

А. О. Ослякова, И. А. Тихомирова

Модификация реологических свойств крови под влиянием ацетазоламида и глибенкламида в норме и при нарушениях кровообращения

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

В работе проанализированы эффекты ацетазоламида и глибенкламида на макрореологические свойства крови, выявлены изменения клеточных характеристик эритроцитов в норме и при ишемии миокарда под действием данных соединений.

Ключевые слова: ацетазоламид, глибенкламид, эритроциты, гемореология, агрегация, деформируемость, ишемическая болезнь сердца.

А. О. Oslyakova, I. A. Tikhomirova

Red Blood Cell Modification under the Influence of Acetazolamide and Glibenklamide in Norm and in Circulation Disorders

In the study the effects of acetazolamide and glibenklamide on macrorheological blood properties were analyzed, the alterations of cellular characteristics of erythrocytes under the influence of these compounds in norm and in ischemic heart disease were revealed.

Keywords: acetazolamide, glibenklamide, erythrocytes, hemoreology, aggregation, deformability, ischemic heart disease.

Введение

Реологические свойства крови во многом определяют адекватность (или неадекватность) кровотока [8] главным образом в системе микроциркуляции – уровня кровообращения, без нормального функционирования которого в живом организме не протекает ни один физиологический или патофизиологический процесс [7]. Патологические процессы, происходящие в организме человека, вызывают различные изменения кровотока, отражающие нарушение гомеостаза [6]. Сердечно-сосудистые заболевания в настоящее время выступают в качестве одной из основных причин заболеваемости и смертности в мире, поэтому изучение механизмов их патогенеза и развития компенсаторных приспособлений являются актуальной проблемой современной медицины и физиологии. Ведущая роль в структуре смертности от сердечно-сосудистых заболеваний принадлежит ишемической болезни сердца (ИБС) – 35 %. Значительная часть (до 40 %) больных ишемической болезнью сердца имеет существенные нарушения реологических свойств крови. Ухудшение гемореологического статуса пациентов происходит по мере нарастания тяжести клинического состояния больного,

выраженности гемодинамических и сосудистых нарушений, распространенности атеросклеротического поражения эндотелия сосудов.

Изменение реологических свойств крови является одним из важнейших звеньев ухудшения состояния микроциркуляции и транспорта кислорода и имеет прогностическое значение при ишемической болезни сердца [1].

При ИБС тканевая гипоксия имеет место не только в поврежденном миокарде, но и в других органах и тканях организма, страдающих от недостаточной функции сердца и нарушенных реологических свойств крови. В условиях эксперимента для моделирования тканевой гипоксии используется ацетазоламид – ингибитор карбоангидразы. Этот фермент играет важную роль в физиологических процессах при необходимости быстрого связывания или освобождения CO_2 , например, при дыхании (карбоангидраза эритроцитов обеспечивает связывание CO_2 кровью в тканях и освобождение CO_2 в легких). О влиянии кратковременного накопления углекислого газа в эритроцитах (что имеет место при гипоксии) на реологические свойства крови, а следовательно, и на ее кислородтранспортный потенциал можно судить по изменению гемореологических пара-

метров после обработки эритроцитов ацетазоламидом.

Ишемическая болезнь сердца в большинстве случаев имеет ряд сопутствующих патологий, которые требуют постоянной фармакологической коррекции, например, сахарный диабет. Влияние препаратов, используемых в терапии диабета на гемореологический статус пациентов, а следовательно, на кислородное снабжение тканей и органов, недостаточно изучено. Одним из препаратов, широко используемых в лечении пациентов с сахарным диабетом второго типа, является глибенкламид. Открытым остается вопрос об эффекте этого соединения на реологические свойства крови.

С учетом вышесказанного целью настоящего исследования стала оценка влияния ацетазоламида и глибенкламида на реологические свойства крови в норме и при ишемической болезни сердца.

Материалы и методы

В исследование после получения устного информированного согласия были включены доноры-добровольцы (лица обоего пола): практически здоровые добровольцы ($n = 12$, средний возраст $20,7 \pm 2,1$ лет) и пациенты с диагнозом ишемическая болезнь сердца ($n = 16$, средний возраст $67,2 \pm 6,3$ лет). 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 трехкратной отмывки в растворе NaCl (0,154 М).

Отмытые клетки инкубировали при 37°C в физиологическом растворе (контроль) и в растворах ацетазоламида (SIGMA, 100 μM) и глибенкламида (SIGMA, 100 μM) (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 цельной крови, плазмы и суспензий эритроцитов со стандартным показателем гематокрита 40 % в разных средах (плазме, физиологическом растворе) измеряли с помощью полуавтоматического капиллярного вискозиметра [4].

Принцип действия прибора основан на создании в системе градиента давления, передающегося исследуемой жидкости, и возможности из-

мерения 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°C . 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 пяти напряжениях сдвига (1,06; 0,85; 0,64; 0,42; 0,21 Па).

Для оценки процесса агрегатообразования эритроциты ресуспендировали в обедненной тромбоцитами аутологичной плазме при стандартном значении гематокрита 0,5 %. Степень агрегации эритроцитов определяли с помощью метода оптической микроскопии с последующей видеорегистрацией и компьютерным анализом изображения [2]. Рассчитывали степень агрегации СА (как отношение числа агрегатов к количеству одиночных клеток) и среднее число эритроцитов, приходящееся на один агрегат – размер агрегата РА.

Деформируемость красных клеток крови оценивали по индексам элонгации (ИЭ) эритроцитов в проточной микрокамере в сдвиговом потоке при фиксированном напряжении сдвига 0,78 Па [7] и рассчитывали по формуле:

$$\text{ИЭ} = (D - Ш) / (D + Ш),$$

где: D – длина деформированного эритроцита; $Ш$ – его ширина.

В качестве косвенной оценки деформируемости использовали показатели вязкости суспензии эритроцитов со стандартным гематокритом 40 % в неагрегирующей среде (физиологическом растворе) [5].

Полученные данные представлены в виде средних значений с их стандартным отклонением ($M \pm \sigma$). Статистическую обработку результатов проводили с использованием параметрических критериев. В случае попарно связанных выборок (при оценке влияния препаратов на исследуемые показатели) использовали парный критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Инкубация эритроцитов здоровых доноров с ацетазоламидом привела к достоверному снижению вязкости суспензий красных клеток крови в аутоплазме со стандартным показателем гематокрита 40 % практически при всех напряжениях сдвига (рис. 1). Аналогичное по направлению, но более выраженное влияние на клетки здоровых

лиц оказал и глибенкламид: вязкость суспензий эритроцитов с $Hct = 40\%$ в плазме была ниже, чем в контроле в среднем на 7,87 % ($p < 0,001$) при высоких напряжениях сдвига, при 0,42 Па – ниже на 5,71 % ($p < 0,05$), при 0,21 Па снижение вязкости суспензий клеток оказалось статистически недостоверным (рис. 1).

При обработке красных клеток крови пациентов с ишемической болезнью сердца как ацетазоламидом, так и глибенкламидом было выявлено еще более существенное снижение вязкости суспензий эритроцитов с фиксированным значением гематокрита в аутоплазме, чем наблюдалось в группе здоровых лиц (рис. 1).

При сравнении показателей вязкости суспензий эритроцитов в физиологическом растворе ($Hct = 40\%$) был отмечен статистически значимый рост текучести суспензий клеток при всех напряжениях сдвига под влиянием и ацетазоламида, и глибенкламида как в группе здоровых доноров, так и в группе пациентов с ИБС (рис. 2).

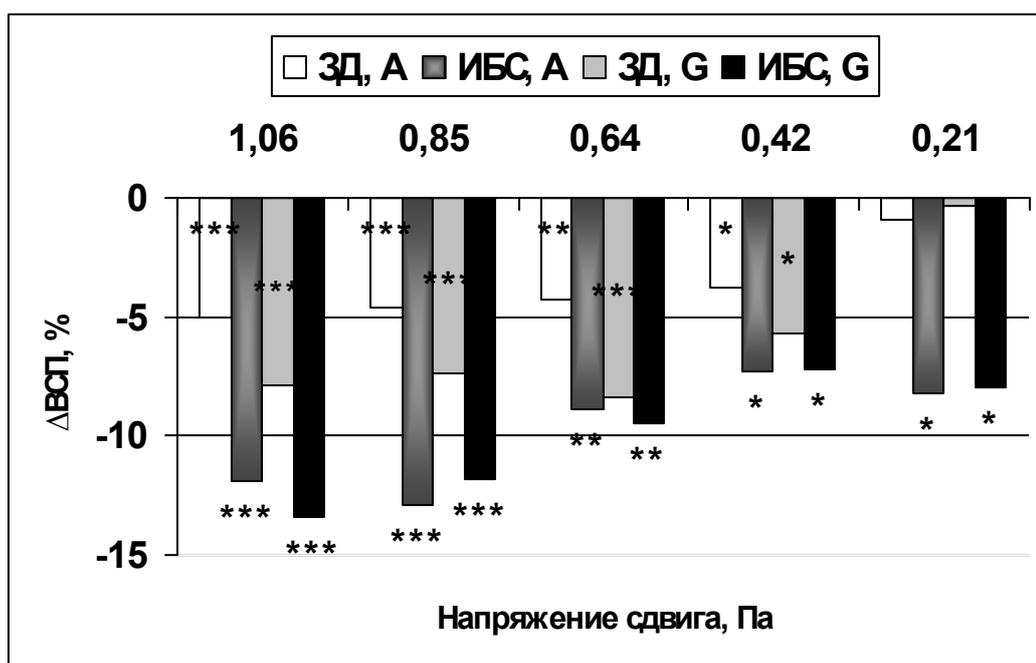


Рис. 1. Изменение вязкости суспензий эритроцитов в аутологичной плазме в группе здоровых лиц (ЗД) и пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) под влиянием ацетазоламида (А) и глибенкламида (Г)

Обозначения: ВСП – вязкость суспензий эритроцитов в аутоплазме с показателем гематокрита 40 %.

Примечание: статистически значимые различия обозначены: * – при $p < 0,05$; ** – при $p < 0,01$; *** – при $p < 0,001$.

Оксигенация клеток и тканей организма в значительной степени зависит от микрореологических свойств красных клеток крови – их способности к деформации и объединению в агрегаты, поскольку клеточные функции осуществля-

ются, в основном, через свободную поверхность их мембран. Исследуемые препараты оказали существенный положительный эффект на клеточные свойства эритроцитов в обеих группах доноров (табл. 1). Влияние и ацетазоламида, и

глибенкламида выразилось в достоверном снижении степени агрегации (СА) эритроцитов здоровых лиц и пациентов с ИБС, среднего размера агрегатов клеток (РА), при этом в обеих группах

наблюдался статистически значимый рост деформируемости эритроцитов, оцениваемой по индексам элонгации клеток (ИЭ) (табл. 1).

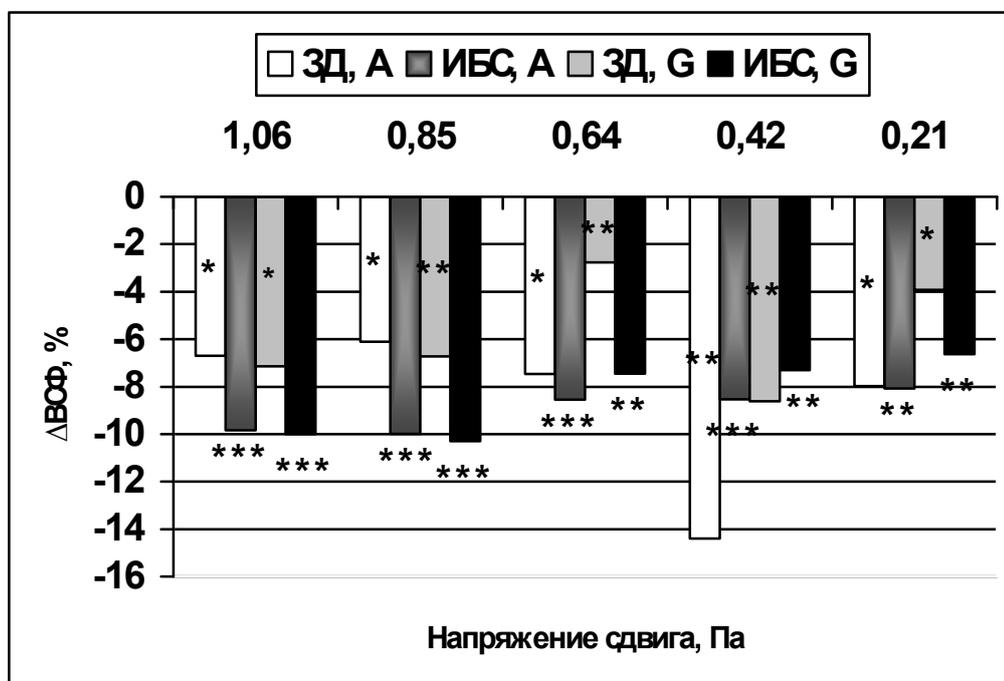


Рис. 2. Изменение вязкости суспензий эритроцитов в буфере в группе здоровых лиц (ЗД) и пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) под влиянием ацетазоламида (А) и глибенкламида (Г)

Обозначения: ВСФ – вязкость суспензий эритроцитов в физиологическом растворе с показателем гематокрита 40 %.

Примечание: статистически значимые различия обозначены: * – при $p < 0,05$; ** – при $p < 0,01$; *** – при $p < 0,001$.

Можно предположить, что наблюдаемое под влиянием ацетазоламида улучшение клеточных свойств эритроцитов как здоровых лиц, так и пациентов с ИБС является адаптивной реакцией клеток, направленной на сохранение оптимального кислородтранспортного потенциала крови в условиях роста концентрации углекислого газа при ингибировании карбоангидразы эритроцитов ацетазоламидом.

Карбоангидраза эритроцитов (СА-II) – цинксо-держащий фермент, катализирующий обратимую реакцию гидратации главного конечного продукта аэробного метаболизма – диоксида углерода – в угольную кислоту, диссоциирующую на гидрокарбонат-ион и катион водорода:



В капиллярах микроциркуляторного русла тканей напряжение непрерывно образующегося в результате метаболизма углекислого газа $p\text{CO}_2$ высокое. Здесь карбоангидраза ускоряет образование угольной кислоты. При прохождении крови по капиллярам микроциркуляторного русла легких $p\text{CO}_2$

уменьшается. Это приводит к высвобождению углекислого газа из крови в альвеолярную смесь газов. Ингибирование карбоангидразы создает гиперкапнические условия, способствуя компенсаторному расслаблению гладкомышечных клеток сосудов. Нами зафиксировано, что ингибитор угольной ангидразы ацетазоламид, наряду с вазодилаторным влиянием на кровеносные микрососуды, оказывает также позитивный эффект на макро- и микрореологические свойства крови (рис. 1, 2; табл. 1).

Активность карбоангидразы в крови в норме довольно постоянна и может служить показателем адаптивных возможностей организма. При некоторых патологических состояниях она способна повышаться (при анемиях различного генеза, нарушениях кровообращения II–III степени, некоторых заболеваниях легких), либо снижаться (при ацидозе почечного генеза, гипертиреозе). Блокаторы карбоангидразы используются в клинической практике (в составе ряда мочегонных препаратов) или для профилактики горной или высотной болезни.

Глибенкламид представляет собой синтетическое гипогликемическое средство, производное сульфонилмочевины. Наряду с гипогликемическим эффектом, глибенкламид оказывает гипохолестеринемическое действие и снижает тромбогенные свойства крови. Нами было продемонстрировано, что этот препарат обладает еще и

выраженным позитивным реологическим эффектом: под его влиянием отмечена оптимизация микрореологических характеристик (агрегируемости и деформируемости эритроцитов), что привело и к повышению текучести крови как здоровых лиц, так и пациентов с ишемической болезнью сердца.

Таблица 1

Изменение микрореологических свойств крови здоровых лиц и пациентов с ИБС после обработки ацетазоламидом и глибенкламидом (M±σ)

Параметры	До обработки препаратом (контроль)	После обработки ацетазоламидом	Δ, %	После обработки глибенкламидом	Δ, %
Здоровые доноры (n = 12)					
СА (отн. ед.)	0,087±0,032	0,049±0,026**	-43,5	0,047±0,019***	-46,2
РА (отн. ед.)	4,99±0,78	4,43±0,48*	-11,4	4,38±0,67*	-12,2
ИЭ (отн. ед.)	0,422±0,022	0,447±0,013**	+5,92	0,443±0,014**	+5,08
Пациенты с ИБС (n = 16)					
СА (отн. ед.)	0,114±0,070	0,069±0,028*	-40,0	0,068±0,027*	-40,5
РА (отн. ед.)	5,09±0,50	4,64±0,50**	-8,96	4,42±0,42***	-13,1
ИЭ (отн. ед.)	0,374±0,028	0,400±0,015**	+6,99	0,399±0,016**	+6,54

Обозначения: СА – степень агрегации красных клеток крови; РА – размер агрегата эритроцитов; ИЭ – индекс элонгации (деформируемость эритроцитов).

Примечание: статистически значимые различия обозначены: * – при p<0,05; ** – при p<0,01; *** – при p<0,001.

Таким образом, можно заключить, что и ацетазоламид, и глибенкламид представляют собой реологически активные соединения и проявляют положительный эффект на потоковые свойства

крови за счет оптимизации клеточных характеристик эритроцитов как в норме, так и при ишемии миокарда.

Библиографический список

1. Константинова, Е. Э. Реологические свойства крови у мужчин и женщин при артериальной гипертензии и ишемической болезни [Текст] / Е. Э. Константинова, Л. А. Иванова, Т. Н. Толстая // Материалы международной конференции по гемореологии. – Ярославль, 2005. – С. 53.
2. Муравьев, А. В. Компьютерная регистрация агрегации эритроцитов при их инкубации с адреналином [Текст] / А. В. Муравьев // Мат. научно-практ. конференции «Методы исследования регионарного кровообращения и микроциркуляции в клинике». – СПб. – 2003. – С. 78–80.
3. Муравьев, А. В. Методы изучения деформируемости эритроцитов в эксперименте и клинике [Текст] / А. В. Муравьев, А. А. Муравьев, С. В. Булаев, А. А. Маймистова // Клиническая лабораторная диагностика, 2010. – №1. – С. 28–29.
4. Муравьев, А. В. Новый капиллярный полуавтоматический вискозиметр [Текст] / А. В. Муравьев, В. Е. Туров, И. В. Колбаско // Мат. междунар. конф. «Гемореология в микро- и макроциркуляции». – Ярославль. – 2005. – С. 28.
5. Муравьев, А. В., Чепоров, С. В. Гемореология (экспериментальные и клинические аспекты реологии крови) [Текст] / А. В. Муравьев, С. В. Чепоров. – Ярославль. – 2009. – 178 с.
6. Мчедлишвили, Г. И. Микроциркуляция крови [Текст] / Г. И. Мчедлишвили. – Л.: Наука, 1989. – 295 с.
7. Шмаков, Ю. И. Особенности реологического поведения и течения крови в системе микроциркуляции: сосуды малого диаметра [Текст] / Ю. И. Шмаков // Реологические исследования в медицине. – 2000. – Вып. 2. – С. 161–172.
8. Pirrelli A. Arterial Hypertension and hemorheology. What is relationship? // Clinical Hemorheology and Microcirculation. – 1999. – Vol. 3. – P. 157–160.