

УДК 57.053

ЭРИТРОЦИТЫ КАК РЕГУЛЯТОРЫ СОСУДИСТОГО ТОНУСА

© 2015 г. О. Г. Лунева¹, С. В. Сидоренко¹, Г. В. Максимов¹, Р. Григорчик², С. Н. Орлов^{1, 3*}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12;

*электронная почта: sergeinorlov@yandex.ru

²Department of Medicine, University of Montreal, 900 rue St-Denis, Montreal (Quebec) H2X0A9, Canada

³Томский государственный университет, 634050, Томск, просп. Ленина, 36

Поступила в редакцию 16.03.2015 г.

Диаметр кровеносных сосудов увеличивается в ответ на снижение парциального давления кислорода. Установлено, что эта уникальная функция изолированных сосудов реализуется только в условиях, когда перфузируемая жидкость содержит эритроциты. Получены данные о том, что сенсором кислорода является гемоглобин, который в деоксигенированном состоянии взаимодействует с белком полосы 3, запуская не идентифицированные сигнальные каскады, влияющие на продукцию оксида азота и высвобождение из эритроцитов АТР, взаимодействующего с P2Y-пуринаргическими рецепторами эндотелия. В обзоре рассмотрены системы, принимающие участие в высвобождении АТР из эритроцитов, а также физиологическое и патофизиологическое значение этого явления.

Ключевые слова: сенсор кислорода, эритроциты, гемолиз, пуринаргическая сигнальная система, сосуды.

DOI: 10.7868/S0233475515040076

ВВЕДЕНИЕ

Регуляция сосудистого тонуса обеспечивает сбалансированное с энергетическими затратами снабжение тканей кислородом, глюкозой и другими веществами, необходимыми для синтеза макроэргических соединений. На уровне организма сосудистый тонус контролируется системами, вовлеченными в регуляцию давления в большом и малом кругах кровообращения. Кроме того, в ряде органов выявлены системы регуляции локального внутрисосудистого давления. Среди них в наиболее полной мере изучена регуляция миогенного тонуса. Под миогенным тонусом (ответом) понимается способность сосудов с диаметром <100–200 мкм уменьшать свой диаметр в ответ на прирост давления заполняющей их жидкости. Миогенный ответ, выявленный в сосудистом русле скелетных мышц, а также в брызжеечных, мозговых, почечных и коронарных сосудах, играет центральную роль в поддержании постоянства движения крови в пределах микроциркуляторного русла вне зависимости от колебаний системного артериального давления. Локальный поток крови является фактором, определяющим регуляцию метаболизма тканей, а сопротивление потоку крови (R_{bf}) равно $\sim 1/d^4$, где d — диаметр просвета сосуда [1]. Роль миогенного тонуса как созданного природой инструмен-

та защиты органов-мишеней от перепадов системного артериального давления изучали многие исследователи [2]. Важно отметить, что миогенный ответ обусловлен свойствами гладкомышечных клеток (ГМК) и обнаруживается в отсутствие как клеток эндотелия, так и клеток крови [3–6]. Другой фактор регуляции локального кровотока — увеличение диаметра просвета мелких сосудов в ответ на снижение парциального давления кислорода (pO_2) [7]. Наш обзор посвящен молекулярным механизмам этого явления с упором на роль эритроцитов и пуринаргической сигнальной системы.

МЕХАНИЗМЫ ВОВЛЕЧЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ В РЕГУЛЯЦИЮ СОСУДИСТОГО ТОНУСА

В 2000 г. Dietrich и соавт. показали, что увеличение диаметра артериол мозга крысы в ответ на снижение pO_2 наблюдается только в том случае, если во внутрисосудистой жидкости присутствуют эритроциты [8]. Так как добавление декстрана не вызывало такого же действия, предположили, что уменьшение сосудистого тонуса в условиях гипоксии связано скорее с присутствием в эритроцитах вазодилатора, нежели с неспецифическим увеличением вязкости перфузата, внутрисо-

судистого давления и развитием миогенного ответа. Впоследствии это явление воспроизвели в целом ряде лабораторий (для обзора см. [9, 10]). Необходимо отметить, что в условиях глубокой гипоксии и ишемии расслабление сосудов, обладающих миогенным ответом, может происходить и в отсутствие эритроцитов. Этот феномен как правило связан с резким снижением содержания АТР в ГМК, что приводит к открытию АТР-чувствительных K^+ -каналов (K_{ATP}) гиперполяризации сарколеммы [11]. Расслабление коронарных артерий крысы в ответ на резкое снижение pO_2 не зависело от ингибиторов K_{ATP} , но полностью подавлялось ингибиторами NO-синтазы [12]. Факторы, обуславливающие сосудоспецифичность этого явления, остаются неизвестными. Ниже мы рассмотрим возможные механизмы вовлечения эритроцитов в регуляцию тонуса сосудов.

Газотрансммиттеры

Оксид азота (NO), оксид углерода (CO) и сероводород (H_2S) рассматриваются как природные газотрансммиттеры, образующиеся при катаболизме аминокислот. В отличие от канонических гормонов и нейротрансммиттеров они легко проникают в клетку и, минуя связывание со специфическими рецепторами плазматической мембраны, запускают сигнальные каскады, вовлеченные в регуляцию ее функциональной активности [13, 14]. В кардиоваскулярной системе главным источником NO и CO служит эндотелий [13, 15], в то время как H_2S продуцируется в основном ГМК, адипоцитами и эритроцитами [16, 17]. NO, продуцируемый эндотелиальной синтазой (eNOS), связывается в ГМК с гемосодержащей группой растворимой гуанилатциклазы, в результате чего происходит активация фермента, накопление cGMP, что и приводит к расслаблению сосудов. Подобное действие оказывает и CO, но эффективность этого газотрансммиттера существенно меньше [15, 18].

Установлено, что вырабатываемый эндотелием NO также связывается с гемоглобином, который высвобождает его в условиях гипоксии [19]. Однако в силу ограниченной диффузии этот механизм может реализоваться только в сосудах с диаметром менее 25 мкм [20]. Предположили, что эритроциты могут поставлять NO за счет высвобождения из S-нитрозогемоглобина (SNO-Hb), который образуется при связывании с цистеином $\beta 93$ β -цепи оксигенированного белка [21, 22]. Эта гипотеза, однако, не согласуется с данными об отсутствии существенных различий в содержании SNO-Hb в артериальной и венозной крови человека [23]. Кроме того, Isbell и соавт. показали, что замена цистеина $\beta 93$ на аланин, не связывающий NO, не влияет на гемодинамику большого и ма-

лого кругов кровообращения у мышей, а увеличение диаметра легочной артерии кролика в ответ на гипоксию одинаков при ее перфузии эритроцитами контрольных и генетически модифицированных мышей [24]. Эритроциты могут также поставлять NO за счет его образования из нитритов (NO_2^-) в реакции $Hb(Fe^{2+}) + NO_2^- = Hb(Fe^{3+}) + NO + OH^-$ [25], протекающей только в присутствии деоксигенированной формы гемоглобина [26]. В самом деле, вазорелаксирующее действие нитритов обнаружено в экспериментах как *in vivo*, так и *in vitro* [25]. Следует, однако, отметить, что действие нитритов сохранялось как в условиях нормоксии, так и в отсутствие эритроцитов [27].

Полисульфиды, содержащиеся в чесноке, считаются основным источником экзогенного H_2S , генерируемого при участии эритроцитов [28], что, по-видимому, и лежит в основе антиатеросклеротического действия чесночных экстрактов. В отличие от NO и CO, достоверного влияния H_2S и его донора NaHS на систему cGMP не обнаружено [29, 30]. В этой связи предположили, что вазорелаксирующее действие H_2S опосредуется активацией АТР-чувствительных K^+ -каналов (K_{ATP}) через его взаимодействие с остатками цистеина. Следует отметить, что этот вывод основан на том, что действие NaHS устраняется глибенкламидом и другими ингибиторами K_{ATP} [15, 31], в то время как прямые данные о стимуляции этих каналов, полученные методом patch-clamp, ограничены единичными публикациями [32, 33].

Пуриnergическая сигнальная система

Начиная с пионерской работы Burnstock и Kennedy [34], в целом ряде лабораторий обнаружили, что внутрисосудистое введение АТР вызывает расслабление сосудов различных отделов кровяного русла, опосредуемое продукцией в эндотелии NO, в то время как при удалении эндотелия наблюдается NO-независимое сужение сосудов (для обзора см. [35]). Расслабляющее действие обусловлено взаимодействием АТР с $P2Y$ -рецепторами эндотелия, сопряженными с G-белками, в то время как сокращение сосудов происходит при взаимодействии $P2X$ -рецепторами ГМК, которые функционируют как неселективные катионные каналы [36] (рис. 1). Наряду с NO, в ответ на активацию $P2Y$ -рецепторов в клетках эндотелия происходит катаболизм арахидоновой кислоты с образованием простаглицлинов PGI_1 и PGI_2 , которые вызывают расслабление ГМК за счет активации системы cAMP, и/или K^+ -каналов [10]. Наличие высокоактивных эндонуклеаз, обнаруженных впервые в эритроцитах В.А. Энгельгардтом и соавт. [37], предполагает деградацию АТР до аденозина (Ado), активирующего $P1$ -рецепторы. Сведения о влиянии аденозина на регу-

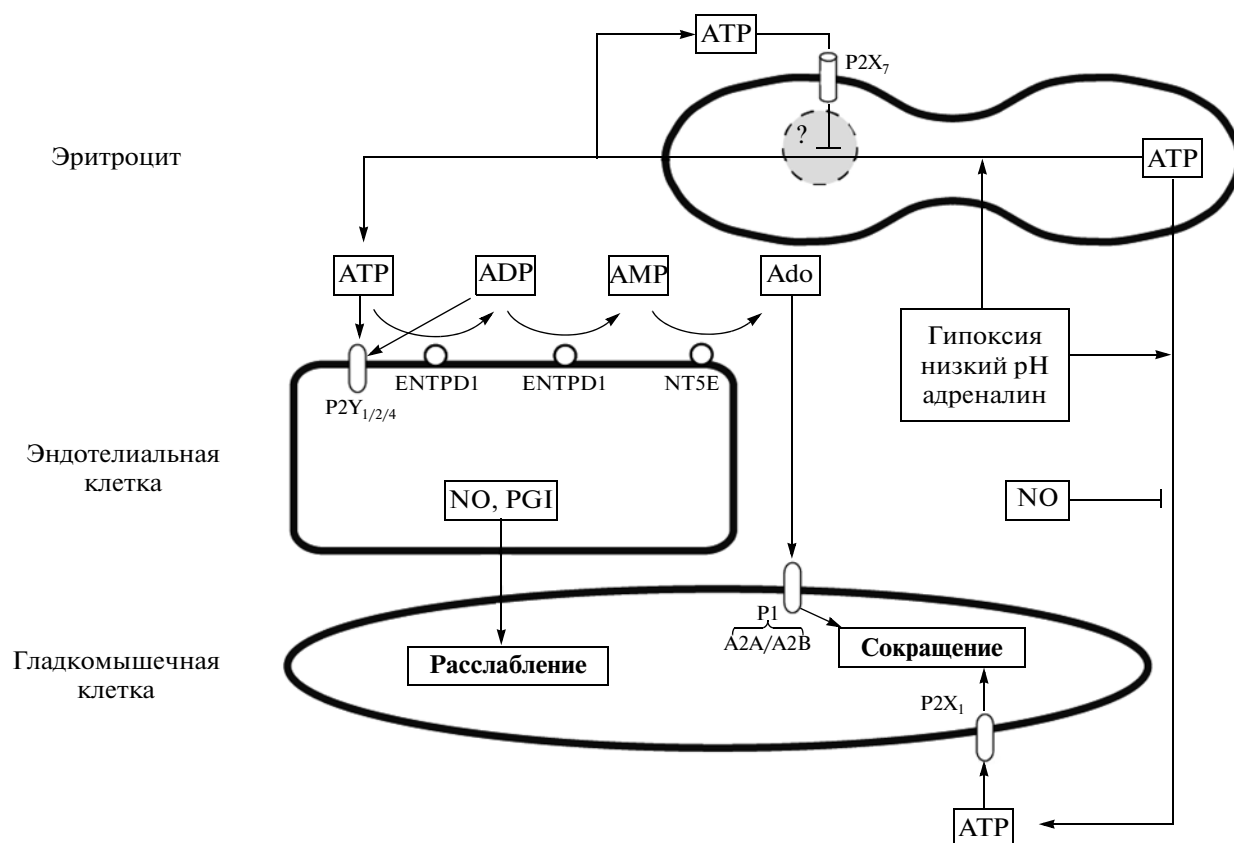


Рис. 1. Схема взаимодействия эритроцитов, эндотелиальных и гладкомышечных клеток в регуляции тонуса кровеносных сосудов посредством пуринергической сигнальной системы и NO ($\rightarrow$ активация, $\dashv$ ингибирование). ENTPD1 и NTSE – эктонуклеотидазы, вовлеченные в катаболизм АТФ; P2X₁, P2Y_{1/2/4}, A2A и A2B – основные типы пуринергических рецепторов, вовлеченных в регуляцию гладкомышечных клеток сосудов и эндотелия. Другие объяснения см. в тексте.

При поиске основного источника внутрисосудистого АТР Bergfeld и Forrester обнаружили, что в условиях гипоксии происходит выброс АТР из изолированных эритроцитов человека [39]. Позднее это явление наблюдали в эритроцитах других млекопитающих [8, 40]. В большинстве работ прирост выброса АТР из эритроцитов в ответ на гипоксию приводил к 2–3-кратному увеличению содержания внеклеточного АТР, измеренного по свечению люциферазы. Так, например, при перфузии артериол головного мозга крысы концентрация внеклеточного АТР в ответ на 5–10-кратное снижение pO_2 увеличивалась от 8 до 14 мкМ [8]. Это согласуется с данными о том, что в отсутствие дополнительных стимулов концентрация АТР в венозной крови увеличивается на 20–40% по отношению к артериальной крови [41]. На основании этих данных сформулирована гипотеза о том, что эритроцит является не только переносчиком кислорода, но и регулятором его доставки к тканям в условиях гипоксии [40]. В этой связи интересно отметить, что наряду с гипоксией вы-

В 1972 году Parker и Snow обнаружили, что 40-минутная инкубация эритроцитов собаки, лишенных Na^+ , K^+ -АТФ-азы, в присутствии 0.5 мМ АТФ приводит к нивелированию трансмембранных градиентов Na^+ и K^+ [46]. Действие АТФ уменьшалось при добавлении Mg^{2+} , что указывало на существование неселективных каналов, активируемых АТФ⁴⁻. Много позднее в эритроцитах человека обнаружили P2X-рецепторы, активация которых приводит к 5–10-кратному увеличению

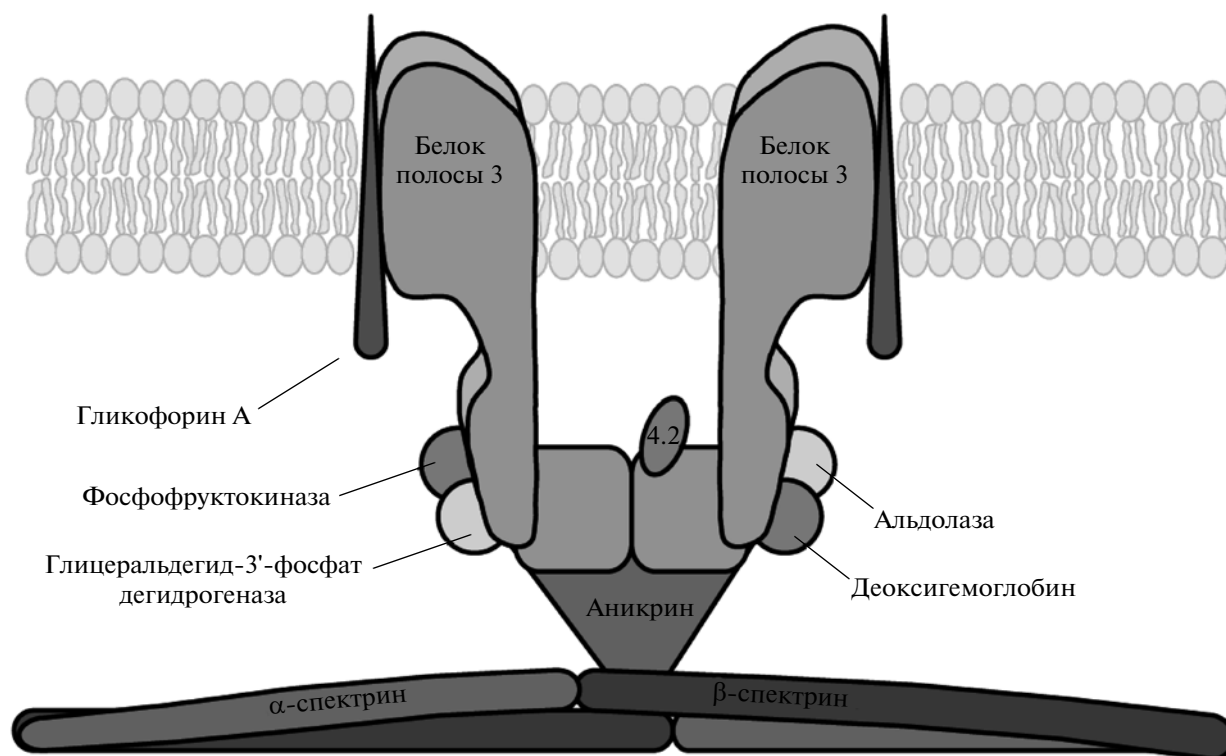


Рис. 2. Схема организации комплекса белка полосы 3 в плазматической мембране эритроцита, в изменении функциональных свойств клетки в условиях гипоксии (из [115] с изменениями). Объяснения см. в тексте.

скорости трансмембранного переноса Na^+ и K^+ [47]. Многочисленные наблюдения указывают на то, что активация P2X_7 -рецепторов сопровождается смертью лейкоцитов, макрофагов и ряда других клеток [48]. Sluyster и соавт. показали, что длительная инкубация эритроцитов человека в присутствии АТФ приводит к увеличению содержания фосфатидилсерина на внешней стороне мембраны [49], что считается маркером апоптоза. Смерть клеток иммунной системы и эритроцитов в ответ на активацию P2X_7 -рецепторов наблюдается в среде с высоким содержанием натрия и не зависит от присутствия Ca^{2+} [48, 49]. Активация P2X_7 -рецепторов может влиять на их функциональное состояние ядерных клеток посредством активации $\text{Na}_i^+/\text{K}_i^+$ -чувствительного Ca_i^{2+} -независимого механизма регуляции экспрессии генов, обнаруженного в нашей лаборатории [50]. Механизм вовлечения P2X_7 -рецепторов в функционирование безъядерных эритроцитов остается не исследованным.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ PO_2 СЕНСОРА

Изначально предполагалась, что сенсор O_2 , ответственный за регуляцию сосудистого тонуса, локализован либо в самих сосудах, либо в прилегающей к ним паренхиматозной ткани [51, 52].

Данные, рассмотренные в предыдущем разделе, указывают на то, что сенсор O_2 , вовлеченный в регуляцию сосудистого тонуса, локализован в эритроцитах. В этой связи разумно предположить, что сенсором O_2 является его же переносчик — тетрамер гемоглобина, который в его деоксигенированной напряженной (tense) форме (Т-Нб) взаимодействует с адапторным белком и запускает каскад сигналов, приводящих к высвобождению АТФ (рис. 2). Эта гипотеза согласуется с негативной корреляцией между высвобождением АТФ и содержанием гемоглобина в расслабленной (relax) оксигенированной форме (R-Нб), а также с данными о блокаде выброса АТФ в условиях гипоксии в присутствии CO [41], сродство которого к гемоглобину на 2–3 порядка выше, чем к O_2 и который полностью блокирует образование Т-Нб.

В модельных бесклеточных системах установлено, что гемоглобин связывается с цитоплазматическим доменом основного интегрального белка мембраны эритроцитов, выполняющего функцию анионного обменника (AE1), белка полосы 3 43 кДа (CDB3) [53], причем сродство CDB3 к Т-Нб у человека и мыши существенно выше, чем к его оксигенированной форме [54, 55]. Обнаружено, что этот же домен взаимодействует с глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназой, альдолазой, пи-

руваткиназой и другими ключевыми ферментами гликолиза и пентозофосфатного пути [56, 57]. Обнаружено, что связывание с дезоксигемоглобином приводит к высвобождению этих ферментов и активации гликолиза [58]. Предполагается, что это явление лежит в основе увеличения примембранной концентрации АТР и его последующего высвобождения и накопления во внеклеточной жидкости [41] (рис. 2). Эта гипотеза в настоящее время проходит проверку в нашей лаборатории.

МЕХАНИЗМ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ АТР ИЗ ЭРИТРОЦИТОВ

Несмотря на большое число работ о выбросе АТР из эритроцитов при действии описанных выше стимулов, молекулярные механизмы этого явления остаются мало изученными. В самом деле, в безъядерных эритроцитах отсутствует эндоплазматический ретикулум, осуществляющий эндоцитоз — основной механизм выброса АТР в других клетках [59, 60]. В этой связи был проведен скрининг соединений, регулирующих транспорт веществ через плазматическую мембрану. Обнаружено, что выброс АТР из эритроцитов человека увеличивается в присутствии нитритов [61], а также при действии проникающих аналогов сАМР и таких активаторов сАМР-опосредованной сигнальной системы, как агонисты β -адренергических рецепторов (адреналин и изопротеренол), простаглицлин PGI_2 и его аналог илопрост, активатор аденилатциклазы форсколин, ингибитор фосфодиэстеразы папаверин [62–64]. Напротив, выброс АТР уменьшается при добавлении ингибиторов сАМР-зависимой протеинкиназы А [62–64] и подавляется NO [65], инсулином [66], С-пептидом [67], статинами [68], амилоидным пептидом [69]. Нами показано, что выброс АТР может вызываться добавлением диметилсульфоксида, используемого в качестве растворителя форсколина и других перечисленных выше амфипатических соединений [70], что надо учитывать при проведении такого рода экспериментов.

Так как транспорт анионов, опосредованный регулятором трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), увеличивается при добавлении сАМР, предположили, что высвобождение АТР из эритроцитов опосредуется CFTR [71, 72]. Следует, однако, отметить, что электрофизиологические эксперименты не смогли выявить существенной проводимости CFTR для АТР [73]. Сравнительно недавно было показано, что выброс АТР в ответ на активацию рецептора PGI_1 блокируется ингибиторами потенциал-зависимых анионных каналов VDAC1 [74]. Электрофизиологические эксперименты, посвященные проверке этой гипотезы, не проводились. В другой серии опытов было установлено,

что выход АТР из эритроцитов человека уменьшается при добавлении карбенексолона и других ингибиторов паннексина 1 (panx1), а также пептида $^{10}panx1$, блокирующего этот неселективный канал, проницаемый для соединений с $M_r < 900$ кДа [62]. Показано также, что panx1 присутствует в эритроцитах человека, и выход АТР сопровождается накоплением красителей, проникающих в клетку через этот канал [75]. Следует, однако, отметить, что выход АТР из эритроцитов обнаружен у мышей panx1^{-/-} [63]. Выше приведены данные о присутствии P2X₇-рецепторов в эритроцитах. Роль этих рецепторов в освобождении АТР из эритроцитов до сих пор не изучали.

Очевидно, что наряду с трансмембранным переносом, увеличение внеклеточной концентрации АТР может быть результатом гибели одиночных эритроцитов. Этот процесс был назван гемолизом. После обнаружения в гибнущих эритроцитах маркеров программируемой клеточной смерти (апоптоза), таких как потеря асимметрии фосфолипидного бислоя и экспозиция фосфатидилсерина на поверхности, этот процесс, который, по-видимому, предшествует гемолизу, получил название эриптоза (eryptosis) [76]. На момент написания обзора библиотека Национального института здоровья США насчитывала 1874 работы, посвященных внутрисосудистому гемолизу, который активируется в условиях гипоксии и при длительной физической нагрузке [77–80].

В подавляющем числе рассмотренных нами работ не проводили систематического сопоставления накопления внеклеточного АТР и гемолиза эритроцитов. Mairbaurl и соавт. показали, что при механическом воздействии выход АТР из эритроцитов человека был пропорционален высвобождению гемоглобина, в то время как при гипоксии высвобождения гемоглобина не обнаружили [77]. Сравнительно недавно мы в параллельных экспериментах сопоставили высвобождение АТР и гемоглобина из эритроцитов человека при гипоосмотическом набухании, гипоксии и механическом воздействии. Во всех случаях мы обнаружили статистически значимую и положительную корреляцию между содержанием внеклеточного АТР и гемоглобина. В дополнительных экспериментах мы визуализировали эритроциты с помощью ИК-спектроскопии при одновременной регистрации свечения люциферазы и показали, что вспышки свечения происходят только при лизисе клеток [70]. На основании этих данных мы сделали вывод о том, что основным механизмом увеличения внеклеточной концентрации АТР при указанных воздействиях является гемолиз.

В норме эритроциты человека циркулируют в кровяном русле 100–120 дней, после чего происходит кластеризация белка полосы 3 с комплектом C3, их захват и переработка специализирован-

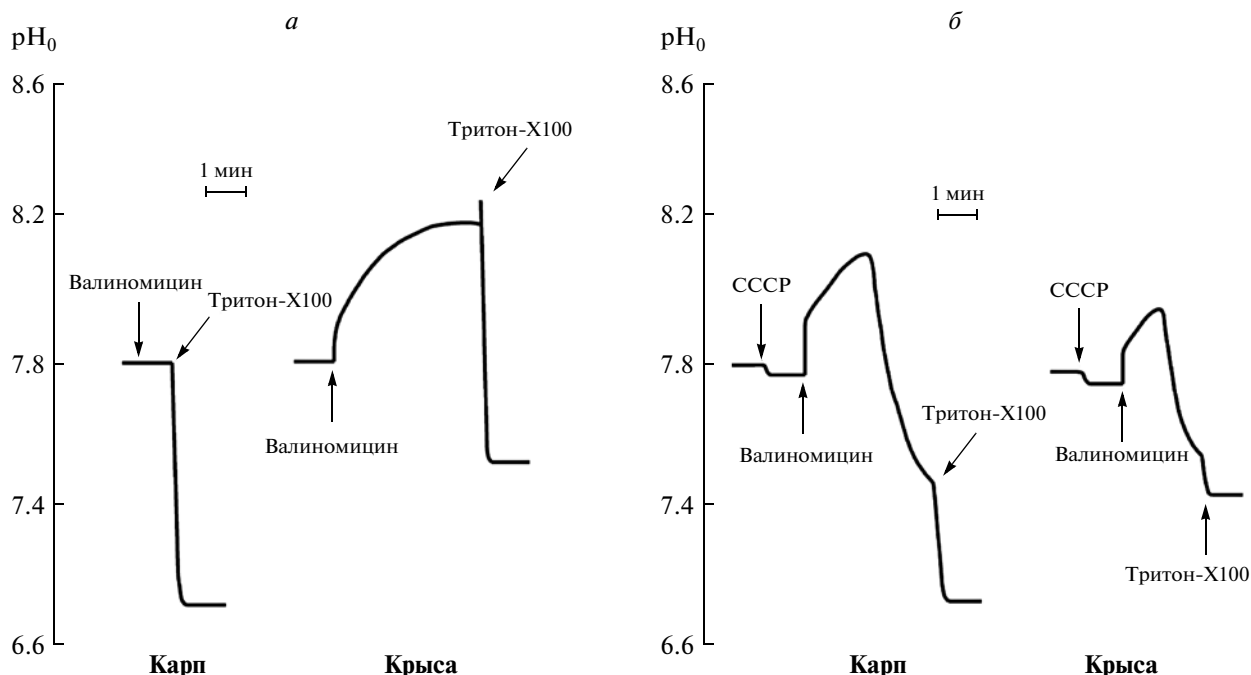


Рис. 3. Кинетика изменения внеклеточного pH (pH_0) в ответ на добавление K^+ -ионофора валиномицина в эритроцитах карпа и крысы в отсутствие (а) и в присутствии (б) протонофора CCCP. Тг-Х-100 – тритон X-100.

ной системой макрофагов селезенки, печени и костного мозга [82]. В экспериментах *in vitro* установлено, что эритроциты могут активироваться при увеличении концентрации внутриклеточного кальция, что связывают с активацией Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов, утечкой калия и хлора, снижением деформируемости эритроцитов, а также при диссипации градиентов натрия и калия в ответ на добавки таких ионофоров, как валиномицин, монензин и грамицидин [83]. Увеличение гемолиза в условиях гипоксии и механических воздействий связывают с изменением взаимодействия белка полосы 3 и цитоскелета [84, 85], но эксперименты, посвященные проверке этой гипотезы, не проведены.

ОСОБЕННОСТИ, ВЫЯВЛЕННЫЕ В ЯДЕРНЫХ ЭРИТРОЦИТАХ

У всех изученных позвоночных сродство гемоглобина к кислороду резко снижается по мере подкисления цитоплазмы (так называемый эффект Бора) [86]. Кроме того, этот параметр уменьшается по мере увеличения концентрации гемоглобина, что связывается с потерей внутриклеточной воды и уменьшения объема клетки [87]. Следует, однако, отметить, что ввиду крайне высокой анионной проницаемости безъядерных эритроцитов млекопитающих по отношению к Na^+ и K^+ pH_i зависит только от внеклеточной концентрации протонов и основного аниона хлора как

$$[H^+]_o/[H^+]_i = [HCO_3^-]_i/[HCO_3^-]_o = [Cl^-]_i/[Cl^-]_o = r,$$

и не зависит от остальных мембранных транспортеров, активность которых существенно меньше скорости переноса анионов белком полосы 3. Исключение составляют Ca^{2+} -чувствительные K^+ -каналы (K_{Ca}), активация которых приводит к резкой гиперполяризации эритроцитов, утечке K^+ и Cl^- , сжатию клеток и закислению цитоплазмы. Это положение проиллюстрировано в экспериментах с применением K^+ -ионофора валиномицина, добавление которого к эритроцитам крысы приводит к высвобождению протонов и, как следствие, к изменению мембранного потенциала (рис. 3а). В отличие от млекопитающих вклад анионной проводимости в формирование нетто-потоков через плазматическую мембрану ядерных эритроцитов существенно ниже, а потому в эритроцитах карпа даже резкая деполяризация в присутствии K^+ -ионофора валиномицина не генерирует трансмембранных потоков гидроксил аниона OH^- [88]. Как и следовало ожидать, эти различия устранялись в присутствии протонофора CCCP (рис. 3б), т.е. в условиях, когда вне зависимости от анионной проницаемости протоны распределяются в соответствии с электрическим потенциалом мембраны $E_m = RT/F(pH_i - pH_o)$.

Указанная выше особенность предполагает, что в отличие от млекопитающих транспортеры одновалентных катионов принимают участие в регуляции pH_i и объема ядерных эритроцитов.

Наиболее полно это положение изучено на примере эритроцитов костистых рыб (Teleostei). У этих рыб увеличение подвижности сопровождается накоплением молочной кислоты и, в силу отсутствия эффективной системы щелочно-кислотного баланса в почках, закислением плазмы крови и, как следствие этого, цитоплазмы эритроцитов. По не известному механизму закисление плазмы сопровождается выбросом катехоламинов и активацией особой cAMP-зависимой изоформы Na^+/H^+ -обменника, обнаруженного в этих клетках [89]. В свою очередь, это приводит к нормализации pH_i и увеличению сродства гемоглобина к кислороду (для обзора см. [87, 90, 91]).

В эритроцитах птиц катехоламины активируют универсальную изоформу $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -котранспорта (NKCC) [92, 93]. Активность этого переносчика возрастает не только под действием катехоламинов, но также в условиях гипоксии, причем действие гипоксии и системы cAMP не аддитивно [93]. Предполагается, что это вызывает увеличение объема клеток и сродства гемоглобина к кислороду в условиях длительного перелета птиц. У рыб деоксигенация гемоглобина наряду с активацией NKCC приводит к увеличению скорости обмена Na^+/H^+ и ингибированию K^+, Cl^- -котранспорта [90, 94]. Кислород-чувствительные ионные транспортеры обнаружены у некоторых земноводных [90, 95]. Предполагается, что в ядерных эритроцитах сенсором кислорода является не только гемоглобин, но и индуцируемый гипоксией фактор транскрипции (hypoxia-inducible factor, HIF-1a) [90, 91]. Эта гипотеза нуждается в дальнейшей экспериментальной проверке. Jensen и соавт. показали, что в отличие от эритроцитов млекопитающих, гипоксия не вызывает выброса АТР из эритроцитов рыб [96]. Данные о регуляции кислородом выброса АТР из эритроцитов других позвоночных отсутствуют.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ И ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Рассмотренные выше данные предполагают, что роль эритроцитов как регулятора сосудистого тонуса связана прежде всего с кровоснабжением органов, претерпевающих резкие изменения энергетического статуса. Очевидно, что нарушения в этой регуляторной системе могут быть вовлечены в патогенез болезней, характеризующихся гипоксическими состояниями. В этом разделе мы приведем несколько примеров, иллюстрирующих это положение.

Физическая нагрузка

Скелетная мускулатура испытывает резкие перепады потребления кислорода по мере изменения физической нагрузки [97, 98]. Обнаружено,

что кровоснабжение скелетной мускулатуры контролируется как NOS, так и циклооксигеназой (COX) [99]. Установлено также, что физическая нагрузка сопровождается увеличением содержания АТР в плазме венозной крови [100]. При наличии интактного эндотелия, внутриаартериальное введение АТР приводит к расслаблению сосудов скелетной мускулатуры [101, 102], которое сопровождается увеличенной продукцией NO [103] и метаболитов арахидоновой кислоты [104] и блокируется ингибиторами NOS и COX [38]. Роль увеличения локальной температуры [44] и других факторов, сопровождающих физическую нагрузку, в высвобождении АТР из эритроцитов окончательно не установлена. Предполагается, что АТР-индуцированное высвобождение NO из клеток эндотелия в условиях локальной гипоксии противодействует сокращению сосудов в силу активации симпатической нервной системы в условиях интенсивной физической нагрузки, что в свою очередь сопровождается активацией β_1 - и β_2 -адренергических рецепторов ГМК [105].

В меньшей степени изучен механизм увеличенной продукции вазорелаксирующих производных арахидоновой кислоты в условиях физической нагрузки. Мы предполагаем, что это увеличение связано с диссипацией трансмембранных градиентов одновалентных ионов, происходящей при возбуждении мышц. В самом деле, как у человека, так и у экспериментальных животных длительная физическая нагрузка в силу перманентной активации потенциал-зависимых K^+ - и Na^+ -каналов и частичной инактивации Na^+, K^+ -АТР-азы сопровождается 3–4-кратным увеличением $[\text{Na}^+]_i$ в клетках скелетной мускулатуры и уменьшением $[\text{K}^+]_i$ на 15–25% [106, 107]. Мы показали, что как в клетках гладкой мускулатуры, так и эндотелия увеличение соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$, вызванное гипоксией на фоне энергетического голодания, приводит к резкому увеличению экспрессии индуцируемой изоформы циклооксигеназы 2 (COX-2) — одного из ключевых ферментов метаболизма арахидоновой кислоты [50, 108]. Роль увеличения соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ в регуляции экспрессии COX-2 в скелетной мускулатуре останется не изученной.

Идиопатическая легочная гипертензия (ИЛГ)

ИЛГ характеризуется увеличением сопротивления малого круга кровообращения, что связывают с нарушением сигнальной системы, опосредованной NO. Sprague и соавт. [109] показали снижение выброса АТР из эритроцитов больных ИЛГ в ответ на механическую деформацию, возникающую при прохождении ими пор с диаметром 5 мкм. Этот дефект не был связан с уменьшением содержания внутриклеточного АТР и был,

по-видимому, обусловлен снижением деформируемости эритроцитов. Отмеченные особенности эритроцитов лежат, по-видимому, в основе уменьшенной продукции NO клетками эндотелия у больных ИЛГ.

Сахарный диабет второго типа

Инсулиннезависимый сахарный диабет второго типа характеризуется ухудшением снабжения кожи и скелетной мускулатуры кислородом, что считается основной причиной резкого замедления заживления ран и преждевременной усталости в ответ на физические нагрузки [110]. Обнаружено, что эритроциты больных этой формой диабета высвобождают меньше АТР в ответ на умеренную гипоксию [111]. Имеет ли это отношение к нарушению снабжения тканей кислородом? Для ответа на этот вопрос сравнивали изменения диаметра сосудов скелетной мускулатуры при их перфузии кровью у индивидов контрольной группы и больных диабетом. Оказалось, что увеличение диаметра артериол в ответ на гипоксию при перфузии кровью у больных диабетом было статистически незначимым в отличие от индивидов контрольной группы [112]. Обнаружено также, что выброс АТР из эритроцитов больных нормализовался в присутствии ингибиторов фосфоэстеразы [113], а также в среде, содержащей пептид С и инсулин в молярном соотношении, соответствующем их концентрации в крови здоровых людей (1 : 1), но не в условиях 6-кратного увеличения содержания пептида С, выявленного у ряда больных диабетом [114]. В связи с полученными в этих работах данными рассматриваются новые подходы к лечению диабетических осложнений, связанных с нарушением регуляции тонуса сосудов эритроцитами [10].

Дисфункция эндотелия

Дисфункция эндотелия в большинстве случаев связана с нарушением целостности монослоя клеток. Основные причины этой патологии — высокое артериальное давление, курение, высокий уровень холестерина, сахарный диабет, ожирение. Дисфункция эндотелия приводит к уменьшению продукции NO в ответ на вазорелаксирующие стимулы и делает ГМК доступными для циркулирующих в крови гормонов и нейротрансмиттеров. В случае АТР это сопровождается активацией P2X-рецепторов ГМК и уменьшением диаметра сосудов (рис. 1). Иными словами, при дисфункции эндотелия в условиях гипоксии и внутрисосудистого механического стресса выброс АТР из эритроцитов будет проводить не к увеличению, но, напротив, к снижению скорости кровотока [35], т.е. усугублять течение болезни. Выброс АТР из эритроцитов человека подавляет-

ся NO [65], что отчасти компенсирует описанные выше негативные последствия дисфункции эндотелия. В какой мере эта патология влияет на функционирование систем, обеспечивающих высвобождение АТР из эритроцитов, до сих пор не исследовано.

Увеличение эритроцитоза отмечено также при ряде патологических состояний, включая сепсис, почечную недостаточность, сахарный диабет, гипертермию [83]. Однако взаимосвязь между эритроцитозом и АТР-зависимой регуляцией сосудистого тонуса не изучали.

НЕРЕШЕННЫЕ ВОПРОСЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Рассмотренные здесь данные показывают, что наряду с доставкой кислорода эритроциты принимают участие в регуляции сосудистого тонуса. Эта регуляторная система включает эритроциты не только как кислородзависимые доноры и акцепторы NO, но и как основной источник АТР для активации пуринергических рецепторов эндотелия. Накапливаются также данные о вовлечении этой регуляторной системы в патогенез легочной гипертензии и сахарного диабета, а также болезней, сопровождающихся дисфункцией эндотелия. Есть серьезные основания полагать, что первичным сенсором кислорода, принимающим участие как в регуляции транспорта NO, так и выброса АТР, является гемоглобин, который в деоксигенизированном состоянии взаимодействует с белком полосы 3. Какие еще белки принимают участие в проведении сигнального каскада, инициированного деоксигенацией гемоглобина? Является ли внутрисосудистый гемолиз универсальным механизмом выброса АТР из эритроцитов в ответ на гипоксию и другие стимулы? Какие механизмы лежат в основе физиологически контролируемого процесса нарушения целостности плазматической мембраны? Каково физиологическое значение P2X₇-рецепторов эритроцитов, и насколько их функция изменяется при патологических состояниях? Мы надеемся, что ответы на эти вопросы будут получены в предстоящих исследованиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Folkow B. 2010. Cardiovascular "remodeling" in rat and human: time axis, extent, and *in vivo* relevance. *Physiology* **25**, 264–265.
2. Loutzenhiser, Griffin K., Williamson G., Bidani A. 2006. Renal autoregulation: new perspectives regarding the protective and regulatory roles of the underlying mechanisms. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **290**, R1153–R1167.

3. Davis M.J., Hill M.A. 1999. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol. Rev.* **79**, 387–423.
4. Hill M.A., Davis M.J., Meininger G.A., Potocnik S.J., Murphy T.V. 2006. Arteriolar myogenic signaling mechanisms: implications for local vascular functions. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **34**, 67–79.
5. Schubert R., Mulvany M.J. 1999. The myogenic response: established facts and attractive hypothesis. *Clin. Sci.* **96**, 313–326.
6. Koltsova S.V., Kotelevtsev S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. 2009. Excitation-contraction coupling in resistant mesenteric arteries: evidence for NKCC1-mediated pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**, 1080–1083.
7. Jensen F.B. 2009. The dual roles of red blood cells in tissue oxygen delivery: oxygen carriers and regulator of local blood flow. *J. Exp. Biol.* **212**, 3387–3393.
8. Dietrich H.H., Ellsworth M.L., Sprague R.S., Dacey R.G. 2000. Red blood cell regulation of microvascular tone through adenosine triphosphate. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **278**, H1294–H1298.
9. Ellsworth M.L., Ellis C.G., Goldman D., Stephenson A.H., Dietrich H.H., Sprague R.S. 2009. Erythrocytes: oxygen sensors and modulators of vascular tone. *Physiology* **24**, 107–116.
10. Sprague R.S., Ellsworth M.L. 2012. Erythrocyte-derived ATP and perfusion distribution: role of intracellular and intracellular communication. *Microcirculation*. **19**, 430–439.
11. Freedman D.S., Liu Y., Rusch N.J., Lombard J.H. 2012. Role of endothelium and arterial K⁺ channels in mediating hypoxic dilation of middle cerebral arteries. *Am. J. Physiol.* **267**, H580–H586.
12. Lynch F.M., Austin C., Heagerty A.M., Izzard A.S. 2006. Adenosine and hypoxic dilation of rat coronary small arteries: roles of the ATP-sensitive potassium channel, endothelium, and nitric oxide. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **299**, H1145–H1150.
13. Li X., Bazer F.W., Gao H., Jobgen W., Johnson G.A., Li P., McKnight J.R., Satterfield M.C., Spencer T.E., Wu G. 2009. Amino acids and gaseous signaling. *Amino Acids* **37**, 65–78.
14. Bannenberg G.L., Vierra H.L.A. 2009. Therapeutic applications of the gaseous mediators carbon monoxide and hydrogen sulfide. *Expert Opin. Ther. Patents* **19**, 663–682.
15. Leffler C.W., Parfenova H., Jaggar J.H., Wang R. 2006. Carbon monoxide and hydrogen sulfide: gaseous messengers in cerebrovascular circulation. *J. Appl. Phys.* **100**, 1065–1076.
16. Wang R. 2011. Signaling pathways for the vascular effects of hydrogen sulfide. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **20**, 107–112.
17. Fang L., Zhao J., Chen Y., Ma T., Xu G., Tang C., Liu X., Geng B. 2009. Hydrogen sulfide derived from periaortic adipose tissue is a vasodilator. *J. Hypertens.* **27**, 2174–2185.
18. Leffler C.W., Parfenova H., Jaggar J.H. 2011. Carbon monoxide as an endogenous vascular modulator. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **301**, H1–H11.
19. Stamler J.S., Jia L., Eu J.P., McMahon T.J., Demchenko I.T., Bonaventura J., Gernet K., Piantadosi C.A. 1997. Blood flow regulation by s-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science*. **276**, 2034–2037.
20. Vaughn M.W., Kuo L., Liao J.C. 1998. Effective diffusion distance of nitric oxide in microcirculation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **274**, H1705–H1714.
21. Rifkind J.M., Nagababu E. 2013. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 2274–2283.
22. Singel D.J., Stamler J.S. 2005. Chemical physiology of blood flow regulation by red blood cells: the role of nitric oxide and S-nitrosohemoglobin. *Annu. Rev. Physiol.* **67**, 99–145.
23. Gladwin M.T., Lancaster J.R., Freeman B.A., Schechter A.N. 2003. Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm. *Nat. Med.* **9**, 496–500.
24. Isbell T.S., Sun C.W., Wu L.C., Teng X., Vitturi D.A., Branch B.G., Kevil C.G., Peng N., Wyss J.M., Ambalavanan N., Schiewert L., Ren J., Pawlik K.M., Renfrow M.B., Patel R.P., Townes T.M. 2008. SNO-hemoglobin not essential for red blood cell dependent hypoxic vasodilation. *Nat. Med.* **14**, 773–777.
25. Cosby K., Partovi K.S., Crawford J.H., Patel R.P., Reiter C.D., Martyr S., Yang B.K., Wacławski M.A., Zalos G., Xu X., Huang K.T., Shields H., Kim-Shapiro D.B., Schechter A.N., Cannon R.O., 3rd, Gladwin M.T. 2003. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nature Med.* **9**, 1498–1505.
26. McMahon T.J., Moon R.E., Luschniger B.P., Carraway M.B., Stone A.E., Stolp B.W., Gow A.J., Pawloski J.R., Watke P., Singel D.J., Piantadosi C.A., Stamler J.S. 2002. Nitric oxide in the human respiratory cycle. *Nat. Med.* **8**, 711–717.
27. Dalsgaard T., Simonsen U., Fago A. 2007. Nitrite-dependent vasodilation is facilitated by hypoxia and is independent of known NO-generating nitrite reductase activities. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292**, H3072–H3078.
28. Benavides G.A., Squadrito G.L., Mills R.W., Patel H.D., Isbell T.S., Patel R.P., Darley-Usmar V.M., Doeller J.E., Kraus D.W. 2007. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 17977–17982.
29. Mancardi D., Penna C., Merlino A., Del Soldato P., Wink D.A., Pagliaro P. 2009. Physiological and pharmacological features of the novel gasotransmitter: hydrogen sulfide. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**, 864–872.
30. Cheang W.S., Wong W.T., Shen B., Lau C.W., Tian X.Y., Tsang S.Y., Yao X., Chen Z.Y., Huang Y. 2010. 4-Aminopyridine-sensitive K⁺ channels contribute to NaHS-induced membrane hyperpolarization and relaxation in the rat coronary artery. *Vascular Pharmacol.* **53**, 94–98.
31. Lowicka E., Beltowski J. 2007. Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacol. Rep.* **59**, 4–24.
32. Cheng Y., Ndisang J.F., Tang G., Cao K., Wang R. 2004. Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery of rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **287**, H2316–H2323.

33. Tang G., Wu L., Liang W., Wang R. 2005. Direct stimulation of KATP channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* **68**, 1757–1764.
34. Burnstock G., Kennedy C. 1986. A dual function for adenosine 5'-triphosphate in the regulation of vascular tone. Excitatory cotransmitter with noradrenaline from perivascular nerves and locally released inhibitory intravascular agent. *Circ. Res.* **58**, 319–330.
35. Ellsworth M.L., Ellis C.G., Goldman D., Stephenson A.H., Dietrich H.H., Sprague R.S. 2008. Erythrocytes: oxygen sensors and modulators of vascular tone. *Physiology* **24**, 107–116.
36. Burnstock G. 2007. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* **87**, 659–797.
37. Orlov S.N. 2007. On the history of ecto-ATPases: the role of W.A. Engelhardt. *Purinergic Signaling* **3**, 231–232.
38. Mortensen S.P., Gonzalez-Alonso J., Bune L.T., Saltin B., Pilegaard H., Hellsten Y. 2009. ATP-induced vasodilation and purinergic receptors in human leg: roles of nitric oxide, prostaglandins, and adenosine. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **296**, R1140–R1148.
39. Bergfeld G.R., Forrester T. 1992. Release of ATP from human erythrocytes in response to brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovasc. Res.* **26**, 40–47.
40. Ellsworth M.L., Forrester T., Ellis C.G., Dietrich H.H. 1995. The erythrocyte as a regulator of vascular tone. *Am. J. Physiol.* **269**, H2155–H2161.
41. Jagger J.E., Bateman R.M., Ellsworth M.L., Ellis C.G. 2015. Role of erythrocyte in regulating local O₂ delivery mediated by hemoglobin oxygenation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**, H2833–H2839.
42. Sprague R.S., Ellsworth M.L., Stephenson A.H., Lonigro A.J. 1996. ATP: the red blood cell link to NO and local control of the pulmonary circulation. *Am. J. Physiol.* **271**, H2717–H2722.
43. Wan J., Ristenpart W.D., Stone H.A. 2008. Dynamics of shear-induced ATP release from red blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 16432–16437.
44. Kalsi K.K., Gonzalez-Alonso J. 2012. Temperature-dependent release of ATP from human erythrocytes: mechanism for the control of local tissue perfusion. *Exp. Physiol.* **97**, 419–432.
45. McCullough W.T., Collins D.M., Ellsworth M.L. 1997. Arteriolar responses to extracellular ATP in striated muscle. *Am. J. Physiol.* **272**, H1886–H1891.
46. Parker J.C., Snow R.L. 1972. Influence of external ATP on the permeability and metabolism of dog red blood cells. *Am. J. Physiol.* **223**, 888–893.
47. Sluyter R., Shemon A.N., Barden J.A., Wiley J.S. 2004. Extracellular ATP increases cation fluxes in human erythrocytes by activation of the P2X7 receptors. *J. Biol. Chem.* **279**, 44749–44755.
48. Di Virgilio F., Chiozzi P., Falzoni S., Ferrari D., Sanz J.M., Venketaraman V., Baricordi O.R. 1998. Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Growth Differ.* **5**, 191–199.
49. Sluyter R., Shemon A.N., Wiley J.S. 2007. P2X7 receptor activation causes phosphatidylserine exposure in human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**, 169–173.
50. Koltsova S.V., Trushina Y., Haloui M., Akimova O.A., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. 2012. Ubiquitous [Na⁺]_i/[K⁺]_i-sensitive transcriptome in mammalian cells: evidence for Ca²⁺_i-independent excitation-transcription coupling. *PLoS One* **7**, e38032.
51. Harder D.R., Narayanan J., Birks E.K., Liard J.F., Imig J.D., Lombard J.H., Lange A.R., Roman R.J. 1996. Identification of a putative microvascular oxygen sensor. *Circ. Res.* **79**, 54–61.
52. Jackson W.F. 1987. Arteriolar oxygen reactivity: where is the sensor? *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **253**, H1120–H1126.
53. Low P.S., Westfall M.A., Allen D.P., Appel K.C. 1984. Characterization of the reversible conformational equilibrium of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3. *J. Biol. Chem.* **259**, 13070–13076.
54. Walder J.A., Chatterjee R., Steck T.L., Low P.S., Musso G.F., Kaiser E.T., Rogers P.H., Arnone A. 1984. The interaction of hemoglobin with the cytoplasmic domain of band 3 of the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* **259**, 10238–10246.
55. Segal M.F., Chu H., Christian J., Low P.S. 2012. Interaction of deoxyhemoglobin with the cytoplasmic domain of murine erythrocyte band 3. *Biochemistry* **51**, 3264–3272.
56. Matayoshi E.D., Sawyer W.H., Jovin T.M. 1991. Rotational diffusion of band 3 in erythrocyte membranes. 2. Binding of cytoplasmic enzymes. *Biochemistry* **30**, 3538–3543.
57. Puchulu-Campanella E., Chu H., Anstee D.J., Galan J.A., Tao W.A., Low P.S. 2013. Identification of the components of glycolytic enzyme metabolon on the human red blood cell membrane. *J. Biol. Chem.* **288**, 848–858.
58. Lewis I.A., Campanella M.E., Markley J.L., Low P.S. 2009. Role of band 3 in regulating metabolic flux of red blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 18515–18520.
59. Grygorczyk R., Hanrahan J.W. 1997. CFTR-independent ATP release from epithelial cell triggered by mechanical stimuli. *Am. J. Physiol.* **272**, C1058–C1066.
60. Tatur S., Groulx N., Orlov S.N., Grygorczyk R. 2007. Ca²⁺-dependent ATP release from A549 cells involves synergic autocrine stimulation by coreleased uridine nucleotides. *J. Physiol.* **584**, 419–435.
61. Cao Z., Bell J.B., Mohanty J.G., Nagababu E., Rifkind J.M. 2009. Nitrite enhances RBC hypoxic ATP-synthesis and the release in vasculature: a new mechanism for nitrite-induced vasodilation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **297**, H1491–H1503.
62. Montalbetti N., Leal Denis M.F., Pignataro O., Kobatake E., Lazarowski E.R., Schwarzbau P.J. 2011. Homeostasis of extracellular ATP in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **286**, 38397–38407.
63. Qiu F., Wang J., Spray D.C., Scemes E., Dahl G. 2011. Two non-vesicular ATP release pathways in the mouse erythrocyte membrane. *FEBS Lett.* **585**, 3430–3435.
64. Sprague R.S., Bowles E.A., Hanson M.S., DuFaux E.A., Sridharan M., Adderley S., Ellsworth M.L., Stephenson A.H. 2008. Prostacyclin analogs stimulate receptor-mediated cSMP synthesis and ATP release from rabbit

- and human erythrocytes. *Microcirculation*. **15**, 461–471.
65. Olearczyk J.J., Ellsworth M.L., Stephenson A.H., Lonigro A.J., Sprague R.S. 2004. Nitric oxide inhibits ATP release from erythrocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **309**, 1079–1084.
 66. Hanson M.S., Ellsworth M.L., Achilleus D., Stephenson A.H., Bowles E.A., Sridharan M., Adderley S., Sprague R.S. 2009. Insulin inhibits low oxygen-induced ATP release from human erythrocytes: implication for vascular control. *Microcirculation* **16**, 424–433.
 67. Richards J.P., Stephenson A.H., Ellsworth M.L., Sprague R.S. 2013. Synergistic effects of C-peptide and insulin on low O₂-induced ATP release from human erythrocytes. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **305**, R1331–R1336.
 68. Clapp K.M., Ellsworth M.L., Sprague R.S., Stephenson A.H. 2013. Simvastatin and GGTI-2133, a geranylgeranyl transferase inhibitor, increase erythrocyte deformability but reduce low O₂ tension-induced ATP release. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **304**, H660–H666.
 69. Misiti F., Orsini F., Clementi M.E., Masala D., Tellone E., Galtieri A., Giardina B. 2008. Amyloid peptide inhibits ATP release from human erythrocytes. *Biochem. Cell Biol.* **86**, 501–508.
 70. Sikora J., Orlov S.N., Furuya K., Grygorczyk R. 2014. Hemolysis is a primary ATP-release mechanism in human erythrocytes. *Blood*. **124**, 2150–2157.
 71. Liang G., Stephenson A.H., Lonigro A.J., Sprague R.S. 2005. Erythrocytes of humans with cystic fibrosis fail to stimulate nitric oxide synthesis in isolated rabbit lung. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**, H1585.
 72. Sprague R.S., Ellsworth M.L., Stephenson A.H., Kleinhenz M.E., Lonigro A.J. 1998. Deformation-induced ATP release from red blood cells requires fibrosis transmembrane conductance regulator activity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **275**, H1726–H1732.
 73. Grygorczyk R., Tabcharani J.A., Hanrahan J.W. 1996. CFTR channels expressed in CHO cells do not have detectable ATP conductance. *J. Membr. Biol.* **151**, 139–148.
 74. Sridharan M., Bowles E.A., Richards J.P., Krantic M., Davis K.L., Dietrich K.A., Stephenson A.H., Ellsworth M.L., Sprague R.S. 2012. Prostacyclin receptor-mediated ATP release from erythrocytes requires the voltage-dependent anion channel. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **302**, H553–H559.
 75. Locovei S., Bao L., Dahl G. 2006. Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 7655–7659.
 76. Lang F., Gullbins E., Lang P.A., Zappulla D., Foller M. 2010. Ceramide in suicidal death of erythrocytes. *Cell Physiol. Biochem*. **26**, 21–28.
 77. Mairbaurl H., Ruppe F.A., Bartsch P. 2013. Role of hemolysis in red cell adenosine triphosphate release in simulated exercise conditions *in vitro*. *Med. Sci. Sports Exerc.* **10**, 1941–1947.
 78. Mairbaurl H. 2013. Red blood cells in sports: effects of exercise and training on oxygen supply by red blood cells. *Front. Physiol.* **4**, Article 332.
 79. Shaskey D.J., Green G.A. 2000. Sports haematology. *Sports Med.* **29**, 27–38.
 80. Mao T.-Y., Fu L.-L., Wang J.-S. 2011. Hypoxic exercise training causes erythrocyte senescence and rheological dysfunction by depressed Cardos channel activity. *J. Appl. Physiol.* **111**, 382–391.
 81. Ray J.L., Leach R., Herbert J.M., Benson M. 2002. Isolation of vascular smooth muscle cells from a single murine aorta. *Methods Cell Sci.* **23**, 185–188.
 82. Knutson M., Wessling-Resink M. 2003. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 61–88.
 83. Lang F., Qadri S.M. 2012. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes. *Blood Purif.* **23**, 125–130.
 84. Barvitenko N.N., Adragna N., Weber R.E. 2005. Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance. *Cell Physiol. Biochem.* **15**, 1–18.
 85. Stefanovic M., Puchulu-Campanella E., Kodippili G., Low P.S. 2013. Oxygen regulates the band 3-ankyrin bridge in the human erythrocyte membrane. *Biochem. J.* **449**, 143–150.
 86. Jensen F.B. 2004. Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport. *Acta Physiol. Scand.* **182**, 215–227.
 87. Nikinmaa M. 1992. Membrane transport and control of hemoglobin-oxygen affinity in nucleated erythrocytes. *Physiol. Rev.* **72**, 301–322.
 88. Orlov S.N., Skryabin G.A. 1993. Catecholamine- and volume-dependent ion fluxes in carp (*Cyprinus carpio*) red blood cells. *J. Comp. Physiol.* **163**, 413–420.
 89. Orlov S.N., Cragoe E.J., Hanninen O. 1994. Volume- and catecholamine-dependent regulation of Na/H antiporter and unidirectional potassium fluxes in *Salmo trutta* red blood cells. *J. Comp. Physiol.* **164**, 135–140.
 90. Bogdanova A., Berenbrink M., Nikinmaa M. 2009. Oxygen-dependent ion transport in erythrocytes. *Acta Physiol. (Oxf)*. **195**, 305–319.
 91. Nikinmaa M. 2002. Oxygen-dependent cellular functions – why fishes and aquatic environment are a prime choice of study. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* **133**, 1–16.
 92. Palfrey H.C., Greengard P. 1981. Hormone-sensitive ion transport systems in erythrocytes as models for epithelial ion pathways. *Ann. Proc. New York Acad. Sci.* **372**, 291–309.
 93. Muzyamba M.C., Cossins A.R., Gibson J.S. 1999. Regulation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport in turkey red cells: the role of oxygen tension and protein phosphorylation. *J. Physiol.* **517**, 421–429.
 94. Berenbrink M., Volkel S., Koldkjar P., Heisler N., Nikinmaa M. 2006. Two different oxygen sensors regulate oxygen-sensitive K⁺ transport in crucian carp red blood cells. *J. Physiol.* **575**, 37–48.
 95. Kristensen K., Koldkjar P., Berenbrink M., Wang T. 2007. Oxygen-sensitive regulatory volume increase and Na transport in red blood cells from the cane toad, *Bufo marinus*. *J. Exp. Biol.* **210**, 2290–2299.
 96. Jensen F.B., Agnisola C., Novak I. 2009. ATP release and extracellular nucleotidase activity in erythrocytes and coronary circulation of rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **152**, 351–356.
 97. Rowel L.B., Saltin B., Kiens B., Christensen N.J. 1986. Is peak quadriceps blood flow in humans even

- higher during exercise with hypoxemia? *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **251**, H1038–H1044.
98. Gonzalez-Alonso J. 2012. ATP as a mediator of erythrocyte-dependent regulation of skeletal muscle blood flow and oxygen delivery in humans. *J. Physiol.* **590**, 5001–5013.
 99. Boushel R., Landberg H., Gemmer C., Olesen J., Crameri R., Scheede C., Sander M., Kjaer M. 2002. Combined inhibition of nitric oxide and prostaglandins reduces human skeletal blood flow during exercise. *J. Physiol.* **543**, 691–698.
 100. Forrester T., Lind A.R. 1969. Identification of adenosine triphosphate in human plasma and the concentration in the venous effluent of forearm muscles before, during and after sustained contractions. *J. Physiol.* **204**, 347–364.
 101. Gonzalez-Alonso J., Olsen D.B., Saltin B. 2002. Erythrocyte and regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery. Role of circulating ATP. *Circ. Res.* **91**, 1046–1055.
 102. Duza T., Sarelius I.H. 2003. Conducted dilations initiated by purines in arterioles are endothelium dependent and require endothelial calcium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**, H26–H37.
 103. Collins D.M., McCullough W.T., Ellsworth M.L. 1998. Conducted vascular responses: communication across the capillary bed. *Microvasc. Res.* **56**, 43–53.
 104. Hammer L.W., Ligon A.L., Hester R.L. 2001. ATP-mediated release of arachidonic acid metabolites from venular endothelium causes arteriolar dilation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**, H2616–H2622.
 105. Kirby B.S., Voyles W.F., Carlson C.L., Dinunno F.A. 2008. Graded sympatholytic effect of ATP on post-junctional α -adrenergic vasoconstriction in the human forearm: implications for vascular control in contracting muscle. *J. Physiol.* **586**, 4305–4316.
 106. McKenna M.J., Bangsbo J., Renaud J.M. 2008. Muscle K^+ , Na^+ , and Cl^- disturbances and Na^+ - K^+ pump inactivation: implications for fatigue. *J. Appl. Phys.* **104**, 288–295.
 107. Murphy K.T., Nielsen O.B., Clausen T. 2008. Analysis of exercise-induced Na^+ - K^+ exchange in rat skeletal muscle. *Exp. Physiol.* **93**, 1249–1262.
 108. Koltsova S.V., Shilov B., Burulina J.G., Akimova O.A., Haloui M., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Tremblay J., Hamet P., Orlov S.N. 2014. Transcriptomic changes triggered by hypoxia: evidence for HIF-1-independent, $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -mediated excitation-transcription coupling. *PLoS One* **9**, e110597.
 109. Sprague R.S., Stephenson A.H., Ellsworth M.L., Keller C., Lonigro A.J. 2001. Impaired release of ATP from red blood cells of humans with primary pulmonary hypertension. *Exp. Biol. Med.* **226**, 434–439.
 110. Melher P., Jeffers B., Estacio R., Schrier R. 1997. Association of hypertension and complications in NIDDM. *Am. J. Hypertens.* **10**, 152–161.
 111. Sprague R.S., Stephenson A.H., Bowles E.A., Stumpf M.S., Lonigro A.J. 2006. Reduced expression of Gi in erythrocytes of humans with diabetes type 2 is associated with impairment of both cAMP generation and ATP release. *Diabetes.* **55**, 3588–3593.
 112. Sprague R.S., Goldman D., Bowles E.A., Achilleus D., Stephenson A.H., Ellis C.G., Ellsworth M.L. 2010. Divergent effects of low O_2 tension and iloprost on ATP release from erythrocytes of humans with type 2 diabetes: implications for O_2 supply to skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **299**, H566–H573.
 113. Sprague R.S., Bowles E.A., Achilleus D., Stephenson A.H., Ellis C.G., Ellsworth M.L. 2012. A selective phosphodiesterase 3 inhibitor rescues low PO_2 -induced ATP release from erythrocytes of humans with type 2 diabetes: implications for vascular control. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **302**, H553–H559.
 114. Lee I.-T., Yang C.-M. 2013. Inflammatory signalings involved in airway and pulmonary diseases. *Mediators Inflamm.* **2013**, 1–12.
 115. Salomao M., Zhang X., Yang Y., Lee S., Hartwig J.H., Chasis J.A., Mohandas N., An X. 2008. Protein 4.1 R-dependent multiprotein complex: a new insights into the structural organization of the red blood cell membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 8026–8031.

Erythrocytes as Regulators of Blood Vessel Tone

O. G. Luneva¹, S. V. Sidorenko¹, G. V. Maksimov¹, R. Grygorczyk², S. N. Orlov^{1,3*}

¹Faculty of Biology, Moscow Lomonosov State University, Leninskie Gory, 1, build. 12, Moscow, 119991 Russia;

*e-mail: sergeinorlov@yandex.ru

²Department of Medicine, University of Montreal, 900 rue St-Denis, Montreal (Quebec) H2X0A9, Canada;

³Tomsk State University, pr. Lenina, 36, Tomsk, 634050 Russia

The drop of oxygen partial pressure results in elevation of the blood vessel diameter. It has been demonstrated that isolated vessels exhibit this unique feature only when they are perfused in the presence of erythrocytes. More recently it was shown that hemoglobin plays a key role in oxygen sensing and its deoxygenated form interacts with band 3 protein, thus triggering the cascade of non-identified intracellular signals involved in nitric oxide production and release of ATP interacting with P2Y purinergic receptors in endothelial cells. In this review, we summarize the data on mechanisms of the ATP release from erythrocytes as well as on its physiological and pathophysiological implications.

Keywords: erythrocytes, hemolysis, oxygen sensor, purinergic signaling system, vessels.