

УДК 612.118.221.2.

ЦИРКИН Виктор Иванович, доктор медицинских наук, профессор кафедры нормальной физиологии лечебного факультета Казанского государственного медицинского университета. Автор 450 научных публикаций, в т. ч. 16 монографий, 5 учебников и 15 учебных пособий

КОСТЯЕВ Андрей Александрович, доктор медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией консервирования крови Кировского научно-исследовательского института гематологии и переливания крови. Автор 350 научных публикаций, в т. ч. 20 монографий, 7 учебников и 20 учебных пособий

ВОЛОДЧЕНКО Анна Ивановна, аспирант кафедры биологии естественно-географического факультета Вятского государственного гуманитарного университета (г. Киров). Автор 17 научных публикаций

МЕХАНИЗМ ВЛИЯНИЯ АЦЕТИЛХОЛИНА НА СКОРОСТЬ АГГЛЮТИНАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Ацетилхолин (АХ, 10^{-10} – 10^{-6} г/мл) дозозависимо повышает скорость агглютинации эритроцитов мужчин. Этот эффект снижается селективными блокаторами M_1 - и M_3 -холинорецепторов (ХР) – гастропепином и 4-DAMP, ингибитором циклооксигеназы и фосфолипазы A_2 индометацином, ингибитором кальмодулина трифлуоперазином, блокатором Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов $BaCl_2$ и блокатором Ca^{2+} -каналов верапамилем. Это означает, что эффект АХ обусловлен активацией M_1 - и M_3 -ХР и реализуется с участием циклооксигеназы, фосфолипазы A_2 , кальмодулина, Ca^{2+} - и K^+ -каналов.

Ключевые слова: эритроциты, агглютинация, ацетилхолин, М-холинорецепторы, циклооксигеназа, фосфолипаза A_2 , кальмодулин.

Ранее было показано [6], что в условиях *in vitro* ацетилхолин повышает скорость агглютинации эритроцитов в изогемагглютинирующей сыворотке I группы у мужчин, небеременных женщин, находящихся в фолликулярной фазе цикла и беременных в I триместре, но не влияет на нее у женщин, находящихся в лютеиновой фазе и во II и III триместрах беременности. В опытах с неселективным блокатором

М-холинорецепторов (М-ХР) атропином было установлено [6], что увеличение скорости агглютинации эритроцитов под влиянием ацетилхолина происходит за счет активации М-ХР. Все это указывало на то, что при беременности изменяется М-холинореактивность эритроцитов, т. е. эффективность активации их М-ХР. Как известно, они представлены M_1 - [23], а также M_2 -, M_3 -, M_4 - и M_5 -ХР [24]. Однако до насто-

ящего времени исследований, касающихся роли соответствующих типов М-ХР в изменении скорости агглютинации эритроцитов под влиянием ацетилхолина и механизмов, лежащих в основе этого процесса, не проводилось. Учитывая перспективность применения в физиологических исследованиях и в клинической практике оценки М-холинореактивности висцеральных органов по М-холинореактивности эритроцитов [6], в работе поставлена цель – исследовать влияние селективных блокаторов М-ХР и ряда веществ, блокирующих функционально важные молекулы клетки (верапамила, хлорида бария, индометацина и трифлуоперазина), на способность

ацетилхолина повышать скорость агглютинации эритроцитов человека в изоагглютинирующей сыворотке анти-(А+В).

Материалы и методы. Исследовали венозную кровь 80 мужчин с группой крови А, В или АВ по системе АВ0. В процентном отношении они составили соответственно 70 %, 25 % и 5 %, при этом 80 % из них были резус-положительные. Кровь получали в объеме 2 мл и помещали ее в пробирку, содержащую 0,5 мл гепарина (50 Ед/мл раствора Кребса), т. е. в соотношении 4:1.

Всего проведено 9 серий. В сериях 1–8 исследовали влияние на эффект ацетилхолина

Таблица 1

СХЕМА ОПЫТОВ ПО ОЦЕНКЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ, ОТМЫВКИ И РЕИНКУБАЦИИ НА СПОСОБНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНА СНИЖАТЬ ВНА

Серии	Показатель ВНА	Капли		
		1 капля	2 капля	3 капля
1–8	ВНА _{кр}	Кровь, инкубированная с раствором Кребса	Раствор Кребса	Изоагглютинирующая сыворотка анти-(А+В)
	ВНА _{ах}	Кровь, инкубированная с раствором Кребса	Ацетилхолин в одной из концентраций (10 ⁻¹⁰ -10 ⁻⁶ г/мл)	
	ВНА _{кр+ив}	Кровь, инкубированная с исследуемым веществом (ИВ)	Раствор Кребса	
	ВНА _{ах+ив}	Кровь, инкубированная с исследуемым веществом (ИВ)	Ацетилхолин в одной из концентраций (10 ⁻¹⁰ -10 ⁻⁶ г/мл)	
9	ВНА _{кр} ИЭ	Гепаринизированная кровь (интактные эритроциты, ИВ)	Раствор Кребса	Изоагглютинирующая сыворотка анти-(А+В)
	ВНА _{ах} ИЭ	Гепаринизированная кровь (интактные эритроциты, ИВ)	Ацетилхолин в одной из концентраций (10 ⁻¹⁰ -10 ⁻⁶ г/мл)	
	ВНА _{кр} ОЭ	Взвесь отмытых эритроцитов (ОЭ)	Раствор Кребса	
	ВНА _{ах} ОЭ	Взвесь отмытых эритроцитов (ОЭ)	Ацетилхолин в одной из концентраций (10 ⁻¹⁰ -10 ⁻⁶ г/мл)	
	ВНА _{кр} РЭ	Взвесь реинкубированных эритроцитов (РЭ)	Раствор Кребса	
	ВНА _{ах} РЭ	Взвесь реинкубированных эритроцитов (РЭ)	Ацетилхолин в одной из концентраций (10 ⁻¹⁰ -10 ⁻⁶ г/мл)	

Примечание: ВНА – время начала агглютинации.

селективных блокаторов М-ХР – гастропепина, метоктрамина, 4-дифенилацетокси-N-метилпиперидин метиодид (4-DAMP), тропикамида, а также веществ, позволяющих изучить пострецепторные процессы – верапамила, хлорида бария, индометацина и трифлуоперазина. Для этого растворы этих веществ (10^{-6} г/мл раствора Кребса) добавляли в объеме 0,25 мл к 0,75 мл гепаринизированной крови и инкубировали 5 минут при комнатной температуре (табл. 1, серия 1–8).

Для сравнения аналогично вместо исследуемого вещества к гепаринизированной крови добавляли раствор Кребса и также инкубировали в течение 5 минут. Влияние ацетилхолина и других веществ на время начала агглютинации (ВНА) эритроцитов оценивали по методике Циркина В.И. и соавт. [8] в нашей модификации [6]. С этой целью на плоскость наносили три капли: 1) каплю гепаринизированной крови после ее 5-тиминутной инкубации с исследуемым веществом (блокаторы М-ХР и другие) или с раствором Кребса, 2) каплю раствора Кребса (контроль) или каплю ацетилхолина в одной из

исследуемой концентрации (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} г/мл; опыт) и 3) каплю изогемагглютинирующей сыворотки анти-(А+В). Затем смешивали первые две капли, а через 10 сек. к ним примешивали третью, т. е. каплю сыворотки, и с этого момента определяли ВНА эритроцитов по появлению первых визуальных признаков агглютинации – «зернышек» агглютината. Это позволяло (табл. 1) определить этот показатель на фоне раствора Кребса ($VNA_{кр}$), на фоне ацетилхолина (VNA_{ax}) или на фоне исследуемого вещества ($VNA_{кр+ив}$, $VNA_{ax+ив}$). ВНА оценивали в секундах и выражали (в опытах) в процентах к контролю, т. е. к $VNA_{кр}$ или к $VNA_{кр+ив}$.

Для исключения влияния веществ, находящихся в сыворотке крови, на процесс агглютинации была проведена серия 9 с тремя видами эритроцитов: 1) интактными эритроцитами, 2) отмытыми эритроцитами и 3) реинкубированными эритроцитами. Для их получения (рис. 1) исходно кровь в объеме 4 мл смешивали с 1 мл раствора Кребса, содержащего 50 Ед гепарина (интактные эритроциты).

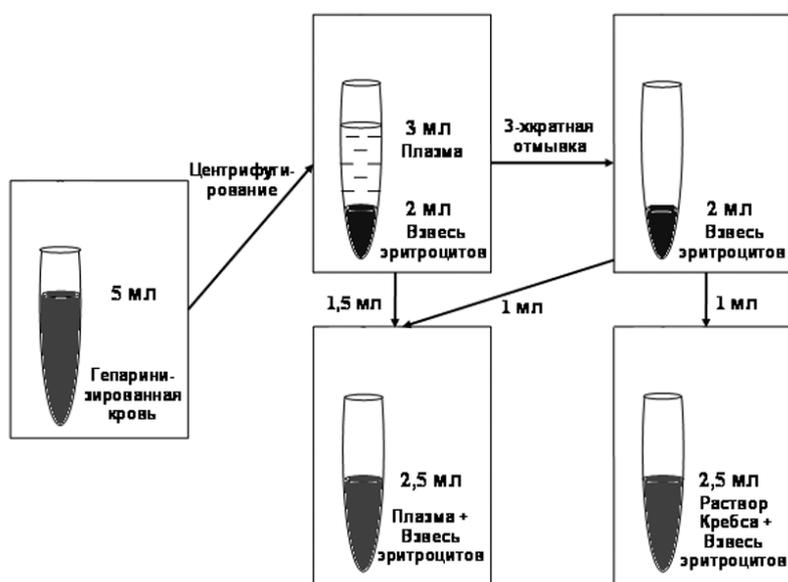


Рис. 1. Схема получения взвеси отмытых и реинкубированных эритроцитов

Затем эту кровь центрифугировали в течение 10 минут при 1 500 об/мин, плазму переносили в отдельную пробирку, а оставшуюся взвесь эритроцитов трижды отмывали физиологическим раствором (в объеме 3 мл). 1 мл взвеси отмытых эритроцитов переносили в пробирку, содержащую 1,5 мл раствора Кребса (отмытые эритроциты). Оставшийся 1 мл взвеси эритроцитов помещали в пробирку, содержащую 1,5 мл плазмы исследуемого донора (реинкубированные эритроциты). Затем, также как и в сериях 1–8, определяли $VNA_{кр}$ и $VNA_{АХ}$, причем, у интактных и отмытых эритроцитов – сразу же после их получения, а у реинкубированных – после 5-тиминутной инкубации в плазме. Для определения VNA на плоскость наносили три капли: 1) каплю гепаринизированной крови (интактные эритроциты) или каплю отмытых эритроцитов или каплю реинкубированных эритроцитов, 2) каплю раствора Кребса (контроль) или каплю ацетилхолина в одной из исследуемой концентрации (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} г/мл; опыт) и 3) каплю изогемагглютинирующей сыворотки анти-(А+В). Дальнейшие процедуры проводили, как и в сериях 1–8.

В работе использовали ацетилхолина хлорид (10^{-10} - 10^{-6} г/мл, «Acros organics», Бельгия), селективные блокаторы – M_1 -ХР гастропепин («Вирион НПО ФГУП», Россия), M_2 -ХР метоктрамин («Sigma», США), M_3 -ХР 4-DAMP («Tocris Bioscience», Англия), M_4 -ХР тропикамид (ООО «Нижфарм», Россия), блокатор Ca^{2+} -каналов верапамил (ООО «Озон», Россия), блокатор циклооксигеназы и фосфолипазы A_2 индометацин («Фармахим-Софарма», Болгария), антагонист кальмодулина трифлуоперазин («Здоровье», Украина) и блокатор Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов хлорид бария («Синтез», Россия). Все вещества, кроме ацетилхолина, применяли в концентрации 10^{-6} г/мл. Использовали изогемагглютинирующую сыворотку анти-(А+В) с титром 1:32 (Кировская областная станция переливания крови). Раствор Кребса (рН=7,4), содержал (мм): NaCl – 136; KCl – 4,7; $CaCl_2$ – 2,52; $MgCl_2$ – 1,2;

KH_2PO_4 – 0,6; $NaHCO_3$ – 4,7; $C_6H_{12}O_6$ – 11.

Результаты исследования подвергнуты статистическому анализу с использованием программы BioStat 2009 Professional. 5.8.4. Так как большинство выборок подчиняется нормальному распределению, определяемому по критерию Шапиро-Уилка, в тексте результаты представлены в виде $M \pm m$. В связи с тем, что число наблюдений в каждой из девяти серий было равно 10, различия между независимыми выборками (между значениями в контроле и опыте, а также между группами «интактные эритроциты», «отмытые эритроциты» и «реинкубированные эритроциты») оценивали по критерию Мана-Уитни, а различия между зависимыми выборками (значениями до и после инкубации с блокаторами и другими веществами) – по критерию Вилкоксона. Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Зависимость эффекта ацетилхолина от его концентрации оценивали по критерию ранговой корреляции Спирмена.

Результаты исследования. Установлено, что время начала агглютинации ($VNA_{кр}$) эритроцитов гепаринизированной крови, инкубированных в течение 5 минут с раствором Кребса, при смешивании с раствором Кребса и изогемагглютинирующей сывороткой в среднем составило 12 ± 1 с ($n=80$). Ацетилхолин, как правило, дозозависимо снижал VNA эритроцитов (рис. 2).

Исключение составили серии, в которых исследовали влияние гастропепина и тропикамида на эффект ацетилхолина, – в них ацетилхолин снижал VNA не зависимо от его концентрации. В среднем у 80 мужчин в $VNA_{АХ}$ опытах с ацетилхолином в концентрациях 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} г/мл составило соответственно $88 \pm 1^*$, $85 \pm 1^*$, $81 \pm 1^*$, $77 \pm 1^*$ и $73 \pm 1^*$ %* от контроля, т. е. от $VNA_{кр}$ (здесь и далее * означает, что различие с контролем статистически значимо по критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$). При этом корреляционный анализ показал, что эффект ацетилхолина зависит от его концентрации – критерий Спирмена составил минус 0,500 ($p < 0,05$).

Таблица 2

ВНА (М±М) ЭРИТРОЦИТОВ ПОСЛЕ ИХ 5-МИНУТНОЙ ИНКУБАЦИИ С БЛОКАТОРАМИ (ОПЫТ) ИЛИ С РАСТВОРОМ КРЕБСА (КОНТРОЛЬ).

Условия	Блокаторы, 10 ⁻⁶ г/мл							
	Гастроцепин	Метоктрамин	4-DAMP	Тропикамид	Верапамил	BaCl ₂	Индометацин	Трифлуоперазин
Контроль, с	15±2	10±1	12±1	15±2	12±1	12±2	11±1	10±1
Опыт, % к контролю	99±3	98±1	97±3	99±3	99±1	97±3	98±2	99±1

Установлено (табл. 2), что сами по себе гастропептин, метоктрамин, 4-DAMP, тропикамид, верапамил, хлорид бария, индометацин и трифлуоперазин (все – в концентрации 10⁻⁶ г/мл) не влияют на ВНА эритроцитов.

Так, после 5-минутной инкубации с гастропептином ВНА эритроцитов в изогемагглютинирующей сыворотке в присутствии раствора Кребса (ВНА_{КР+ИВ}) составила 99±3 % от ВНА эритроцитов, инкубированных в течение 5 минут с раствором Кребса (ВНА_{КР}), равного 15±2 сек. Это позволило использовать данные вещества для изучения роли рецепторов и механизмов внутриклеточной передачи сигнала в реализации способности ацетилхолина повышать скорость агглютинации эритроцитов.

Установлено, что селективный блокатор М₁-ХР гастропептин (рис. 2, панель А) полностью блокирует способность ацетилхолина (10⁻¹⁰-10⁻⁶ г/мл) снижать ВНА. Так, исходно ВНА_{АХ} при воздействии ацетилхолина в концентрациях 10⁻¹⁰, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶ г/мл составило соответственно 86±4*, 91±2*, 87±3*, 87±4*, 85±2%* от контроля, а ВНА_{АХ+ИВ}, т. е. на фоне ацетилхолина и исследуемого вещества (гастропептина), составило соответственно 113±9^х, 100±3^х, 106±5^х, 101±4^х, 101±4%^х от контроля (здесь и далее ^х означает, что различия со значениями ВНА_{АХ} статистически значимы по критерию Вилкоксона, p<0,05).

Селективный блокатор М₃-ХР 4-DAMP (рис. 2, панель В) также снижал способность ацетилхолина уменьшать ВНА, но при этом полная блокада этой способности наблюда-

лась лишь для ацетилхолина в концентрациях 10⁻¹⁰ и 10⁻⁹ г/мл. Так, ВНА_{АХ} при воздействии ацетилхолина в концентрациях 10⁻¹⁰, ..., 10⁻⁶ г/мл составляло соответственно 88±2*, 85±2*, 79±2*, 73±3*, 67±2%* от контроля, а ВНА_{АХ+ИВ} (4-DAMP) – соответственно 95±2^х, 96±3^х, 92±3*^х, 90±2*^х, 84±4%*^х от контроля.

Селективный блокатор М₂-ХР метоктрамин (рис. 2, панель Б) и селективный блокатор М₄-ХР тропикамид (рис. 2, панель Г), как правило, не влияли на способность ацетилхолина снижать ВНА. Так, в опытах с метоктрамином ВНА_{АХ} при воздействии ацетилхолина в концентрациях 10⁻¹⁰, ..., 10⁻⁶ г/мл составило соответственно 87±3*, 82±3*, 77±2*, 74±4* и 68±4%* от контроля, а ВНА_{АХ+ИВ} (метоктрамин) – соответственно 84±2*, 75±3*^х, 73±3*, 73±4* и 67±3%* от контроля.

В целом, результаты опытов с блокаторами М-ХР позволяют заключить, что ацетилхолин снижает ВНА эритроцитов, т. е. повышает скорость их агглютинации за счет активации М₁- и М₃-ХР, в то время как активация М₂- и М₄-ХР не влияет на этот процесс.

При анализе механизма, лежащего в основе увеличения скорости агглютинации под влиянием ацетилхолина, нами показано (рис. 2), что блокатор Ca²⁺-каналов верапамил (панель Д), блокатор Ca²⁺-зависимых K⁺-каналов хлорид бария (панель Е), ингибитор циклооксигеназы и фосфолипазы А₂ индометацин (панель Ж) и антагонист кальмодулина трифлуоперазин (панель З) полностью блокируют способность ацетилхолина снижать ВНА (p<0,05). Так, в

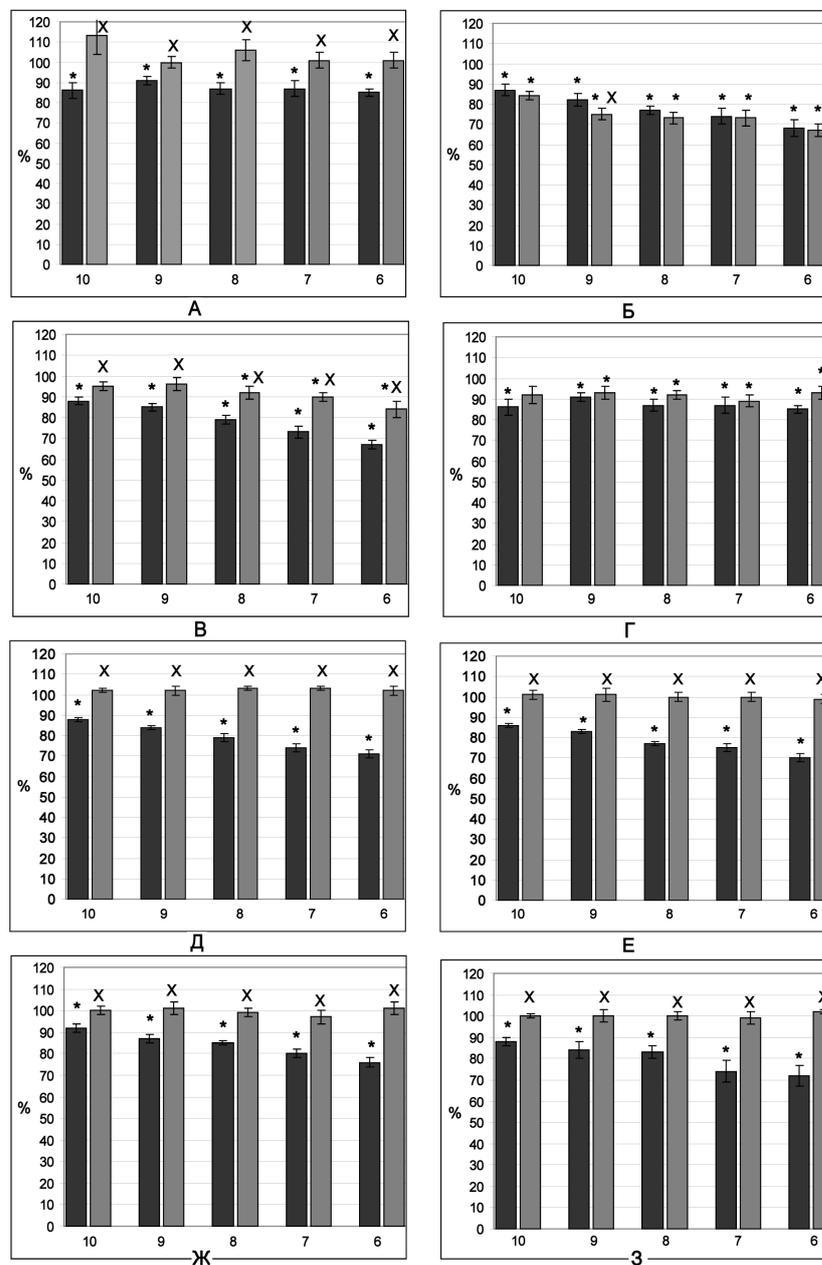


Рис. 2. Время начала агглютинации эритроцитов в присутствии ацетилхолина (в % от контроля): исходное (панель А, Б, В, Г, Д, Е, Ж, З, 1-е столбцы) и после 5-минутной экспозиции с гинипраломом (10^{-6} г/мл, панель А, 2-е столбцы), метоктрамином (10^{-6} г/мл, панель Б, 2-е столбцы), 4-DAMP (10^{-6} г/мл, панель В, 2-е столбцы), тропикамидом (10^{-6} г/мл, панель Г, 2-е столбцы), верапамилом (10^{-6} г/мл, панель Д, 2-е столбцы), хлоридом бария (10^{-6} г/мл, панель Е, 2-е столбцы), индометацином (10^{-6} г/мл, панель Ж, 2-е столбцы) и трифлуоперазином (10^{-6} г/мл, панель З, 2-е столбцы). * и X – различия с контролем и группой «Ацетилхолин» статистически значимы ($p < 0,05$) соответственно по критерию Манна-Уитни и Вилкоксона.

опытах с верапамилом $\text{ВНА}_{\text{АХ}}$ при воздействии ацетилхолина в концентрациях $10^{-10}, \dots, 10^{-6}$ г/мл составило соответственно $88 \pm 1^*$, $84 \pm 1^*$, $79 \pm 2^*$, $74 \pm 2^*$ и $71 \pm 2\%^*$ от контроля, а $\text{ВНА}_{\text{АХ+ИВ}}$ (верапамил) – соответственно 102 ± 1^x , 102 ± 2^x , 103 ± 1^x , 103 ± 1^x и $102 \pm 2\%^x$ от контроля. Таким образом, эти результаты позволяют заключить, что способность ацетилхолина повышать скорость агглютинации эритроцитов реализуется с участием фосфолипазы A_2 , циклооксигеназы и кальмодулина, а также за счет увеличения внутриэритроцитарной концентрации Ca^{2+} и снижения содержания K^+ внутри эритроцита.

При изучении влияния на исследуемый эффект ацетилхолина веществ, находящихся в сыворотке крови (серия 9), было показано (табл. 3), что ацетилхолин снижает ВНА интактных, отмытых и реинкубированных эритроцитов.

При этом изменение ВНА под влиянием ацетилхолина во всех трех группах было идентично. Так, для ацетилхолина в концентрации 10^{-6} г/мл $\text{ВНА}_{\text{АХ}}$ для интактных, отмытых и реинкубированных эритроцитов составило соответственно $72 \pm 5\%^*$, $77 \pm 4\%^*$ и $77 \pm 4\%^*$ от контроля ($p > 0,05$). Это означает, что способность ацетилхолина повышать скорость агглютинации эритроцитов не изменяется после процедуры отмывки и не зависит от присутствия веществ, находящихся в плазме крови. Отме-

тим, что в отсутствие плазмы или при ее добавлении к отмытым эритроцитам $\text{ВНА}_{\text{КР}}$ оставалось таким же, как и у интактных эритроцитов, т. е. при наличии плазмы крови.

Обсуждение. Нами установлено, что ацетилхолин, как правило, дозозависимо снижает ВНА эритроцитов человека, т.е. повышает скорость их агглютинации, тем самым мы подтвердили результаты наших предыдущих исследований [6]. Лишь в опытах с гастрोцепином и тропикамидом подобная зависимость не выявлена. Это, по нашему мнению, может быть связано с тем, что опыты с указанными блокаторами проводились в зимнее время, а опыты с другими веществами – в летнее. Такое объяснение согласуется с нашими данными [10] о зависимости М-холинореактивности от метеофакторов.

Нами впервые установлено, что фоновая скорость агглютинации эритроцитов, также как и способность ацетилхолина повышать скорость агглютинации, не зависят от присутствия веществ, находящихся в плазме крови, так как значения $\text{ВНА}_{\text{КР}}$ и $\text{ВНА}_{\text{АХ}}$ в опытах с отмытыми и реинкубированными эритроцитами были такими же, как в опытах с интактными эритроцитами.

Ранее нами было показано [6], что способность ацетилхолина повышать скорость агглютинации эритроцитов полностью блокируется

Таблица 3

ВНА (М±m) ИНТАКТНЫХ, ОТМЫТЫХ И РЕИНКУБИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ НА ФОНЕ РАСТВОРА КРЕБСА ИЛИ АЦЕТИЛХОЛИНА

Условия опыта и концентрация веществ, г/мл	Интактные эритроциты		Отмытые эритроциты		Реинкубированные эритроциты	
	n	М±m	n	М±m	n	М±m
Кребс, с	10	11±3	10	10±2	10	11±2
Ацетилхолин, 10^{-10}	10	94±4*	10	92±2*	10	91±2*
Ацетилхолин 10^{-9}	10	87±4*	10	83±4*	10	89±3*
Ацетилхолин 10^{-8}	10	80±4*	10	84±5*	10	81±3*
Ацетилхолин 10^{-7}	10	77±5*	10	76±4*	10	76±4*
Ацетилхолин 10^{-6}	10	72±5*	10	77±4*	10	77±4*

Примечание: * – различия с контролем (т. е. со значениями на фоне раствора Кребса) статистически значимы ($p < 0,05$) по критерию Манна-Уитни; n – количество наблюдений.

неселективным М-холиноблокатором атропином. Результаты, представленные в данной статье, уточняют, что способность ацетилхолина повышать скорость агглютинации эритроцитов обусловлена активацией M_1 - и, частично M_3 -ХР и не зависит от активации M_2 - и M_4 -ХР, т.к. об этом свидетельствует тот факт, что селективный M_1 -холиноблокатор гастроцепин полностью блокирует эффект ацетилхолина, селективный M_3 -холиноблокатор 4-DAMP полностью блокирует эффект ацетилхолина при использовании его в концентрациях 10^{-10} и 10^{-9} г/мл, а в концентрациях 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} г/мл – блокирует его частично, в то время как селективные блокаторы M_2 - и M_4 -ХР (соответственно метоктрамин и тропикамид) не влияют на эффект ацетилхолина (10^{-10} - 10^{-6} г/мл). Отметим, что результаты наших исследований подтверждают данные литературы о наличии в эритроцитах M_1 - и M_3 -ХР [23; 24]. При этом мы не исключаем наличие в эритроцитах других популяций М-ХР.

Агглютинация эритроцитов, как известно [2, с. 310], представляет собой склеивание в присутствии электролитов антигеннесущих эритроцитов с помощью специфических антител, или агглютининов (анти-А и анти-В), относящихся к классам IgM и IgG. Она заканчивается образованием видимых невооруженным глазом хлопьев, или осадка (агглютината). Скорость агглютинации, согласно нашей точке зрения, преимущественно зависит от величины отрицательного заряда поверхности эритроцитов – при его снижении скорость агглютинации повышается, так как уменьшается действие сил, способствующих отталкиванию эритроцитов друг от друга, и увеличивается вероятность их взаимодействия. Как известно [12, с. 4], снижение поверхностного отрицательного заряда эритроцита может происходить при увеличении микровязкости липидного слоя мембраны и, как мы предполагаем, при увеличении выхода из эритроцита положительно заряженных ионов, в частности K^+ . Выход K^+ из эритроцита, согласно данным литературы [3], увеличивается при открытии Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов в

результате увеличения внутриэритроцитарной концентрации Ca^{2+} . Как известно [24], при связывании ацетилхолина с M_1 - и M_3 -ХР, ассоциированными с Gq-белками, происходит активация фосфолипазы С (рис. 3), что приводит к образованию диацилглицерола (ДАГ) и инозитолтрифосфата (ИФ₃). В результате открываются ИФ₃-зависимые Ca^{2+} -каналы, что повышает вход Ca^{2+} в эритроциты и выход из них K^+ .

Результаты наших экспериментов показали, что способность ацетилхолина повышать скорость агглютинации снижается под влиянием хлорида бария и верапамила. Как известно, хлорид бария является блокатором Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов [4, с. 104], а верапамил – антагонистом Ca^{2+} [5]. Эти результаты наших исследований подтверждают наше предположение, что для реализации эффекта ацетилхолина необходимо увеличение внутриэритроцитарной концентрации Ca^{2+} и выход K^+ из эритроцита.

Увеличение концентрации Ca^{2+} в эритроците, согласно данным литературы [18], приводит к активации фосфолипазы A_2 . Она расщепляет фосфолипиды мембраны с образованием арахидоновой кислоты, которая, как известно [19], под действием циклооксигеназы превращается в простагландины, в том числе ПГЕ₂. Арахидоновая кислота и ПГЕ₂, согласно данным литературы [7; 13; 20], повышают проницаемость неселективных катионных каналов для Ca^{2+} и тем самым дополнительно повышают внутриэритроцитарную концентрацию этих ионов. Полагаем, что это также стимулирует открытие Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов и выход K^+ из эритроцита. Это предположение подтверждают результаты опытов, согласно которым индометацин блокирует способность ацетилхолина повышать скорость агглютинации.

Микровязкость мембраны эритроцита, по нашему мнению, также играет важную роль в увеличении скорости агглютинации. Согласно данным литературы [11] микровязкость мембраны эритроцита увеличивается при деструкции липидного бислоя и при уменьшении белково-липидных контактов. Деструкция липидного бислоя происходит при активации фосфоли-

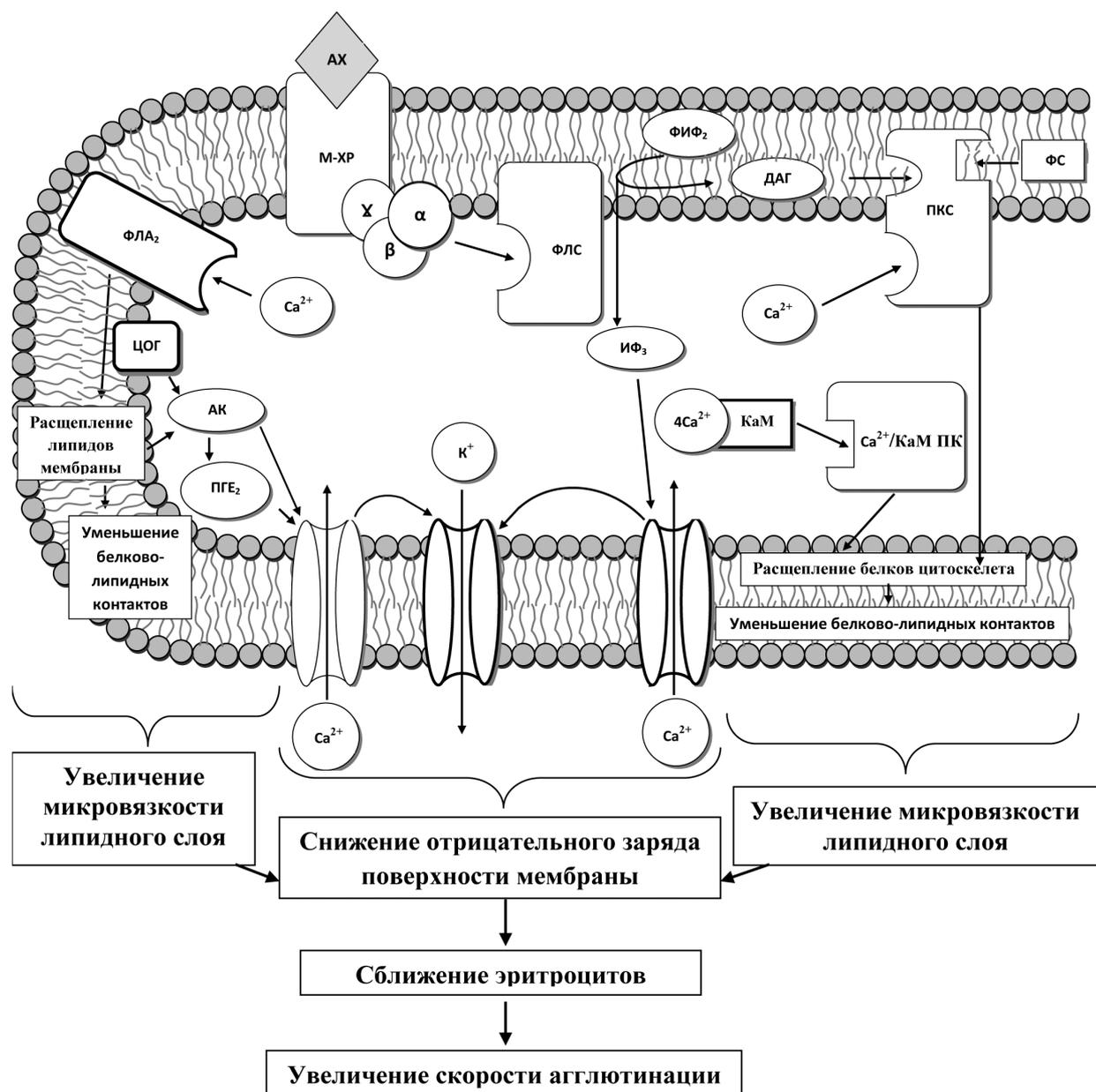


Рис. 3. Механизм повышения скорости агглютинации эритроцитов человека под влиянием ацетилхолина. Ах – ацетилхолин, М-ХР – M_1 - или M_3 - холинорецепор, α , β , γ – субъединицы Gq-белка, ФЛС – фосфолипаза С, ПКС – протеинкиназа С, ФИФ_2 – фософоинозитолбифосфат, ДАГ – диацилглицерол, ФС – фосфодитилсерин, ИФ_3 – инозитолтрифосфат, CaM – кальмодулин, $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ПК – кальций-кальмодулин-зависимая протеинкиназа, ФЛА_2 – фосфолипаза A_2 , ЦОГ – циклооксигеназа, АК – арахидоновая кислота, ПГЕ_2 – простагландин E_2 . Жирным контуром выделены звенья, участие которых подтверждено опытным путем

пазы A_2 [4, с. 35], а уменьшение белково-липидных контактов – при активации фосфолипазы A_2 и Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ, в том числе протеинкиназы С и Ca^{2+} -кальмодулин-зависимой протеинкиназы [4, с. 35; 14; 16; 17; 21]. Известно, что Ca^{2+} -кальмодулин-зависимая протеинкиназа активируется под влиянием увеличения концентрации внутриэритроцитарного Ca^{2+} , который делает активным кальмодулин. Под влиянием комплекса « Ca^{2+} -кальмодулин» и Ca^{2+} -кальмодулин-зависимой протеинкиназы происходит фосфорилирование белков цитоскелета, в том числе спектрина [14; 16], аддуцина [21] и белка полосы 4.1 [17]. Фосфорилирование этих белков, как известно [9], способствует утрате их сродства друг к другу и к фософлипидам мембраны. Это, совместно с деструкцией липидного бислоя под действием фосфолипазы A_2 , приводит к уменьшению белково-липидных контактов и увеличению микровязкости эритроцитарной мембраны и, тем самым, к снижению поверхностного отрицательного заряда эритроцитов. Наши данные о том, что трифлуоперазин, являющийся антагонистом кальмодулина [9], и индометацин, как ингибитор циклооксигеназы и фосфолипазы A_2 [1], блокируют эффект ацетилхолина, подтверждают предположение о роли повышения микровязкости мембраны эритроцитов в увеличении скорости их агглютинации под влиянием ацетилхолина.

Согласно данным литературы [15; 22], входящий в эритроцит Ca^{2+} совместно с образовавшимся диацилглицеролом и фосфатидилсеринном эритроцитарной мембраны активирует протеинкиназу С, которая фосфорилирует белки полос 4.1 и 4.9. Хотя в нашем исследовании участие этого звена не было подвергнуто экспериментальной проверке, мы не исключаем, что фосфорилирование этих белков также вносит вклад в увеличение микровязкости мембраны эритроцита под влиянием ацетилхолина.

Отметим, что в наших опытах верапамил, хлорид бария, индометацин и трифлуоперазин, полностью блокирующие способность ацетилхолина повышать скорость агглютинации эри-

троцитов, сами по себе не изменяли ее фоновые значения. Косвенно, это означает, что снижение внутриэритроцитарной концентрации Ca^{2+} (под влиянием верапамила или индометацина), уменьшение выхода K^+ из эритроцита (под влиянием хлорида бария или верапамила, или индометацина), а также снижение микровязкости мембраны (под влиянием трифлуоперазина или индометацина) не отражаются на фоновой скорости агглютинации эритроцитов, но препятствуют ее повышению под влиянием ацетилхолина. Не исключено, что блокирующий эффект этих веществ частично связан с тем, что они обладают слабым М-холиноблокирующим эффектом.

Таким образом, результаты наших опытов позволяют утверждать, что в основе способности ацетилхолина повышать скорость агглютинации эритроцитов лежит активация M_1 - и M_3 -ХР, в результате которой уменьшается поверхностный отрицательный заряд. Это изменение заряда обусловлено повышением выхода K^+ из эритроцита (в следствие открытия Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов за счет увеличения внутриэритроцитарной концентрации Ca^{2+} под влиянием инозитолтрифосфата, образовавшегося при активации фосфолипазы С), а также ростом микровязкости мембраны (за счет деструкции липидного бислоя и уменьшения белково-липидных контактов под влиянием фосфолипазы A_2 , Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеинкиназы, протеинкиназы С и комплекса « Ca^{2+} -кальмодулин»).

Выводы.

1. Ацетилхолин (10^{-10} - 10^{-6} г/мл) дозозависимо повышает скорость агглютинации эритроцитов человека.

2. Этот эффект не изменяется при воздействии селективных блокаторов M_2 - и M_4 -ХР (соответственно метоктрамина и тропикамида), но снижается при воздействии селективных блокаторов M_1 - и M_3 -холинорецепторов (соответственно гастропепина и 4-DAMP), ингибитора циклооксигеназы и фосфолипазы A_2 индометацина, ингибитора кальмодулина трифлуоперазина, блокатора Ca^{2+} -зависимых

K⁺-каналов хлорида бария и блокатора Ca²⁺-каналов верапамила.

3. Способность ацетилхолина повышать скорость агглютинации эритроцитов связана с

активацией M₁- и M₃-ХР и объясняется уменьшением поверхностного отрицательного заряда в следствие повышения выхода K⁺ из эритроцитов и роста микровязкости их мембран.

Список литературы

1. Бышевский А.Ш., Галян С.Л., Шаповалов П.Я. Влияние соединений, модифицирующих превращения арахидоновой кислоты в тромбоцитах, на эффекты этинилэстрадиола // Гемостаз и реология. 2000. № 1. С. 8–12.
2. Жибурт Е.Б. Трансфузиология. СПб., 2002.
3. Изменение агрегации и деформируемости эритроцитов при активации внутриклеточных сигнальных путей / А.А. Маймистова, В.Б. Кошелев, С.В. Булаева, А.В. Муравьев // Ярославский пед. вестн. 2010. № 3. С. 71–74.
4. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Курилова Л.С. Механизмы внутриклеточной сигнализации. СПб., 2003.
5. Кузьмина О.А. Клиническая фармакология, фармакокинетика антагонистов кальция и их применение в современной медицине // Междунар. мед. журн. (Харьков). 2006. Т. 12. № 1. С. 117–121.
6. М-холинореактивность эритроцитов беременных женщин, определяемая по изменению скорости агглютинации эритроцитов под влиянием ацетилхолина / А.И. Стрельникова, В.И. Циркин, А.В. Крысова, С.В. Хлыбова и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012. Т. 154. № 8. С. 140–144.
7. Нарушение деформационных и транспортных характеристик эритроцитов при развитии у них апоптоза / И.В. Миндукшев, В.В. Кривошлык, И.А. Добрылко, Н.В. Гончаров и др. // Биологические мембраны. 2010. Т. 27. № 1. С. 28–38.
8. Оценка адренореактивности эритроцитов, основанная на способности адреналина повышать скорость агглютинации эритроцитов / В.И. Циркин, М.А. Громова, Д.А. Колчина, В.И. Михайлова и др. // Фундаментальные исследования. 2008. № 7. С. 59–60.
9. Сторожок С.А., Санников А.Г., Белкин А.В. Зависимость стабильности деформабельности мембран эритроцитов от межмолекулярных взаимодействий белков цитоскелета. Тюмень, 1997. Т. 3. С. 140.
10. Стрельникова А.И. Изменение параметров вариабельности сердечного ритма, адрено- и холинореактивности эритроцитов человека под влиянием метеорологических факторов // Человек и его здоровье: фундаментальная наука и клиническая медицина: материалы XIII Всерос. мед.-биол. конф. Санкт-Петербург, 24 апреля 2010. СПб., 2010. С. 192–193.
11. Ультраструктура эритроцитов в норме и при патологии: морфологические феномены, клинические аспекты / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, Е.А. Степовая, С.Б. Ткаченко // Морфология. 2004. № 5. С. 48–51.
12. Шамратова В.Г. Регуляция электрокинетических свойств эритроцитарных популяций при различном функциональном состоянии организма: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Казань, 2012.
13. Arachidonic Acid Increases Calcium in Erythrocytes / L. Soldati, C. Lombardi, D. Adamo, A. Terraneqra, G. Bianchi, G. Vezzoli // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2002. Vol. 293. P. 974–978.
14. Boivin P., Galand C. Is Spectrin a Calmodulin-binding Protein? // Biochem. Int. 1984. Vol. 8. P. 231–236.
15. Effect of Protein Kinase C Activation on Cytoskeleton and Cation Transport in Human Erythrocytes. Reproduction of some membrane abnormalities revealed in essential hypertension / Y.V. Postnov, G.M. Kravtsov, S.N. Orlov, N.I. Pokudin, I.Y. Postnov, Y.V. Kotelevtsev // Hypertension. 1988. Vol. 12. P. 267–273.
16. Huestis W.H., Nelson M., Ferrell J.E. Calmodulin-Dependent Spectrin Kinase Activity in Human Erythrocytes // Progress in Clinical and Biological Research. 1981. Vol. 256. P. 137–155.
17. Husain A., Howlett G., Sawyer W. The Interaction of Calmodulin with Erythrocyte Membrane Proteins // Biochem. Int. 1985. Vol. 10. P. 1–12.
18. Influence of Enzymatic Phospholipid Cleavage on the Permeability of the Erythrocyte Membrane: III. Discrimination Between the Causal Role of Split Products and of Lecithin Removal / B. Deuticke, M. Grunze, B. Forst, P. Luetkemeier // Journal of Membrane Biology. 1981. Vol. 59 (1). P. 45–55.

-
19. In Vivo Effects of Meloxicam, Celecoxib, and Ibuprofen on Free Radical Metabolism in Human Erythrocytes / M.Y. Burak Cimen, O.B. Cimen, G. Eskandari, G. Sahin, C. Erdogan, U. Atik // *Drug and Chemical Toxicology*. 2003. Vol. 26 (3). P. 169–176.
 20. *Kaestner L., Bernhardt I.* Ion Channels in the Human Red Blood Cell Membrane: their Further Investigation and Physiological Relevance // *Bioelectrochemistry*. 2002. Vol. 55. P. 71–74.
 21. *Mische S., Mooseker M., Morrow J.* Erythrocyte Adducing: a Calmodulin-regulated Actin-binding Protein that Stimulated Spectrin-actin Binding // *J. Cell Biol.* 1987. Vol. 105. P. 2837–49.
 22. Protein Kinase C of Human Erythrocytes Phosphorylates Bands 4.1 and 4.9 / W.C. Faquin, S.B. Chahwala, L.C. Cantley, D. Branton // *Biochim. Biophysica Acta*. 1986. Vol. 887 (2). P. 142–149.
 23. *Tang L.C.* Human Erythrocyte as a Model for Investigating Muscarinic Agonists and Antagonists // *Gen. Pharmacol.* 1991. Vol. 22 (3). P. 485–490.
 24. Tetrodotoxin-sensitive Na⁺ Channels and Muscarinic and Purinergic Receptors Identified in Human Erythroid Progenitor Cells and Red Blood Cell Ghosts / J.F. Hoffman, A. Dodson, A. Wickrema, S.D. Dib-Hajj // *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 2004. Vol. 101 (33). P. 12370–12374.

References

1. Byshevskiy A.Sh., Galyan S.L., Shapovalov P.Ya. Vliyanie soedineniy, modifitsiruyushchikh prevrashcheniya arakhidonovoy kisloty v trombositakh, na efekty etinilestradiola [The influence of compounds modifying conversion of arachidonic acid in platelets, on the effects of ethinylestradiol]. *Gemostaz i reologiya*, 2000, no. 1, pp. 8–12.
2. Zhiburt E.B. *Transfuziologiya* [Transfusiology]. St. Petersburg, Piter Publ., 2002. 736 p.
3. A.A. Maymistova, V.B. Koshelev, S.V. Bulaeva, A.V. Murav'ev. Izmenenie agregatsii i deformiruемости eritrotsitov pri aktivatsii vnutrikletochnykh signal'nykh putey [The Change of Erythrocytes Deformability and Aggregation under Activation of Intracellular Signaling Transduction Pathways]. *Yaroslavskiy pedagogicheskii vestnik*, 2010, no. 3, pp.71–74.
4. Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Kurilova L.S. *Mekhanizmy vnutrikletochnoy signalizatsii* [Intracellular signaling mechanisms]. St. Petersburg, St. Petersburg University Publ., 2003. 208 p.
5. Kuz'mina O.A. Klinicheskaya farmakologiya, farmakokinetika antagonistov kal'tsiya i ikh primeneniye v sovremennoy meditsine [Clinical pharmacology, pharmacokinetics of calcium antagonists and their application in modern medicine]. *Mezhdunarodnyy meditsinskiy zhurnal (Kharkov)*, 2006, vol.12, no. 1, pp. 117–121.
6. V.I. Tsirkin, A.V. Krysova, S.V. Khlybova et al. M-kholinoreaktivnost' eritrotsitov beremennykh zhenshchin, opredelyaemaya po izmeneniyu skorosti agglyutinatsii eritrotsitov pod vliyaniem atsetilkholina [M-Cholinoreactivity of Erythrocytes of Pregnant Women Evaluated by Changes in the Rate of Erythrocyte Agglutination under the Influence of Acetylcholine]. A.I. Strel'nikova, *Byulleten'eksperimental'noy biologii i meditsiny*, 2012, vol. 154, no. 8, pp.140–144.
7. I.V. Mindukshev, V.V. Krivoshlyk, I.A. Dobrylko, N.V. Goncharov, et al. Narusheniye deformatsionnykh i transportnykh kharakteristik eritrotsitov pri razvitiu i nikh apoptoza [Abnormalities of elastic and transporting properties of red blood cells under development of apoptosis]. *Biologicheskie membrany*, 2010, vol. 27, no. 1, pp. 28–38.
8. V.I. Tsirkin, M.A. Gromova, D.A. Kolchina, V.I. Mikhaylova et al. Otsenka adrenoreaktivnosti eritrotsitov, osnovannaya na sposobnosti adrenalina povyshat' skorost' agglyutinatsii eritrotsitov [Evaluation of erythrocyte adrenoreactivity, based on the ability of adrenaline to increase the rate of hemagglutination]. *Fundamental'nye issledovaniya*, 2008, no. 7, pp. 59–60.
9. Storozhok S.A., Sannikov A.G., Belkin A.V. *Zavisimost' stabil'nosti deformabel'nosti membran eritrotsitov ot mezhmolekulyarnykh vzaimodeystviy belkov tsitoskeleta* [Dependence of the stability of erythrocyte membrane deformability on intermolecular interactions of cytoskeletal proteins]. Tyumen, Tyumen University Publ., 1997, vol. 3, p. 140.
10. Strel'nikova A.I. Izmeneniye parametrov variabel'nosti serdechnogo ritma, adreno- i kholinoreaktivnosti eritrotsitov cheloveka pod vliyaniem meteorologicheskikh faktorov. *Chelovek i ego zdorov'e: fundamental'naya nauka i klinicheskaya meditsina: materialy XIII vseros. med.-biol. konf.* [Proc. 13th Int. Conf. "Man and his health: fundamental science and clinical medicine"]. St. Peterburg, April 24, 2010. St. Petersburg University Publ., 2010, pp. 192–193.

11. N.V. Ryazantseva, V.V. Novitskiy, E.A. Stepovaya, S.B. Tkachenko. Ul'trastuktura eritrotsitov v norme i pri patologii: morfologicheskie fenomeny, klinicheskie aspekty [Erythrocyte ultrastructure in norm and pathology: morphological phenomena and clinical correlations]. *Morfologiya*, 2004, no. 5, pp. 48–51.
12. Shamratova V.G. *Regulyatsiya elektrokineticheskikh svoystv eritrotsitarnykh populyatsiy pri razlichnom funktsional'nom sostoyanii organizma: avtoref. dis. ... d-ra biol. nauk* [Regulation of electrokinetic properties of erythrocyte populations in different functional states of the organism. Dr. sci. diss. abstract]. Kazan, 2012.
13. L. Soldati, C. Lombardi, D. Adamo, A. Terraneqra et al. Arachidonic acid increases calcium in erythrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, vol. 293, pp. 974–978.
14. Boivin P., Galand C. Is spectrin a calmodulin-binding protein? *Biochem. Int.*, 1984, vol. 8, pp. 231–236.
15. Y.V. Postnov, G.M. Kravtsov, S.N. Orlov, N.I. Pokudin et al. Effect of protein kinase C activation on cytoskeleton and cation transport in human erythrocytes. Reproduction of some membrane abnormalities revealed in essential hypertension. *Hypertension*, 1988, vol.12, pp. 267–273.
16. Huestis W.H., Nelson M., Ferrell J.E. Calmodulin-dependent spectrin kinase activity in human erythrocytes. *Progress in clinical and biological research*, 1981, vol. 256, pp. 137–155.
17. Husain A., Howlett G., Sawyer W. The interaction of calmodulin with erythrocyte membrane proteins. *Biochem. Int.*, 1985, vol. 10, pp. 1–12.
18. B. Deuticke, M. Grunze, B. Forst, P. Luetkemeier Influence of enzymatic phospholipid cleavage on the permeability of the erythrocyte membrane: III. Discrimination between the causal role of split products and of lecithin removal. *Journal of Membrane Biology*, 1981, vol. 59 (1), pp. 45–55.
19. M.Y. Burak Cimen, O.B. Cimen, G. Eskandari, G. Sahin et al. In vivo effects of meloxicam, celecoxib, and ibuprofen on free radical metabolism in human erythrocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 2003, vol. 26 (3), pp. 169–176.
20. Kaestner L., Bernhardt I. Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance. *Bioelectrochemistry*, 2002, vol. 55, pp. 71–74.
21. Mische S., Mooseker M., Morrow J. Erythrocyte adducing: a calmodulin-regulated actin-binding protein that stimulated spectrin-actin binding. *J. Cell Biol.*, 1987, vol. 105, pp. 2837–49.
22. W.C. Faquin, S.B. Chahwala, L.C. Cantley, D. Branton. Protein kinase C of human erythrocytes phosphorylates bands 4.1 and 4.9. *Biochim. Biophysica Acta*, 1986, vol. 887 (2), pp. 142–149.
23. Tang L.C. Human erythrocyte as a model for investigating muscarinic agonists and antagonists. *Gen. Pharmacol.*, 1991, vol. 22 (3), pp. 485–490.
24. J.F. Hoffman, A. Dodson, A. Wickrema, S.D. Dib-Hajj Tetradotoxin-sensitive Na⁺ channels and muscarinic and purinergic receptors identified in human erythroid progenitor cells and red blood cell ghosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, vol. 101 (33), pp.12370–12374.

Tsirkin Viktor Ivanovich

General Medicine Faculty,
Kazan State Medical University (Kazan, Russia)

Volodchenko Anna Ivanovna

Postgraduate Student, Natural Geography Faculty,
Vyatka State Humanities University (Kirov, Russia)

Kostyaev Andrey Aleksandrovich

Kirov Research Institute of Hematology and Blood
Transfusion (Kirov, Russia)

MECHANISM OF THE EFFECT OF ACETYLCHOLINE ON THE RATE OF HEMAGGLUTINATION IN HUMANS

Acetylcholine (ACh, 10⁻¹⁰–10⁻⁶ g/ml) dose-dependently increases the rate of erythrocyte agglutination in men. This effect is reduced by selective blockers of M₁- and M₃-cholinergic receptors (ChR):

gastrotsepin and 4-DAMP, inhibitor of cyclooxygenase and phospholipase A₂, indomethacin, inhibitor of calmodulin trifluoperazine, blocker of Ca²⁺-dependent K⁺-channels BaCl₂, and blocker of Ca²⁺-channels verapamil. This means that the effect of ACh is caused by the activation of M₁- and M₃-ChR and involves cyclooxygenase, phospholipase A₂, calmodulin and Ca²⁺- and K⁺-channels.

Keywords: *erythrocytes, agglutination, acetylcholine, muscarinic receptors, cyclooxygenase, phospholipase A₂, calmodulin.*

Контактная информация:

Циркин Виктор Иванович

адрес: 402012, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49

e-mail: tsirkin@list.ru

Володченко Анна Ивановна

адрес: 610002, г. Киров, ул. Свободы, д. 122

e-mail: strelnikovaai@mail.ru

Костяев Андрей Александрович

адрес: 610027, г. Киров, ул. Красноармейская, д. 72

e-mail: labcon@mail.ru

Рецензент – *Щёголева Л.С.*, доктор биологических наук, профессор, директор Института физиологии природных адаптаций Уральского отделения РАН (г. Архангельск)