

А. А. Муравьев, Е. А. Баталова, П. В. Михайлов, А. А. Ахапкина, А. М. Тельнова

Механизмы срочной и долговременной адаптации кровообращения: возможности моделирования в опытах in vitro

Работа Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение 14.В37.21.0214 и при поддержке РФФИ, грант № 12-04-00550-а.

Целью настоящего исследования было изучение роли гемореологических механизмов транспорта кислорода при долго-временной и срочной адаптации к мышечным нагрузкам. Работа проведена при моделировании разных вариантов макро- и микро-реологических изменений цельной крови и эритроцитов. Была показана роль изменения концентрации эритроцитов в реализации транспортного потенциала крови. Моделировали изменения гематокрита от 20 до 55 %, а также вязкости суспензионной среды с помощью декстрана разной концентрации. Эффекты срочной адаптации были исследованы при инкубации эритроцитов с катехоламинами, ацетилхолином и простагландинами группы E и F. Полученные в работе данные свидетельствовали о том, что макро- и микро-реологические свойства крови активно участвуют в механизмах срочной и долговременной адаптации к мышечным нагрузкам.

Ключевые слова: срочная и долговременная адаптация, механизмы, реология крови, эритроциты, гематокрит, вязкость плазмы, деформируемость, агрегация.

A. A. Muravyov, E. A. Batalova, P. V. Mikhailov, A. A. Akhapkina, A. M. Telnova

Mechanisms of Short- and Long-Term Adaptation of Circulation: Possibilities of Modeling in Vitro Experiments

The aim of this study was to investigate the role of hemorheological mechanisms of the oxygen transport under short- and long-term muscular adaptation. The research was completed under modeling of the different variants of macro- and microrheological alterations of the whole blood and erythrocytes. The role of red blood cell concentration change in blood oxygen transport efficiency was shown. For this purpose the changes of hematocrit (Hct) from 20 to 55% were simulated and plasma viscosity changes were designed using dextran solution with different concentrations. The short-term adaptation effects were studied under cell incubation with catecholamines, acetylcholine and prostaglandins of groups E and F. Taken together obtained data clearly showed that macro- and microrheological blood properties are involved in the mechanisms of short- and long-term muscular adaptation.

Keywords: short- and long-term adaptation, mechanisms, blood rheology, erythrocytes, hematocrit, plasma viscosity, deformability, aggregation.

Введение

Адаптация кровообращения при мышечных нагрузках включает приспособительные изменения всех звеньев системы кровообращения. Эти изменения, в первую очередь, направлены на обеспечения эффективного транспорта кислорода в тканевые микрорайоны. Для решения этой стратегической задачи имеет важное значение текучесть крови и ее транспортные возможности. Эффективность транспорта кислорода кровью в значительной степени зависит от концентрации эритроцитов (гематокрит) [4, 16]. С другой стороны, повышение гематокрита влечет за собой выраженное увеличение вязкости крови, и, следовательно, нарастание сопротивления кровотоку и падение тканевой перфузии [10].

Для долговременной адаптации к мышечным нагрузкам характерно в состоянии покоя снижение вязкости цельной крови за счет меньшей вязкости плазмы и гематокрита [2, 5]. Однако для эффективной перфузии тканей при мышечной нагрузке (срочная адаптация) необходима оптимальная вязкость плазмы и концентрации эритроцитов. Это связано с тем, что указанные реологические характеристики обеспечивают необходимое напряжение сдвига на эндотелии сосудов, которое, в свою очередь, запускает механизмы продукции оксида азота (NO) для последующей вазодилатации артериол. Последнее не только само по себе повышает тканевую перфузию, но и стимулирует открытие резервных капилляров в тканевом регионе [13, 15]. Следо-

вательно, необходима информация об оптимальных величинах основных реологических характеристик, при которых транспортные возможности крови реализуются наиболее эффективно.

С учетом вышесказанного целью настоящего исследования было изучение гемореологических механизмов срочной и долговременной адаптации кровообращения с применением моделирования в опытах *in vitro*.

Материал и методы исследования

Кровь для приготовления их суспензий в изотоническом растворе и аутологичной плазме (гематокрит 40 %), получили венопункцией (здоровые доноры, мужчины, n=24; возраст – 18–24 года). Готовились суспензии эритроцитов в изотоническом растворе хлорида натрия (NaCl) с Hct от 20 до 55 % с «шагом» в 5 %.

Для анализа роли вязкости плазмы в текучести крови были изучены реологические показатели суспензии эритроцитов (Hct=40 %) с заменой плазмы на стандартные растворы на основе высокомолекулярного декстрана 70. В исследовании были использованы три концентрации декстрана 10 г/л, 20 г/л, 30 г/л со следующей кажущейся вязкостью 1,360, 1,660, 2,057 мПа·с соответственно.

Для изучения влияния на микрореологические свойства эритроцитов гормонов, простагландинов проводили *in vitro* исследование. Для этого эритроциты инкубировали 15 мин. при 37⁰С. Исследование выполнено на образцах крови практически здоровых людей мужского пола в возрасте от 18 до 45 лет. Все суспензии эритроцитов готовили с показателем гематокрита (Hct), равным 40 %. В качестве контроля исследовали эритроциты, инкубированные только в изотоническом растворе (NaCl).

Вязкость цельной крови и плазмы регистрировали с помощью капиллярного вискозиметра при 6 скоростях сдвига. Все измерения выполнены при комнатной температуре. Степень агрега-

ции эритроцитов определяли агрегометром (Munne M1, Германия), который дает возможность получить 4 индекса агрегации. Кроме того, процесс агрегации контролировали методом прямой микроскопии с компьютерной регистрацией и анализом изображения.

Деформируемость эритроцитов исследовали двумя методами:

1) регистрировали вязкость суспензий эритроцитов с гематокритом 40 % (Hct). Вязкость суспензионной среды (изотонический раствор хлорида натрия, с 5,0 мМ глюкозы) была постоянной и составила 1,10 мПа·с. Коэффициент вариации при измерении вязкости был около 1,0 %;

2) определяли индекс удлинения эритроцитов (ИУЭ) [5] в проточной микрокамере. На основе измерения длины (L) и ширины (W) вытянутых потоком клеток рассчитывали индекс деформируемости (ИД) как $ИД = (L-W)/(L+W)$ автоматически, на основе специально написанной компьютерной программы.

Гематокрит определяли на гематокритной центрифуге (Elmi CM-70).

Реологическую эффективность транспорта кислорода (Hct/η) оценивали отношением гематокрита к вязкости крови [10, 16].

Статистическую обработку цифрового материала проводили, используя табличный редактор Microsoft Excel. Достоверность различий между сравниваемыми средними величинами принимали при уровне значимости 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Для уточнения влияния гематокрита на текучесть крови и ее транспортный потенциал были поставлены модельные опыты с суспензиями эритроцитов в физиологическом растворе с разным уровнем гематокрита в интервале от 20 до 55 % с шагом в 5 % (табл. 1).

Таблица 1

Распределение вязкости суспензий при высоком и низком напряжениях сдвига в зависимости от величины гематокрита (M±m; n=16)

Hct, %	BC1, мПа·с	BC2, мПа·с	Hct/η
20%	1,9±0,03	1,8 ±0,05	10,56±0,22
25%	2,19±0,03**	2,14±0,07**	11,45±0,2*
30%	2,67±0,09**	2,64±0,13**	11,35±0,38

35%	3,05±0,09**	3,32±0,17**	11,57±0,38*
40%	3,8±0,06**	4,21±0,29**	10,53±0,19
45%	4,39±0,08**	5,30±0,31**	10,27±0,2
50%	4,86±0,11**	6,92±0,33**	10,29±0,23
55%	5,39±0,22**	8,1±0,35**	10,32±0,48

Обозначения: ВС1 – вязкость суспензии эритроцитов в физиологическом растворе при высоком напряжении сдвига; ВС2 – вязкость суспензии эритроцитов в физиологическом растворе при низком напряжении сдвига; Нсг – гематокрит; * – различия достоверны при $p < 0,05$; ** – различия достоверны при $p < 0,01$.

Как видно из данных, представленных в табл. 2, при гематокрите 20 % вязкость суспензии эритроцитов при высоком напряжении сдвига составила $1,9 \pm 0,03$ мПа·с. С увеличением гематокрита с 20 % до 25 % вязкость суспензии увеличилась на 13 % ($p < 0,01$). При дальнейшем повышении гематокрита с шагом в 5 % наблюдалось последовательное возрастание вязкости суспензии. При гематокрите 55 % эта разница

между вязкостью суспензии с гематокритом 20 % достигла, в среднем – 68 % ($p < 0,01$).

Оценка эффективности транспорта кислорода в исследуемых суспензиях эритроцитов с заданным Нсг показала, что наибольшей величины показатель Нсг/η достигал при гематокрите 25–35 %. Пиковая величина индекса зарегистрирована при гематокрите 35 %, а наименьшие – соответствовали суспензиям с гематокритом более 45 % и менее 25 % (рис. 1).

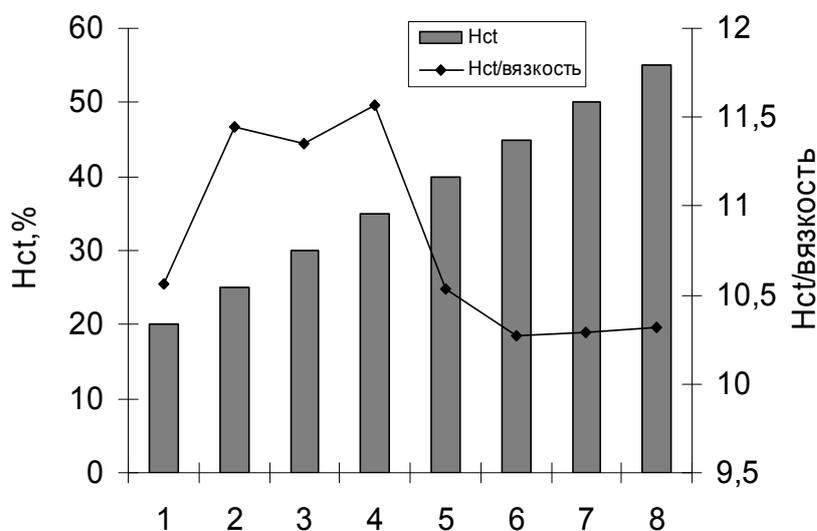


Рис. 1. Распределение значений показателя эффективности транспорта кислорода (линия с маркерами) в суспензии с учетом величины гематокрита (столбики)

Для уточнения роли суспензионной среды были проведены исследования со взвешями эритроцитов с гематокритом 40 % в декстране-70 при разной концентрации последнего. Концентрации декстрана-70 были выбраны таким образом, чтобы их кажущаяся вязкость была расположена в диапазоне значений ниже и выше этого показателя, характерного для вязкости плазмы крови здоровых лиц (вязкость плазмы от 1,70 до 1,90 мПа·с).

Как видно и данных, представленных в табл. 2, увеличение вязкости среды приводило к возрастанию вязкости суспензии. При увеличении вязкости среды на 18 % (декстране-70, концентрация 2 %) прирост вязкости суспензии эритроцитов составил 13,2 % ($p < 0,01$). При низком напряжении сдвига прирост составил соответственно 9,5 % и 7,0 %.

Таблица 2

Показатели реологического профиля суспензий эритроцитов с Hct=40 % в суспензионных средах разной вязкости (M±m; n=16)

Показатели	Изотонический раствор	Декстран-70 (1 %)	Декстран-70 (2 %)	Декстран-70 (3 %)
Vсус1	4,06±0,08	4,89±0,13**	5,63±0,17**	6,48±0,21**
Vсус2	4,30±0,14	6,18±0,83*	6,83±0,70**	7,35±0,29**
Tk	0,418±0,004	0,4±0,007*	0,386±0,007**	0,366±0,008**
ИУЭ	0,214±0,005	0,227±0,005	0,235±0,005*	0,238±0,005*
Hct/η	9,87±0,19	8,23±0,23**	7,16±0,2**	6,23±0,19**

Обозначения: * – различия достоверны при $p < 0,05$; ** – различия достоверны при $p < 0,01$; Vсус1 – вязкость суспензии эритроцитов в декстране-70 при высоком напряжении сдвига; Vсус2 – вязкость суспензии эритроцитов в декстране-70 при низком напряжении сдвига; Tk – индекс ригидности эритроцитов; ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов; Hct/η – отношение гематокрита к вязкости крови как индекс эффективности транспорта кислорода.

Оценка транспортного потенциала исследуемых суспензий эритроцитов с Hct=40 % показала, что наибольшее значение Hct/η = 8,23 имели суспензии эритроцитов в 1 % растворе декстрана-70 с вязкостью 4,8 мПа·с. Наименьшее значение транспортного потенциала соответствовало самой высокой вязкости в 6,4 мПа·с.

Корреляционный анализ взаимоотношений «транспортный потенциал» – «вязкость среды» обнаружил наличие отрицательной корреляции с коэффициентом -0,92 ($p < 0,01$).

Гормональное управление метаболизмом включает как регуляцию процессов ассимиляции и накопления вещества и энергии, так и их расход. Процессы использования энергии в клетках регулируют катехоламины [8]. Поскольку на мембранах зрелых эритроцитов представлены оба типа адренорецепторов [12, 14, 17], то вполне вероятно ожидать изменения микрореологических свойств

этих клеток под действием катехоламинов. При этом известно, что адреналин более эффективно связывается с β-адренергическими рецепторами, тогда как норадреналин – с α-адренергическими структурами клеточных мембран [6, 7]. Действительно, при инкубации эритроцитов с адреналином (табл. 3) в концентрации 0,10 μM наблюдали умеренное увеличение деформируемости. На это указывал прирост индекса удлинения на 6 %. Умеренное позитивное влияние адреналина на текучесть эритроцитов подтверждалось и снижением вязкости суспензии с 3,78±0,012 мПа·с до 3,42±0,010 мПа·с после инкубации с препаратом. Разница составила 10 % и была статистически достоверной ($p < 0,01$). Под влиянием адреналина значительно возросла и агрегация эритроцитов. Увеличение показателя агрегации относительно контроля составило 58 % ($p < 0,05$).

Таблица 3

Изменения микрореологических показателей эритроцитов после инкубации с адреналином (M±m, n=18)

Показатели	Контроль (без препарата)	Адреналин 0,10 μM
ηс, мПа·с	3,78±0,012	3,42±0,010**
ИУЭ, отн. ед.	0,201±0,004	0,212±0,005
ПА, отн. ед.	0,097±0,018	0,153±0,02*

Показатели	Контроль (без препарата)	Адреналин 0,10 мМ
Ч/А	5,02±0,12	6,31±0,31**

Обозначения: η_c – вязкость суспензии (Hct=40%); ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов; ПА – показатель агрегации эритроцитов; Ч/А – число эритроцитов в одном агрегате; * – различия достоверны при $p < 0,05$; ** – различия достоверны при $p < 0,01$.

Сходный эффект наблюдали и при инкубации эритроцитов с норадреналином (концентрация 0,10 мМ). Так, показатель агрегации существенно увеличился относительно контроля, разница составила 87 % ($p < 0,01$). Вязкость суспензии эритроцитов существенно не изменилась. Однако регистрация степени удлинения эритроцитов в микрокамере показала прирост деформируемости на 7 % относительно контроля.

Изменение микрореологических свойств эритроцитов под влиянием агониста и антагонистов мускариновых рецепторов

Как видно из данных табл. 4, при инкубации суспензий эритроцитов как с агонистом М-рецепторов – ацетилхолином, так и с их антагонистами – пирензепином и галламином, во всех опытах относительно контроля наблюдалось снижение агрегации эритроцитов и увеличение их деформируемости.

Таблица 4

Изменение показателей деформируемости и текучести эритроцитов под влиянием инкубации с агонистом и антагонистами мускариновых рецепторов ($M \pm m$; $n=16$)

Показатели	Контроль	Ацетилхолин 10 мМ	Пирензепин 10 мМ	Галламин 10 мМ
η_c , мПа·с	3,1±0,044	2,96±0,05*	2,67±0,204*	2,72±0,185*
ИУЭ, отн. ед.	0,248±0,005	0,266±0,006*	0,280±0,005**	0,282±0,004**
ПА, отн. ед.	0,153±0,022	0,114±0,016	0,094±0,01*	0,109±0,019

Обозначения те же, что в табл. 3; * – различия достоверны при $p < 0,05$; ** – различия достоверны при $p < 0,01$.

Инкубация эритроцитов с ацетилхолином на 26 % снизила показатель агрегации по сравнению с контролем и на 4 % повысила индекс удлинения эритроцитов, на сходную величину – 5 % ($p < 0,05$) понизилась и вязкость суспензии эритроцитов.

При инкубации эритроцитов с антагонистами М-рецепторов наблюдали еще более выраженное снижение агрегации эритроцитов и увеличение деформируемости эритроцитов. Инкубация с селективным ингибитором М₁-рецепторов пирензепином привела к значительному снижению агрегации – на 39 % ($p < 0,05$) и увеличению индекса удлинения эритроцитов – на 13 % ($p < 0,01$). Действие галламина привело к существенному снижению агрегации на 29 % и повышению деформируемости эритроцитов – индекс удлинения эритроцитов вырос относительно контроля на 14 % ($p < 0,01$), на сходную величину понизилась и вязкость суспензии (12 %, $p < 0,05$).

Изменение микрореологических свойств эритроцитов под влиянием простагландинов

Известный стимулятор аденилатциклазы простагландин Е₁ вызывал значительное снижение агрегации эритроцитов (табл. 6), на это указывало уменьшение показателя агрегации относительно контроля на 47 %. Поскольку размеры агрегатов при этом практически не изменялись, то интегральный индекс агрегации снижался под влиянием препарата на такую же величину, как ПА – 46 % ($p < 0,05$). Деформируемость эритроцитов увеличилась, о чем свидетельствует уменьшение вязкости суспензии на 17 % ($p < 0,01$) и увеличение индекса удлинения эритроцитов на сходную величину – 18 % ($p < 0,01$).

Представитель другого класса простагландинов ПГФ_{2 α} , напротив, существенно стимулировал прирост агрегации эритроцитов.

Таблица 5

Изменение микрореологических показателей эритроцитов под влиянием простагландинов E₁ и E₂ (M±m, n=16)

Показатели	Контроль (без препарата)	Простагландин E ₁ 0,01μM	Простагландин Φ _{2α} 0,01μM
η _c , мПа·с	3,66±0,18	3,04±0,24*	3,62±0,28
ИУЭ, отн. ед.	0,204±0,005	0,241±0,007**	0,192±0,006
ПА, отн. ед.	0,102±0,014	0,054±0,046	0,208±0,038*

Обозначения те же, что в табл. 3; * – различия достоверны при p<0,05; ** – различия достоверны при p<0,01.

При этом показатель агрегации увеличился на 104 % (p<0,05), а размер агрегатов стал на 15,6 % больше, чем в контроле. В итоге, интегральный индекс агрегации оказался выше на 136 % (p<0,01) по сравнению с его величиной, полученной на клетках, инкубированных без препарата. В то же время ПГΦ_{2α} в меньшей степени повлиял на деформируемость эритроцитов. Так, вязкость суспензии эритроцитов практически не изменилась, а индекс удлинения эритроцитов возрос всего на 5,8 % относительно контроля.

Заключение

Высокая концентрация эритроцитов может быть основой долговременной адаптации организма к мышечным нагрузкам [1, 4]. Однако увеличение вязкости крови при критических величинах гематокрита (Hct>46 %) может ограничивать эффективность этого механизма [9]. Снижение вязкости плазмы ведет к приросту текучести цельной крови и ее транспортным возможностям для кислорода. Вместе с тем существенное уменьшение вязкости плазмы может ухудшить капиллярную перфузию в тканях. Это связано с уменьшением стимулирующего влияния опти-

мальной вязкости крови на клетки эндотелия и продукции ими NO в этих условиях [15]. Эритроциты при длительной адаптации к мышечным нагрузкам могут находиться в условиях повышенной продукции ацетилхолина и некоторого увеличения его концентрации в крови [3, 11]. Следовательно, инкубация эритроцитов с ацетилхолином или его агонистами может моделировать этот механизм адаптации микрореологических свойств эритроцитов к длительным мышечным нагрузкам. С другой стороны, для быстрой мобилизации кровотока при срочной адаптации должны быть активированы сигнальные молекулы симпатoadреналовой системы и паракринная регуляция. Моделирование описанных выше эффектов с помощью инкубации эритроцитов с адреналином, норадреналином и простагландинами подтвердило это предположение.

Таким образом, полученные в работе данные свидетельствуют о том, что макро- и микрореологические свойства крови активно участвуют в механизмах срочной и долговременной адаптации к мышечным нагрузкам.

Библиографический список

1. Карпман, В. Л., Абрикосова, М. А. Некоторые общие закономерности сердечно-сосудистой системы человека к физическим нагрузкам [Текст] / В. Л. Карпман, М. А. Абрикосова // Успехи физиол. наук. – 1979. – Т. 10, № 2. – С. 97–121.
2. Левин, В. Н., Муравьев, А. В. Реологические особенности крови при долговременной и срочной адаптации к мышечным нагрузкам [Текст] / В. Н. Левин, А. В. Муравьев // Бюл. exper. биол. и медицины. – 1985. – Т. 99, № 2. – С. 142–144.
3. Маймистова, А. А. Изменение агрегации и деформируемости эритроцитов при активации внутриклеточных сигнальных путей [Текст] / А. А. Маймистова [и др.] // Ярославский педагогический вестник. – 2010. – Т. 3, № 3. – С. 71–74.
4. Михайлов, П. В. Микроциркуляция и реологические свойства крови у лиц с разным уровнем аэробной работоспособности [Текст] / П. В. Михайлов [и др.] // Ярославский педагогический вестник. – 2010. – Т. 3, № 3. – С. 66–71.
5. Муравьев, А. В. Чепоров, С. В. Гемореология (экспериментальные и клинические аспекты реологии крови) [Текст] : монография / А. В. Муравьев, С. В. Чепоров. – Ярославль : Изд-во ЯГПУ, 2009. – 178 с.
6. Ткачук, В. А. Гормональная регуляция транспорта Ca²⁺ в клетках крови и сосудов [Текст] / В. А. Ткачук // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 1998. – Т. 84, № 10. – С. 1006–1018.

7. Теппермен, Дж., Теппермен, Х. Физиология обмена веществ и эндокринная система [Текст] / Дж. Теппермен, Х. Теппермен ; под ред А. И. Ажипы ; пер. с англ. В. И. Кандрора. – М. : Мир, 1989. – 656 с.
8. Фаллер, Дж., Шилдс, Д. Молекулярная биология клетки [Текст] / Дж. Фаллер, Д. Шилдс ; под ред. И. Б. Збарского ; пер. с англ. А. Анваера, Ю. Бородинной, К. Кашкина. – М. : «БИНОМ», 2003. – 272 с.
9. Brun J. F., Khaled S., Raynaud E., Bouix D., Micallef J. P. and Orsetti A. The triphasic effects of exercise on blood rheology: which relevans to physiology and pathophysiology? // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. – 1998. – Vol. 18. – P. 104–109.
10. Chien S., Lung L. Physicochemical basis and clinical implications of red cell aggregation // *Clin. Hemorheol.* – 1987. – Vol. 7. – P. 71–91.
11. Hilario S., Saldanha C., Martin-a-Silva J. The effect of adrenaline upon human erythrocyte properties. Sex-related differences? // *Biorheology*. – 1999. – Vol. 36, N 1–2. – P. 124.
12. Horga J. F., Gisbert J., De Agustin J. C. A beta-2-adrenergic receptor activates adenilate cyclase in human erythrocyte membranes at physiological calcium plasma concentrations // *Blood Cells. Molecules and Diseases*. – 2000. – Vol. 26. – P. 223–228.
13. Martini J., Carpentier B., Chávez Negrete A., Cabrales P., Tsai A. G., Intaglietta M. Beneficial effects due to increasing blood and plasma viscosity // *Clin. Hemorheol. and Microcirc.* – 2006. – Vol. 35, N 1–2. – P. 51–57.
14. Sager G., Jacobsen S. Effect of plasma on human erythrocyte beta-adrenergic receptors // *Biochem. Pharmacol.* – 1985. – Vol. 34. – P. 3767–3771.
15. Salazar Vázquez B.Y., Martini J., Chávez Negrete A., Cabrales P., Tsai A.G., Intaglietta M. Microvascular benefits of increasing plasma viscosity and maintaining blood viscosity: counterintuitive experimental findings. // *Biorheology*. – 2009. – Vol. 46, N 3. – P. 167–179.
16. Stoltz J. F., Donner M., Muller S., Larcen A. Hemorheology in clinical practice. Introduction to the notion of hemorheologic profile // *J. Mal Vasc.* – 1991. – Vol. 6. – P. 261–270.
17. Sundquist J., Susan D., Bias J. The α 1-adrenergic receptor in human erythrocyte membranes mediates interaction in vitro of epinephrine and thyroid hormone at the membrane Ca²⁺-ATPase // *Cellular Signalling*. – 1992. – Vol. 4. – P. 795–799.