонентами которого являются: альфа- и бета-спектрин, актин, полоса 4.1, аддуцин и дематин [15]. Все эти белки, кроме актина, фосфорилируются протеинкиназами, представленными в эритроцитах [9]. Кроме того, три двойных белок-белковых взаимодействия, такие как гликофорин С (ГФС) – белок полосы 4.1R, ГФС – p55 и p55 – 4.1R составляют тройной комплекс в эритроцитарной мембране [20]. Он является ответственным за проявление механических свойств мембраны, эластичности и стабильности клетки в целом [26]. При фосфорилировании белка полосы 4.1 происходит диссоциация указанного выше тройного комплекса, изменяется состояние цитоскелета и мембранной эластичности эритроцита (рис. 1) [8, 21]. Последняя определяет деформируемость эритроцита в целом и способность его эффективно участвовать в тканевой перфузии и доставке кислорода клеткам [1, 2, 6, 19].

Начальным этапом регуляторного пути при изменениях механических свойств является действие сигнальной молекулы на рецепторы, которые экспонированы на мембране зрелых эритроцитов [5, 11, 22, 25]. Действительно, при исследованиях *in vitro* в качестве мишеней для сигнальных молекул в эритроцитах могут быть рассмотрены рецепторы, ионные каналы и ферменты, представленные в клетках данного типа [10, 13, 15, 23]. Вместе с тем комплексных исследований изменения микрореологических свойств эритроцитов при активации мембранных рецепторов, ионных каналов и ферментов недостаточно.

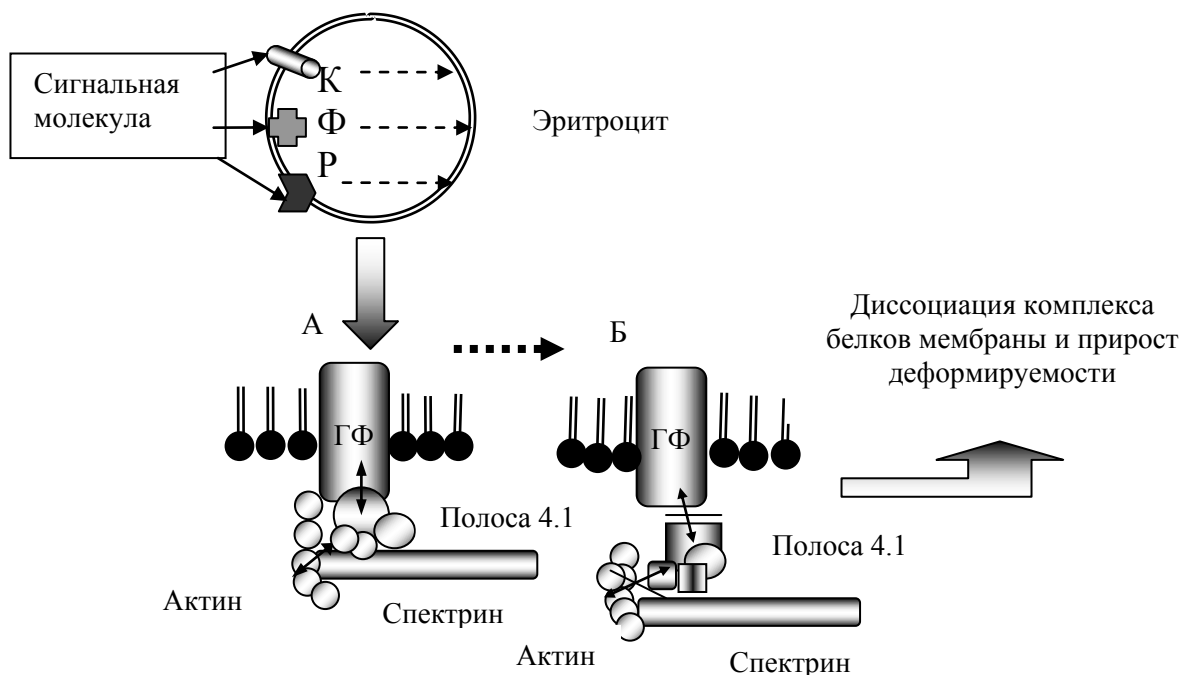


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая диссоциацию тройного комплекса: спектрин – актин – полоса 4.1 – гликофорин С мембраны эритроцита при фосфорилировании полосы 4.1 протеинкиназой, при активации мембранных белков-мишеней (рецепторов, ферментов или каналов). Обозначения: А – дефосфорилированное состояние полосы 4.1; Б – фосфорилированное состояние полосы 4.1; ГФ – интегральный белок мембраны эритроцита гликофорин С; К – мембранный канал; Ф – ассоциированный с мембраной фермент; Р – мембранный рецептор

Учитывая вышесказанное, целью данного исследования было изучение микромеханических ответов зрелых эритроцитов человека на стимулирование мембранных рецепторов, ионных каналов и ферментов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Цельную кровь получали венопункцией. В качестве антикоагулянта использовали гепарин. Эритроциты отделяли от плазмы центрифугированием (15 мин при 3000 об/мин), клетки трижды отмывали в изотоническом растворе хлорида натрия, содержащем глюкозу (5,0 мМ), и ресуспендировали в растворе Рингера (рН – 7,4, осмолярность – 300 мОсм/л; определяли на осмометре *Fogel OM-801*, Германия) до гематокрита 40 % для последующей их инкубации с препаратами и регистрации их микрореологических свойств.

В первой серии эритроциты делили на четыре аликвоты и клетки инкубировали:

- 1) с агонистом альфа-1 и бета-адренорецепторов мембраны эритроцитов: адреналином (1,0 μM);
- 2) с агонистом альфа-1-адренорецепторов мембраны эритроцитов: фенилэфрином (1,0 μM);
- 3) с агонистом бета-адренорецепторов мембраны: изопротеренолом (1,0 μM);
- 4) только в растворе Рингера (без препарата) – контрольные образцы.

Во второй серии опытов эритроциты делили на четыре аликвоты и клетки инкубировали:

- 1) с неселективным ингибитором фосфодиэстераз (ФДЭ): изобутилметилксантином (ИБМК, 100 μM);
- 2) с ингибитором фосфодиэстеразы-3: цилостазолом (10 μM);
- 3) со стимулятором аденилатциклазы (АЦ): форсколином (10 μM);
- 4) только в растворе Рингера (без препаратов) – контрольные образцы.

В третьей серии опытов эритроциты делили на четыре аликвоты и клетки инкубировали:

- 1) со стимулятором входа кальция в эритроциты: кальциевым ионофором (A23186, 3,0 μM);
- 2) с блокатором кальциевых каналов: верапамилом (10 μM);
- 3) с блокатором кальцийзависимых калиевых каналов: клотримазолом (10 μM);
- 4) только в растворе Рингера (без препарата) – контрольные образцы.

Суспензии эритроцитов инкубировали с препаратами в течение 15 мин при 37 °С. После инкубации эритроцитов регистрировали их микрореологические свойства: измеряли агрегацию, вязкость их суспензии (гематокрит 40 %) и степень деформируемости. Матричные растворы препаратов готовили в *DMSO*, этиловом спирте или в воде. Анализы были выполнены в течение 4 часов после взятия крови. Все препараты получены от фирмы «*Sigma-Aldrich*» (США).

Деформируемость эритроцитов исследовали двумя методами:

1. Регистрировали вязкость суспензий эритроцитов с гематокритом 40 % (*Hct*) на полуавтоматическом капиллярном вискозиметре при высоком напряжении сдвига (2,45 Н·м⁻²). Все измерения выполнены при комнатной температуре (20,0 ± 1,0 °С, поддерживалась путем кондиционирования воздуха). Вязкость суспензионной среды (изотонический раствор Рингера) была постоянной и составила 1,10 мПа·с. Коэффициент вариации при измерении вязкости не превышал 1,0 %.

2. Для оценки мембранной вязкоэластичности эритроцитов и их деформируемости в целом определяли индекс удлинения эритроцитов (ИУЭ) в проточной микрокамере, где создавали постоянное течение путем приложения

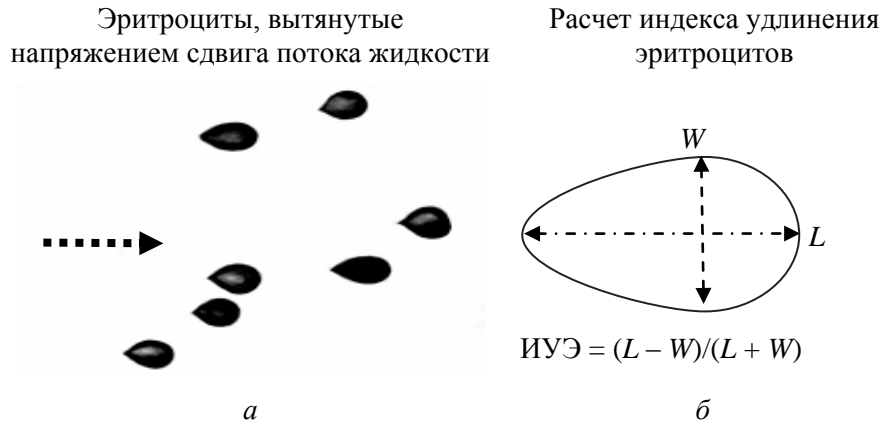


Рис. 2. Эритроциты, закрепленные одной точкой к дну микрокамеры и вытянутые потоком жидкости (а). Расчет индекса удлинения эритроцитов как показателя их деформируемости (б). Стрелкой указано направление потока в микрокамере

напряжения сдвига $0,98 \text{ Н}\cdot\text{м}^{-2}$. Микрокамеру заполняли суспензией эритроцитов ($Hct = 0,5\%$). Суспензионной средой для них был раствор Рингера с добавлением декстрана-200 (10 % ХАЕС-стерил, *Fresenius Kabi*, Германия) соотношение: 30 % декстрана-200, 70 % – раствор Рингера. Вязкость этой жидкости составила $1,30 \text{ мПа}\cdot\text{с}$. В микрокамеру подавали давление, которое вытягивало клетки, прикрепленные к дну камеры. На основе измерения длины (L) и ширины (W) вытянутых клеток (около 100 клеток) рассчитывали индекс удлинения эритроцитов (ИУЭ) как показатель их деформируемости (рис. 2): $\text{ИУЭ} = (L - W) / (L + W)$, автоматически, на основе специально написанной компьютерной программы (№ 2010613237 – номер регистрации в федеральной службе по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам).

Агрегацию эритроцитов оценивали с помощью агрегометра *Myrenne M1* (Германия), который дает возможность получить четыре индекса агрегации, при низких (3 с^{-1}) и высоких скоростях сдвига (600 с^{-1}). Кроме того, процесс агрегации контролировали методом прямой микроскопии с компьютерной регистрацией и анализом изображения.

Гематокрит определяли при помощи микрогематокритной центрифуги (*Elmi CM-70*).

Статистическая обработка экспериментальных данных

Весь цифровой материал обработан статистически с определением выборочной средней величины (M), величины среднего квадратичного отклонения (σ) и статистической ошибки средней (m). 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. За уровень статистически значимых принимали изменения при $p < 0,05$. В тексте и таблице приведены средние величины (M) и величины статистической ошибки средней (m).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изменения микрореологических характеристик эритроцитов при активации мембранных рецепторов

Имеются данные о том, что на мембране эритроцитов экспонированы альфа-1 и бета-адренорецепторы [11]. При инкубации с адреналином наблюдали умеренный

прирост деформируемости эритроцитов на 6–8 % и выраженное увеличение их агрегации (на 34 %, таблица).

Альфа-1-адренорецептор сопряжен с кальциевым каналом [25]. При инкубации эритроцитов с фенилэфрином деформируемость эритроцитов достоверно не изменялась, хотя некоторое ее уменьшение наблюдалось, тогда как агрегация эритроцитов возросла в этих условиях на 53 % (таблица). Стимулирование бета-адренорецепторов изопротеренолом привело к существенному увеличению деформируемости эритроцитов на 19 % ($p < 0,05$), в то время как агрегация эритроцитов оказалась на 12 % ниже, чем в контроле ($p < 0,05$; таблица).

Изменения микрореологических характеристик эритроцитов при активации ферментов, расположенных в структурах мембраны эритроцитов

Прямая активация фермента мембраны аденилатциклазы (АЦ) с помощью форсколина сочеталась с приростом мембранной эластичности. На это указывало увеличение индекса удлинения эритроцитов на 17 % ($p < 0,05$). При этом агрегация эритроцитов снизилась на 27 % ($p < 0,05$, таблица). С другой стороны, при ингибировании активности фосфодиэстеразы с помощью ИБМК был выявлен сходный с форсколином ответ эритроцитов. Так, индекс удлинения эритроцитов достоверно повышался на 11 %, а агрегация уменьшилась на 25 % ($p < 0,05$, таблица). ИБМК является неселективным ингибитором активности фосфодиэстеразы в клетках.

Изменение микрореологических показателей эритроцитов при их инкубации с препаратами

Показатель	ИУЭ, отн. ед.	η_c , мПа·с	ПА, отн. ед.
<i>Препараты, действующие на мембранные рецепторы клеток ($M \pm m, n = 26$)</i>			
Контроль (без препарата)	0,218 ± 0,005	3,55 ± 0,09	7,34 ± 0,32
Адреналин (1,0 мМ)	0,236 ± 0,004*	3,34 ± 0,012	9,83 ± 0,36*
Фенилэфрин (1,0 мМ)	0,214 ± 0,005	3,48 ± 0,10	11,20 ± 0,42*
Изопротеренол (1,0 мМ)	0,259 ± 0,004*	3,15 ± 0,13*	6,46 ± 0,26*
<i>Препараты, действующие на активность ферментов мембран клеток ($M \pm m, n = 24$)</i>			
Контроль (без препарата)	0,209 ± 0,005	3,62 ± 0,10	7,12 ± 0,22
Форсколин (10 мМ)	0,244 ± 0,004*	3,37 ± 0,012	5,22 ± 0,23*
ИБМК (100 мМ)	0,233 ± 0,006*	3,39 ± 0,10	5,34 ± 0,16*
Цилостозол (10 мМ)	0,238 ± 0,005*	3,29 ± 0,12*	5,46 ± 0,24*
<i>Препараты, действующие на ионные каналы мембран клеток ($M \pm m, n = 24$)</i>			
Контроль (без препарата)	0,210 ± 0,004	3,40 ± 0,08	7,18 ± 0,28
A23187 (3 мМ)	0,198 ± 0,004*	3,48 ± 0,012	12,78 ± 0,54*
Верапамил (10 мМ)	0,243 ± 0,005*	3,02 ± 0,12*	5,88 ± 0,25*
Клотримазол (10 мМ)	0,234 ± 0,005*	3,19 ± 0,10	7,36 ± 0,22

Примечание: η_c – вязкость суспензии эритроцитов; ПА – показатель агрегации эритроцитов; * – $p < 0,05$ относительно контроля.

Инкубация эритроцитов с цилостазолем – ингибитором фосфодиэстеразы-3 – привела к приросту деформируемости эритроцитов на 14 % и уменьшению их агрегации (на 23 %, $p < 0,05$). В этих условиях и вязкость суспензии эритроцитов достоверно снизилась на 9 % (см. таблицу).

Известно что кальций (Ca^{2+}) оказывает существенное влияние на механические свойства клеток [23]. Стимулирование его входа в эритроциты при помощи ионофора A23187 сопровождалось выраженным приростом агрегации эритроцитов и небольшими негативными изменениями деформируемости (см. таблицу).

С другой стороны, блокирование входа Ca^{2+} в эритроциты с помощью верапамила привело к увеличению ИУЭ на 16 % по сравнению с контролем, а также к снижению вязкости суспензии и агрегации эритроцитов на 11 и 18 % соответственно (см. таблицу). На механическом поведении эритроцитов может сказаться и потеря калия (K^+) через кальцийактивируемые K^+ -ионные каналы (Гардош-каналы [12]). Блокирование этих каналов клотримазолом положительно сказалось на деформируемости эритроцитов и мало повлияло на их агрегацию (см. таблицу).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вне- и внутриклеточный сигнальный путь, ассоциированный со срочным изменением пластичности мембран эритроцитов и деформируемости клетки в целом, включает: активацию мембранного рецептора при связывании лиганда, изменение состояния *G*-белков, активацию АЦ, продукцию цАМФ и стимулирование цАМФ-зависимой протеинкиназы *A* (ПКА) [22]. Известно, что на мембране человеческих эритроцитов представлены как альфа-1, так и бета-1- и -2-адренорецепторы [5, 11, 24, 25]. Полученные нами данные показали, что бета-агонист изопротеренол существенно изменял микрореологические свойства эритроцитов. Поскольку бета-адренорецепторы сопряжены с *G_s*-белками, активирующими фермент – аденилатциклазу [27], то можно ожидать такого же эффекта от ее прямого стимулирования. Форсколин – специфический симулятор АЦ [17] – достоверно увеличивал деформируемость эритроцитов и снижал их агрегацию. Роль фермента аденилатциклазы заключается в повышении продукции цАМФ в клетках [14]. Поэтому можно полагать, что положительные изменения микрореологических свойств эритроцитов и повышение их текучести связаны с приростом концентрации цАМФ. При инкубации эритроцитов с проникающим аналогом цАМФ были получены изменения, сходные с действием форсколина и другого стимулятора АЦ – простагландина E_1 [18]. Конечным звеном этого регуляторного каскада является фосфорилирование белков мембраны протеинкиназой *A* (ПКА), что ведет к изменению ее механических свойств. Было показано, что фосфорилирование белка полосы 4.1 при помощи ПКА сопровождается позитивным изменением деформируемости эритроцитов [4]. С другой стороны, активация Ca^{2+} -сигнального пути (в наших опытах при инкубации эритроцитов с кальциевым ионофором), вероятно, сопровождалась интенсификацией формирования белкового комплекса с участием спектрина, актина, полосы 4,1 и интегральных белков – полосы 3 и ГФС [3]. Известно, что при концентрации Ca^{2+} выше 100 μM происходит снижение деформации эритроцитов [22, 26]. Было показано, что блокирование входа Ca^{2+} в клетку верапамилем, напротив, повышает деформируемость эритроцитов и текучесть их суспензий. Сходный эффект наблюдали при ингибировании Гардош-эффекта [12] с помощью клотримазола. Возможно, прирост деформируемости каким-то образом связан с обменом K^+ . Так, было установлено, что происходит диссоциация тройного комплекса актин – спектрин – полоса 4.1 цитоскелета мембраны эритроцита при повышении концентрации KCl выше 100 мМ.

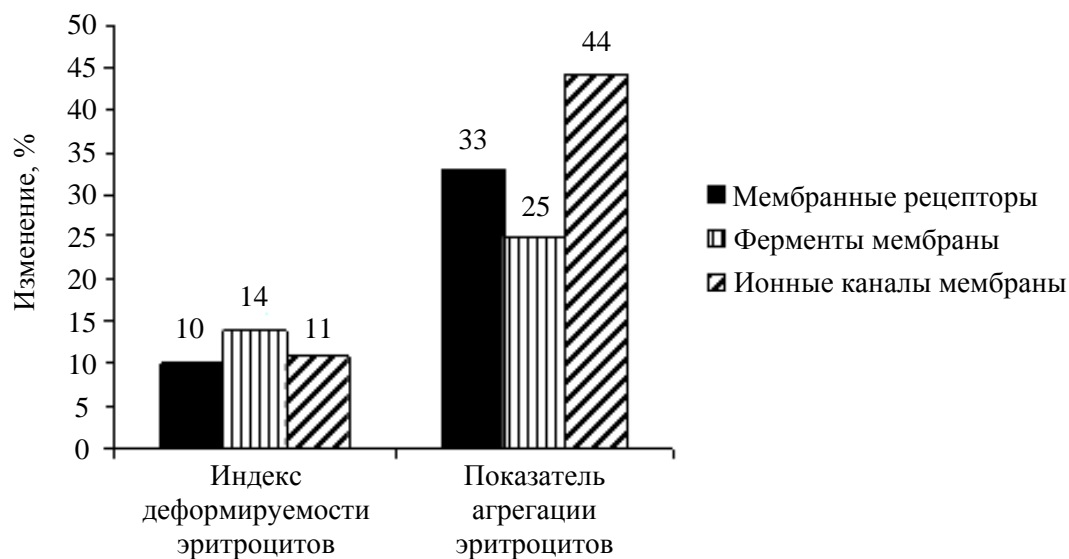


Рис. 3. Усредненные данные (в каждом случае по трем препаратам) изменений деформируемости эритроцитов и показателя их агрегации при активации или ингибировании: мембранных рецепторов эритроцитов; ферментов мембраны и ионных каналов мембраны

Другой эффект ингибирования активности Гардош-каналов может быть связан с повышением обмена K^+ и воды в эритроцитах и сохранением ими двояковогнутой формы [7]. Это может обеспечить их оптимальную деформируемость [19].

Сравнительный анализ показал, что наиболее существенно деформируемость эритроцитов изменяется при активации/ингибировании исследованных ферментов мембраны эритроцитов (рис. 3). В среднем по всем трем препаратам (форсколин, ИБМК и цилостазол) прирост деформируемости эритроцитов составил 14 %, что несколько больше, чем при активации рецепторов и ионных каналов (см. рис. 3).

Что касается агрегации эритроцитов, то она в большей степени изменялась при активации или ингибировании активности ионных каналов (см. рис. 3).

Выводы

1. Микромеханические свойства эритроцитов статистически достоверно изменяются под влиянием активации или ингибирования элементов молекулярных сигнальных каскадов клеток (рецепторов, ферментов и ионных каналов).

2. Наиболее существенные изменения деформируемости эритроцитов наблюдаются в условиях активизации аденилатциклазного сигнального пути, поскольку при активации его элементов были получены наибольшие изменения деформируемости эритроцитов. Так, стимулирование бета-адренорецепторов изопротеренолом сопровождалось приростом деформируемости на 19 %, активации аденилатциклазы форсколином – на 17 %, ингибирования активности фосфодиэстеразы цилостазолом – на 14 %.

3. Что касается агрегации эритроцитов, то она также существенно снижалась при активации указанного выше молекулярного сигнального пути, а повышение агрегации эритроцитов связано с поступлением Ca^{2+} в эритроциты через соответствующие мембранные каналы.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 14-04-01703-а, и гранта № 243 Минобрнауки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Муравьев А.В., Тихомирова И.А., Булаева С.В., Вдовин В.А., Муравьев А.А. Исследование роли отдельных реологических характеристик крови в изменении ее текучести и транспортного потенциала // Российский журнал биомеханики. – 2012. – Т. 16, № 3. – С. 32–41.
2. Муравьев А.В., Тихомирова И.А., Маймистова А.А., Михайлов П.В., Муравьев А.А. Роль микрореологических свойств эритроцитов в неньютоновском поведении цельной крови // Российский журнал биомеханики. – 2010. – Т. 14, № 4. – С. 96–104.
3. Anderson J.P., Morrow J.S. The interaction of calmodulin with human erythrocyte spectrin. Inhibition of protein 4.1-stimulated actin binding // J. Biol. Chem. – 1987. – Vol. 262, № 13. – P. 6365–6372.
4. Boivin P., Garbarz M., Dhermy D., Galand C. *In vitro* phosphorylation of the red blood cell cytoskeleton complex by cyclic AMP-dependent protein kinase from erythrocyte membrane // Biochim. Biophys. Acta. – 1981. – Vol. 647, № 1. – P. 1–6. DOI: 10.1016/0005-2736(81)90289-3.
5. Bree F., Gault I., d'Athis P., Tillement J.P. Beta adrenoreceptors of human red cells, determination of their subtypes // Biochem. Pharmacol. – 1984. – Vol. 33, № 24. – P. 4045–4050. DOI: 10.1016/0006-2952(84)90019-4.
6. Chien S., Sung L.P. Molecular basis of red cell membrane rheology. Part 1 // Biorheology. – 1990. – Vol. 27. – P. 327–344.
7. De Franceschi L., Rivera A., Fleming M.D., Honczarenko M., Peters L.L., Gascard P., Mohandas N., Brugnara C. Evidence for a protective role of the Gardos channel against hemolysis in murine spherocytosis // Blood. – 2005. – Vol. 106, № 4. – P. 1454–1459. DOI: 10.1182/blood-2005-01-0368.
8. Eder P.S., Soong C.J., Tao M. Phosphorylation reduces the affinity of protein 4.1 for spectrin // Biochemistry. – 1986. – Vol. 25, № 7. – P. 1764–1770. DOI: 10.1021/bi00355a047.
9. Govekar R.B., Zingde S.M. Protein kinase C isoforms in human erythrocytes // Ann. Hematol. – 2001. – Vol. 80, № 9. – P. 531–534. DOI: 10.1007/s002770100352.
10. Hanson M.S., Stephenson A.H., Bowles E.A., Sprague R.S. Insulin inhibits human erythrocyte cAMP accumulation and ATP release: role of phosphodiesterase 3 and phosphoinositide 3-kinase // Exp. Biol. Med. – 2010. – Vol. 235, № 2. – P. 256–262. DOI: 10.1258/ebm.2009.009206.
11. Horga J.F., Gisbert J., De Agustin J.C. A beta-2-adrenergic receptor activates adenylate cyclase in human erythrocyte membranes at physiological calcium plasma concentrations // Blood Cells, Molecules and Diseases. – 2000. – Vol. 26, № 3. – P. 223–228. DOI: 10.1006/bcmd.2000.0299.
12. Kaiserova K., Lakatos B., Peterajova E., Orlicky J., Varecka L. Investigation of properties of the Ca²⁺ influx and of the Ca²⁺-activated K⁺ efflux (Gardos effect) in vanadate-treated and ATP-depleted human red blood cells // Gen. Physiol. Biophys. – 2002. – Vol. 21, № 4. – P. 429–442.
13. Lang F., Birka C., Myssina S., Lang K.S., Lang P.A., Tanneur V., Duranton C., Wieder T., Huber S.M. Erythrocyte ion channels in regulation of apoptosis // Adv. Exp. Med. Biol. – 2004. – Vol. 559. – P. 211–217.
14. 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 // J. Biol. Chem. – 1988. – Vol. 263, № 5. – P. 2209–2216.
15. Manno S., Takakuwa Y., Mohandas N. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation // J. Biol. Chem. – 2005. – Vol. 280, № 9. – P. 7581–7587. DOI: 10.1074/jbc.M410650200.
16. 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, № 2. – P. 489–497. DOI: 10.1042/bj20031401.
17. Morris S.A., Bilezikian J.P. Evidence that forskolin activates turkey erythrocyte adenylate cyclase through a noncatalytic site // Arch. Biochem. Biophys. – 1983. – Vol. 220, № 2. – P. 628–636. DOI: 10.1016/0003-9861(83)90456-3.
18. Muravyov A.V., Tikhomirova I.A. Role molecular signaling pathways in changes of red blood cell deformability // Clin. Hemorheol. Microcirc. – 2013. – Vol. 53, № 1–2. – P. 45–59. DOI: 10.3233/CH-2012-1575.
19. Nash G.B. Red cell mechanics: what changes are needed to adversely affect *in vivo* circulation // Biorheology. – 1991. – Vol. 28. – P. 231–239.
20. Nunomura W., Takakuwa Y., Parra M., Conboy J., Mohandas N. Regulation of protein 4.1R, p55, and glycophorin C ternary complex in human erythrocyte membrane // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275, № 32. – P. 24540–24546. DOI: 10.1074/jbc.M002492200.
21. Nunomura W., Takakuwa Y. Regulation of protein 4.1R interactions with membrane proteins by Ca²⁺ and calmodulin // Front. Biosci. – 2006. – Vol. 11, № 2. – P. 1522–1539. DOI: 10.2741/1901.
22. Oonishi T., Sakashita K., Uysaka N. Regulation of red blood cell filterability by Ca²⁺ influx and cAMP-mediated signaling pathways // Am. J. Physiol. – 1997. – Vol. 273, № 6. – P. 1828–1834.

23. Romero P.J., Romero E.A. New vanadate-induced Ca^{2+} pathway in human red cells // Cell Biol. Int. – 2003. – Vol. 27, № 11. – P. 903–912. DOI: 10.1016/j.cellbi.2003.07.002.
24. Sager G., Jacobsen S. Effect of plasma on human erythrocyte beta-adrenergic receptors // Biochem. Pharmacol. – 1985. – Vol. 34, № 20. – P. 3767–3771. DOI: 10.1016/0006-2952(84)90019-4.
25. Sundquist J., Blas S., Hogan J.E., Davis F.B., Davis P.J. The alpha 1-adrenergic receptor in human erythrocyte membranes mediated interaction in vitro of epinephrine and thyroid hormone at the membrane Ca^{2+} -ATPase // Cell. Signal. – 1992. – Vol. 4, № 6. – P. 795–799. DOI: 10.1016/0898-6568(92)90060-L.
26. Takakuwa Y., Mohandas N., Ishibashi T. Regulation of red cell membrane deformability and stability by skeletal protein network // Biorheology. – 1990. – Vol. 27. – P. 357–365.
27. Xiao R.P., Avdonin P., Zhou Y.Y., Cheng H., Akhter S.A., Eschenhagen T., Lefkowitz R.J., Koch W.J., Lakatta E.G. Coupling of beta-2-adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes // Circulation Res. – 1999. – Vol. 84, № 1. – P. 43–52. DOI: 10.1161/01.RES.84.1.43.

MICROMECHANICAL RESPONSES OF HUMAN RED BLOOD CELLS TO STIMULATION OF MEMBRANE RECEPTORS, IONIC CHANNELS AND ENZYMES

A.V. Muravyov, I.A. Tikhomirova, A.A. Akhapkina, S.V. Bulaeva,
P.V. Mikhaylov, A.A. Muravyov (Yaroslavl, Russia)

Red blood cells (RBCs) are the high specialized cells having the oxygen transport as the main function. They lost nucleus and mitochondria but they kept many elements of the molecular signaling pathways. Red blood cells alter their mechanical properties under realization of transport tasks – they can be deformed and unite each other (aggregations). There are some evidences that RBC mechanical changes happen under influence of signaling molecules, such as: receptors, ion channels, and enzymes. So, the aim of study was to investigate a role of receptors, ion channels, and enzymes in RBC micromechanical property alterations. For these purposes, RBCs were incubated with adrenoceptor agonists, inhibitors of enzymes and ion channels of the membrane, followed by registration of erythrocyte aggregation and deformability. It has been shown that adrenaline increased moderately RBC deformability, together with a marked rise in their aggregation (by 34 %), whereas alpha-1 agonist – phenylephrine did not markedly change RBC deformability, but strongly stimulated RBC aggregation, its increase was 53 %. On the contrary – beta-adrenoceptor agonist isoproterenol promoted with a marked increase in the deformability of red blood cells together with a moderate decrease in red blood cell aggregation. More significant and positive changes in RBC deformability were watched under the changing of enzyme activity. The average increase of the red cell deformability was 14 %. Stimulation of Ca^{2+} entry into erythrocytes or blocking ion channels significantly altered the red blood cell deformability and their aggregation, especially under the influence of the Ca^{2+} channel blocker – verapamil. The strongest effect of Ca^{2+} was monitored for aggregation, it is changed on average by 44 %. The findings suggest that the mechanical properties of red blood cells and their transport capacity significantly changed under the effect of the activation or inhibition of the elements of molecular signaling pathways of cells (receptors, enzymes and ion channels).

Key words: red blood cells, mechanical properties, deformability, aggregation, receptors, ionic channels, enzymes.

Получено 29 июля 2015