

О. А. Овчинникова, И. А. Тихомирова

### Реологические свойства крови в условиях модификации энергетического баланса эритроцитов

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

Энергетическое обеспечение процессов внутриклеточного гомеостаза в эритроцитах осуществляется за счет АТФ. Истощение АТФ в красных клетках крови ведет к ряду нарушений. Полученные данные демонстрируют, что способность эритроцитов к деформации и агрегации зависит от внутриклеточного содержания АТФ.

**Ключевые слова:** АТФ, деформируемость, агрегация, эритроцит, реологические свойства крови.

O. A. Ovchinnikova, I. A. Tikhomirova

### Rheological Properties of Blood in Conditions of Erythrocytes Balance Modification

Energy ensuring of processes of the intracellular homeostasis in erythrocytes is carried out by means of ATP. ATP exhaustion in red blood cells leads to some cellular disorders. The obtained results of our research showed that erythrocyte deformability and aggregation were markedly altered and these changes were accompanied by the intracellular ATP content variations.

**Keywords:** ATP, deformability, aggregation, erythrocytes, rheological blood properties.

#### Введение

Энергия макроэргов имеет большое значение для обеспечения целостности мембраны и двояковогнутой формы эритроцитов. Энергетическое обеспечение процессов внутриклеточного гомеостаза (и прежде всего, ионного) в эритроцитах осуществляется за счет АТФ, образующейся в процессе гликолиза, который является основным путем обмена энергии в красных клетках крови. Истощение АТФ в эритроцитах ведет к ряду нарушений, в частности, к блокированию ионных насосов и к изменению ионного баланса в системе среда-клетка.

Недостаточно изученным остается вопрос о влиянии энергетического потенциала красных клеток крови на их способность к выполнению кислородтранспортной функции, которая на уровне микроциркуляции во многом определяется реологическими свойствами крови. В связи с этим **целью** настоящего исследования стало изучение реологических свойств крови в условиях модификации энергетического баланса эритроцитов.

#### Материалы и методы

Для достижения поставленной в исследовании цели было изучено 75 образцов венозной крови практически здоровых доноров-добровольцев,

лиц обоего пола в возрасте от 21 до 49 лет. Для оценки влияния препаратов на реологические свойства эритроцитов трижды отмытые клетки инкубировали при 37° С в физиологическом растворе (контроль) и в присутствии препарата (эксперимент). В экспериментах использовали следующие препараты, меняющие энергетический потенциал клеток: метаболический ингибитор гликолиза йодацетамид (5 мМ), блокатор гликолиза дезоксиглюкозу (20 мМ), предшественников АТФ – аденозиндифосфорную кислоту (АДФ, 0,4 мМ) и рибоксин (инозин, 1,5 мМ). Время инкубирования с препаратами составило 15 минут, за исключением дезоксиглюкозы (30 мин.).

Инкубационный раствор удаляли центрифугированием, эритроциты использовали для измерения интересующих показателей. Реологические измерения включали определение вязкости суспензий эритроцитов при приведении к стандартному гематокриту как в аутоплазме, так и в физиологическом растворе. Измерение проводилось с помощью капиллярного вискозиметра. Степень агрегации красных клеток оценивали с помощью микроскопии разбавленной крови с видеорегистрацией и компьютерным анализом изображения. Для исследования степени дефор-

мируемости клеток определяли индекс удлинения эритроцитов в проточной микрокамере [4] по соотношению длины деформированной клетки к ее ширине ( $IУЭ = (L-W)/(L+W)$ , где L – длина деформированной клетки, W – ее ширина).

Содержание АТФ в эритроцитах измеряли с помощью люминометра ЛЮМ-1 («Люмтек», Москва), который предназначен для высокочувствительного измерения интенсивности хеми- и биолюминесценции (слабых оптических свечений) в видимой области спектра, возникающей при протекании ряда биохимических и/или химических реакций в растворах.

Данные, полученные в ходе исследования, были обработаны методами математической статистики, в случае нормального распределения использовали параметрические критерии, при оценке влияния препарата – парный критерий Стьюдента. При отклонении распределения от нормального закона пользовались непараметрическими критериями. Для выявления взаимосвязи между изучаемыми параметрами были рассчитаны коэффициенты ранговой корреляции.

### Результаты

Для оценки влияния изменений внутриклеточного содержания АТФ на реологические свойства крови нами проводилась модификация

содержания АТФ в клетке: повышение энергетического потенциала моделировали обработкой эритроцитов рибоксином и АДФ, снижение – инкубацией с дезоксиглюкозой и йодацетамидом (ЙАА).

Выявлено достоверное повышение текучести суспензий эритроцитов в плазме со стандартным показателем гематокрита (40 %) под влиянием АДФ в среднем на 17,3 % ( $p < 0,01$ ) и на 9,4 % ( $p < 0,05$ ) при инкубации с рибоксином. Под влиянием дезоксиглюкозы снижение вязкости суспензии эритроцитов в аутоплазме в среднем составило 11,4 % ( $p < 0,01$ ). Снижение текучести суспензий эритроцитов в аутоплазме при действии йодацетамида составило в среднем 15,3 % ( $p < 0,05$ ) (рис. 1).

Вязкость суспензии красных клеток крови в физиологическом растворе была ниже по сравнению с контролем при воздействии следующих препаратов: АДФ – в среднем на 18,4 % ( $p < 0,001$ ), инозина – в среднем на 10,5 % ( $p < 0,01$ ), дезоксиглюкозы – в среднем на 9,3 % ( $p < 0,05$ ). После инкубирования с йодацетамидом наблюдалось повышение вязкости суспензии эритроцитов в физиологическом растворе в среднем на 24,6 % ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контролем (рис. 2).

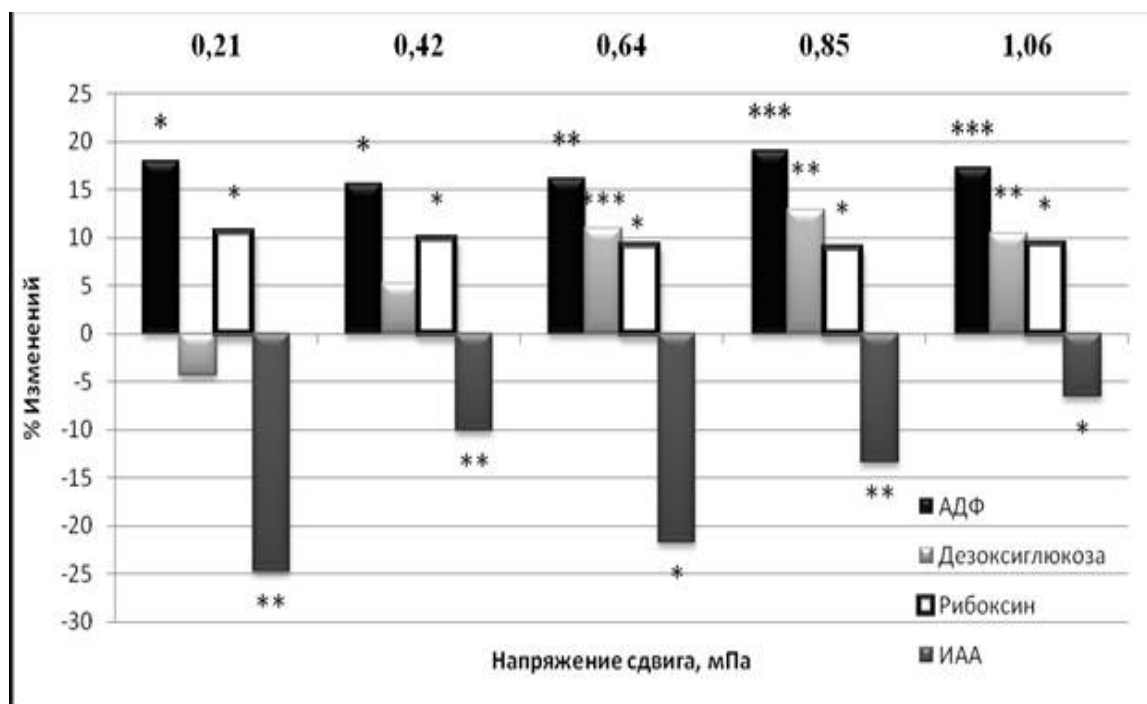


Рис. 1. Изменения текучести суспензии эритроцитов в аутоплазме с Ht=40 % при действии метаболически активных соединений

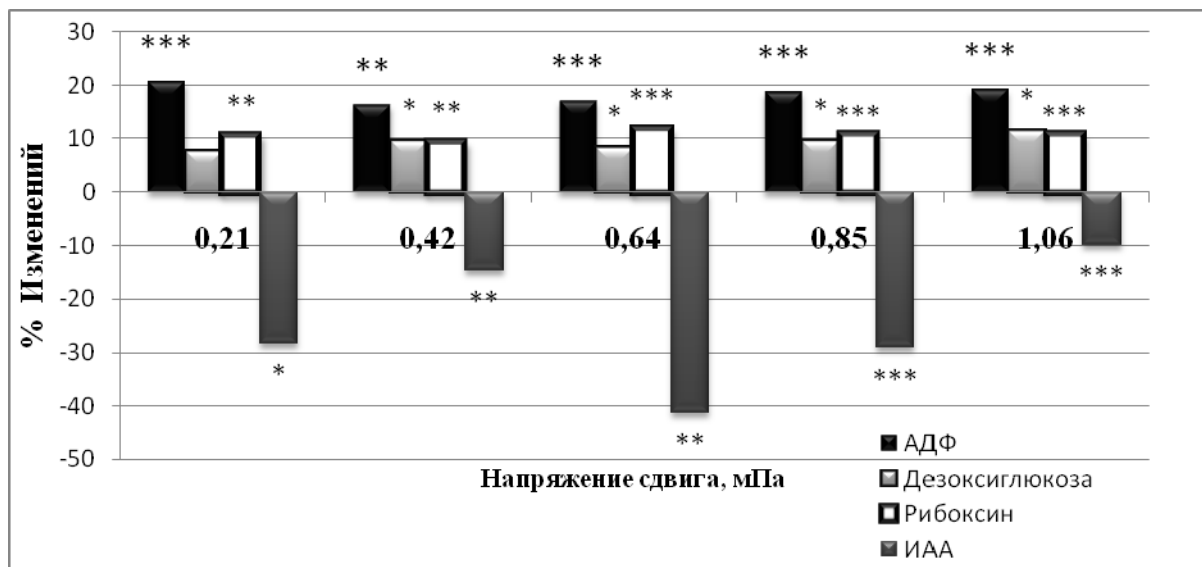


Рис. 2. Изменения текучести суспензии эритроцитов в физиологическом растворе с  $Ht=40\%$  под действием метаболически активных соединений

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

Степень агрегации красных клеток крови снизилась под влиянием рибоксина на 42,1 % ( $p<0,05$ ) и на 14,3 % ( $p<0,05$ ) после инкубации с АДФ. Увеличение этого показателя на 10,3 % ( $p<0,05$ ) наблюдалось после инкубации эритроцитов с йодацетамидом и на 12,5 % ( $p<0,05$ ) после воздействия дезоксирибозы.

Деформируемость эритроцитов была выше после обработки клеток АДФ (на 5,3 %,  $p<0,05$ ) и рибоксином (на 5,9 %,  $p<0,01$ ) и снизилась после

инкубирования с йодацетамидом (на 19,9 %,  $p<0,01$ ) и дезоксирибозой (на 6,3 %). Выявлено достоверное повышение содержания АТФ в эритроцитах на 33,6 % ( $p<0,001$ ) после инкубации красных клеток крови с рибоксином и на 43,8 % ( $p<0,001$ ) после их обработки АДФ (рис. 3). Выраженное изменение содержания АТФ отмечено под воздействием йодацетамида и дезоксирибозы – ее концентрация снизилась на 42,9 % и на 74 % соответственно ( $p<0,001$ ).

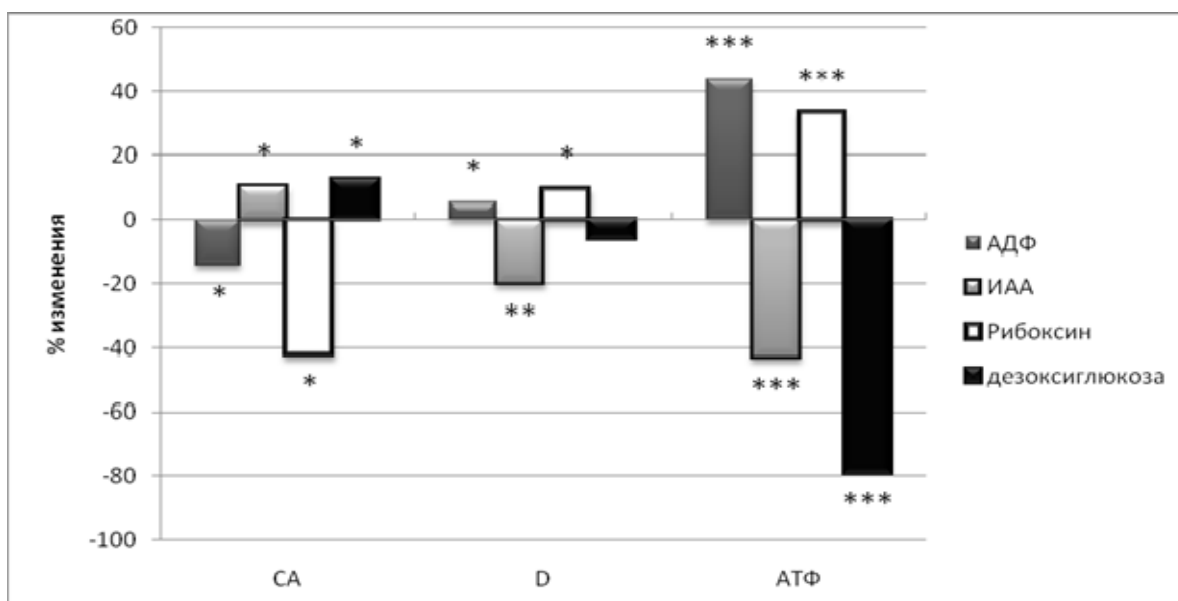


Рис. 3. Изменения микрореологических свойств и содержания АТФ

Обозначения: СА – степень агрегации эритроцитов; D – деформируемость эритроцитов.

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

Найдена достоверная обратная корреляция между уровнем АТФ и способностью эритроцитов к объединению в агрегаты под влиянием АДФ ( $r=-0,56$ ,  $p<0,05$ ) и рибоксина ( $r=-0,545$ ,  $p<0,05$ ).

### Обсуждение результатов

Основным процессом обмена энергии в эритроцитах является гликолиз. Дезоксиглюкоза воспринимается активными клетками как обычная глюкоза и захватывается в цитоплазму. Однако она проходит только первую стадию гликолиза и далее не усваивается. В результате ее метаболиты накапливаются в клетке, и, будучи жиронерастворимыми, они не могут ее покинуть. Рибоксин (инозин) – метаболическое средство, предшественник АТФ стимулирует анаэробный гликолиз. При наличии соответствующих ферментов может быть использован в качестве источника энергии [6].

Йодацетамид применяется в качестве ингибитора транспорта глюкозы [5]. Глюкозотранспортная система мембран эритроцитов (определяющая роль в которой принадлежит полипептиду полосы 4.5) характеризуется повышенной устойчивостью к внешним воздействиям, адресуемым к мембранным белкам. Параметры транспорта остаются постоянными при изменении ионной силы раствора и добавлении ионов Са, они слабо зависят от концентрации  $H^+$ -ионов в области рН 6,0–9,0.

Влияние используемых соединений на энергетический потенциал красных клеток крови подтвердилось изменением содержания АТФ под их воздействием: выявлено достоверное повышение содержания АТФ в эритроцитах после их инкубации с рибоксином и АДФ и снижение – под воздействием дезоксиглюкозы и ЙАА.

Реологические свойства крови, а следовательно, ее кислородтранспортный потенциал также изменились после обработки эритроцитов данными препаратами: рибоксин и АДФ приводят к уменьшению вязкости суспензий эритроцитов с  $Ht=40\%$  в физиологическом растворе (на 10,5 %,  $p<0,01$  и на 18,4 %,  $p<0,001$  соответственно) и в аутоплазме (на 9,4 %,  $p<0,05$  и на 17,3 %,  $p<0,01$  соответственно).

В молекуле АТФ две фосфатные группы соединены с остальной частью молекулы особой химической связью, носящей название макроэргической, что означает «богатая энергией». Один из фосфатных остатков может легко отделяться от АТФ, и, высвобождая энергию, АТФ при этом переходит в аденозиндифосфат (АДФ), который

гораздо беднее химической энергией, чем АТФ. За счет энергии, освобождаемой при окислении, АДФ вновь может подвергаться фосфорилированию, в результате чего происходит присоединение фосфатной группы и восстанавливается макроэргическая связь.

АТФ, таким образом, можно рассматривать как богатую энергией «заряженную» форму, тогда как АДФ – как «разряженную», относительно более бедную энергией форму аденозинфосфата. В животных клетках в ходе сложной цепи превращений, из которых слагается дыхание, энергия, заключенная в питательных веществах, в результате окисления расходуется на построение АТФ из АДФ. Таким образом, АДФ можно рассматривать и как самостоятельный (хотя и уступающий АТФ по эффективности) источник энергии в клетке, и как предшественник основного макроэрга – АТФ.

Рибоксин – агонист пуринергических рецепторов, которые являются частью лиганд-контролируемых ионных каналов и оказывают метаболотропное действие, осуществляемое через ГТФ-связывающие белки (Gi-белки). При возбуждении пуринергических рецепторов возникает гиперполяризация мембраны, в основном за счет усиления эффузии ионов калия из клеток. Метаболотропный компонент в действии этих рецепторов приводит к образованию дополнительного количества энергии, независимо от ее гликолитического образования.

С использованием рибоксина в клинической практике связывают первые успехи в решении проблемы борьбы с микроциркуляторными нарушениями и улучшения метаболизма остроинфарктированного миокарда (ОИМ). Кардиопротекторное действие рибоксина через его стимулирующее влияние на анаэробный гликолиз, целенаправленный синтез белков-ферментов, обеспечивающих биоэнергетику кардиомиоцитов, согласуется с противогипоксическим действием препарата [1].

Инкубация эритроцитов с этими соединениями (АДФ и рибоксин) привела не только к повышению внутриклеточного содержания АТФ, но и к оптимизации текучих свойств крови за счет снижения агрегируемости эритроцитов (на 14,3 % и 42,1 % соответственно,  $p<0,05$ ) и повышения их деформируемости (на 5,3 % и 5,9 %, соответственно,  $p<0,05$ ).

Выраженное энергетическое истощение (снижение внутриэритроцитарной концентрации АТФ на 42,9 %,  $p<0,001$ ) отмечено под действием йодацетамида, необратимо блокирующего

ферменты гликолиза [5]. При этом зафиксирован и самый значительный рост вязкости крови (на 41,3 %,  $p < 0,01$  при высоких напряжениях сдвига, на 21,8 %,  $p < 0,01$  – при низких). Поскольку свойства плазмы и показатель гематокрита были стандартизированы, основной вклад в текущие свойства крови при высоких напряжениях сдвига принадлежал деформируемости эритроцитов, а при низких – их агрегируемости. Обработка красных клеток крови йодацетамидом привела к самому существенному снижению их деформируемости (в сравнении с другими препаратами) и достоверному росту степени агрегации, что в конечном итоге и обусловило выявленные неблагоприятные изменения макрореологических показателей крови [8].

Несмотря на то, что влияние дезоксиглюкозы на энергетический баланс эритроцитов было самым значительным (внутриклеточное содержание АТФ снизилось на 74 %,  $p < 0,001$ ), влияние этого соединения на гемореологические показатели было не столь однозначным.

Гемореологический эффект от инкубации красных клеток крови в среде с присутствием дезоксиглюкозы был сходным с влиянием высокого содержания глюкозы в среде инкубации на макро- и микрореологические свойства крови. По данным S. Shin и соавт. (2008), инкубация эритроцитов в среде с высокой концентрацией глюкозы вызывает снижение их деформируемости и агрегируемости, приводящее к снижению вязкости крови при низких напряжениях сдвига (за счет положительного влияния на агрегируемость) и повышению вязкости крови при высоких напряжениях сдвига за счет ухудшения деформируемости [7].

Отмеченная нами тенденция к росту вязкости крови при низких напряжениях сдвига была обу-

словлена увеличением их агрегируемости после инкубации с дезоксиглюкозой (на 12,5 %,  $p < 0,05$ ), а снижение высокосдвиговой вязкости крови после обработки эритроцитов этим препаратом детерминировалось выраженной тенденцией к снижению их деформируемости.

Различный эффект двух ингибиторов гликолиза – йодацетамида и дезоксиглюкозы – на реологические свойства крови, по всей видимости, определяется разными механизмами их действия. Об этом свидетельствуют и опубликованные данные по их влиянию на насосную функцию сердца. Ингибирование креатинфосфатного пути транспорта энергии посредством йодацетамида сопровождалось значительно более глубоким угнетением насосной функции сердца, чем ингибирование аденилатного пути транспорта дезоксиглюкозы, останавливающей гликолиз на уровне глюкозо-6-фосфата [2].

Таким образом, в результате проведенного исследования было показано важное значение внутриэритроцитарного содержания АТФ в реализации кислородтранспортной функции крови на уровне микроциркуляции, в обеспечении способности клеток крови к объединению в агрегаты и к деформации под действием приложенного напряжения сдвига. Полученные данные демонстрируют, что способность эритроцитов к деформации в значительной степени зависит от внутриклеточного содержания АТФ: при снижении уровня АТФ деформируемость падает, при повышении – возрастает. Результаты исследования свидетельствуют о снижении деформируемости эритроцитов в условиях энергодефицита, что согласуется с данными ряда авторов [3], и подчеркивают ведущую роль энергообеспечения клетки в поддержании ее формы и способности проходить через узкие микрососуды.

#### Библиографический список

1. Дунаев, В. В. К механизму действия рибоксина [Текст] / В. В. Дунаев, В. С. Тишкин, Е. И. Евдокимов. – Фарм и Токс, 1989. – С. 56–58.
2. Капелько, В. И. Креатинфосфокиназный путь транспорта энергии в мышечных клетках [Текст] / В. И. Капелько // Соросовский образовательный журнал (Биология). – 2000. – Т. 6, № 11. – С. 8–12.
3. Маймистова, А. А. Роль протеинкиназ, фосфатаз и аденилатциклазной системы в изменении деформируемости эритроцитов [Текст] / А. А. Маймистова, А. В. Муравьев, С. В. Булаева // Материалы международной конференции «Гемореология и микроциркуляция (от функциональных механизмов в клинику)». – Ярославль, 2009. – С.54.
4. Муравьев, А. В. Методы изучения деформируемости эритроцитов в эксперименте и клинике [Текст] / А. В. Муравьев, А. А. Муравьев, С. В. Булаева, А. А. Маймистова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. – № 1. – С. 28–29.
5. Черницкий, Е. А., Воробей, А. В. Структура и функции эритроцитарных мембран [Текст] / Е. А. Черницкий, А. В. Воробей. – Минск : Наука и техника, 1981. – 214 с.
6. Элиот, В., Элиот, Д. Биохимия и молекулярная биология [Текст] / В. Элиот, Д. Элиот. – М. : МАИК «Наука/Интерпериодика», 2002. – 446 с.
7. Shin S., Ku Y-H., Suh J-S., Singh M. Rheological characteristics of erythrocytes incubated in glucose me-

dium // Clinical Hemorheology and Microcirculation. – 2008. – № 38. – P. 153-161.

8. Sprague R., Ellsworth M., Stephenson A., Kleinhenz M. Deformation-induced ATP release from red

blood cells requires CFTR activity // American Physiological Society. – 2010. – H1726-P1732.