

А.О. Ослякова, И.А. Тихомирова

Сосудистые факторы регуляции и их влияние на реологические свойства крови

Работа выполнена в рамках реализации Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы. Поддержана грантом РФФИ, № 09-04-00436-а.

В настоящем исследовании проанализировано влияние вазодилаторов эндотелиальной природы на реологические свойства крови, показаны изменения клеточных характеристик эритроцитов под действием оксида азота и простациклина

Ключевые слова: оксид азота, простациклин, гемореология, эритроциты, микрососуды, регуляция.

А.О. Osljakova, I.A. Tikhomirova

Vascular Factors of Regulation and Its Influence on Rheological Blood Properties

The influence of endothelium-derived vasodilators on the rheological blood properties was analysed in this study. The changes of cellular parameters of erythrocytes were revealed after nitric oxide and prostacyclin treatment.

Key words: nitric oxide, prostacyclin, hemorheology, erythrocytes, microvessels, change mechanisms.

Введение

Жизнедеятельность организма связана с постоянным изменением потребностей тканей и органов в кислороде и питательных веществах. В снабжении тканей кислородом в соответствии с их локальными метаболическими потребностями важную роль играет регуляция тонуса кровеносных сосудов. Вазодилатация, обусловленная функционированием микроваскулярного эндотелия (выбросом вазодилаторов оксида азота и простагландина P_g I₂), в достаточной степени изучена [1].

Интерес к молекуле оксида азота NO как составной части «эндотелиального фактора расслабления сосудов» (endothelium-derived relaxing factor, EDRF) первоначально был вызван его способностью регулировать тонус сосудов. Однако очень скоро список биологических функций NO значительно расширился. Оксид азота оказался связан с передачей сигналов нейронами, иммунными реакциями, репродуктивными и другими функциями. Также оксид азота и простациклин (P_g I₂), высвобождающиеся из эндотелия, препятствуют агрегации и адгезии тромбоцитов [2].

В последнее время появились публикации, посвященные участию эритроцитов в регуляции микрокровотока посредством NO [3].

Оксид азота является важным вазодилаторным агентом в условиях гипоксии. Гипоксическая вазодилатация представляет собой ответ, посредством которого падение напряжения кислорода вызывает периферическое увеличение кровотока [4,5]. Хотя гипоксия усиливает опосредованное оксидом азота расслабление сосудов [6,7], NO эндотелиальной природы не играет непосредственной роли в гипоксической вазодилатации, и фактически активность eNOS ослабляется при гипоксии вследствие ограничения субстрата - O₂. Однако eNOS может обеспечивать субстратом - NO эндотелиальной природы (EDNO) гемоглобин эритроцитов для осуществления гипоксической вазодилатации, в большинстве случаев отдаленной во времени и пространстве от момента и места поступления EDNO в эритроциты. Таким образом, используя O₂-сенсорную функцию гемоглобина, эритроциты стимулируют ступенчатую дилатацию кровеносных сосудов при снижении напряжения кислорода [7,8], тем самым регулируя сосудистый тонус.

Несмотря на то, что сосудистые эффекты вазодилаторов, высвобождаемых эндотелиоцитами, достаточно изучены, их возможному влиянию на собственно реологические свойства кро-

ви (а, значит, и на ее кислородтранспортный потенциал) не уделялось должного внимания.

Целью настоящего исследования было оценить эффекты простациклина и Spermine NONOate (Spermine–Nitric oxide complex hydrate; SPER/NO) – донора оксида азота на макро- и микро-реологические свойства крови.

Материалы и методы

В исследование были включены 10 практически здоровых доноров-добровольцев (лица обоего пола). Для определения реологических параметров забор крови проводился из локтевой вены квалифицированным медицинским персоналом. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (10 Ед/мл).

Эритроциты использовались в исследовании после отделения от плазмы путем центрифугирования и 3-кратной отмывки в растворе NaCl (0,154M).

Отмытые клетки инкубировали при 37° С в физиологическом растворе (контроль) и в растворах донора оксида азота SPER/NO (SIGMA, 10⁻⁶ M) и простагландина Pg I₂ (простациклин) (SIGMA, 10⁻⁷ M) (эксперимент). Инкубационный раствор удаляли центрифугированием, а клетки крови ресуспендировали в аутоплазме при фиксированном значении гематокрита (для измерения вязкости и степени агрегации эритроцитов) и в неагрегирующей среде (для оценки деформируемости клеток).

Кажущуюся вязкость плазмы, крови и суспензий эритроцитов со стандартным показателем гематокрита 40% в разных средах (плазме, физиологическом растворе) измеряли с помощью полуавтоматического капиллярного вискозиметра [9].

Принцип действия прибора основан на создании в системе градиента давления, передающегося исследуемой жидкостью, и возможности измерения скорости перемещения этой жидкости при заданном фиксированном давлении, что позволяет выполнить определение кажущейся вязкости объекта в интервале заданных напряжений сдвига за один цикл измерений.

Измерения проводились при постоянной температуре 21°С. Калиброванный капилляр заполняли исследуемой жидкостью, при нагнетании фиксированного давления жидкость начинала перемещаться по капилляру, скорость ее движения в данном случае обратно пропорциональна вязкости.

Скорость перемещения исследуемой жидкости фиксировалась автоматически с помощью встроенных фотодиодов.

Величину кажущейся вязкости вычисляли по формуле:

$$\eta = K \cdot P \cdot t,$$

где η – кажущаяся вязкость крови (плазмы или суспензии, мПа·с),

K – константа капилляра (зависит от его геометрии, определяется при калибровке системы ньютоновской жидкостью с известной вязкостью (40% раствор сахарозы);

t – время движения пробы жидкости по измерительной части капилляра (фиксируется автоматически с помощью встроенных фотодиодов);

P – приложенное рабочее давление (задается экспериментатором).

Измерение кажущейся вязкости производили при следующих напряжениях сдвига (Па): 1,06; 0,85; 0,64; 0,42; 0,21.

Эритроциты ресуспендировали в обедненной тромбоцитами аутологичной плазме при стандартном уровне Ht=0,5% для оценки процесса агрегатообразования. Степень агрегации эритроцитов определяли с помощью метода оптической микроскопии с последующей видеорегистрацией и компьютерным анализом изображения [10]. При регистрации рассчитывали степень агрегации ($CA = N_{\text{агрегатов}} / N_{\text{свободных эритроцитов}}$) как отношение числа агрегатов к количеству одиночных эритроцитов и показатель агрегации ($PA = N_{\text{эритроцитов в агрегате}} / N_{\text{агрегатов}}$), равный среднему числу эритроцитов, приходящихся на один агрегат.

О деформируемости красных клеток крови судили по индексу элонгации в проточной микрокамере в сдвиговом потоке при фиксированном напряжении сдвига 0,78 Па [11]. В качестве косвенной оценки деформируемости использовали показатели вязкости суспензии эритроцитов со стандартным гематокритом 40% в неагрегирующей среде [12].

Содержание АТФ в эритроцитах измеряли методом билюминесценции с помощью люминометра ЛЮМ-1 («Люмтек», Москва). Концентрацию АТФ в экстракте эритроцитов рассчитывали по формуле:

$$[АТФ]_{\text{обр}} = 5 \cdot 10^{-8} \cdot ((I_{\text{обр}}) / (I_{\text{контр}})), \text{ моль/л,}$$

где $I_{\text{обр}}$ – среднее значение величины билюминесцентного сигнала для образца клеток;

$I_{\text{контр}}$ – билюминесцентный сигнал для АТФ-контроля.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием параметриче-

ских критериев (в случае нормального распределения). В случае попарно связанных выборок (при оценке влияния препаратов на исследуемые показатели) использовали парный критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Простациклин (P_g I₂) и оксид азота (NO) синтезируются в эндотелиальных клетках сосудов и обладают наиболее выраженным вазодилаторным эффектом из всех известных в настоящее время агентов аналогичного действия. Однако, помимо влияния на тонус сосудов, они оказывают воздействие на реологические и клеточные свойства крови. Реологические характеристики крови практически здоровых лиц, полученные в ходе исследования, представлены в табл. 1.

Таблица 1
Реологические показатели крови
и внутриэритроцитарное содержание АТФ (M±σ)

Параметр	Контроль (n=10)	SPER/NO (n=10)	Простациклин P _g I ₂ (n=10)
ВСП ₍₁₎ (мПа·с)	4,25±0,61	4,54±0,59	4,27±0,79
ВСП ₍₂₎ (мПа·с)	5,50±0,95	5,56±0,69	5,41±0,94
ВСП ₍₃₎ (мПа·с)	7,54±1,18	7,81±1,08	7,34±1,34
ВСП ₍₄₎ (мПа·с)	12,0±1,5	12,2±1,7	11,4±1,8
ВСП ₍₅₎ (мПа·с)	24,7±2,5	26,1±2,5	23,6±3,0
ВСФ ₍₁₎ (мПа·с)	2,97±0,23	2,95±0,15	2,85±0,15
ВСФ ₍₂₎ (мПа·с)	3,71±0,19	3,63±0,09	3,52±0,21**
ВСФ ₍₃₎ (мПа·с)	5,04±0,29	5,00±0,22	4,75±0,33*
ВСФ ₍₄₎ (мПа·с)	7,68±0,52	7,75±0,22	7,34±0,51
ВСФ ₍₅₎ (мПа·с)	15,6±0,9	15,9±0,7	15,2±1,3
СА (отн.ед.)	0,139±0,050	0,078±0,020*	0,190±0,074*
РА (отн.ед.)	5,52±0,59	5,48±0,69	5,29±0,55
АТФ, 10 ⁻⁸ (моль/л)	8,76±7,77	4,89±4,51*	6,45±5,30*
ИЭ (отн.ед.)	0,317±0,021	0,318±0,018	0,317±0,012

Примечание: статистически значимые различия обозначены: * - при $p < 0,05$;

Обозначения: ВСП – вязкость суспензии эритроцитов в аутоплазме с гематокритом 40%; ВСФ – вязкость суспензии эритроцитов в физиологическом растворе с гематокритом 40%; подстрочные индексы для напряжений сдвига: 1 – 1,06 Па, 2 – 0,85 Па, 3 – 0,64 Па, 4 – 0,42 Па, 5 – 0,21 Па; СА – степень агрегации; РА – показатель агрегации; АТФ – концентрация внутриклеточного АТФ; ИЭ – индекс элонгации (деформируемость).

После инкубации красных клеток крови со SPER/NO кажущаяся вязкость суспензий эритроцитов в аутоплазме со стандартным показателем гематокрита 40% (табл. 1) не имела значимых отличий от группы контроля. Также под влиянием донора оксида азота не изменилась вязкость суспензий эритроцитов с фиксированным показателем гематокрита в физиологическом растворе при всех напряжениях сдвига.

Известно, что оксид азота, продуцируемый в сосудистом эндотелии, ингибирует агрегацию тромбоцитов [1]. Обработка эритроцитов SPER/NO показала аналогичное действие данного агента (оксида азота) и в отношении красных клеток крови - степень агрегации эритроцитов в эксперименте достоверно снизилась на 43,9% ($p < 0,05$).

Простациклин – вазодилатор, который является главным продуктом метаболизма арахидоновой кислоты во всех эндотелиальных клетках. Данное соединение оказывает сосудорасширяющее действие за счет стимуляции специфических рецепторов гладкомышечных клеток сосудов, что приводит к повышению активности аденилатциклазы и к увеличению образования в них циклического АМФ. Основная локализация рецепторов простациклина – гладкомышечные клетки артериальных сосудов, в венозных сосудах эти рецепторы не обнаружены. Внутривенное введение простациклина приводит к вазодилатации и системному снижению артериального давления, причем в сосудах не только большого, но и малого кругов кровообращения.

После инкубации клеток с простациклином наблюдалась достоверно более низкая вязкость суспензий эритроцитов в физиологическом растворе по сравнению с контрольной группой при напряжениях сдвига 0,85 и 0,64 Па – на 5,12% ($p < 0,01$) и 5,75% ($p < 0,05$) соответственно.

При сравнении показателей вязкости суспензий эритроцитов со стандартным показателем гематокрита (40%) в аутоплазме не было выявлено статистически значимых различий текучести суспензий интактных клеток и эритроцитов, подвергшихся обработке простагландином P_g I₂. Однако эффект данного препарата на клеточные свойства эритроцитов был значимым. Несмотря на то, что простациклин, как и оксид азота, представляет собой мощный ингибитор агрегации тромбоцитов, нами было отмечено противоположно направленное влияние этого агента на агрегатообразование красных клеток крови. После инкубации с простациклином степень агрегации

достоверно повышалась – на 36,7% ($p < 0,05$) (табл. 1).

Проведенное исследование не зафиксировало существенных изменений деформируемости клеток под действием препаратов при сравнении индексов элонгации эритроцитов в сдвиговом потоке. При оценке деформируемости по показателям вязкости суспензий эритроцитов в физиологическом растворе зафиксировано достоверное повышение способности клеток к деформации под влиянием простаглицина.

Нами было выявлено достоверное снижение содержания АТФ в эритроцитах после инкубации красных клеток крови со Spermine NONOate на 44,2% ($p < 0,05$) и после их обработки простаглицлином на 26,4% ($p < 0,05$).

Несмотря на то, что молекула NO сама по себе действует аутокринно и паракринно, она также находится в химическом равновесии с другими молекулами, которые представляют собой стабильные запасы биоактивности NO. К этим молекулам можно отнести S-нитрозилированный гемоглобин (S-нитрозогемоглобин; Hb-SNO), который является преобразователем биоактивности оксида азота в организме, действуя тонко регулируемым образом для управления кардиореспираторным и сосудистым гомеостазом.

Hb-SNO оказывает сосудорасширяющее действие и усиливает кровоток в сосудах. Таким образом, Hb-SNO как в свободном виде, так и в составе

эритроцитов обладает EDRF-подобными свойствами [13].

Следует учитывать и то, что NO может реагировать не только с SH-группами гемоглобина, но и с его гемом, образуя нитрозильные комплексы (HbNO). И Hb-SNO, и HbNO образуют большой пул депонированного в красных клетках крови оксида азота. Синтез простаглицина происходит постоянно, но он не депонируется, а секретируется в непосредственно в кровь.

Являясь регулятором тонуса сосудов (и тем самым кровяного давления), NO участвует и в патогенезе различных сердечно-сосудистых заболеваний, включая гипертоническую болезнь и атеросклероз. Хорошо известна защитная роль NO в начальной стадии ишемии как фактора, улучшающего кровоток и снижающего повреждение тканей [13]. Также большой интерес представляет влияние окиси азота и простаглицина на функциональную активность сердца.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что вазодилаторы эндотелиальной природы (оксид азота и простаглицлин) оказывают влияние не только непосредственно на сосуды, но и воздействуют на собственно макро- и микрореологические свойства крови, существенно изменяя клеточные свойства, в частности способность к агрегатообразованию и энергетику эритроцитов.

Библиографический список

1. Cavar I., Kelava T., Heinzel R., Culo F. The role of prostacyclin in modifying acute hepatotoxicity of acetaminophen in mice // *Coll Antropol.* – 2009. – № 33. – P. 25-29.
2. Dusting G.J., Fennessy P., Yin Z.L., Gurevich V. Nitric oxide in atherosclerosis: vascular protector or villain? // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.* – 1998. – № 25. – P. 34-41.
3. Mark W. Vaughn, Kuang-Tse Huang, Lih Kuoll, James C. Liao Erythrocytes Possess an Intrinsic Barrier to Nitric Oxide Consumption // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2000. – № 4. – P. 2342–2348.
4. Allen B.W., Piantadosi C.A. How do red blood cells cause hypoxic vasodilation? The SNO-hemoglobin paradigm // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2006. – № 291. – P. 1507-1512.
5. Singel D.J., Stamler J.S. Chemical physiology of blood flow regulation by red blood cells: the role of nitric oxide and S-nitrosohemoglobin // *Ann. Rev. Physiol.* – 2005. – № 67. – P. 99-145.
6. Crawford J.H., White C.R., Patel R.P. Vasoactivity of S-nitrosohemoglobin: role of oxygen, heme, and NO oxidation states // *Blood.* – 2003. – № 101. – P. 4408-4415.
7. Datta B., Tufnell-Barrett T., Bleasdale R.A., Jones C.J., Beeton I., Paul V., Frenneaux M., James P. Red blood cell nitric oxide as an endocrine vasoregulator: 9. a potential role in congestive heart failure // *Circulation.* – 2004. – № 109. – P. 1339-1342.
10. Gonzalez-Alonso J., Richardson R.S., Saltin B. Exercising skeletal muscle blood flow in humans re

sponds to reduction in arterial oxyhaemoglobin, but not to altered free oxygen // *J. Physiol.* – 2001. – № 530. – P. 331-341.

11. Муравьев, А.В., Туров, В.Е., Колбаско, И.В. Новый капиллярный полуавтоматический вискозиметр [Текст] // *Гемореология в микро- и макроциркуляции: мат. международн. конф.* – Ярославль, 2005. – С. 28.

12. Муравьев, А.В. Компьютерная регистрация агрегации эритроцитов при их инкубации с адреналином [Текст] // *Методы исследования регионарного кровообращения и микроциркуляции в клинике: мат. научно-практ. конференции.* – СПб, 2003. – С. 78–80.

13. Муравьев, А.В., Муравьев, А.А., Булаева, С.В., Маймистова, А.А. Методы изучения деформируемости эритроцитов в эксперименте и клинике [Текст] / А.В. Муравьев // *Клиническая лабораторная диагностика.* – 2010. – №1. – С. 28-29.

14. Муравьев, А.В., Чепоров, С.В. Гемореология (экспериментальные и клинические аспекты реологии крови). [Текст] – Ярославль, 2009. – 178 с.

15. Осипов, А.Н., Борисенко, Г.Г., Владимиров, Ю.А. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротенинов // [Текст] *Успехи биологической химии.* – 2007. – Т. 47. – С. 259-292.