

А. В. Муравьев, С. В. Булаева, А. В. Замышляев

Механизмы изменения реологических свойств крови у лиц с патологией церебрального сосудистого русла под влиянием пентоксифиллина

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ №12-04-00550-а и в рамках ведомственной целевой программы Минобрнауки, № 01201276739

Имеются многочисленные свидетельства того, что вязкость цельной крови и плазмы повышены при сосудистых расстройствах. Это снижение текучести крови и ее транспортных возможностей, как правило, обусловлено выраженной агрегацией эритроцитов и существенно повышенной ригидностью клеток. В данном исследовании реологические параметры крови были исследованы у лиц с нарушением сосудистого русла головного мозга (церебральный атеросклероз) до и после четырехнедельного курса применения реокорректора – пентоксифиллина (400 мг x 3 раза в день). Параллельно исследовали прямой микрореологический эффект этого препарата. Было показано, что существенный вклад в снижение вязкости цельной крови после периода терапии, наряду с вязкостью плазмы, оказывает более высокая деформируемость эритроцитов и их сниженная агрегируемость. В исследовании *in vitro* было продемонстрировано, что при инкубации эритроцитов с ингибиторами активности фосфодиэстераз, существенно и благоприятно изменяются микрореологические свойства эритроцитов.

Ключевые слова: вязкость крови, деформируемость эритроцитов, агрегация, пентоксифиллин, фосфодиэстеразы, церебральный атеросклероз.

A. V. Muravyov, S. V. Bulaeva, A. V. Zamyshlayev

Rheological properties change of patients with cerebrovascular disease after pentoxifylline therapy

There are many evidences that the whole blood and plasma viscosity are increased under vascular disorders. The blood viscosity rise and the blood transport capacity reduction under vascular diseases may be due to the red blood cell (RBC) aggregation increase and their deformability lowering. To correct RBC microreological disturbances drugs with well-known rheological efficiency can be used. In the present study the rheological parameters were investigated in patients with the cerebrovascular disease after 4 weeks of the pentoxifylline therapy together with *in vitro* direct pentoxifylline (0.02 mg/ml) effect on RBC microreology assessment. There were found similar rheological changes of RBC deformability and RBCA as after therapy as *in vitro* pentoxifylline treatment of cells. It was shown that the drugs can inhibit the cellular phosphodiesterase activity resulted in RBCD rise and their aggregation lowering. Therefore, red blood cell microreology control mechanisms may be associated with the phosphodiesterase activity inhibition.

Keywords: blood viscosity, cerebrovascular disease, red blood cells deformability and aggregation, phosphodiesterase, pentoxifylline.

Введение

В последние годы получены убедительные данные об участии повышенной вязкости крови в процессе системных нарушений микроциркуляции у лиц с цереброваскулярными заболеваниями [1, 3, 14]. Известно, что прирост вязкости цельной крови и снижение ее транспортного потенциала, наблюдаемые при сосудистых расстройствах, происходят из-за микрореологических нарушений [2–6]. Применяемые при лечении заболеваний лекарственные препараты могут оказывать прямое влияние на реологические свойства крови и в первую очередь на микрореологию эритроцитов [7, 8, 9]. Однако при оценке только курсового применения лекарственного препарата трудно с уверенностью сказать о его прямом воздействии на деформацию и агрегацию эритроцитов и, следовательно, на текучесть цельной крови [12, 13].

Для этого протокол исследования необходимо дополнить оценкой прямого влияния используемого препарата для коррекции реологических нарушений у больных в опытах *in vitro* [12]. Таким образом, целью данной работы было проведение анализа изменений макро- и микрореологических показателей крови лиц с церебральным атеросклерозом (ЦА) в условиях лекарственной терапии тренталом (пентоксифиллином) и *in vitro* исследование изменений агрегации и деформируемости эритроцитов под действием этого лекарственного препарата.

Материал и методы исследования

Дизайн исследования

Изучение реологических свойств крови лиц с ЦА проводили в несколько этапов. На **первом этапе** регистрировали макро- и микрореологические параметры крови у пациентов с верифици-

рованным диагнозом церебральный атеросклероз (возраст – от 50 до 68, $n=31$) до и после курса лечения больных с включением в схему пентоксифиллина (Трентал, Sanofi-Aventis, 1200 мг/день, в течение четырех недель).

На втором этапе для проведения исследования прямых эффектов трентала на микрореологию эритроцитов лиц с церебральным атеросклерозом клетки инкубировали с данным препаратом (0,02 мг/мл) в течение 15 мин при 37 °С. В качестве контроля в этой серии исследовали суспензии эритроцитов в изотоническом растворе без добавления препарата.

Методы исследования

В комплекс измерений *макрореологических* свойств крови включали регистрацию вязкости цельной крови при высоких (BK_1) и при низких скоростях сдвига (BK_2), плазмы (ВП), гематокрита (Hct). Измерение вязкости проводили на полуавтоматическом капиллярном вискозиметре при напряжениях сдвига от 0,196 Н·м⁻² до 1,96 Н·м⁻² при комнатной температуре (20,0±1,0 °С). Гематокрит цельной крови и приготовленных суспензий эритроцитов определяли с помощью специальной центрифуги СМ-70 (Латвия). Для исследования *микрореологических* свойств эритроцитов из цельной крови клетки получали центрифугированием (10 мин, при 2750 об/мин). После этого эритроциты отмывали три раза в изотоническом растворе хлорида натрия (NaCl) с добавлением 5 мМ глюкозы. Затем суспензию отмывтых эритроцитов делили на две аликвоты и после периода инкубации, как описано выше, проводили регистрацию агрегации и деформируемости клеток.

Деформируемость эритроцитов (ДЭ) исследовали двумя методами:

1) Регистрировали вязкость суспензий эритроцитов [11] в изотоническом растворе NaCl с Hct=40 % на капиллярном вискозиметре при напряжении сдвига 1,96 Нм⁻² (BC). Вязкость суспензионной среды была постоянной и составила 1,10 мПа·с. Коэффициент вариации при измерении вязкости не превышал 1,0 %.

2) Определяли индекс удлинения эритроцитов (ИУЭ), используя метод проточной микрокамеры. Для этого микрокамеру заполняли суспензией эритроцитов (0,5 %) в изотоническом растворе NaCl, содержащем 5,0 мМ глюкозы и 0,1 % альбумина, и помещали на предметный столик микроскопа. Затем в камеру подавали давление, которое создавало в ней величину напряжения сдвига ($\tau = 0,78$ Нм⁻²), что приводило к деформационному вытягиванию клеток по направлению потока.

Изображение вытянутых эритроцитов, прикрепленных одной точкой к поверхности микроканала, с микроскопа передавалось через USB порт в компьютер, используя цифровой окуляр (модель DCM 500). После «захвата» и записи изображения его обрабатывали с помощью компьютерной программы, где определяли длину и ширину деформированных клеток (около 100) и рассчитывали индекс удлинения как показатель деформации:

$$ИУЭ = (L-W)/(L+W),$$

где L – длина деформированной клетки, W – ее ширина.

Агрегацию эритроцитов регистрировали агрегометром (Mylene M1) и методом оптической микроскопии с последующим компьютерным анализом изображения.

Регистрация биохимических показателей крови

Концентрацию гемоглобина крови (Hb; гемоглобинцианидным методом), общего белка плазмы (биуретовым методом), триглицеридов (энзиматическим колориметрическим методом), глюкозы (глюкозооксидазным методом), альбумина (по реакции с бромкрезоловым зеленым) в плазме определяли на биохимическом фотометре Микролаб-540, используя реагенты фирм «Витал-Европа» и «Агат».

Статистическую обработку полученных цифровых материалов проводили, используя табличный редактор *Microsoft Excel* и программу «*Statistica*» (версия 6.0).

Результаты исследования и их обсуждение

Применение в течение четырех недель трентала в терапии больных церебральным атеросклерозом сопровождалось неоднозначными изменениями гемореологических параметров. Было найдено, что вязкость цельной крови при высоких напряжениях сдвига у 45 % пациентов (рис. 1) снижалась в среднем на 12 % ($p<0,05$), тогда как у 48 % наблюдалось ее достоверное повышение на 17 %. При низких напряжениях сдвига вязкость крови в результате лечения снижалась у 68 % лиц (рис. 2) с ЦА на 34 % ($p<0,05$), а у 26 % выявлен ее статистически значимый прирост на сходную величину.

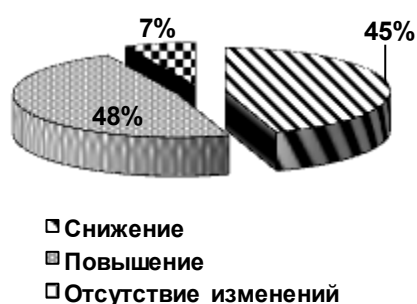


Рис. 1. Изменение вязкости цельной крови у лиц с церебральным атеросклерозом при высоких напряжениях сдвига под влиянием лечения тренталом (1200 мг/сутки)

В основе более выраженного позитивного изменения в результате лечения низкосдвиговой вязкости крови могло лежать достоверное повышение на 7 % деформируемости эритроцитов, о чем свидетельствует наличие корреляции ($r=0,430$; $p<0,05$), выявленной между $ВК_2$ и $ВС$.

Снижение вязкости плазмы на 16 % ($p<0,05$), которое наблюдалось у 42 % пациентов под влиянием лекарственной терапии, также могло вносить определенный вклад в уменьшение вязкости цельной крови, как при высоких, так и при низких напряжениях сдвига.

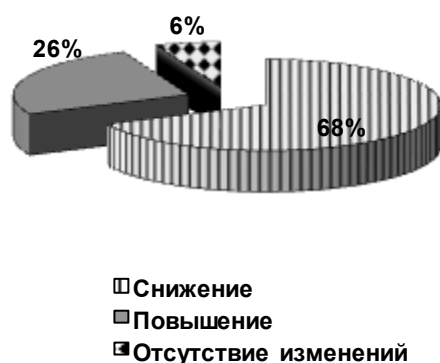


Рис. 2. Изменение вязкости цельной крови у лиц с церебральным атеросклерозом при низких напряжениях сдвига под влиянием лечения тренталом (1200 мг/сутки)

Косвенным свидетельством этого могут выступать выявленные нами корреляционные взаимосвязи между $ВК_1$ и $ВП$, а также $ВК_2$ и $ВП$. В результате лечения было найдено статистически значимое снижение уровня холестерина в плазме на 12 % (рис.3). Также наблюдалась тенденция к снижению концентрации в плазме триглицеридов и глюкозы.

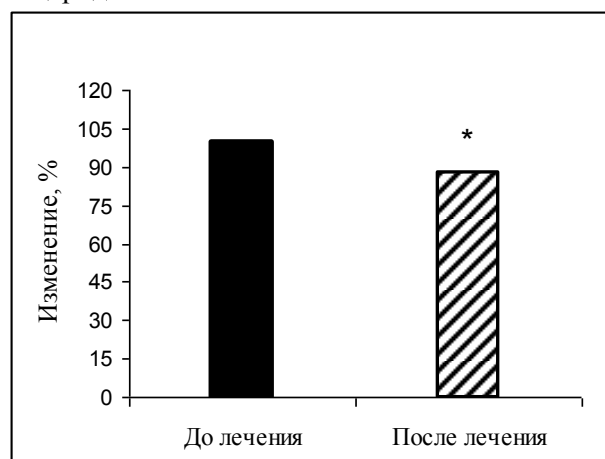


Рис. 3. Изменение концентрации холестерина в плазме у лиц с церебральным атеросклерозом после четырехнедельной коррекции пентоксифиллином (1200 мг/сутки)

Показатель гемоглобина в крови, а также уровень общего белка и альбуминов в плазме после у лиц с ЦА были сопоставимы с теми, что наблюдались до лечения. Что касается агрегации эритроцитов, то после курса лечения тренталом у 52 % пациентов наблюдалось ее достоверное снижение в среднем на 45 %. Вместе с тем, более чем у трети лиц, наоборот – ее заметное увеличение агрегации ($p<0,05$). Важно отметить тот факт, что снижение агрегации после лечения, как правило, наблюдалось у пациентов с исходно высокой агрегацией, в то время как у лиц с изначально низкими величинами агрегации в результате четырехнедельной терапии тренталом агрегация существенно возрастала. Этим можно объяснять столь разнонаправленные изменения агрегации, наблюдаемые после курса лечения больных тренталом.

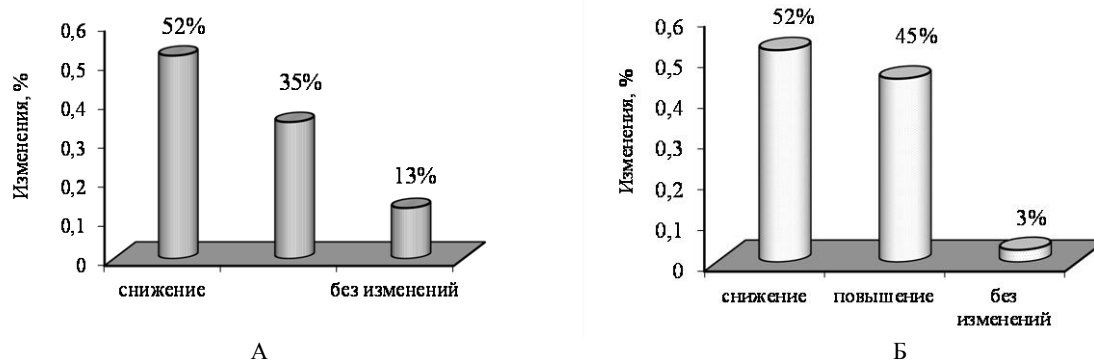


Рис. 4. Изменение интегрального индекса агрегации эритроцитов (в процентах) лиц с церебральным атеросклерозом. А – после лечения; Б – после инкубации клеток с пентоксифиллином (0,02 мг/мл)

Важно иметь в виду, что при инкубации с пентоксифиллином эритроцитов пациентов с исходно высокой агрегацией, было найдено ее достоверное снижение на сходную, как после лечения, величину, около 50 % ($p < 0,05$). Тогда как у лиц с исходно низкой агрегацией этот препарат *in vitro*, также как четырех недельная терапия им, существенно (на 90 %; $p < 0,05$) повысил агрегацию эритроцитов.

Изменения деформируемости эритроцитов лиц с ЦА после инкубации эритроцитов с пентоксифиллином *in vitro* также во многом совпа-

дали с изменениями этой микрореологической характеристики у данных пациентов, которые наблюдались в результате лекарственной терапии. Так после инкубации эритроцитов с пентоксифиллином был найден статистически значимый прирост ИУЭ, который составил в среднем 8 %. Снижение вязкости суспензии эритроцитов под влиянием пентоксифиллина наблюдалось у 52 % пациентов, а после лечения этим препаратом – у 55 % (рис. 5).

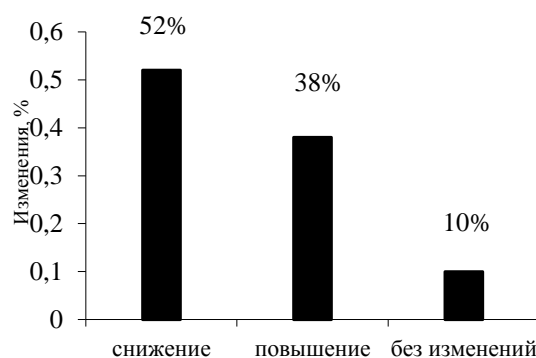


Рис. 5. Изменение вязкости суспензии эритроцитов пациентов с церебральным атеросклерозом при прямом воздействии на них трентала (*in vitro*, 0,02 мг/мл)

В качестве внутриклеточной молекулярной мишени для пентоксифиллина вероятно служат ферменты фосфодиэстеразы [10, 11]. При их ингибировании повышается уровень циклического АМФ в клетках, запуская каскад внутриклеточных реакций, который вероятно приводит к повышению деформируемости эритроцитов [12]. Позитивные изменения деформируемости

эритроцитов, полученные в результате действия пентоксифиллина могли быть связаны именно с ингибированием данных ферментов, поскольку в предварительных опытах при использовании селективных ингибиторов фосфодиэстераз (ФДЭ) наблюдались сходные изменения пластичности клеток. Так в частности ингибитор фосфодиэстеразы 1 в эритроцитах – винпоцетин, способство-

вал достоверному приросту деформируемости эритроцитов на 8 %, тогда как ингибитор ФДЭ 4 – ролипрам повышал ДЭ в среднем на 15 % ($p < 0,05$). При применении классического ингибитора активности ФДЭ – изобутилметилксантина (ИБМК) отмечалось достоверное повышение пластичности эритроцитов на 19 % ($p < 0,01$).

Таким образом, в результате исследования получены неоднозначные изменения вязкости цельной крови и плазмы у лиц с церебральным атеросклерозом после четырехнедельной терапии пентоксифиллином. Изменения микрореологических свойств эритроцитов у лиц с церебральным атеросклерозом в результате лечения пентоксифиллином в подавляющем большинстве случаев совпадали с изменениями микрореологии клеток у данных пациентов, полученными после инкубации эритроцитов с этим препаратом *in vitro*.

Библиографический список

1. Маймистова, А. А. Сравнительный анализ изменений гемореологического профиля мужчин и женщин с нарушениями церебрального кровообращения [Текст] / А. А. Маймистова, А. В. Муравьев, С. В. Булаева, Е. Л. Волкова // Ярославский педагогический вестник. Том III. (Физико-математические и естественные науки). – 2010. – № 4. – С. 67–72.
2. Муравьев, А. В. Изменение реологического профиля у больных диабетом 1 и 2 типа при лечении Тренталом [Текст] / А. В. Муравьев, А. В. Замышляев, Ф. А. Чучканов, И. А. Тихомирова, С. В. Булаева, А. А. Маймистова // Клиническая фармакология и тер. – 2009. – 18. – №2. – С. 87–92.
3. Ройтман, Е. В., Гемореологические эффекты различных плазмозамещающих препаратов [Текст] / Е. В. Ройтман, И. И. Дементьева, Ю. А. Морозов // Мат. Междунар. Конф. «Гемореология и микроциркуляция». – Ярославль, – 2003. – С. 77.
4. Bolokadze N., Lobjanidze I., Momtselidze. Blood rheological properties and lipid peroxidation in cerebral and systemic circulation of neurocritical patients // Clin. Hemorheol. and Microcirc. – 2004. – Vol. 30, N 2. – P. 99–105.
5. Delamaire M., Durand F., Pinel J.F., Goff M.C., Chauvel P., Beauplet A. Importance of erythrocyte aggregation phenomena in cerebrovascular accidents. // Clin. Hemorheol. and Microcirc. – 1995. – Vol. 15, N 3. – P. 430.
6. Endres S., Semmler J., Eisenbut T., Sinba B. The role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in suppression of tumor necrosis factor- α synthesis: effect of pentoxifylline // Leukocytes and Endothelial Interactions. Prous Science. Barselona. –1995. – P. 59–69.
7. Forconi S., Turchetti V., Matteis C., Leoncini F., Picciolini F., Trabalzini L., Postorino G., Altavilla R. Be-

Заключение

При *in vitro* исследовании прямых эффектов лекарственного препарата пентоксифиллина (0,02 мг/мл) на микрореологию эритроцитов лиц с церебральным атеросклерозом были найдены сходные изменения свойств клеток с теми, что наблюдались в результате лечения данных больных.

При исходно высокой агрегации отмечалось достоверное снижение интегрального индекса агрегации, в то время как у лиц с изначально низкой агрегацией, после терапии наблюдался ее существенный прирост.

Эффект позитивного изменения деформируемости эритроцитов, как в результате лечения, так и в результате применения трентала *in vitro* может быть связан с ингибированием активности фосфодиэстераз в клетках.

havior of blood viscosity, intraerythrocytic calcium, total erythrocytic morphology in ischaemic diseases // Clin. Hemorheol. and Microcirc. – 1995. – Vol. 15, N 3. – P. 68.

8. Koenig W., Ernst E. The possible role of hemorheology in atherothrombogenesis // Atherosclerosis. – 1992. – Vol. 94, N 2–3. – P. 93–107.

9. Koscielny J., Jung E.M., Mrowietz C., Kiesewetter H., Latza R. Blood fluidity, fibrinogen, and cardiovascular risk factors of occlusive arterial disease: results of the Aachen study // Clin. Hemorheol. and Microcirc. – 2004. – Vol. 31, N 3. – P. 185–195.

10. Muravyov A.V., Meiselman J.H., Yakusevich V.V. Zamishlayev A.V. Effects of antihypertensive therapy on hemorheological profiles in female hypertensive patients with initially low or high whole blood viscosity // Clin. Hemorheol. and Microcirc. – 2002. – Vol. 26. – P. 125–135.

11. Muravyov A.V., Yakusevich V.V., Kabanov A.V., Petrochenko A.S. The effect of diuretics on red blood cell microrheological parameters in female hypertensive patients // Clin. Hemorheol. and Microcirc. – 2005. – Vol. 33. – N 2. – P. 121.

12. Muravyov A. V. Yakusevich V. V., Maimistova A. A., Chuchkanov F. A., Bulaeva S. V. Hemorheological efficiency of drugs, targeting on intracellular phosphodiesterase activity: in vitro study // Clin. Hemorheol. and Microcirc. – 2007. – Vol. 36, N 4. – P. 327–334.

13. Solerte S.B., Fioravanti M., Cerutti N. Retrospective analysis of long-term hemorheologic effects of pentoxifylline in diabetic patients with angiopathic complications // Acta Diabetol. – 1997. – Vol. 34. – P. 67–74.

14. Velcheva I., Antonova N., Titianova E., Damianov P., Dimitrov N., Dimitrova V. Hemorheological disturbances in cerebrovascular diseases // Clin. Hemorheol. and Microcirc. – 2008. – Vol. 39, N 1-4. – P. 391–396.

Bibliograficheskiy spisok

1. Majmistova, A. A. Sravnitel'nyj analiz izmenenij gemoreologicheskogo profilja mužhchin i zhenshhin s narushenijami cerebral'nogo krovoobrashhenija [Tekst] / A. A. Majmistova, A. V. Murav'jov, S. V. Bulaeva, E. L. Volkova // Jaroslavskij pedagogicheskij vestnik. Tom III. (Fiziko-matematicheskie i estestvennye nauki). – 2010. – № 4. – S. 67–72.
2. Murav'jov, A. V. Izmenenie reologicheskogo profilja u bol'nyh diabetom 1 i 2 tipa pri lechenii Trentalom [Tekst] / A. V. Murav'jov, A. V. Zamysljaev, F. A. Chuchkanov, I. A. Tihomirova, S. V. Bulaeva, A. A. Majmistova // Klinicheskaja farmakologija i ter. – 2009. – 18. – №2. – S. 87–92.
3. Rojtmán, E. V., Gemoreologicheskie jeffekty razlichnyh plazmozameshchajushhih preparatov [Tekst] / E. V. Rojtmán, I. I. Dement'eva, Ju. A. Morozov // Mat. Mezhdunar. Konf. «Gemoreologija i mikrocirkuljacija. – Jaroslavl', – 2003. – S. 77.
4. Bolokadze N., Lobjanidze I., Momtselidze. Blood rheological properties and lipid peroxidation in cerebral and systemic circulation of neurocritical patients // Clin. Hemorheol. and Microcirc. – 2004. – Vol. 30, N 2. – P. 99–105.
5. Delamaire M., Durand F., Pinel J.F., Goff M.C., Chauvel P., Beauplet A. Importance of erythrocyte aggregation phenomena in cerebrovascular accidents. // Clin. Hemorheol. and Microcirc. – 1995. – Vol. 15, N 3. – P. 430.
6. Endres S., Semmler J., Eisenbut T., Sinba B. The role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in suppression of tumor necrosis factor- α synthesis: effect of pentoxifylline // Leukocytes and Endothelial Interactions. Prous Science. Barselona. –1995. – P. 59-69.
7. Forconi S., Turchetti V., Matteis C., Leoncini F., Picciolini F., Trabalzini L., Postorino G., Altavilla R. Behavior of blood viscosity, intraerythrocytic calcium, total erythrocytic morphology in ischaemic diseases // Clin. Hemorheol. and Microcirc. – 1995. – Vol. 15, N 3. – P. 68.
8. Koenig W., Ernst E. The possible role of hemorheology in atherothrombogenesis // Atherosclerosis. – 1992. – Vol. 94, N 2–3. – P. 93–107.
9. Koscielny J., Jung E.M., Mrowietz C., Kiesewetter H., Latza R. Blood fluidity, fibrinogen, and cardiovascular risk factors of occlusive arterial disease: results of the Aachen study // Clin. Hemorheol. and Microcirc. – 2004. – Vol. 31, N 3. – P. 185–195.
10. Muravyov A.V., Meiselman J.H., Yakusevich V.V., Zamishlayev A.V. Effects of antihypertensive therapy on hemorheological profiles in female hypertensive patients with initially low or high whole blood viscosity // Clin. Hemorheol. and Microcirc. – 2002. – Vol. 26. – P. 125–135.
11. Muravyov A.V., Yakusevich V.V., Kabanov A.V., Petrochenko A.S. The effect of diuretics on red blood cell microrheological parameters in female hypertensive patients // Clin. Hemorheol. and Microcirc. – 2005. – Vol. 33. – N 2. – P. 121.
12. Muravyov A. V. Yakusevich V. V., Maimistova A. A., Chuchkanov F. A., Bulaeva S. V. Hemorheological efficiency of drugs, targeting on intracellular phosphodiesterase activity: in vitro study // Clin. Hemorheol. and Microcirc. – 2007. – Vol. 36, N 4. – P. 327–334.
13. Solerte S.B., Fioravanti M., Cerutti N. Retrospective analysis of long-term hemorheologic effects of pentoxifylline in diabetic patients with angiopathic complications // Acta Diabetol. – 1997. – Vol. 34. – P. 67–74.
14. Velcheva I., Antonova N., Titianova E., Damianov P., Dimitrov N., Dimitrova V. Hemorheological disturbances in cerebrovascular diseases // Clin. Hemorheol. and Microcirc. – 2008. – Vol. 39, N 1-4. – P. 391–396.