

Министерство просвещения РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Ярославский государственный педагогический
университет им. К.Д. Ушинского», Ярославль, Россия
Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский
университет», Гродно, Республика Беларусь

**МИКРОЦИРКУЛЯЦИЯ, РЕОЛОГИЯ КРОВИ
И КИСЛОРОДНЫЙ ГОМЕОСТАЗ:**

Международный интернет-симпозиум

в рамках ежегодной научно-практической конференции Ярославского
государственного педагогического университета
им. К.Д. Ушинского «Чтения Ушинского»

Сборник материалов международного интернет-симпозиума

Ярославль – Гродно
2022

УДК 612.1; 579.61
ББК 52.64; 54.1
М 59

Печатается по решению редакционно-издательского совета ЯГПУ им. К.Д. Ушинского и рекомендовано к изданию редакционно-издательским советом учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет» (протокол № 8 от 18.04.2022 г.)

Проведение симпозиума осуществлялось в рамках международного научного проекта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований и Российского фонда фундаментальных исследований «БРФФИ–РФФИ-2020» (№ М20Р-428 – БРФФИ) и (№ 20-515-00019- РФФИ)

Рецензенты: доцент кафедры патологической физиологии им. Д.А.Маслакова УО «Гродненский государственный медицинский университет» доктор медицинских наук, доцент *М.Н. Ходосовский*; заведующий кафедрой медико-биологических основ спорта Ярославского государственного педагогического университета им. К.Д. Ушинского доктор медицинских наук, профессор *В.Н. Левин*

Микроциркуляция, реология крови и кислородный гомеостаз:

М 59 Международный интернет-симпозиум в рамках ежегодной научно-практической конференции Ярославского государственного педагогического университета им. К.Д. Ушинского «Чтения Ушинского» : сборник материалов международного интернет-симпозиума / под науч. ред. А.В. Муравьева, В.В. Зинчука. – Ярославль ; Гродно : РИО ЯГПУ, 2022. – 251 с.
ISBN 978-5-00089-540-5

Международный симпозиум был организован и проведен в рамках ежегодной научно-практической конференции «Чтения Ушинского» ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского». В программу симпозиума включены материалы фундаментальных и клинических исследований транспорта кислорода и эффективность регуляции этих процессов. В представленных материалах, сделанных докладов отражены разные аспекты обеспечения организма кислородом, включая анализ роли системного кровообращения, микроциркуляции и реологии крови, а также клеточные и молекулярные механизмы изменений микрореологии клеток крови. Существенный объем материала, представленного на симпозиум, составляют фундаментальные и клинические исследования роли газотрансмиттеров: оксида азота и сероводорода, в сочетании с озоном в регуляции микрореологических свойств клеток крови в норме и патологии. Важный блок материалов симпозиума представляют доклады исследования микрореологии эритроцитов, выполненные на базе новых лазерных и цифровых технологий.

УДК 612.1; 579.61
ББК 52.64; 54.1

ISBN 978-5-00089-540-5

© ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского», 2022
© Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет», 2022
© Авторы материалов, 2022

Общая информация

Место проведения симпозиума: интернет платформа WEB-конференций «Мираполис»

Дата проведения симпозиума: 10 марта 2022 г. Две сессии: с 9.00 до 13.00 – первая сессия и с 14.00 до 17.00 – вторая сессия

Формы докладов участников симпозиума: 1) *устные дистанционный доклады* (регламент: **15 мин** выступление + **2 мин** вопросы и ответы); 2) *устные стендовые дистанционные доклады* (регламент: 5 мин выступление, с использованием до 5-6 слайдов)

Способы интернет-коммуникации: Вариант 1 – для **персонального** подключения со своего компьютера к интернет-платформе «Мираполис» докладчики получают по электронной почте на свой электронный адрес ссылку, по которой будет произведено соединение. До начала конференции необходимо связаться с организатором работы платформы «Мираполис» в ЯГПУ им. Ушинского **Осетровым Игорем Александровичем** (после этого сами докладчики или И.А. Осетров могут загрузить презентации). Адрес электронной почты Осетрова И.А. - **igos.yar@yandex.ru**;

Вариант 2 – для подключения группы докладчиков руководитель-организатор группы связывается со своего электронного адреса с Осетровым И.А. и получает ссылку для соединения с платформой «Мираполис» на общий компьютер и организует выступления участников конференции согласно списку выступлений, приведенного в разделе «Научная программа»

Требования к оборудованию для трансляции Вебконференции: персональные компьютеры с Microsoft Windows-7 и выше, а также смартфоны или планшеты/

**Научная программа международного симпозиума
«Микроциркуляция, реология крови и кислородный гомеостаз»
10 марта 2022, Сессия 1 (9.00 – 13.00 ч.)**

Открытие конференции

Вступительное слово:

Проректор по научной работе ЯГПУ им. К.Д. Ушинского
Александр Михайлович Ходырев

Проректор по научной работе ГрГМУ Сергей Борисович Вольф

I. Устные доклады

Председатели сессии:

проф. Виктор Владимирович Зинчук, Гродно, Беларусь

проф. Алексей Васильевич Муравьев, Ярославль, Россия

1. Роль микрореологических параметров в изменении параметров микроциркуляции крови при сахарном диабете и артериальной гипертензии

А.В. Приезжев, П.Б. Ермолинский, Ю.И. Гурфинкель, Л.И. Дячук, К. Корнеев, О.Е. Фадюкова, В.Б. Кошелев, А.Е. Луговцов, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

2. Blood coagulation time determination by AC current phase shift response measurement simultaneously with the blood viscosity

N. Antonova¹, R. Zlatev², R. Ramos², M. Stoytcheva²

¹ Dept. Biomechanics, Institute of Mechanics to the Bulgarian Academy of Sciences, 1113 Sofia, Bulgaria; ² Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, B.C. México

3. Changes in basic hemorheological parameters during and after regular physical activity. Relation with microcirculation and oxygen uptake (supply)

I. Ivanov^{a,b}, N. Antonova^b

^a National Sports Academy "Vassil Levski", Sofia, Bulgaria;

^b Department of Biomechanics, Institute of Mechanics, Bulgarian Academy of Sciences, Akad. G.Bonchev str., Bl.4, 1113 Sofia, Bulgaria

4. Кислородтранспортная функция крови при коронавирусной инфекции

Зинчук В.В.¹, Глуткина Н.В.²

¹ УО Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь; ² Гродненская университетская клиника, Гродно,

Беларусь

5. Деформируемость эритроцитов при хранении крови зависит от внутриклеточного содержания монооксида азота

Акулич Н.В.¹, Зинчук В.В.².

¹УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория», Минск, Беларусь; ²УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

6. Измерение асимметрии распределения эритроцитов по размерам методом лазерной дифрактометрии мазка крови

Никитин С.Ю., Цыбров, Е.Г. , МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

7. Кислородное обеспечение крови крыс при окислительном стрессе в условиях введения мелатонина и модуляторов содержания оксида азота

Глуткин С.В., Зинчук В.В., Гуляй И.Э., Щурко А.С.

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

8. Микрогемолиз и расстройства микроциркуляции у пациентов с артериальной гипертензией

Козловский В.И., УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет (ВГМУ)», Витебск, Беларусь

9. Особенности кислородтранспортной функции крови и прооксидантно-антиоксидантного равновесия при разрыве церебральных аневризм

Нечипуренко Н.И.¹, Сидорович Р.Р.¹, Пашковская И.Д.¹, Степанова Ю.И.², Ахремчук А.И.¹, Прокопенко Т.А.¹.

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии», Минск, Беларусь; ²УО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Беларусь

10. Development of Experimental Microfluidic Device and Methodology for evaluation of RBCs Deformability and Aggregation and Leukocyte Adhesion

N. Antonova¹, A. Muravyov², Chr. Christov³, A. Alexandrova¹, I. Velcheva⁴;

¹Dept. of Biomechanics, Institute of Mechanics, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria; ²Dept. of Medicine and Biology, State Pedagogical University, Yaroslavl, Russia; ³Dept. of Interfaces and Colloids, Institute of Physical Chemistry, Bulgarian Academy of Sciences,

Sofia, Bulgaria; ⁴ Clinic of Neurology, Uni Hospital, Panagyurishte, Bulgaria

11. Сравнительный анализ микрососудистых и гемореологических характеристик у лиц с разным аэробным потенциалом организма

Михайлов П.В., Осетров И.А., Остроумов Р.С., Муравьев А.А.
Государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского, Ярославль, Россия

II. Фиксированные доклады

12.30 – 13.00

1. Оценка мембранных свойств эритроцитов у пациентов с колоректальным раком

Малышева Ю.В., Плотников М.Б., Алиев О.И., Тихомирова И.А., Сидехменова А.В., Анищенко А.М., Федорова Е.П.

ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского», Ярославль; НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, Томск

2. Современные методы исследования микроциркуляции

Кузнецова Е.А., Коршунова А.А., Зеркалина Е.И.,
Государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского, Ярославль, Россия

3. Анализ характера взаимосвязи между отдельными параметрами гемодинамики, состава крови, функции внешнего дыхания и иммунологического профиля у тренированных и детренированных лиц

Масленникова Ю.Л., Государственный авиационный университет, Рыбинск, Россия

4. Нарушения митохондриального дыхания нейронов головного мозга крыс с неодномоментной перевязкой общих сонных артерий

Бонь Е.И., Максимович Н.Е., Дремза И.К., Маркова А.Д., Родцевич А.Г.

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

5. Не всем пациентам с пневмонией показана «прон-позиция»

Водоевич В.П., Рудницкий М.К., Харук Ю.Е., Шульга Е.В.

Гродненский государственный медицинский университет; УЗ

«Городская клиническая больница № 2 г. Гродно» Гродно, Беларусь

6. Состояние лейкоцитарного звена крови крыс с экспериментальным перитонитом и введением аминоксантидина

Гусаковская Э.В., Максимович Н.Е., Ранцевич П.И., Кривонос Н.А., Лупеко П.Д., Лещенок М.А., Дрожжа С.Д.

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

7. Аденилатциклазный сигнальный путь и микрореология эритроцитов

Волкова Е.Л., Кузнецова Е.А., Государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского, Ярославль, Россия

8. Соматическая патология у женщин в зависимости от вида менопаузы

Милош Т. С., Гуляй И. Э.

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

10 марта 2022, Сессия 2 (14.00 – 17.30 ч.)

I. Устные доклады

Председатели сессии:

проф. Виктор Владимирович Зинчук, Гродно, Беларусь

проф. Алексей Васильевич Муравьев, Ярославль, Россия

д.м.н. Михаил Николаевич Ходосовский, Гродно, Беларусь

1. Изменения микроциркуляции у спортсменов после выполнения функциональной пробы с локальной мышечной нагрузкой

Доможилова А. А., Макоева Ф.К.,

Национальный государственный университет физической культуры, спорта и здоровья имени П. Ф. Лесгафта, Санкт-Петербург, Россия

2. Участие гемоглобина в регуляции редокс-состояния тканей при ишемии-реперфузии печени

Ходосовский М.Н., Зинчук В.В., УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

3. Расстройства микроциркуляции у пациентов с метаболическим синдромом

Сергиевич А.В., УО «Витебский государственный ордена Дружбы

народов медицинский университет (ВГМУ)», Витебск, Беларусь

4. Особенности эритроцитарного ответа на действие озона

Билецкая Е.С., Зинчук В.В.

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

5. Микрореологические свойства эритроцитов при их старении: *in vitro* измерения с помощью лазерных методов

¹Ермолинский П.Б., ¹Луговцов А.Е., ¹Приезжев А.В., ²Яйя Ф., ²Вагнер Х.

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, ²Саарский университет, Саарбрюкен, Германия

6. Микрореологические параметры эритроцитов человека и их изменения при инкубации крови с наночастицами Fe₂O₃, перспективными для биомедицинских применений»

¹Луговцов А.Е., ¹Ермолинский П.Б., ¹Романова А.А., ¹Приезжев А.В., ^{2,3}Переведенцева Е.В., ³Ченг Ч.-Л.

¹МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия; ²ФИАН им. П.Н. Лебедева, Москва, Россия; ³Университет Донг Хва, Хуалинь, Тайвань

7. Влияние ранней хирургической некрэктомии у беременных крыс с глубоким термическим ожогом кожи на прооксидантно-антиоксидантный баланс и содержание NO в организме матери

Ковальчук-Балбатун Т.В., Гуляй И.Э., УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

8. Выраженность морфологического повреждения эндотелия и прооксидантно-антиоксидантного дисбаланса у крыс с экспериментальным перитонитом и введением неселективного ингибитора NO-синтазы

Гусаковская Э.В., Максимович Н.Е., Ранцевич П.И., Кривонос Н.А., Лупеко П.Д., Лещенок М.А., Дрожжа С.Д., УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

9. Коррекция микрореологических характеристик эритроцитов донорами газотрансммиттеров

Муравьев А.В., Тихомирова И.А., Петроченко Е.П., Булаева С.В., Волкова Е.Л., Замышляев А.В., Государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского, Ярославль, Россия

II. Фиксированные доклады

16.30 – 17.00

1. Сравнение влияния фибриногена и гамма глобулина на агрегацию эритроцитов in vitro

Корнеев К.Н. (студент 3-го курса физического ф-та МГУ), П.Б.

Ермолинский, Луговцов А.Е., Приезжев А.В.

МГУ, Москва, Россия

2. Оценка изменений микрореологических параметров клеток крови при артериальной гипертензии оптическими методами

Умеренков Д.А. (студент 3-го курса физического ф-та МГУ),

Ермолинский П.Б., Луговцов А.Е., Приезжев А.В.

МГУ, Москва, Россия

3. Сравнение механизмов взаимодействия декстранов и фибриногена с мембраной эритроцитов и их влияния на агрегацию последних

Романова А.А., Ермолинский П.Б., Луговцов А.Е., Приезжев А.В.,

МГУ, Москва, Россия

4. Анализ степени агрегации эритроцитов при разных сдвиговых напряжениях в проточной камере с использованием цифровой обработки изображений

Орешкин Е.С., Ермолинский П.Б.

МГУ, Москва, Россия

5. Калибровка лазерного эктацитометра эритроцитов

Лебедева М.С., Никитин С.Ю.

МГУ, Москва, Россия

6. Нарушение функции эндотелия у молодых здоровых лиц при дифференцированном потреблении пальмового масла

Кежун Л.В., Якубова Л.В., Белоус Ю.И.

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

7. Особенности кислородного гомеостаза у пользователей электронных и обычных сигарет

Дорохина Л.В., Орехов С.Д., Дашкевич П.А., Косяк У.Н., Редькин

Н.А., УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

8. Содержание газотрансммиттеров у пациентов с саркоидозом Бека

Глуткина Н.В., Велисейчик А.А.

УО «Гродненский государственный медицинский университет»,
Гродно, Беларусь

9.Сродство гемоглобина к кислороду у лиц с различным содержанием аспросина

Аль-Джебур Джаафар Шати Оваид

УО «Гродненский государственный университет им. Янки Купалы,
Гродно, Беларусь

17.10 Подведение итогов и закрытие заседания симпозиума

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Antonova N., Zlatev R., Ramos R., Stoytcheva M.</i> Blood coagulation time determination by AC current phase shift response measurement simultaneously with the blood viscosity_____	16
<i>Ivanov I., Antonova N.</i> Changes in basic hemorheological parameters during and after regular physical activity. Relation with microcirculation and oxygen uptake (supply)_____	17
<i>Antonova N., Muravyov A., Christov Chr., Alexandrova A., Velcheva I.</i> Development of Experimental Microfluidic Device and Methodology for evaluation of RBCs Deformability and Aggregation and Leukocyte Adhesion_____	18
<i>Velcheva I., Antonova N., Kmetski T., Tsonevska G., Alexandrova A., Stambolieva K., Bechev B.</i> Local carotid stiffness in patients with cerebral lacunar infarctions. Relation to blood viscosity_____	19
<i>Акулич Н.В., Зинчук В.В.</i> Деформируемость эритроцитов при хранении крови зависит от внутриклеточного содержания монооксида азота_____	20
<i>Аль-Джебур Джаафар Шати Оваид.</i> Сродство гемоглобина к кислороду у лиц с различным содержанием аспросина_____	26
<i>Билецкая Е.С., Зинчук В.В., Муравьев А.В.</i> Особенности эритроцитарного ответа на действие озона_____	31
<i>Бонь Е.И., Максимович Н.Е., Дремза И.К., Маркова А.Д., Родцевич А.Г.</i> Нарушения митохондриального дыхания нейронов головного мозга крыс с неодномоментной перевязкой общих сонных артерий_____	37
<i>Водоевич В.П., Рудницкий М.К., Харук Ю.Е., Шульга Е.В.</i> Не всем пациентам с пневмонией показана «прон-позиция» конечностей_____	43
<i>Глуткин С.В., Зинчук В.В., Гуляй И.Э., Щурко А.С.</i> Кислородное обеспечение крови крыс при окислительном стрессе в условиях введения мелатонина и модуляторов содержания оксида азота_____	46
<i>Глуткина Н.В., Зинчук В.В.</i> Содержание газотрансмиттеров у пациентов с саркоидозом Бека_____	50
<i>Гусаковская Э.В., Максимович Н.Е., Ранцевич П.И., Кривонос Н.А., Лупеко П.Д., Лещенок М.А., Дрожжа С.Д.</i> Выраженность морфологического повреждения эндотелия и прооксидантно-	

антиоксидантного дисбаланса у крыс с экспериментальным перитонитом и введением неселективного ингибитора NO-синтазы	56
<i>Гусаковская Э.В., Максимович Н.Е., Ранцевич П.И., Кривонос Н.А., Лунеко П.Д., Лещенок М.А., Дрожжа С.Д.</i> Состояние лейкоцитарного звена крови крыс с экспериментальным перитонитом и введением аминогуанидина	60
<i>Доможилова А.А., Макоева Ф.К.</i> Изменения микроциркуляции у спортсменов после выполнения функциональной пробы с локальной мышечной нагрузкой	63
<i>Дорохин К.М., Балла А.А., Орехов С.Д., Стасевич Е.В.</i> Параметры эхокардиографии у пациентов перед каротидной эндартерэктомией	67
<i>Дорохина Л.В., Орехов С.Д., Дашкевич П.А., Косяк У.Н., Редькин Н.А.</i> Особенности кислородного гомеостаза у пользователей электронных и обычных сигарет	72
<i>Зинчук В.В., Глуткина Н.В., Кулага Е.Я.</i> Кислородтранспортная функция крови при коронавирусной инфекции	78
<i>Зинчук В.В., Билецкая Е.С., Приезжев А.В., Тихомирова И.А., Михайлов П.В., Муравьев А.В.</i> Изменение микрореологии эритроцитов и кислородтранспортной функции крови при сочетанном действии озона и газотрансмиттеров	84
<i>Кежун Л.В., Якубова Л.В., Белоус Ю.И.</i> Нарушение функции эндотелия у молодых здоровых лиц при дифференцированном потреблении пальмового масла	94
<i>Ковальчук-Балбатун Т.В., Гуляй И.Э.</i> Влияние ранней хирургической некрэктомии у беременных крыс с глубоким термическим ожогом кожи на прооксидантно-антиоксидантный баланс и содержание NO в организме матери	99
<i>Козловский В.И., Акуленок А.В.</i> Микрогемолиз и расстройства микроциркуляции у пациентов с артериальной гипертензией	105
<i>Масленникова Ю.Л.</i> Анализ характера взаимосвязи между отдельными параметрами гемодинамики, состава крови, функции внешнего дыхания и иммунологического профиля у тренированных и детренированных лиц	110
<i>Милош Т.С., Гуляй И.Э.</i> Соматическая патология у женщин в зависимости от вида менопаузы	116

Михайлов П.В., Остроумов Р.С., Тихомирова И.А., Муравьев А.В., Осетров И.А. Гемореологические и микрососудистые механизмы транспорта кислорода у лиц с разным аэробным потенциалом организма	123
Михайлов П.В., Остроумов Р.С., Кузнецова Е.А., Волкова Е.Л., Булаева С.В., Муравьев А.А. Роль микрореологии эритроцитов в микроциркуляции	130
Муравьев А.В., Тихомирова И.А., Петроченко Е.П., Булаева С.В., Волкова Е.Л., Замышляев А.В. Коррекция микрореологических характеристик эритроцитов донорами газотрансмиттеров	137
Нечипуренко Н.И., Сидорович Р.Р., Пашковская И.Д., Степанова Ю.И., Ахремчук А.И., Прокопенко Т.А. Особенности кислородтранспортной функции крови и прооксидантно-антиоксидантного равновесия при разрыве церебральных аневризм	144
Никитин С.Ю., Лебедева М.С., Цыбров Е.Г. Калибровка лазерного эктацитометра эритроцитов	150
Орешкин Е.С., Ермолинский П.Б., Луговцов А.Е., Приезжев А.В. Анализ степени агрегации эритроцитов при разных сдвиговых напряжениях в проточной камере с использованием цифровой обработки изображений	157
Приезжев А.В., Зинчук В.В., Ермолинский П.Б., Гурфинкель Ю.И., Дячук Л.И., Корнеев К.Н., Луговцов А.Е. Роль микрореологических параметров в изменении параметров микроциркуляции крови при сахарном диабете и артериальной гипертензии	161
Пронько Т.П., Снежицкий В.А., Харитоненко Т.В., Стемковская О.Г. Ассоциация тромбоцитарных индексов с агрегационной активностью тромбоцитов у пациентов с non-q инфарктом миокарда	165
Романова А.А., Ермолинский П.Б., Семенов А.Н., Луговцов А.Е., Приезжев А.В. Роль с-реактивного белка и макромолекул декстрана в процессе агрегации эритроцитов	170
Сергиевич А.В., Козловский В.И. Расстройства микроциркуляции у пациентов с метаболическим синдромом	175
Тихомирова И.А., Муравьев А.В., Петроченко Е.П., Малышева Ю.В., Петроченко А.С. Оценка влияния разных концентраций сероводорода на агрегатные свойства клеток крови	180

Тихомирова И.А., Петроченко Е.П., Малышева Ю.В., Кислов Н.В., Лемехова В.А., Муравьев А.В. Влияние доноров оксида азота и сероводорода на микрореологические характеристики эритроцитов у больных злокачественными новообразованиями	186
Фадюкова О.Е., Кошелев В.Б. Калиевые и хлорные каналы опосредуют эффекты сероводорода на деформируемость эритроцитов крысы	193
Фатеев М.М., Лендоева Д.В., Смирнова А.С. Воздействие фаз овариально-менструального цикла на показатели variability сердечного ритма	200
Ходосовский М.Н., Зинчук В.В. Участие гемоглобина в регуляции редокс-состояния тканей при ишемии-реперфузии печени	206
Никитин С.Ю., Цыбров Е.Г., Лебедева М.С. Измерение асимметрии распределения эритроцитов по размерам методом лазерной дифрактометрии мазка крови	212
Луговцов А.Е., Тучин В.В., Переведенцева Е.В., Ч.-Л. Ченг, Приезжев А.В. Микрореологические параметры эритроцитов человека и их изменения при инкубации крови с наночастицами Fe_2O_3 перспективными для биомедицинских применений	220
Корнеев К.Н., Ермолинский П.Б., Луговцов А.Е., Приезжев А.В. Сравнение влияния фибриногена и гамма-глобулина на агрегацию эритроцитов IN VITRO	229
Умеренков Д.А., Ермолинский П.Б., Луговцов А.Е., Приезжев А.В. Оценка изменений микрореологических параметров клеток крови при артериальной гипертензии оптическими методами	235
Сведения об авторах	241

МАТЕРИАЛЫ СИМПОЗИУМА

N. Antonova, R. Zlatev, R. Ramos, M. Stoytcheva

BLOOD COAGULATION TIME DETERMINATION BY AC CURRENT PHASE SHIFT RESPONSE MEASUREMENT SIMULTANEOUSLY WITH THE BLOOD VISCOSITY

Abstract. There are many methods - biological, chemical, physical (optical, electrical) and mechanical, used to assess the properties of blood and the changes that occur with them in many diseases. The electrical conductivity and impedance are the only electrical parameters employed so far for this purpose in combination with some rheological one as blood viscosity. In this work a virtual instrument based on LabVIEW platform was developed for measurement of the AC current vs. the voltage phase shift caused by a blood sample at 100 mV p-p AC voltage application within the frequency range between 1 Hz and 10 KHz.

The capacitance and the active resistance values of the blood sample determining the AC current/voltage phase shift depend on blood sample properties such as blood cells adsorption and orientation as well as on their fractional volume concentration. Some diseases strongly affect the first two parameters and hence the phase shift value. The combination of the AC current/voltage phase shift with the rheological parameters mostly the blood viscosity allows enhancing of the understanding and the interpretation of the hemorheology results in terms of blood circulation which is of great medical diagnostic importance.

Acknowledgements: The study has been supported by the project Grant № KII-06-H27/13 “Development of an experimental microfluidic system and methodology for the assessment of the microrheological properties of blood. Analysis of the peripheral vasomotor reactivity and vascular endothelial functions in patients with type 2 diabetes mellitus from”, funded by the Bulgarian National Science Fund.

**CHANGES IN BASIC HEMORHEOLOGICAL PARAMETERS
DURING AND AFTER REGULAR PHYSICAL ACTIVITY.
RELATION WITH MICROCIRCULATION AND OXYGEN
UPTAKE (SUPPLY)**

Abstract: Regular exercises (RE) have enormous potential in combating the global epidemic of an increase in chronic metabolic and inflammatory diseases, including obesity, metabolic syndrome, type II diabetes and many more. Physiological reactions to exercise are complex and not well studied and analyzed.

The purpose of the study is to overview the changes of some of the main hemorheological parameters during and after regular physical activity. As well as to focus on their role and relation with microcirculation and oxygen uptake (supply) of different organs and tissues.

It is known that the immediate physiological response to regular and/or intense physical activity is highly dependent on the type, duration, intensity, cyclicity and duration of physical activity, as well as the individual level of training (training status) of the participants. The analysis of the literature yielded results for the indisputable influence of RE on parameters such as erythrocyte rheological properties, plasma components (fibrinogen, albumin, globulins), blood viscosity, blood volume, endothelial changes of blood vessels, blood pressure.

The reported results contribute to the elucidation of complex processes that determine the ability of the human body to adapt to specific intensive training programs, which is crucial for improving the health status of ordinary people and optimizing sports performance in elite athletes.

DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL MICROFLUIDIC DEVICE AND METHODOLOGY FOR EVALUATION OF RBCS DEFORMABILITY AND AGGREGATION AND LEUKOCYTE ADHESION

Abstract: Background: The microfluidics has become a prominent field for studying blood microrheology. The aim of the study is to develop an experimental microfluidic device for assessing microrheological properties of blood cells' suspensions. Methods: A method for assessing the deformability of blood cells and a device for its implementation developed by one of the co-authors was used. Based on it a new microfluidic device was elaborated and connected in a system, including a microscope with a digital camera, a pump with a manometer, computer with specially developed software. Diluted blood cells' suspensions are investigated between two parallel optical slides with a 100 μm distance between them. The motion of the blood cells in the microchamber is observed by the microscope and recorded and visualized by the digital camera. Results: The system was tested with model suspensions and with diluted red blood cell (RBC) suspensions to specify and validate the experimental conditions: pressure range, flow rate, etc. The pressure changes, realized by the syringe pump, connected to a manometer are established and thus the changes of the shear rate in the microfluidic device are determined. Experimental data about the blood microrheological parameters as RBC aggregation and deformability, leukocyte adhesion, as well as the simultaneous evaluation of RBC aggregation and leukocyte adhesion for a group of healthy donors (control group) and from donors with type 2 diabetes (T2DM) and their mutual interaction are obtained. Conclusions: The developed device and experimental system is a promising tool for the study of erythrocyte deformability and aggregation, as well as leukocyte adhesion.

Keywords: Microfluidic Device, Methodology, Microrheology, RBC Deformability and Aggregation, Leukocyte Adhesion.

Acknowledgements: The study has been supported by the project Grant № КП-06-H27/13 "Development of an experimental microfluidic system and methodology for the assessment of the microrheological

properties of blood. Analysis of the peripheral vasomotor reactivity and vascular endothelial functions in patients with type 2 diabetes mellitus from”, funded by the Bulgarian National Science Fund.

*I. Velcheva, N. Antonova, T. Kmetski, G. Tsonevska,
A. Alexandrova, K. Stambolieva, B. Bechev*

LOCAL CAROTID STIFFNESS IN PATIENTS WITH CEREBRAL LACUNAR INFARCTIONS. RELATION TO BLOOD VISCOSITY

Abstract. Objective: The carotid stiffness is an important factor in the pathogenesis of the cerebrovascular diseases and especially of the cerebral small vessel disease. Its major determinants are the vessel wall structure and function and the blood pressure values. However the role of blood viscosity is not enough studied. The aim of our study was to evaluate the local arterial stiffness of the common carotid artery (CCA) and its relation to blood viscosity in patients with LI.

Methods: Twenty two patients with chronic LI aged 63 to 78 years and 15 age-matched controls were examined. The inclusion criteria of LI patients were consistent with the neuroimaging diagnosis standards. An ultrasound examination with a real-time automatic measurement of the CCA intima-media thickness (IMT), the parameters of local CCA stiffness: distensibility (DC) and compliance coefficients (CC), alpha and beta stiffness indices and pulse wave velocity (PWV) was performed by using radio frequency (RF) - data technology (MyLabSeven, Esaote, Italy). Whole blood (WBV) at shear rates of 0.0237 s⁻¹ to 128.5 s⁻¹ was also examined in patients and controls.

Results. The results revealed higher values of IMT, significant decrease of DC and CC and increase of α and β stiffness indices and PWV in the patients with LI as compared to the control group. Parallel increase of WBV was found within the range of shear rates 0.0237 s⁻¹ to 128.5 s⁻¹. In the patients with LI the increased CCA stiffness was associated with increased CC.

Conclusion. In LI patients the impact of blood viscosity on the elastic properties of the CCA is accomplished directly at the macrovascular level and indirectly by the microvascular arteriolar wall changes.

Keywords: lacunar infarctions, common carotid artery, intima-media thickness, local carotid stiffness, whole blood viscosity

УДК 612.111+615.224.03+615.1/4

Н.В. Акулич, В.В. Зинчук

ДЕФОРМИРУЕМОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ХРАНЕНИИ КРОВИ ЗАВИСИТ ОТ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ МОНООКСИДА АЗОТА

Аннотация. В статье методом проточной цитофлуориметрии проведен анализ содержания монооксида азота и деформируемость эритроцитов при хранении крови. Выявлены различия между уровнем внутриклеточного монооксида азота и деформируемостью красных кровяных телец.

Ключевые слова: монооксид азота, эритроциты, стоматин, деформируемость, DAF-FM

N.V. Akulich, V. V. Zinchuk

ERYTHROCYTE DEFORMABILITY DURING BLOOD STORAGE DEPENDS ON INTRACELLULAR NITROGEN MONOXIDE CONTENT

Abstract. Nitrogen monoxide content and deformability of erythrocytes during blood storage were analyzed by flow cytofluorimetry. Differences between the level of intracellular nitrogen monoxide and the deformability of red blood cells were revealed.

Key words: Nitric oxide, red blood cells, reticulocyte, DAF-FM

Введение

В последние несколько лет наблюдается значительный рост исследований, направленных на выяснение биохимических и протеомных механизмов «старения» эритроцитов при хранении клеточных продуктов. Хранение эритроцитов (RBC) сопровождается морфо-функциональными изменениями [1], которые на ранних этапах проявляются обратимой дискоцит↔эхиноцит/стоматоцит трансформацией. С использованием гемоконсерванта удастся поддерживать жизнеспособность эритроцитов, а их терминальной формой являются гипохромные сфероциты [2], которые могут

являться причиной нежелательных явлений при переливании эритроцитсодержащих компонентов крови [3]. Нами постулируется, что изменения эритроцитов в процессе консервации крови будут аналогичны таковым, происходящим в организме. Следовательно, выяснение взаимосвязи между морфологическими особенностями эритроцитов в процессе хранения и лежащими в основе этих изменений механизмами является целью нашего исследования.

Установлено, что способность эритроцитов адаптировать свою форму к динамическим условиям потока в различных участках сосудистого русла может зависеть как от механических свойств мембраны красных кровяных телец, вязкости их цитоплазмы, так и от некоторых газотрансмиттеров, в частности монооксида азота [4]. Кроме того, еще одной переменной, определяющей деформируемость красных кровяных телец в ходе хранения эритроцитов является шеддинг фрагментов эритроцитов, который, в свою очередь, представляет механизм адаптации площади поверхности мембраны к упругому напряжению, создаваемому белками цитоскелета [5]. Обсуждаемая в этой работе модель количественно воспроизводит скорость потери площади в стареющих эритроцитах.

Таким образом, шеддинг фрагментов мембраны с последующим образованием микрочастиц и изменения формы эритроцитов во время хранения (снижение деформируемости) должны быть компенсированы другими эритроцитарными механизмами системы транспорта газов, одним из которых является L-аргинин NO система эритроцитов, с участием которой реализуется управляемая вазодилатация. Эти вышеприведенные факты определили задачи исследования: оценку деформируемости эритроцитов, количества микровезикул, уровень внутриклеточного NO и содержания стоматина при хранении крови.

Методика

Исследования проводилось на базе Учреждения здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория». Забор крови добровольцев (n=17) производился с использованием вакуумных систем с ЭДТА K₂. Хранение крови (гематокрит 70%) осуществлялось в пластиковых пробирках, предварительно заполненных гемоконсервантом PAGGSM (Fresenius Kabi). Исследование одобрено комитетом по этике УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория». Морфоденситометрический анализ фиксированных и окрашенных препаратов производили с

использованием микроскопа Olympus BX-53 (Olympus). Для оценки площади поверхности эритроцитов применялись алгоритмы программного обеспечения «Диаморф-ЦИТО» (Диаморф).

Определение внутриклеточного NO, анализ уровня стоматина и деформируемости эритроцитов проводили методом проточной цитометрии (FACS ARIA). Для гейтирования эритроцитов пробы крови окрашивались моноклональными антителами к линейному маркеру эритроцитов (гликофору A, CD 235 a), для оценки NO использовали диацетильное производное 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлуоресцеина (DAF-FM DA) (Molecular Probes). Для подготовки проб при проведении исследований на проточном цитометре использовали фосфатный буфер FACS Flow (BD Bioscience). Анализировали в каждой пробе не менее 40 000 клеток. Микрочастицы эритроцитов оценивали по низким значениям прямого светорассеяния и сильной экспрессии на цитоплазматической мембране линейного маркера эритроцитов (CD 235a).

Оценку деформируемости производили согласно [6] на основании анализа гистограмм прямого светорассеяния (FSc). Свежая кровь здоровых добровольцев характеризуется наличием бимодального распределения сигнала FSc, отражающим наличие двух популяций клеток. Для подтверждения формы эритроцитов в исследуемых регионах использовался анализ RBC после сортировки субпопуляций двух регионов интереса. Стабильность настройки цитометра-сортера проверялась с помощью латексных частиц (BD CaliBRITE beads, Becton-Dickinson).

Для анализа стоматина эритроцитов кровь фиксировали холодным глутаровым альдегидом, а затем пермеабелизировали 0,1 % раствором Triton X-100. После эритроциты осаждали центрифугированием и ресуспендировали в PBS. К полученной суспензии добавляли первичные кроличьи антитела к стоматину (Abcam, ab169524) и конъюгированные с аллофикоцианином мышинные антитела CD 235. Затем к суспензии добавляли флуоресцентно-меченные вторичные антитела (козьи антитела к Ig G кролика, конъюгированные с FITC). Полученную суспензию RBC подвергали цитофлуориметрическому анализу. Для возбуждения флуоресцентных красителей использовали лазеры с длиной волны 488 и 632 нм. Регистрацию флуоресценции производили с использованием узкополосных фильтров. Для анализа применяли логарифмическую шкалу с 4 декадами. В ходе анализа производили

настройку флуоресценции проточного цитометра таким образом, чтобы в 1-й декаде флуоресценции двух используемых каналов находились клетки изотипического контроля.

Полученные данные были проанализированы при помощи дисперсионного и корреляционного анализа с применением программы для персонального компьютера «Statistica 10.0».

Результаты и обсуждение

Анализ микроскопических препаратов показал, что в течение первой недели хранения эритроциты, характеризовались наличием впадины в центре клетки (пэллор) и выраженным возвышением на периферии (тор), особенностей морфологии не выявлено: большинство клеток представлено нормоцитами.

Таблица

Содержание монооксида азота, стоматина и оптико-морфометрические характеристики эритроцитов и микрочастиц при хранении крови (Mean \pm SD), n=17

Параметр	До хранения (контроль)	Срок хранения (недели)			
		1-я	2-я	3-я	4-я
Площадь поверхности нормоцитов, мкм ²	138,6 $\pm 3,6$	141,4 $\pm 3,7$	131,5 $\pm 3,6$	114,1 $\pm 2,4^*$	109,0 $\pm 2,3^*$
Интенсивность флуоресценции DAF-FM в нормоцитах, (о.е.)	242,5 $\pm 6,8$	234,5 $\pm 5,8$	302,5 $\pm 16,2^*$	324,7 $\pm 12,9^*$	308,0 $\pm 18,8^*$
Интенсивность флуоресценции DAF-FM в микрочастицах, (о.е.)	0	0	554,4 $\pm 31,8$	614,5 $\pm 15,5$	780,2 $\pm 29,7^*$
Интенсивность флуоресценции anti-Stom в нормоцитах, (о.е.)	1021,0 $\pm 140,4$	853,5 $\pm 135,8$	905,0 $\pm 151,1$	795,3 $\pm 245,3$	336,8 $\pm 230,1^*$
Интенсивность флуоресценции anti-Stom в микрочастицах, (о.е.)	0	0	1142,0 $\pm 342,1^*$	5342,1 $\pm 240,5^*$	2224,0 $\pm 358,1^*$
Деформируемость нормоцитов, M1/M2: PCD(о.е.)	2,8:0,9	1,8:0,5*	1,3:0,3*	1,2:0,2*	1,5:0,2*

* – наличие достоверных различий по отношению к контролю ($p \leq 0,05$, ANOVA)

Площадь поверхности эритроцитов контрольных образцов составляла $138,6 \pm 3,6$ мкм², а, хранящейся 1 неделю, – $141,4 \pm 3,7$ мкм², соответственно (см. табл.). Дальнейшее хранение (2 и более недель) приводило к постепенному превращению нормоцитов в сфероциты, при этом площадь поверхности значительно снижалась до $114,1 \pm 2,4$ мкм² ($p < 0.05$) и $109,0 \pm 2,3$ мкм² ($p < 0.05$) на третьей и четвертой неделях, соответственно.

Уровень монооксида азота нормоцитов, измеренный по интенсивности флуоресценции DAF-FM, до первой недели хранения не различался и составлял, соответственно, $242,5 \pm 6,8$ и $234,5 \pm 5,8$ о.е. ($p > 0.05$), в контроле и у хранящейся одну неделю. Содержание монооксида азота в нормоцитах продолжало постепенно нарастать, увеличиваясь к третьей неделе наблюдения до $324,7 \pm 12,9$ о.е. ($p < 0,05$). Затем уровень внутриклеточного NO снизился до $308,0 \pm 18,8$ о.е. и превышал значения контроля более чем на 25% ($p < 0.05$).

При увеличении продолжительности хранения эритроцитсодержащих компонентов донорской крови в пробах увеличилось количество микрочастиц, и их доля к четвертой недели хранения выросла более чем в 20 раз, а интенсивность флуоресценции DAF-FM превышала таковую по сравнению с нормоцитами в контрольных образцах.

Содержание стоматина в нормоцитах на протяжении 3-х недель наблюдения имело тенденцию к снижению, но статистически достоверные изменения были выявлены только на 4-й неделе хранения крови. В микрочастицах, которые детектировались в пробах крови начиная со 2-й недели наблюдения выявлен значительный рост содержания стоматина, наибольшее значение флуоресценции антител к этому белку ($5342,1 \pm 240,5$) отмечалось на 3-й неделе наблюдения.

Деформируемость эритроцитов при хранении крови с гемоконсервантом снижалась начиная с 1-й недели наблюдения: с 2,8 о.е. в контрольных пробах, до 1,5 о.е. на 4-й неделе хранения. Такой характер изменений, вероятно, связан с окислением и разрушением структурных белков эритроцитов, снижением способности красных кровяных телец поддерживать организацию мембраны и росту гемолиза при переливании эритроцитарных компонентов крови. Так с использованием оптического ротационного клеточного анализатора показано [7], что состав микрочастиц эритроцитсодержащих продуктов крови аналогичен таковому, образующемуся *in vivo*, за исключением высокого уровня стоматина [8], что подтверждается и в

нашем исследовании. Одной из возможных причин таких особенностей состава микрочастиц и рост количества сфероцитов в клеточных продуктах является сниженная их секвестрация в условиях *in vivo*, обусловленная лейкоредукцией при заготовке крови и отсутствием потоковой деформации красных кровяных телец.

Заключение. В ходе исследования проведена оценка деформируемости эритроцитов в зависимости от продолжительности хранения крови. Выявлена обратно пропорциональная зависимость ($r = -0,82$, $p < 0,05$) между уровнем внутриклеточного монооксида азота и деформируемостью красных кровяных телец. Проведенный анализ количества и свойств эритроцитарных микрочастиц (микровезикул) выявил прямо пропорциональную зависимость ($r = 0,71$, $p < 0,05$) между содержанием стоматина и внутривезикулярным уровнем NO. Результаты, представленные здесь, подтверждают сложившиеся представления, согласно которым изменения в мембране красных кровяных телец являются причиной снижения деформируемости при хранении крови. После 3-й недели морфо-функциональные изменения, становятся необратимыми, поскольку они включают нарастание образования микрочастиц, содержащих белки цитоплазматической мембраны эритроцита. Установлено, что одним из адаптационных механизмов, компенсирующих снижение деформируемости красных кровяных телец при хранении крови, является рост внутриклеточного содержания монооксида азота в эритроцитах, и, особенно, в микрочастицах, что позволит нивелировать возникающий дефицит за счет дилатации сосудов микроциркуляторного русла.

Библиографический список

1. Frank S.M., Abazyan B., Ono M. et al. Decreased erythrocyte deformability after transfusion and the effects of erythrocyte storage duration // *Anesth. Analg.* – 2013. – Vol. 116, № 5. – P. 975–981.
2. Hogman C.F., Meryman H.T. Storage parameters affecting red blood cell survival and function after transfusion // *Transfus. Med. Rev.* – 1999. – Vol. 13, № 4. – P. 275–296.
3. Oldenborg P.A., Zheleznyak A., Fang Y.F. et al. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells // *Science.* – 2000. – Vol. 288, № 5473. – P. 2051–2054
4. Зинчук В.В. Деформируемость эритроцитов: физиологические аспекты // *Успехи физиологических наук.* – 2001. – Том 32, № 3. – С. 64–76.

5. Sens P., Gov N. Force balance and membrane shedding at the red-blood-cell surface // Phys Rev Lett. – 2007. – Vol. 98. – P. 018102.

6. Piagnerelli M. et al. Assessment of erythrocyte shape by flow cytometry techniques // J. Clin. Pathol. – 2007. – Vol. 60. – P. 549–554.

7. Salzer U., Zhu R., Lutten M. et al. Vesicles generated during storage of red cells are rich in the lipid raft marker stomatin // Transfusion. – 2008. – Vol. 48, 3. – P. 451–462.

8. Cluitmans J.C., Hardeman M.R., Dinkla S. et al. Red blood cell deformability during storage: towards functional proteomics and metabolomics in the Blood Bank // Blood Transfus. – 2012. – Vol. 10, Suppl 2. – S12–S18.

УДК 616-056.257-092:612.018.2-018.26

Аль-Джебур Джаафар Шати Оваид

СРОДСТВО ГЕМОГЛОБИНА К КИСЛОРОДУ У ЛИЦ С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ АСПРОСИНА

Аннотация. Проведена оценка состояния кислородтранспортной функции крови с различным содержанием аспросина. У лиц с повышенным содержанием аспросина отмечается ухудшение основных показателей оксигенации крови и рост сродства гемоглобина к кислороду. Выявленные изменения кислородсвязывающих свойств гемоглобина имеют значение для обеспечения функционального состояния организма.

Ключевые слова: сродство гемоглобина к кислороду, аспросин

Al-Jebur Jaafar Shati Owaid

HEMOGLOBIN AFFINITY FOR OXYGEN IN PERSONS WITH DIFFERENT ASPROSIN CONTENT

Abstract. An assessment of the state of the oxygen transport function of blood with different levels of asprosin was carried out. In persons with a high content of asprosin, there is deterioration in the main indicators of blood oxygenation and an increase in the affinity of hemoglobin for oxygen. The revealed changes in the oxygen-binding properties of hemoglobin are important for ensuring the functional state of the body.

Key words: hemoglobin affinity for oxygen, asprosin

Ведение. В 2016 году группа исследователей из США во главе с Romere C. et al. [4] обнаружила новый гормон из группы адипокинов, названный аспросином, который является регулятором важнейших реакций организма на непродолжительное голодание, таких как высвобождение глюкозы из печени и усиление аппетита. Аспросин играет существенную роль в развитии некоторых метаболических расстройств, в частности связанных с инсулинорезистентностью, приводя к избыточному выбросу глюкозы из печени в условиях гиперинсулинемии, что может иметь значение для формирования функционального состояния организма.

Цель. Оценить состояние сродства гемоглобина к кислороду у лиц с различным содержанием аспросина.

Методика. Объектом исследования были мужчины в возрасте 30-60 лет с различной массой тела. Проведение данного исследования одобрено Регионарным этическим комитетом. Все исследуемые были проинформированы о протоколе исследования и подписали информированное добровольное согласие на использование биологического материала.

Индекс массы тела определялся по формуле масса тела (кг)/рост (m^2). Интерпретация его осуществлялась по рекомендациям Всемирной организации здравоохранения, согласно которой значения индекса массы тела менее 16 соответствует дефициту массы тела, 16-18,5 – недостаточной массе тела, 18,5-25 – нормальной массе тела, 25-30 – избыточной массе тела, 30-35 – ожирению I степени, 35-40 – ожирению II степени, 40 и более – ожирению III степени.

Полученные образцы цельной крови были использованы согласно протоколу исследования. Хранение образцов осуществлялось при температуре не выше – 40 °C. Количественный анализ аспросина определяли методом иммуноферментного анализа при помощи тест-системы ELISA Kit For Asprosin (Biobase, China).

Из локтевой вены на фоне восстановленного оттока забирали кровь, в которой определяли парциальное давление кислорода (pO_2), и углекислого газа (pCO_2), pH, степень насыщения крови кислородом (SO_2) на газоанализаторе Radiometer, ABL80. Рассчитывались показатели кислотно-основного состояния по номограммам Siggaard-Andersen: стандартный бикарбонат (SBC), реальный/стандартный недостаток (избыток) буферных оснований (ABE/SBE), гидрокарбонат (HCO_3^-), общая углекислота плазмы крови (TCO_2). Оценивали, СГК по показателю $p50$ (pO_2 крови при 50% насыщении

её кислородом), определяемого спектрофотометрическим методом ($p50_{\text{раел}}$). На основании формул Severinghaus J.W. [5] рассчитывали $p50$ при стандартных pH, $p\text{CO}_2$ и температуре ($p50_{\text{станд}}$) и положение кривой диссоциации оксигемоглобина.

Все показатели проверяли на соответствие признака закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. С учетом этого была использована непараметрическая статистика с применением программы "Statistica 10.0". Уровень статистической значимости принимали за $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Концентрация аспросина в крови лиц с нормальным значением индекса массы тела составило 8,6 (8,00; 9,20) нмоль/л, $p < 0,05$. У исследуемых с более высоким значением индекса массы тела этот параметр имел значение 13,225 (11,85; 15,65) нмоль/л, $p < 0,05$. У лиц с избыточной массой тела его величина была равной 29,86 (28,16; 32,83) нмоль/л, $p < 0,05$.

Уровень аспросина в крови влияет на общее количество запасов энергии в жировой ткани, а это, в свою очередь, направляет центральную нервную систему на регулирование энергетического гомеостаза, нейроэндокринных функций, метаболической регуляции. Увеличение концентрации аспросина приводит к нарушениям многих важнейших функций, в частности вызывает репродуктивную недостаточность, ожирение, инсулинорезистентность, сахарный диабет, метаболический синдром и аутоиммунные заболевания. В связи с этим, дальнейшее изучение физиологической роли аспросина является актуальным направлением для разработки лечебно-профилактических мероприятий.

Как известно, адипокины участвуют в регуляции сигнального пути L-аргинин-NO-системы [2]. Эти пептидные гормоны, синтезируемые с жировой тканью и передающие сигнал к мишеням (сосуды, мозг, печень, мышцы) сопряжены с L-аргинин-NO-зависимым сигнальным каскадом, в котором имеются инсулинчувствительные, противовоспалительные (адипонектин, оментин, адиполин, кемерин, програнулин), а также воспалительные белки (висфатин, васпин, апелин), влияющие на патогенез метаболического нарушений. Участие этого гормона в регуляции L-аргинин-NO-системы при метаболических нарушениях открывает определённые возможности при разработке новых подходов для коррекции нарушений гомеостаза.

Ранее было показано важность оценки одного из адипокининов, а именно лептина, во взаимосвязи с показателями транспорта кислорода кровью у пациентов с инфарктом миокарда в сочетании с метаболическим синдромом [3], так как данный фактор может влиять на процессы транспорта кислорода кровью как за счет прямого действия (механизмы внешнего дыхания, кровообращение, L-аргинин-NO-система, энергетика), так и опосредованно через модификацию кислородтранспортной функции крови (гемопоез). Вышеизложенное свидетельствует о критической роли аспросина в развитии метаболических расстройств. Возможно влияние данного гормона не только на функциональное состояние организма, но и на кислородное обеспечение, в частности, механизмы транспорта кислорода крови.

В нашем исследовании у лиц с повышенным содержанием аспросина по сравнению со здоровыми, наблюдалось снижение SO_2 , pO_2 венозной крови. Выявлен рост показателя $p50_{\text{станд}}$, что, является физиологическим ответом на гипоксию в тканях, возникшую из-за недостаточности адаптационного резерва кровообращения. Показатель $p50_{\text{реал}}$ также увеличивался по сравнению с контрольной группой. Следует обратить внимание на возникший сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина к кислороду вправо. Вероятно, это связано с некоторым истощением компенсаторной реакции организма, на что указывает уменьшение содержания pO_2 и SO_2 . Увеличение $p50$ способствует росту потока кислорода в ткани в условиях нормоксии или умеренной гипоксии, в тоже время его уменьшение может иметь неблагоприятное значение, обладая прооксидантным эффектом в условиях нарушенной утилизации кислорода тканями [1].

Сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо у исследуемых пациентов с повышенным значением индекса массы тела можно расценивать при снижении pO_2 в крови можно расценивать как механизм компенсации кислородной недостаточности, хотя в условиях окислительного стресса, когда нарушена утилизация кислорода тканями и значительная его часть используется в оксигеназных реакциях, ведущих к образованию активных форм кислорода, это может приводить к активации процессов свободнорадикального окисления.

Можно предположить участие системы газотрансмиттеров в изменении кислородсвязующих свойств крови, прежде всего,

монооксида азота и сероводорода. Как известно, данные газотрансмиттеры вносят вклад в модификацию SGK, что достигается через различные механизмы: образование сульфгемоглобина, модулирование внутриэритроцитарной системы, L-аргинин-NO системы, а также опосредовано через системные механизмы формирования функциональных свойств гемоглобина [1]. В этом аспекте представляет интерес определение газотрансмиттеров у лиц с различным содержанием аспросина.

Заключение

Таким образом, у лиц с повышенным содержанием аспросина отмечается ухудшение основных показателей оксигенации крови (pO_2 , SO_2) и рост SGK. Выявленные изменения кислородсвязующих свойств гемоглобина имеют значение для обеспечения функционального состояния организма лиц данной категории.

Библиографический список

1. Зинчук В.В. Кислородтранспортная функция крови и газотрансмиттер сероводород // Успехи физиологических наук. – 2021. – Т. 52, № 3. – С. 41–55.
2. Кузнецова Л.А. Метаболический синдром: влияние адипокинов на L-аргинин-NO-синтаза-NO сигнальный путь // Acta Biomedica Scientifica. – 2021. – Vol. 6, № 2. – С. 22–40.
3. Пырочкин В.М., Глуткина Н.В. Механизмы транспорта кислорода и свободнорадикального окисления липидов при инфаркте миокарда в сочетании с метаболическим синдромом, сахарным диабетом 2-го типа. – М.: Новое знание, 2014. – 136 с.
4. Romere C., Duerschmid C., Bournat J. et al. Asprosin, a fasting-induced glucogenic protein hormone // Cell. – 2016. – Vol. 165, № 3. – P. 566–579.
5. Severinghaus J.W. Blood gas calculator // J. Appl. Physiol. – 1966. – Vol. 21, № 5. – P. 1108–1116.

Е.С. Билецкая, В.В. Зинчук, А.В. Муравьев

ОСОБЕННОСТИ ЭРИТРОЦИТАРНОГО ОТВЕТА НА ДЕЙСТВИЕ ОЗОНА

Аннотация. Проведена оценка особенностей эритроцитарного ответа на действие озона в опытах *in vitro*. Выявлено усиление эффекта данного газа на показатели транспорта кислорода суспензии эритроцитов, который более выражен при добавлении донора газотрансмиттера монооксида азота (нитроглицерина) и не отмечается при введении сероводорода.

Ключевые слова: эритроциты, озон, газотрансмиттер, монооксид азота, сероводород

E.S. Biletskaya, V.V. Zinchuk, A.V. Muravyov

FEATURES OF THE ERYTHROCYTE RESPONSE TO THE ACTION OF OZONE

Abstract. The evaluation of the features of the erythrocyte response to the action of ozone in experiments *in vitro* was carried out. An increase in the effect of this gas on the parameters of oxygen transport in a suspension of erythrocytes was revealed, which is more pronounced with the addition of a donor of gas-transmitter nitrogen monoxide (nitroglycerin) and is not observed with the introduction of hydrogen sulfide.

Key words: erythrocytes, ozone, gas transmitter, nitrogen monoxide, hydrogen sulfide

Введение

Красные кровяные клетки участвуют в метаболизме газотрансмиттера монооксида азота (NO): его образовании и элиминации [1]. В гипоксических условиях существенным источником NO могут быть эритроциты. Кроме того, было показано, что данные клетки содержат 3-меркаптопирuvat, сульфотрансферазы и, следовательно, могут продуцировать газотрансмиттер сероводород (H₂S) [2]. Газотрансмиттеры NO и H₂S проявляют схожие, а иногда и взаимозависимые эффекты как *in vivo*, так и *in vitro*. Так, образование

нитрозилгемоглобина усиливается сульфидом и показывает наличие перекрестных взаимодействий между данными газотрансммиттерами в эритроцитах [3]. Одним из факторов, влияющих на систему газотрансммиттеров, является озон (O_3). Эта молекула влияет на функциональное состояние организма, в частности, на систему крови [4], за счет окислительной активности стимулирует антиоксидантную систему защиты, улучшает деформируемость эритроцитов. Проведённые ранее нами исследования доказывают эффект озона на кислородтранспортную функцию (КТФ) крови, который ещё больше увеличивается при добавлении нитроглицерина и проявляется в выраженном сдвиге кривой диссоциации оксигемоглобина вправо [5]. Данный газ проявляет свои эффекты, в том числе и за счёт воздействия на NO-генерирующую систему [6]. Однако, как известно, NO-синтазной активностью обладают не только эритроциты, но и лейкоциты, тромбоциты. В связи с этим особый интерес вызывает изучение особенностей непосредственно эритроцитарного ответа на действие озона при добавлении доноров газотрансммиттеров.

Цель

Оценить особенности эритроцитарного ответа на действие озона в опытах *in vitro* при модификации системы газотрансммиттеров.

Методика

Опыты были выполнены на суспензии эритроцитов. Исследование проводилось в соответствии рекомендациями комитета по биомедицинской этике и деонтологии учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет».

Образцы крови ($n=10$) были разделены на 4 аликвоты по 1,2 мл, которые центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут для разделения плазмы и эритроцитов, затем дважды промывали охлаждённым изотоническим раствором. К эритроцитарной массе добавляли озонированный изотонический раствор хлорида натрия в объёме 1 мл (в контроль без озонирования) и 0,1 мл растворов, содержащих газотрансммиттеры (в 3-ю – нитроглицерин в конечной концентрации 0,05 ммоль/л, 4-ю – гидросульфид натрия в конечной концентрации 0,38 ммоль/л), в остальные группы – изотонический раствор хлорида натрия, после чего пробы перемешивались. Время инкубации составляло 60 мин. Изотонический раствор хлорида натрия барбатировался озоно-кислородной смесью, которая создавалась озонотерапевтической установкой УОТА-60-01-Медозон (Россия).

После добавления озона на газоанализаторе Stat Profile pHOx plus L (США) при 37°C в крови определяли следующие показатели КТФ суспензии эритроцитов: парциальное давление кислорода (pO_2), степень оксигенации (SO_2) и кислотно-основного состояния: парциальное давление углекислого газа (pCO_2), стандартный бикарбонат (SBC), реальный/стандартный недостаток (избыток) буферных оснований (ABE/SBE), гидрокарбонат (HCO_3^-), концентрация водородных ионов (pH), общая углекислота плазмы крови (TCO_2). Сродство гемоглобина к кислороду (СГК) оценивали спектрофотометрическим методом по показателю $p50_{\text{реал}}$ (pO_2 крови при 50% насыщении ее кислородом). По формулам Severinghaus рассчитывали значение $p50_{\text{станд}}$.

Все показатели проверяли на соответствие признака закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. С учетом этого была использована непараметрическая статистика с применением программы "Statistica 10.0". Сравнение трех и более независимых групп проводили с помощью рангового дисперсионного анализа Крускала-Уоллиса. Достоверность полученных данных, с учетом размеров малой выборки, множественных сравнений, оценивалась с использованием U-критерия Манна-Уитни. При проведении парных сравнений уровней показателей внутри групп при повторных измерениях, использовали критерий Вилкоксона. Результаты представлены как медиана (Me), 25-й и 75-й квартильный размах. Уровень статистической значимости принимали за $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Добавление озона в эритроцитарную суспензию приводит к росту основных показателей КТФ суспензии эритроцитов, таких как SO_2 , pO_2 , $p50_{\text{реал}}$, $p50_{\text{станд}}$ и смещению кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО) (рис.) вправо в сравнении с контрольной группой.

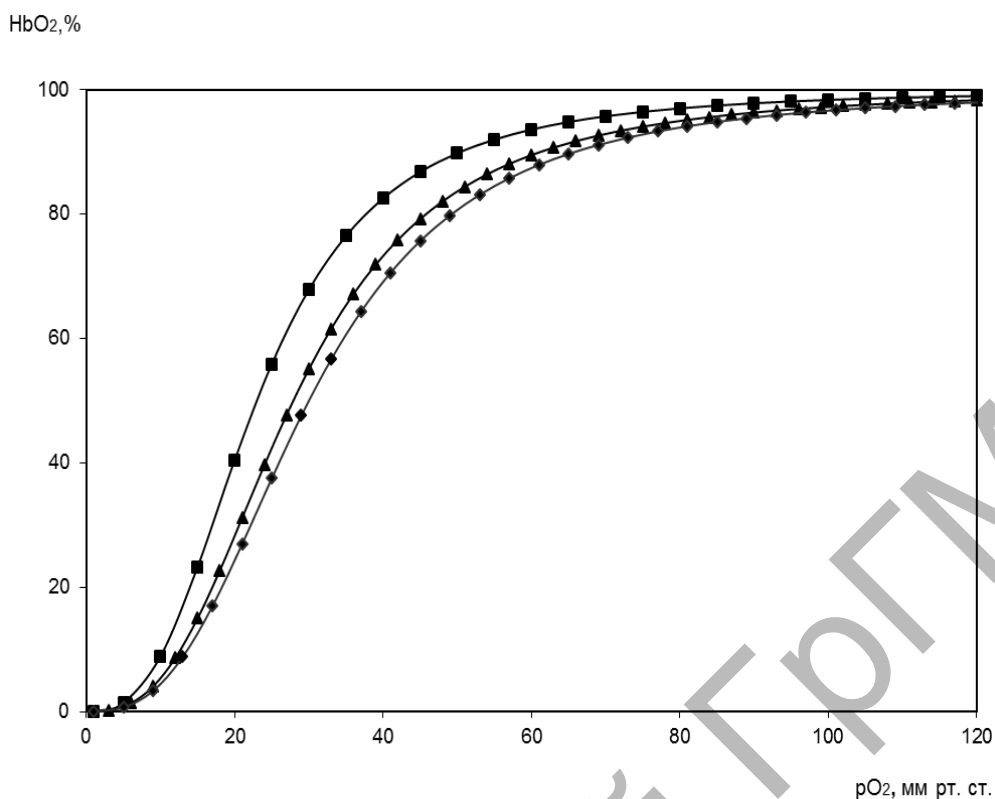


Рис. 1. Эффект озона на положение кривой диссоциации оксигемоглобина при реальных значениях pH и pCO₂ в условиях гипоксии. Обозначения: ■ - контроль; ▲ - эритроцитарная масса + озон; ◆- эритроцитарная масса + нитроглицерин + озон.

Отмечается увеличение SO₂ на 121,8% p<0,05; pO₂ на 74,1% p<0,05; показателя SGK p50_{реал} 21,43 % p<0,05. Подобная тенденция сохраняется и по отношению к p50_{станд.} При анализе параметров кислотно-основного баланса значимых изменений не выявлено. Нитроглицерин усиливает эффект данного газа на КТФ суспензии эритроцитов в заданных условиях, SO₂ и pO₂ увеличиваются на 12,54% p<0,05 и на 21,04% p<0,05 соответственно по отношению к группе в которую предварительно добавлялся озон. Показатель p50_{реал} возрастает на 7,5% p<0,05 и сдвиг КДО вправо становится более выраженным. Гидросульфид натрия не оказывает подобного эффекта.

Эритроциты являются важной мишенью для действия озона в сравнении с другими форменными элементами. Данный газ улучшает доставку кислорода за счёт гексозомонофосфатного шунта, способствуя активации 2,3-дифосфоглицерат (ДФГ) мутаза, что в итоге приводит к превращению 1,3-ДФГ в 2,3-ДФГ в эритроцитах, который связываясь с β-цепью гемоглобина может приводить к

сдвигу КДО вправо [7]. На наш взгляд, кроме данного механизма могут работать и другие, в частности, опосредованные газотрансммитерами. Эритроциты содержат эритроцитарную NO-синтазу, которая продуцирует NO [8]. Несмотря на большую реакционную способность гемоглобина при взаимодействии с NO, его родственные формы (нитриты, нитраты) обнаруживаются в плазме, однако при ингибировании эритроцитарной NO-синтазы концентрация нитритов и нитратов в плазме, значительно снижается, что доказывает факт экспорта NO из эритроцитов через анионообменник 1 в форме вторичных форм азота (например, нитрита), с которыми не может связаться гемоглобин, обеспечивая свободный пул NO [9]. Наши данные показывают, что эффект газотрансммитеров неоднозначен, так добавление экзогенного донора монооксида азота (нитроглицерина) усиливает влияние O₃ на КТФ эритроцитарной суспензии, а гидросульфид натрия подобным эффектом не обладает. Высвобождение NO из красных кровяных клеток регулируется изменениями pO₂ в крови [10], а наличие O₃, способствует росту данного параметра. Известно, что NO может оказывать влияние на изменение SGK [11].

Таким образом, полученные нами данные реализуются при участии газотрансммитеров, в частности, NO, но не H₂S, что и демонстрируют особенности эритроцитарного ответа на действие озона на показатели КТФ, за счёт влияния на NO-продуцирующую функцию красных кровяных клеток при добавлении донора монооксида азота (нитроглицерина).

Заключение

Физиологические эффекты O₃ реализуются через эритроцитарное звено, что проявляется в росте следующих показателей КТФ суспензии эритроцитов: pO₂, SO₂, p50_{реал} и p50_{станд}. Добавление нитроглицерина в заданных условиях приводит к усилению эффекта данного фактора на КТФ эритроцитов и более выраженному сдвигу КДО вправо, а гидросульфид натрия подобного действия не оказывает.

Финансирование. *Осуществляется в рамках международного проекта «БРФФИ–РФФИ-2020» (№ М20Р-428).*

Библиографический список

1. Kuhn V., Diederich L., Keller T.C. et al. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia // Antioxid Redox Signal. – 2017 – Vol. 26, № 13. – P. 718-742.

2. Cortese-Krott M.M. Red Blood Cells as a "Central Hub" for Sulfide Bioactivity: Scavenging, Metabolism, Transport, and Cross-Talk with Nitric Oxide // *Antioxid Redox Signal.* – 2020. – Vol. 33, № 18. – P.1332-1349.

3. Bianco C.L., Savitsky A., Feelisch M. et al. Investigations on the role of hemoglobin in sulfidemetabolism by intact human red blood cells // *Biochem Pharmacol.* – 2018. – Vol. 149. – P. 163–173.

4. Lacerda A.C., Grillo R., Martins C.B. et al. Efficacy of biostimulatory ozone therapy: Case report and literature review // *J Cosmet Dermatol.* – 2022. – Vol. 21, № 1. – P. 130-133.

5. Зинчук В.В., Билецкая Е.С. Особенности влияния озона на кислородзависимые процессы крови при гипоксических условиях // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция.* – 2021. – Т. 20, № 3. – С. 70–76.

6. Зинчук В. В. Эффект озона на кислородтранспортную функцию и прооксидантно-антиоксидантный баланс крови в условиях воздействия на NO-генерирующую систему в опытах *in vitro* // *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова.* – 2021. – Т. 107, № 1. – С. 16-27.

7. Bocci V. How a calculated oxidative stress can yield multiple therapeutic effects // *Free Radic Res.* – 2012. – Vol. 46, № 9. – P. 1068-1075.

8. Kishimoto S., Maruhashi T., Kajikawa M. et al. Hematocrit, hemoglobin and red blood cells are associated with vascular function and vascular structure in men // *Sci Rep.* – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 11467.

9. Richardson K.J., Kuck L., Simmonds M.J. Beyond oxygen transport: active role of erythrocytes in the regulation of blood flow // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2020. – Vol. 319, № 4. – P. 866-872.

10. Zheng S., Krump N.A., McKenna M.M. et al. Regulation of erythrocyte $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransport by an oxygen-switched kinase cascade // *J Biol Chem.* – 2019. – Vol. 294, № 7. – P. 2519-2528.

11. Tsai A.G., Intaglietta M., Sakai H. et al. Microcirculation and NO-CO studies of a natural extracellular hemoglobin developed for an oxygen therapeutic carrier // *Curr Drug Discov Technol.* – 2012. – Vol. 9, № 3. – P. 166-172.

*Е.И. Бонь, Н.Е. Максимович, И.К. Дремза, А.Д. Маркова,
А.Г. Родцевич*

НАРУШЕНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ДЫХАНИЯ НЕЙРОНОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС С НЕОДНОМОМЕНТНОЙ ПЕРЕВЯЗКОЙ ОБЩИХ СОННЫХ АРТЕРИЙ

Аннотация. Митохондрии играют ключевую роль в жизнедеятельности нейронов, которые нуждаются в постоянном поступлении АТФ. Цель работы – провести сравнительный анализ дыхания митохондрий гомогенатов головного мозга крыс со ступенчатой субтотальной церебральной ишемией с различной продолжительностью между перевязками обеих общих сонных артерий. Эксперименты выполнены на 24 самцах беспородных белых крыс массой 260 ± 20 г. Моделирование ишемии головного мозга осуществляли в условиях внутривенного тиопенталового наркоза (40-50 мг/кг). Ступенчатую субтотальную ишемию осуществляли путем последовательной перевязки обеих общих сонных артерий с интервалом 7 суток (подгруппа 1), 3-е суток (подгруппа 2) или 1 сутки (подгруппа 3). Проведенные исследования показали зависимость тяжести повреждения головного мозга от интервала между прекращением кровотока. При 7-суточном промежутке происходило включение компенсаторных механизмов, которые препятствовали развитию существенных нарушений энергообмена.

Ключевые слова: митохондрии, нейроны, ишемия головного мозга

*E.I. Bon, N.E. Maksimovich, I.K. Dremza, A.D. Markova,
A.G. Rodtsevich*

DISTURBANCES IN MITOCHONDRIAL RESPIRATION OF RATS BRAIN NEURONS WITH NON-SIMULTE LONGATION OF THE COMMON CAROTID ARTERIES

Abstract. Mitochondria play a key role in the life of neurons, which need a constant supply of ATP. The aim of this work is to carry out a

comparative analysis of mitochondrial respiration in brain homogenates of rats with graded subtotal cerebral ischemia with different duration between ligation of both common carotid arteries. Experiments were performed on 24 male outbred white rats weighing 260 ± 20 g. Modeling of cerebral ischemia was performed under conditions of intravenous thiopental anesthesia (40-50 mg/kg). Stepwise subtotal ischemia was performed by sequential ligation of both common carotid arteries with an interval of 7 days (subgroup 1), 3 days (subgroup 2) or 1 day (subgroup 3). The conducted studies have shown the dependence of the severity of brain damage on the interval between the cessation of blood flow. With a 7-day interval between dressings, compensatory mechanisms were switched on, which prevented the development of significant disturbances in energy metabolism.

Key words: mitochondria, neurons, cerebral ischemia

Введение. Митохондрии играют ключевую роль в жизнедеятельности клетки. Наиболее характерной их особенностью является наличие большого числа ферментов, участвующих в окислительном фосфорилировании и снабжении клетки энергией [3,4,5]. Кроме того, митохондрии участвуют в хранении и передаче наследственной информации, апоптозе и пластических процессах [1,6].

Энергетические потребности головного мозга, необходимые для нормальной функциональной активности нейронов, составляют примерно 1046 Дж или 250 кал в минуту, обеспечиваются на 95% за счет аэробного гликолиза [3,6]. В связи с тем, что основной путь получения энергии в головном мозге – аэробный распад глюкозы, его потребность в кислороде, по сравнению с таковой у других органов, чрезвычайно велика.

Цель

Провести сравнительный анализ дыхания митохондрий гомогенатов головного мозга крыс со ступенчатой субтотальной церебральной ишемией с различной продолжительностью между перевязками обеих общих сонных артерий.

Методика

Эксперименты выполнены на 24 самцах беспородных белых крыс массой 260 ± 20 г с соблюдением требований Директивы Европейского Парламента и Совета № 2010/63/EU от 22.09.2010 о защите животных, используемых для научных целей. Моделирование ишемии головного мозга (ИГМ) осуществляли в

условиях внутривенного тиопенталового наркоза (40-50 мг/кг). Ступенчатую субтотальную ИГМ (ССИГМ) осуществляли путем последовательной перевязки обеих ОСА с интервалом 7 суток (подгруппа 1, n=6), 3-е суток (подгруппа 2, n=6) или 1 сутки (подгруппа 3, n=6) [2]. Взятие материала осуществляли через 1 час после перевязки второй ОСА в каждой из подгрупп. Контрольную группу составили ложно оперированные крысы аналогичных пола и веса. Для исследования митохондриального дыхания головной мозг извлекали на холоде (0-4°C), осушали фильтровальной бумагой, взвешивали и гомогенизировали в среде выделения, содержащей 0,32 М сахарозы, 10 mM Трис-НСl, 1 mM ЭДТА, pH 7,4 (в соотношении 1:10), используя гомогенизатор Поттера-Эвельгейма с тефлоновым пестиком согласно модифицированному методу [7,8]. Митохондрии изолировали методом дифференциального центрифугирования [7]. Для изучения митохондриального дыхания концентрированную суспензию митохондрий вносили в термостатируемую герметичную полярографическую ячейку объемом 3,0 мл со средой инкубации в количестве, обеспечивающем конечную концентрацию белка в ячейке 1 мг/мл. Инкубационная среда для регистрации дыхания митохондрий включает 0,17 М сахарозу, 40 mM KCl, 10 mM Трис-НСl, 5 mM KH_2PO_4 , 8 mM KHCO_3 , 0,1 mM ЭДТА, pH 7,4. Использование растворов субстратов сукцината и комплекса малата/глутамат позволяет оценить степень функциональной активности цепи переноса электронов (ЦПЭ) в митохондриях в целом, в особенности – I и II комплекса ЦПЭ. Так как в эксперименте использованы малые выборки, которые имели ненормальное распределение, анализ проводили методами непараметрической статистики с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 10.0 для Windows (StatSoft, Inc., США). Данные представлены в виде Me (LQ; UQ), где Me – медиана, LQ – значение нижнего квартиля; UQ – значение верхнего квартиля. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$ (тест Крускала-Уоллиса с поправкой Бонферони) [9].

Результаты и обсуждение

При изучении дыхания митохондриальной фракции гомогенатов головного мозга крыс со ступенчатой церебральной ишемией были получены следующие данные. По сравнению с группой «контроль», в присутствии малата/глутамата в 1-й подгруппе ССИГМ наблюдалось увеличение V_2 на 46(39;56)%, $p < 0,05$ и коэффициента дыхательного

контроля на 56(51;63)%, $p < 0,05$, указывая на активацию транспорта протонов водорода через АТФ-синтазный комплекс. Остальные показатели не изменялись ($p > 0,05$). В присутствии сукцината в 1-й подгруппе ССИГМ с интервалом между перевязками обеих общих сонных артерий 7 суток, отмечалось увеличение показателей V_1 , V_4 на 45(39;52) %, $p < 0,05$ и на 47(37;55)%, $p < 0,05$, соответственно, коэффициента дыхательного контроля – на 48(41;56)%, $p < 0,05$. По сравнению с группой «контроль», во 2-й подгруппе ССИГМ с интервалом между перевязками 3 суток, в присутствии субстрата «малат/глутамат» отмечалось только уменьшение V_4 на 49(32;54)%, $p < 0,05$. Показатели V_2 и V_4 были меньше на 58(42;69)%, $p < 0,05$, а коэффициент фосфорилирования – на 50(41;65)%, $p < 0,05$. В присутствии сукцината, происходило уменьшение скоростей V_2 , V_3 и V_4 на 61(51;69)%, $p < 0,05$, 48(40;52)%, $p < 0,05$ и 30(28;39)%, $p < 0,05$, соответственно. По сравнению с 1-й подгруппой ССИГМ, во 2-й подгруппе наблюдалось уменьшение V_2 – на 67(52;74)%, $p < 0,05$, V_4 – на 58(49;68)%, $p < 0,05$ и коэффициента дыхательного контроля – на 60(52;74)%, $p < 0,05$. В 3-й подгруппе ССИГМ с минимальным интервалом между перевязками обеих ОСА 1 сутки, по сравнению с группой «контроль» в присутствии сукцината, происходило уменьшение скоростей V_2 , V_3 и V_4 на 52(43;65)%, $p < 0,05$, 61(52;69)%, $p < 0,05$ и 65(58;71)%, $p < 0,05$, соответственно. Уменьшились также коэффициент дыхательного контроля на 42(37;49)%, $p < 0,05$ и коэффициент фосфорилирования на – 37(28;45)%, $p < 0,05$. По сравнению с показателями в 1-й подгруппе (интервал между перевязками ОСА 7 суток), в 3-й подгруппе ССИГМ (интервал между перевязками ОСА 1 сутки), в присутствии субстрата «малат/глутамат» показатели V_2 , V_3 и V_4 уменьшились на 46(34;52)%, $p < 0,05$, 52(41;64)%, $p < 0,05$ и 72(61;82)%, $p < 0,05$, соответственно. Также отмечалось уменьшение коэффициента фосфорилирования на 30(19;45)%, $p < 0,05$. По сравнению с 1-й подгруппой ССИГМ скорости V_2 , V_3 и V_4 были меньше на 71(63;84)%, $p < 0,05$; на 43(38;51)%, $p < 0,05$ и на 79(67;86)%, $p < 0,05$, соответственно, а коэффициент фосфорилирования – на 50(41;65)%, $p < 0,05$. В присутствии сукцината происходило уменьшение скоростей V_1 , V_2 , V_3 на 57(49;68)%, $p < 0,05$ и V_4 на 80(71;95)%, $p < 0,05$ и 66(52;74)%, $p < 0,05$. Уменьшились также коэффициенты акцепторного контроля – на 43(39;48)%, $p < 0,05$, дыхательного контроля – на 72(62;83)%, $p < 0,05$ и коэффициент фосфорилирования – на 43(29;54)%, $p < 0,05$.

По сравнению со 2-й подгруппой, в 3-й подгруппе ССИГМ, в присутствии обоих используемых субстратов показатели дыхания митохондриальной фракции гомогенатов головного мозга существенно не изменялись ($p>0,05$), что указывает на равнозначность нарушений I и II комплексов переноса электронов во 2-й и 3-й подгруппах ССИГМ. При ишемии головного мозга происходит повреждение внутренней митохондриальной мембраны вследствие активации процессов свободнорадикального окисления, затем происходит повышение ее проницаемости и снижение уровня протонного градиента из-за перехода протонов по градиенту концентрации через образующиеся неспецифические поры в митохондриальный матрикс. В результате снижается эффективность синтеза АТФ, а для поддержания межмембранного потенциала в этих условиях требуется больше субстратов и кислорода. При перевязке обеих ОСА с интервалом 3 суток гистологические изменения были не столь выраженными, как в подгруппе 3 – клеток с перичеллюлярным отеком не наблюдалось. При перевязке с интервалом 7 суток патологических изменений было еще меньше: соотношение нейронов по степени хроматофилии цитоплазмы и размеры перикарионов нейронов отличались несущественно от значений показателя в контрольной группе. У этих же животных параметры дыхания митохондриальной фракции гомогенатов головного мозга нормализовались, а некоторые даже превысили уровень контроля, что может быть связано с запуском ряда компенсаторных процессов: увеличения синтеза цитохромов, ферментов цикла Кребса, образования митохондрий, восстановления их крист, повышения эффективности процессов утилизации кислорода и субстратов окисления и доставки их к митохондриям, вследствие морфофункциональных изменений, перестройки митохондриальных ферментных комплексов, активации ферментов окисления и фосфорилирования, увеличения степени сопряжения процессов окисления и фосфорилирования адениннуклеотидов (АДФ, АМФ, креатина), активации гликолитического пути окисления, увеличения синтеза нуклеиновых кислот и белков, транспорта O_2 и субстратов обмена веществ, а также экономного использования кислорода и субстратов обмена веществ в реакциях биологического окисления и пластических процессах, увеличения эффективности реакций анаэробного ресинтеза АТФ и активности анаболических процессов [3, 10].

Таким образом, проведенные исследования показали зависимость тяжести повреждения головного мозга при ССИГМ от интервала между прекращением кровотока по обеим ОСА. При 7-суточном промежутке между перевязками ОСА происходило включение компенсаторных механизмов, которые препятствовали развитию существенных нарушений энергообмена, приводя к менее выраженным морфологическим нарушениям и степени неврологического дефицита. При перевязке ОСА с интервалом 1 сутки степень нарушения энергообмена была максимальной, что указывает на недостаточность реализации компенсаторных механизмов.

Библиографический список

1. Бонь Е.И., Максимович Н.Е. Морфофункциональная характеристика митохондрий и иммуногистохимические подходы к их изучению // Сибирский медицинский журнал. – 2019. – № 4. – С. 5–11.
2. Бонь Е.И., Максимович Н.Е. Способы моделирования и морфофункциональные маркеры ишемии головного мозга // Биомедицина. – 2018. – № 2. – С. 59–71.
3. Максимович Н.Е., Бонь Е.И., Зиматкин С.М. Головной мозг крысы и его реакция на ишемию : монография. – Гродно : ГрГМУ, 2020. – 240 с.
4. Holvoet P. Low Cytochrome Oxidase 1 Links Mitochondrial Dysfunction to Atherosclerosis in Mice and Pigs // PLoS One. – 2017. – Vol. 12. – P. 307–312.
5. Hackenbrock C.R. Lateral diffusion and electron transfer in the mitochondrial inner membrane // Trends Biochemistry. – 1981. – Vol. 15. – P. 151–154.
6. Baertling F. NDUFA9 point mutations cause a variable mitochondrial complex I assembly defect // Clinical Genet. – 2018. – Vol. 93. – P. 111–118.
7. Барковский Е.В., Бокуть С.Б., Бородинский А.Н., Буко В.У., Дорошенко Е.М., Дремза И.К. и др. Современные проблемы биохимии. Методы исследований. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 491 с.
8. Boumans H., Grivell L.A., Berden J.A. The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273. – P. 4872–4877.
9. Батин Н.В. Компьютерный статистический анализ данных :

учеб.- метод. пособие. – Минск : Ин-т подгот. науч. кадров НАН Беларуси, 2008. – 160 с.

10.Chan P.H. Mitochondria and neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia // Neurochem. Res. – 2004. – Vol. 29. – P. 1943–1949.

УДК 616.98:578.834.1]:616.24-008.4]-083-056.257

В.П. Водоевич¹, М.К. Рудницкий², Ю.Е. Харук², Е.В. Шульга¹

НЕ ВСЕМ ПАЦИЕНТАМ С ПНЕВМОНИЕЙ ПОКАЗАНА «ПРОН-ПОЗИЦИЯ»

Аннотация. Коронавирусная инфекция (SARS COV-2) на сегодняшний день остается актуальной проблемой во всем мире. Согласно современным рекомендациям, в лечении коронавирусной пневмонии важное место занимает «прон-позиция». Необходим дифференцированный подход к широкому использованию «прон-позиции» в терапии.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция, пациент, «прон-позиция»

V.P. Vodoyevich¹, M.K. Rudnitskiy², YU.Ye. Kharuk², Ye.V. Shul'ga¹

NOT ALL PATIENTS WITH PNEUMONIA ARE INDICATED IN THE «PRON POSITION»

Abstract. Coronavirus infection (SARS COV-2) today remains an urgent problem throughout the world. According to modern requirements, an important place in the treatment of coronavirus infection patients is occupied by patients - "prone position". Implementation of a differentiated approach to the use of "prone position" in therapy.

Key words: coronavirus infection, patient, prone-position

Актуальность. Главной причиной летального исхода у пациентов с коронавирусной пневмонией является развитие острой дыхательной недостаточности. Поэтому, наряду с медикаментозной терапией, актуальным является изучение положения пациента в кровати, при котором ему будет легче дышать.

Цель

Доказать, что не всем пациентам, в частности, с тяжелым течением пневмонии, диффузным поражением легких, показана «прон-позиция», т.к. происходит нарастание дыхательной недостаточности.

Методика

Обычно, при патологии легких сам пациент для облегчения дыхания выбирает положение (занимает вынужденное положение): при бронхиальной астме – сидя, при поражении плевры – на больном боку для уменьшения боли и т.д. Вопрос о «прон-позиции», методике ее проведения возник во время коронавирусной инфекции, когда МЗ РБ был издан приказ № 296 от 16.03.2020 [1]. В нем указано, что «прон-позиция» это укладывание пациента, находящегося на искусственной вентиляции легких (ИВЛ), на живот с целью улучшения легочного кровотока и вентиляции тех зон легких, которые остаются гиповентилируемыми в положении пациента на спине. Вентиляция в положении на животе приводит к рекрутированию альвеол, расправлению ателектазов без создания повышенного давления в дыхательных путях, улучшению оксигенации.

Действительно, при положении пациента на спине плохо вентилируются задне-нижние отделы легких, поэтому при локализации пневмонии в этих отделах оправдана «прон-позиция». У пациентов, находящихся на ИВЛ, положение в кровати должно периодически меняться, чтобы не было пролежней. Дело в том, что в последующих приказах (№ 340, 378, 400, 557, 615, 1106 за 2020 год, № 900 за 2021 год, № 20, 36, 75 за 2022 год) указывается о необходимости применения «прон-позиции» у всех пациентов с пневмонией, независимо от тяжести течения, объема поражения легких, локализации процесса. При чем, положение в «прон-позиции» рекомендуется до 16 часов в сутки, и при этом не указывается, что это должны быть пациенты, находящиеся на ИВЛ.

В нашем исследовании были привлечены пациенты в основном старше 65 лет, находящихся в разных отделениях 2-й городской клинической больницы г. Гродно весной и летом 2021 г. Все отделения были перепрофилированы для лечения коронавирусной инфекции (360 коек). У пациентов с пневмонией, ассоциированной с COVID-19, исследовались число дыханий и насыщение крови кислородом, а также самочувствие пациентов до переворачивания на живот и после переворачивания. Причем, после переворачивания эти

данные исследовались через 20-30', чтобы исключить влияние физической нагрузки. Пациенты были с разной степенью тяжести пневмонии, т.е. по КТ данным определялся различный объем поражения легочной ткани.

Результаты и обсуждение. Первые исследования были произведены в отделении реанимации и ЛОР-отделении (20 пациентов). Выявлено, что в «прон-позиции» у пациентов с тяжелым течением пневмонии и поражением более 70% легочной ткани число дыханий увеличивалось на 3-4 дыхания в 1', а также уменьшалось и насыщение крови кислородом на 2-3%. Сами пациенты отмечали ухудшение самочувствия, усиление одышки и сердцебиения, поэтому в этой позиции они находились не более 30 минут и переворачивались на спину. У пациентов, с поражением легких менее 30% эти показатели не изменились.

Ухудшение состояния пациентов в «прон-позиции» физиологически объяснимо. При вдохе расширение грудной клетки происходит в основном спереди. При лежании на животе вдох затрудняется, т.к. во время вдоха надо грудную клетку «отжать от матраса» и приподнять массу своего тела. «Прон-позиция» особенно противопоказана у пациентов с избыточным весом, который во время вдоха надо приподнимать.

Выводы. «Прон-позицию» при лечении пневмоний следует применять дифференцированно. При поражении в нижне-задних отделах легких «прон-позиция» показана. При диффузном поражении легких, более 70%, особенно у пациентов с избытком массы тела, она противопоказана, т.к. усиливается дыхательная недостаточность, что может привести к развитию осложнений и неблагоприятному исходу.

Библиографический список

1. Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 16.03.2020 № 296 "О мерах по организации оказания медицинской помощи пациентам с признаками респираторной инфекции и принятию дополнительных противоэпидемических мер в организациях здравоохранения" / режим доступа: <https://belmapo.by/normativnyie-dokumentyi-ministerstva-zdravooxraneniya-respubliki-belarus-po-infekczii-covid-19.html>

С.В. Глуткин, В.В. Зинчук, И.Э. Гуляй, А.С. Щурко

**КИСЛОРОДНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ КРОВИ КРЫС
ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ В УСЛОВИЯХ
ВВЕДЕНИЯ МЕЛАТОНИНА И МОДУЛЯТОРОВ
СОДЕРЖАНИЯ ОКСИДА АЗОТА**

Аннотация. В нашем исследовании выявлены эффекты моно и комбинированного назначения модуляторов продукции сероводорода при участии мелатонина на кислородное обеспечение при окислительном стрессе. Данное влияние связано с регулированием содержания кислорода в крови, действием на респираторный или метаболический компоненты кислотно-основного состояния, изменениями внутриэритроцитарных механизмов, включением защитно-компенсаторных процессов адаптации.

Ключевые слова: гипоксия, мелатонин, сероводород, кровь

S.V. Hlutkin, V.V. Zinchuk, I.E. Gulai, A.S. Shchurko

**BLOOD OXYGEN SUPPLY OF RATS IN OXIDATIVE STRESS
UNDER ADMINISTRATION OF MELATONIN AND
MODULATORS OF THE CONTENT OF NITRIC OXIDE**

Abstract. Our study presents the effects of mono and combined administration of modulators of nitric oxide production with the participation of melatonin on oxygen supply under oxidative stress. This influence is associated with the regulation of the oxygen content in the blood, the effect on the respiratory or metabolic components of the acid-base state, changes in intra-erythrocytic mechanisms, activation of protective-compensatory adaptation processes.

Keywords: hypoxia, melatonin, hydrogen sulfide, blood

Введение. Изучение механизмов клеточного ответа и адаптации на изменения концентрации кислорода продолжает вызывать интерес у ученых и специалистов медицинских профессий [1]. Важным является поиск способов профилактики и повышения защитно-адаптационных механизмов организма в условиях гипоксических состояний. Воздействуя на L-аргинин-NO систему, можно изменять

уровень монооксида азота, и тем самым его физиологические эффекты [2]. Цель данной работы – изучить кислородное обеспечение крови крыс при окислительном стрессе в условиях введения мелатонина и модуляторов содержания оксида азота.

Методика. Эксперименты были выполнены на 90 крысах-самцах массой 220–300 г. Животные были разделены на 7 групп: 1-ая – контроль (интактные животные), 2-ая – гипоксия, 3-ья – мелатонин+гипоксия, 4-ая – L-аргинин+гипоксия, 5-ая – мелатонин+L-аргинин+гипоксия, 6-ая – L-NAME+гипоксия, 7-ая – мелатонин+L-NAME +гипоксия. Через 30 минут после внутрибрюшинного введения веществ животных помещали в камеру и подвергли однократному гипоксическому воздействию. В условиях адекватного наркоза проводили забор смешанной крови из правого предсердия сразу после извлечения крысы из камеры. На анализаторе газов крови «Stat Profile pHox plus L» (USA) определяли показатели кислородтранспортной функции крови (КТФ) и кислотно-основного состояния (КОС). Активность свободнорадикальных процессов оценивали по содержанию первичных (ДК), триеновых конъюгатов (ТК), и промежуточных (МДА) продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Содержание неферментативных и ферментативных компонентов антиоксидантной системы оценивали по содержанию восстановленного глутатиона (GSH), церулоплазмينا, активности каталазы. Определение газотрансмиттеров: суммарное содержание нитрат/нитритов и концентрация H_2S . Для анализа результатов использовали методы непараметрической статистики (Н-критерий Краскела-Уоллиса, U-критерий Манна-Уитни, Т-критерий Уилкоксона), коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r).

Результаты и их обсуждение. Введение мелатонина до гипоксического воздействия приводит к сохранению значения $p50_{\text{реал}}$ (23,89 [20,26;29,23], мм рт. ст., $p<0,05$) на уровне контрольной группы, чем у крыс «гипоксия» (34,97 [23,76;40,78] мм рт. ст.). Значения других показателей ($p50_{\text{станд}}$, $p\text{O}_2$ и $p\text{CO}_2$) снижаются. Введение L-аргинина и последующее гипоксическое воздействие приводит к снижению $p\text{O}_2$ до 10,3 [6,3;13,5] мм рт. ст. ($p<0,05$) в сравнении с группой «гипоксия» (14,4 [13,7;16] мм рт. ст.). Комбинация препаратов мелатонин и L-аргинин понижает $p50_{\text{реал}}$ (24,69 [18,41;25,37] мм рт. ст., $p<0,05$) против животных, подвергнутых только действию низкой концентрации кислорода (34,97 [23,76;40,78] мм рт. ст.). У крыс группы «L-NAME+гипоксия»

параметры $p50_{\text{реал}}$ и pO_2 имеют более высокий уровень (28,68 [24,99;34,89] мм рт. ст. ($p<0,05$) и 16,1 [13,5;28,9] мм рт. ст. ($p<0,05$), соответственно) относительно группы «мелатонин+гипоксия» (таблица 3). Совместное введение мелатонина и L-NAME характеризуется снижением $p50_{\text{реал}}$ (28,94 [27,26;31,4] мм рт. ст., $p<0,05$) в сравнении с «гипоксия» (34,97 [23,76;40,78] мм рт. ст.), но более высоким значением ($p<0,05$) чем у «мелатонин + гипоксия» (23,89 [20,26;29,23] мм рт. ст.). Также комбинация данных веществ обеспечивает более высокий уровень pO_2 (17,95 [14,3;27,5] мм рт. ст.).

Гипоксическое воздействие приводит к нарушению КОС, смещению в сторону увеличения кислотности крови. Развивающийся метаболический ацидоз обусловлен, в первую очередь, снижением pH (7,073 [6,889;7,112], $p<0,05$), pCO_2 (41,2 [37,9;49,7] мм рт. ст., $p<0,05$) и HCO_3^- (11,4 [7,9;13], $p<0,05$), а также уменьшением TCO_2 , ABE, SBE и SBC. Введение мелатонина в меньшей степени приводит к понижению параметров КОС в сравнении с группой «гипоксия» ($p<0,05$). Выявлено, что уровень pH уменьшается в 4, 6, 7 относительно контроля. Низкая концентрация кислорода во вдыхаемом воздухе приводит к снижению других показателей КОС во всех экспериментальных группах. В то же время наиболее высокие значения данных параметров в группе «мелатонин+L-аргинин+гипоксия». В группе «гипоксия» наблюдается увеличение продуктов ПОЛ в эритроцитах: ДКэр – 23,76 [22,68;24,48] $\Delta D_{278}/\text{мл}$ ($p<0,05$), ТКэр – 14,28 [12,96;15,12] $\Delta D_{278}/\text{мл}$ ($p<0,05$), МДАэр – 7,63 [6,83;9,47] мкмоль/л ($p<0,05$), в сравнении с контролем. Назначение мелатонина приводит к снижению первичных продуктов ПОЛ (20,94 [17,76;22,2] $\Delta D_{278}/\text{мл}$, ($p<0,05$) и 10,935 [9,665;13,02] $\Delta D_{278}/\text{мл}$ ($p<0,05$)) в эритроцитах относительно группы «гипоксия».

Введение L-аргинина вместе с мелатонином способствует уменьшению уровней ДКэр (20,84 [17,33;23,52] $\Delta D_{278}/\text{мл}$, $p<0,05$) и ТКэр (11,9 [10,33;12,84] $\Delta D_{278}/\text{мл}$, $p<0,05$) в эритроцитах в сравнении с животными, подвергнутыми только гипоксическому воздействию. Назначение L-NAME приводит к снижению концентрации продуктов ПОЛ в плазме крови крыс (ДКпл – 0,59 [0,55;0,77] $\Delta D_{278}/\text{мл}$, $p<0,05$; ТКпл – 0,57 [0,55;0,625] $\Delta D_{278}/\text{мл}$, $p<0,05$; МДАпл – 1,66 [1,4105;2,538] мкмоль/л, $p<0,05$), а комбинированное введение L-NAME и мелатонина понижением их в эритроцитах (ДКэр – 18,78

[15;20,28] $\Delta D_{278}/\text{мл}$, $p < 0,05$, ТКэр – 12 [9,48;12,6] $\Delta D_{278}/\text{мл}$, $p < 0,05$) относительно группы «гипоксия».

Гипоксическое воздействие уменьшает содержание восстановленного глутатиона (44,22 [37,66;48,16] мкмоль/г Нб, $p < 0,05$) в сравнении с контролем (55,25 [51,11;58,9] мкмоль/г Нб). Введение мелатонина увеличивает уровень восстановленного глутатиона (52,77 [49,26;56,9] мкмоль/г Нб, $p < 0,05$) и снижает активность каталазы (14,73 [13,06;15,6] ммоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{мин/г}$ Нб, $p < 0,05$) относительно группы «гипоксия». В группе «мелатонин + L-аргинин + гипоксия» содержание восстановленного глутатиона имеет более высокое значение (53,5 [46,54;54,46] мкмоль/г Нб, $p < 0,05$), а активность каталазы – меньший уровень (14,39 [7,5;16,9] ммоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{мин/г}$ Нб, $p < 0,05$), чем у животных, подвергнутых только действию низкой концентрации кислорода, и группы «L-аргинин + гипоксия».

После гипоксического воздействия наблюдается повышение суммарного содержания нитрат/нитритов (23,82 [21,13;27,94] мкмоль/л, $p < 0,01$) и снижение концентрации сероводорода (6,76 [6,36;8,67] мкмоль/л, $p < 0,05$) в плазме в сравнении с контролем (17,15 [14,5;19,12] мкмоль/л и 7,81 [7,6;10,63] мкмоль/л, соответственно). Введение мелатонина увеличивает уровень сероводорода (9,995 [8,635;12,16] мкмоль/л, $p < 0,01$) относительно группы «гипоксия». Модификация L-аргинин-NO системы приводит к повышению суммарного содержания нитрат/нитритов как после введения L-NAME (35,29 [31,47;38,23] мкмоль/л, $p < 0,001$), так и после комбинации мелатонин и L-NAME (20,05 [17,43;21,37] мкмоль/л, $p < 0,05$) чем у гипоксических животных.

Увеличивает концентрацию сероводорода в плазме крыс совместное назначение мелатонина с L-аргинином (11,2 [10;13,81] мкмоль/л, $p < 0,001$) и L-NAME (11,59 [8,91;13,63] мкмоль/л, $p < 0,01$) в сравнении с группой «гипоксия». Введение мелатонина до гипоксии понижает р50реал, улучшает показатели КОС, снижает активность процессов ПОЛ в эритроцитах, что может быть связано и с участием в этих процессах сероводорода. Установлены в этой группе корреляционные связи между р50станд и р50реал ($r=0,86$), уровнем сероводорода ($r=0,59$), HCO_3^- ($r=0,55$), TCO_2 ($r=0,56$), АВЕ ($r=0,54$), а также между МДАэр и Нб ($r=0,63$), сероводород ($r=0,67$). Назначение L-аргинина уменьшает pO_2 , что может быть обусловлено через диссоциацию оксигемоглобина и NO продукцию (р50реал и р50станд

($r=0,58$), pO_2 ($r=0,81$), нитрат/нитриты ($r=-0,71$)); снижает нарушения КОС. Сочетание мелатонина с L-аргинином приводит к поддержанию механизмов компенсаторно-приспособительного характера: понижение $p50_{реал}$, дисбаланса КОС, продукции продуктов ПОЛ в эритроцитах. Количество NO будет зависеть от образования первичных продуктов ПОЛ в эритроцитах ($r=0,63$) и сродства гемоглобина к кислороду при реальных условиях среды ($r=-0,61$). Введение L-NAME сопровождается снижением активности свободнорадикальных процессов в плазме крыс, что, вероятно, будет связано с реакциями, регулирующими продукцию NO ($r=0,74$) и сероводорода ($r=0,92$). Комбинация мелатонина и L-NAME уменьшает SGK при стандартных условиях среды, улучшает параметры КОС, снижает образование первичных продуктов ПОЛ в эритроцитах. Установлена корреляция между ДКэр и ТКэр ($r=0,92$), восстановленным глутатионом ($r=0,71$), сероводородом ($r=-0,71$). Полученные данные будут важны для обоснования вклада модуляторов продукции монооксида азота на процессы транспорта кислорода кровью, обеспечивающих потребление, доставку и утилизацию кислорода в организме, в компенсацию и декомпенсацию аэробного метаболизма, и разработку методов коррекции его нарушений в условиях гипоксии.

Библиографический список

1. Сороко С.И. Значение стресс-реакции в интегративном ответе организма человека на острое гипоксическое воздействие // Вестник образования и развития науки Российской академии естественных наук. – 2016. – Т. 20, № 4. – С. 88-95.

2. Mader M.M., Czorlich P. The role of L-arginine metabolism in neurocritical care patients // Neural. Regen. Res. – 2022. – Vol. 17, № 7. – P. 1446-1445.

УДК 578.834:616.24-002.6

Н.В. Глуткина¹, Вл. В. Зинчук²

СОДЕРЖАНИЕ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ У ПАЦИЕНТОВ С САРКОИДОЗОМ БЕКА

Аннотация. Определялось содержание газотрансмиттеров монооксида азота и сероводорода у пациентов с саркоидозом Бека. На

основании проведенных исследований установлено, что при саркоидозе отмечается увеличение концентрации монооксида азота и снижение сероводорода, что имеет значение для обеспечения процессов массопереноса кислорода к тканям.

Ключевые слова: кислородтранспортной функции крови, саркоидоз, монооксид азота, сероводород

N.V. Glutkina¹, Vl. V Zinchuk²

OXYGEN TRANSPORT FUNCTION OF BLOOD IN CORONAVIRUS INFECTION

Abstract. The content of gas transmitters nitric monoxide and hydrogen sulfide was determined in patients with Beck's sarcoidosis. Based on the studies, it was found that in sarcoidosis there is an increase in the concentration of nitrogen monoxide and a decrease in hydrogen sulfide, which is important for ensuring the processes of oxygen mass transfer to tissues.

Key words: oxygen transport function of blood, sarcoidosis, nitric oxide, hydrogen sulfide

Введение

На сегодняшний день саркоидоз рассматривается как фенотипически гетерогенное мультисистемное доброкачественное воспалительное заболевание неизвестной этиологии, отличительным морфологическим признаком которого является наличие эпителиоидноклеточной неказеозной гранулемы в одном или нескольких органах [4]. Саркоидоз является распространенным системным воспалительным заболеванием неизвестной природы, имеющим множество клинических масок: от бессимптомных до серьезных поражений различных органов и систем, для которого характерен типичный гранулематозный характер воспаления, возникающий в генетически восприимчивом организме под действием триггеров окружающей и внутренней среды, обладающих антигенными свойствами [7].

Значимость этой патологии в настоящее время определяется повышением его частоты, обусловленное возрастающей урбанизации населения, тяжелым прогрессирующим течением, для которого в наибольшей степени известны легочные манифестации саркоидоза, но многообразие его клинических проявлений свидетельствует о

системном характере заболевания, что связано с его патогенезом, с широким кругом как проявлений гранулематозного воспаления, так и неспецифических (метаболических, аутоиммунных) синдромов [9].

Газотрансмиттер H_2S вовлечен в регуляцию ряда физиологических процессов в нервной, сердечно-сосудистой и дыхательной систем, что реализуется через ряд механизмов: действует как антиоксидант, утилизируя активные формы кислорода и азота, связывается с гемами и/или восстанавливает их, участвует в персульфидировании, то есть посттрансляционной модификации остатков цистеина белка с образованием персульфидов белка [1]. Система газотрансмиттеров участвуют в регуляции кровообращения, включая сосудистый компонент, а также и текущую по сосудам кровь, управляя ее текучестью и транспортным потенциалом через регуляторное воздействие на микрореологию ее клеток и, в частности, состояния эритроцитов [6]. Так как H_2S не только вазодилататор, но еще и важный регулятор клеточного роста, способный уменьшать структурное ремоделирование тканей сосудов, что значимо для механизмов ряда сосудистых патологий и может стать основой разработки новых терапевтических подходов [8]. Данное обстоятельство является причиной диагностических и терапевтических проблем в практике врачей разных специальностей, в связи с чем, диагностическая значимость определения критериев степени тяжести этой патологии, в частности, активности системы газотрансмиттеров остается дискутируемой.

Несомненно, газотрансмиттер сероводород участвует в модификации СГК, что достигается через различные механизмы: образование различных дериватов гемоглобина (сульфгемоглобин), модулирование внутриэритроцитарной системы формирования кислородсвязывающих свойств крови, L-аргинин-NO системы, а также опосредовано через системные механизмы формирования функциональных свойств гемоглобина [3].

Цель

Оценка содержания газотрансмиттеров монооксида азота и сероводорода у пациентов с саркоидозом Бека (жителей Гродненской области).

Методика

Объектом исследования были 30 пациентов с саркоидозом Бека (2-ая стадия, легочно-медиастинальная форма, активная фаза), не получавшие патогенетической терапии. В 76,7% случаев у

патологические изменения на рентгенографии были выявлены при прохождении планового медицинского осмотра (у данных пациентов отсутствовали симптомы). У всех пациентов диагноз был подтвержден по результатам биопсии гистологического исследования легочной ткани. Концентрация нитрат/нитритов в плазме определялась с помощью реактива Грисса, сероводорода (H_2S) – спектрофотометрическим методом на реакции между сульфид-анионом и раствором N,N-диметил-парафенилендиамина солянокислого в присутствии хлорного железа.

Статистическая обработка цифровых данных произведена с использованием программы Statistica 10.0. Нормальность распределения полученных результатов оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Результаты считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Были получены данные в соответствии с которыми установлено увеличение концентрации монооксида азота и снижение сероводорода в крови при этой форме саркоидоза Бека (2-ая стадия, легочно-медиастинальная форма, активная фаза). Саркоидоз есть мультисистемное воспалительное заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся образованием гранул в пораженных органах. Клиническая картина многообразна, в первую очередь поражаются легкие и лимфоузлы, но в его развитии и прогрессировании играют роль, как генетическая предрасположенность, так и перенесенные инфекции и факторы внешней среды [5]. В том аспекте представляется интересным данные о том, что сравнение микрореологических ответов эритроцитов на действие донора H_2S в условиях блокирования K^+ -АТФ-каналов и ингибирования растворимая гуанилатциклаза позволяет предположить, что сероводород как газовый медиатор в значительной степени использует NO-ассоциированный сигнальный путь, для данных газотрансммиттеров выявлены наиболее вероятные сигнальные каскады с ключевыми молекулярными мишенями, имеющие схожие способы действия и параллельные регулирующие цели [6]. Взаимодействия NO- и H_2S -зависимых сигнальных путей между важно для реализации механизмов регуляции различных функций органов и систем. Данные газомодуляторы, взаимодействуя между собой, образуют сложную систему, управляющую интеграционными процессами организма. Многие физиологические эффекты H_2S

обусловлены его взаимодействием с другими газообразными посредниками (NO, CO), осуществляемым как на уровне регуляции ферментов синтеза, так и мишеней их действия, поэтому предлагается рассматривать газомедиаторы не по отдельности, а как союз молекул, регулирующих клеточные процессы [3].

В нашем предыдущем исследовании проведена оценка распределения частот аллелей полиморфизмов G894T гена эNOS-3 у пациентов саркоидозом [2]. При изучении частот распределения аллелей в данном контингенте установлено, что 96,7 % в генотипе присутствует аллель G, в то время как аллель T наличествует у 43,3 % добровольцев. При оценке встречаемости генотипов полиморфизма G894T у обследуемых лиц нами было выявлено, что гомозиготный доминантный генотип (GG) имеется у 56,7 % выборки. Гетерозиготный генотип изучаемого полиморфизма был определен у 36,7 % тестируемых лиц. Результаты свидетельствуют, что в данной выборке генотип TT встречается в 8,5 раза реже, чем генотип GG, и в 5,5 раза реже, чем генотип GT, что свидетельствует о важности определения содержания метаболитов NO в крови при этой патологии, что и было сделано в данной работе.

Концепция газомедиаторов рассматривает конкретные свойства этих сигнальных молекул газов, в том числе их хорошую проницаемость через клеточные мембраны, взаимодействие с гемопротеинами и их способность к регуляции посредством включения определенных сигнальных механизмов [8].

H₂S проявляет двухфазный, зависимый от концентрации способ действия: при низких концентрациях обладает цитопротекторным действием, тогда как при более высоких концентрациях он цитотоксичен, H₂S подавляет дыхательную цепь за счет прямого связывания с цитохромом с оксидазой и ее ингибирования [1].

В целом метод оценки газотрансмиттеров представляется перспективным у пациентов с саркоидозом и интерстициальными заболеваниями легких как в практическом (диагностическом ракурсе), так и для уточнения патогенетических механизмов заболевания, которые с момента его описания остаются не до конца изученными. Кроме того, можно предполагать, что совмещение данных этого метода с результатами генетического анализа полиморфизма гена NO-синтазы будет иметь положительный эффект, так как генетическое исследование в комплексе с определением

активности системы газотрансмиттеров позволит дифференцировать терапию этой патологии в зависимости от генотипа NO-синтазы.

Выводы

Таким образом, на основании проведенных исследований установлено, что при саркоидозе отмечается увеличение концентрации монооксида азота и снижение сероводорода, что может иметь значение для обеспечения процессов переноса кислорода к тканям. Поиск средств коррекции возникающей дыхательной недостаточности и гипоксии при саркоидозе должно быть направлено на улучшение функционирования системы газотрансмиттеров.

Библиографический список

1. Борисов В.Б., Форте Е. Терминальная оксидаза цитохром bd защищает бактерии от токсического воздействия сероводорода // Биохимия. – 2021. – Т. 86, вып. 1. – С. 30–42.
2. Глуткина Н.В., Велисейчик А.А., Норик С.Ф. Молекулярно-генетические особенности механизмов транспорта кислорода при саркоидозе Бека // Роль микрореологии и микроциркуляции при разных вариантах обеспечения организма кислородом: сборник материалов международного симпозиума / под науч. ред. А.В. Муравьева. – Ярославль: РИО ЯГПУ; Гродно, 2021. – С. 38-41.
3. Зинчук В.В. Кислородтранспортная функция крови и газотрансмиттер сероводород // Успехи физиологических наук. – 2021. – Т. 52, № 3. – С. 41–55.
4. Игнатьева Е.А. Возможности современной лучевой диагностики саркоидоза (обзор литературы) // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2021. – Вып. 82. – С. 146–157.
5. Кодиров Х.Н., Французевич Л.Я., Бобков А.П. и др. Перспективы поиска новых лабораторных маркеров саркоидоза // Практическая пульмонология. – 2021. – № 2. – С. 59–64.
6. Муравьев А.В. Роль газовых медиаторов (CO, NO и H₂S) в регуляции кровообращения: анализ участия микрореологии клеток крови // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2021. – Т. 20, № 1. – С. 91–99.
7. Пальчикова И.А., Денисова О.А., Чернявская Г.М. и др. Рентгенологические и морфологические параллели при саркоидозе органов дыхания // Туберкулез и болезни лёгких. – 2021. – Т 99, № 1. – С. 48–54.
8. Тихомирова И.А., Петроченко Е.П., Петроченко А.С. Сероводород как сигнальная молекула в сердечно-сосудистой

системе // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2021. – Т. 20, № 1. – С. 5–16.

9. Французевич Л.Я., Бобков А.П., Джайн М. и др. Фенотипирование ангиотензин-I-превращающего фермента у пациентов с системными проявлениями саркоидоза // Лечебное дело. – 2021. – № 2. – С. 78–87.

УДК 616.381-002-099:611.018.3:611.13[.14.018.74:577.121.7]-092.9

Э.В. Гусаковская, Н.Е. Максимович, П.И. Ранцевич, Н.А. Кривонос, П.Д. Лупеко, М.А. Лещенок, С.Д. Дрожжа

**ВЫРАЖЕННОСТЬ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ
ЭНДОТЕЛИЯ И ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО
ДИСБАЛАНСА У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ
ПЕРИТОНИТОМ И ВВЕДЕНИЕМ НЕСЕЛЕКТИВНОГО
ИНГИБИТОРА NO-СИНТАЗЫ**

Аннотация. В результате проведенных исследований установлено, что течение экспериментального перитонита у крыс в условиях введения неселективного ингибитора NO-синтазы – метилового эфира N^ω-нитро-L-аргинина (L-NAME) сопровождается развитием более выраженного морфологического повреждения эндотелия кровеносных сосудов и прооксидантно-антиоксидантного дисбаланса, что свидетельствует о неблагоприятных последствиях ингибирования всех изоформ фермента при воспалительном процессе в брюшной полости.

Ключевые слова: экспериментальный перитонит, NO-синтаза, эндотелий, прооксидантно-антиоксидантное состояние, L-NAME

*E.V. Husakouskaya, N.Ye. Maksimovich, P.I. Rantsevich,
N.A. Krivonos, P.D. Lupeko, M.A. Leshchenok, S.D. Drozhzha*

**MORPHOLOGICAL DAMAGE TO ENDOTHELIUM AND
PROOXIDANT-ANTIOXIDANT IMBALANCE IN RATS
WITH EXPERIMENTAL PERITONITIS AND ADMINISTRATION
OF A NON-SELECTIVE NO-SYNTASE INHIBITOR**

© Э.В. Гусаковская, Н.Е. Максимович, П.И. Ранцевич,
Н.А. Кривонос, П.Д. Лупеко, М.А. Лещенок, С.Д. Дрожжа, 2022

Abstract. As a result of the studies, it was found that the course of experimental peritonitis in rats with administration of a non-selective inhibitor of NO-synthase, N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), is accompanied by the development of more pronounced morphological damage to the endothelium of blood vessels and prooxidant-antioxidant imbalance, which indicates the adverse effects of inhibition of all enzyme isoforms in inflammatory process in the abdominal cavity.

Keywords: experimental peritonitis, NO-synthase, endothelium, prooxidant-antioxidant state, L-NAME

Введение

Перитонит характеризуется высоким показателем летальности, что обуславливает необходимость детализации его патогенеза и улучшения терапии [1]. Известно, что в патогенезе воспаления важная роль принадлежит монооксиду азота (NO), обладающему множеством противоречивых эффектов – про- и антиоксидантных, про- и противовоспалительных, про- и антиадгезивных, что может быть обусловлено активацией определенной изоформы NO-синтазы (NOS): нейрональной, индуцируемой, эндотелиальной [2]. Важная роль при воспалении принадлежит макрофагальной (индуцируемой) изоформе NOS, активация которой приводит к образованию значительных количеств NO, который, наряду с реализацией бактерицидного эффекта, оказывает губительное воздействие на ткани организма [3]. Однако немаловажной представляется роль эндотелиальной NOS, принимающей участие в регуляции кровотока [4]. В свою очередь, недостаточность сведений о механизмах развития микроциркуляторных нарушений и окислительного стресса при воспалительном процессе в брюшной полости в условиях модуляции активности NOS обуславливает актуальность проведения исследований в данном направлении. В связи с этим целью настоящего исследования стало изучение выраженности морфологического повреждения эндотелия кровеносных сосудов и прооксидантно-антиоксидантного дисбаланса у крыс с экспериментальным перитонитом и введением неселективного ингибитора NOS – метилового эфира N^ω-нитро-L-аргинина (L-NAME).

Методика

Эксперименты выполнены на крысах-самцах, 230-250 г (n=54). Крысы разделены на 3 равные серии, которым внутрибрюшинно, в

объеме 0,6 мл/100 г массы тела, вводили: 1-й серии (контроль) – 0,9 %-й хлорид натрия, 2-й серии (экспериментальный перитонит, ЭП) – 15 % каловую взвесь, 3-й серии (ЭП+L-NAME) – 15 % каловую взвесь, с дополнительным внутримышечным введением неселективного ингибитора NOS – метилового эфира N^ω-нитро-L-аргинина (L-NAME), 10 мг/кг («Sigma», США). Изучение состояния эндотелия кровеносных сосудов производили путем подсчета количества циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) в гемоцитометре [5]. Содержание продукта липопероксидации – малонового диальдегида (MDA) и антиоксиданта – восстановленного глутатиона (GSH) определяли в плазме крови [6]. В каждой группе исследования проводили спустя полсуток, 1 сутки и 3 суток. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10.0 для Windows (StatSoft Inc., США), используя непараметрические методы. Данные представлены – Me (LQ; UQ), где Me – медиана, LQ и UQ – значения нижнего и верхнего квартилей, соответственно.

Результаты и обсуждение

Введение неселективного ингибитора NOS – метилового эфира N^ω-нитро-L-аргинина (L-NAME) крысам с ЭП способствовало увеличению морфологического повреждения эндотелия кровеносных сосудов, что выражалось в повышении количества ЦЭК в крови спустя полсуток – в 1,6 раза ($p<0,01$), спустя 1 сутки – в 1,3 раза ($p<0,01$), а спустя 3 суток – в 1,4 раза ($p<0,01$). Изучение прооксидантно-антиоксидантного состояния у крыс с ЭП и введением неселективного ингибитора NOS – L-NAME показало более значительное увеличение содержания продукта перекисного окисления липидов – MDA и уменьшение уровня антиоксиданта GSH, по сравнению с их концентрацией в плазме крови крыс с перитонитом без введения модулятора, указывая на возрастание активности оксидативных процессов. В частности, у крыс с введением L-NAME отмечено увеличение содержания MDA в плазме крови спустя полсуток и 1 сутки ЭП – в 1,2 раза ($p<0,01$) в оба срока, а спустя 3 суток – в 1,5 раза ($p<0,01$), свидетельствуя об увеличении выраженности процессов липопероксидации. Наряду с повышением концентрации MDA в условиях использования L-NAME наблюдалось уменьшение уровня GSH в плазме крови спустя полсуток – в 1,3 раза ($p<0,01$), спустя 1 сутки – в 2,3 раза ($p<0,01$), спустя 3 суток – в 1,6 раза ($p<0,01$), по сравнению со значениями у крыс с перитонитом без

введения данного модулятора NOS, как проявление снижения антиоксидантной защиты. Выявленные изменения свидетельствуют о большей выраженности прооксидантно-антиоксидантного дисбаланса у крыс с ЭП и введением L-NAME, чем у животных с перитонитом без его введения.

Предполагается, что увеличение активности процессов липопероксидации и снижение антиоксидантной защиты при введении L-NAME может быть связано с потенцированием воспалительного процесса через уменьшение образования NO конститутивными NOS, что приводит к нарушению микроциркуляции, усилению выраженности гипоксии и ацидоза, способствующих увеличению наработки активных форм кислорода в митохондриальной цепи тканевого дыхания, лейкоцитами и др. [7].

Таким образом, введение неселективного ингибитора NO-синтазы – метилового эфира N^ω-нитро-L-аргинина (L-NAME) крысам с экспериментальным перитонитом приводило к усугублению выраженности морфологического повреждения эндотелия кровеносных сосудов и прооксидантно-антиоксидантного дисбаланса, свидетельствуя о негативных последствиях ингибирования всех изоформ фермента.

Благодарности. Выражаем благодарность Организаторам конференции.

Библиографический список

1. Гусаковская Э.В., Максимович Н.Е. Альтернативность выбора адекватного способа моделирования перитонита в эксперименте // Новости медико-биологических наук. – 2018. – Т. 17, № 2. – С. 73-78.
2. Максимович Н.Е., Маслаков Д.А. Аминокислота L-аргинин и перспективы её использования в клинике // Здоровоохранение. – 2003. – № 5. – С. 35–37.
3. Савельев В. С., Петухов В. А. Перитонит и эндотоксиновая агрессия. – Москва, 2012. – 326 с.
4. Sylman J. Development of vascular injury models to measure the interactions between platelets, endothelial cells and nitric oxide under physiological flow conditions. – Colorado School of Mines: ProQuest Dissertations Publishing, 2015. – 231 p.
5. Hladovec J. Circulating endothelial cells as sign of vessel wall lesions // Physiol. Bohemoslov. – 1978. – Vol. 27, № 2. – P. 140–144.

6. Rice-Evans C. A. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research. London: Elsevier, 1991. – 291 p.

7. Корокина Л.В., Граник В.Г., Макаров В.А. и др. Коррекция L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции при использовании синтетических доноров оксида азота // Биомедицина. – 2006. – № 4. – С. 90-92.

УДК 616.381-002-099:611.018.3:611.13[.14.018.74:577.121.7]-092.9

Э.В. Гусаковская, Н.Е. Максимович, П.И. Ранцевич, Н.А. Кривонос, П.Д. Лупеко, М.А. Лещенок, С.Д. Дрожжа

**СОСТОЯНИЕ ЛЕЙКОЦИТАРНОГО ЗВЕНА КРОВИ КРЫС
С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПЕРИТОНИТОМ И ВВЕДЕНИЕМ
АМИНОГУАНИДИНА**

Аннотация. Статья посвящена изучению реакции лейкоцитов крови у крыс с экспериментальным перитонитом и введением ингибитора индуцируемой изоформы NO-синтазы – аминугуанидина. Установлено, что применение аминугуанидина при экспериментальном перитоните приводит к менее выраженным изменениям показателей крови, характеризующих состояние лейкоцитарного звена иммунной защиты, о чем свидетельствует уменьшение общего количества лейкоцитов, выраженности сдвига лейкоцитарной формулы влево и увеличение содержания лимфоцитов.

Ключевые слова: экспериментальный перитонит, лейкоциты, NO-синтаза, аминугуанидин

E.V. Husakouskaya, N.Ye. Maksimovich, P.I. Rantsevich, N.A. Krivonos, P.D. Lupeko, M.A. Leshchenok, S.D. Drozhzh

**THE STATE OF THE LEUKOCYTE LINK OF THE BLOOD
OF RATS WITH EXPERIMENTAL PERITONITIS AND
ADMINISTRATION OF AMINOGUANIDINE**

Abstract. The article is devoted to the study of the reaction of blood leukocytes in rats with experimental peritonitis and administration of

inhibitor of the inducible isoform of NO-synthase, aminoguanidine. It was found that use of aminoguanidine in experimental peritonitis results in less pronounced changes in blood parameters characterizing the state of the leukocyte link of immune defense, as evidenced by a decrease in the total number of leukocytes and shift of the leukocyte differential count to the left along with an increase in the content of lymphocytes.

Key words: experimental peritonitis, leukocytes, NO-synthase, aminoguanidine

Введение

Неизученность эффектов монооксида азота (NO) при экспериментальном перитоните (ЭП) обуславливает необходимость проведения исследований в направлении детализации патогенеза и улучшения терапии. В частности, изучение эффектов NO, образующегося при воспалении в высоких концентрациях при участии индуцируемой изоформы NO-синтазы (NOS) [1], может быть достигнуто путем применения ингибитора данной изоформы фермента. Также, учитывая то, что при воспалительном процессе важная роль принадлежит лейкоцитам [2], целью настоящего исследования стало определение состояния лейкоцитарного звена крови крыс с экспериментальным перитонитом и введением ингибитора индуцируемой изоформы NOS – аминогуанидина.

Методика

Эксперименты выполнены на крысах-самцах, 230-250 г (n=54). Крысы разделены на 3 равные серии, которым внутрибрюшинно, 0,6 мл/100 г, вводили: 1-й серии (контроль) – 0,9 %-й NaCl, 2-й серии (ЭП) – 15 % каловую взвесь, 3-й серии (ЭП+AG) – 15 % каловую взвесь, с внутримышечным введением аминогуанидина (AG), 15 мг/кг («Sigma», США). Исследование общего содержания и количественного состава лейкоцитов осуществляли в камере Горяева и в мазках крови, с окраской азур-эозином [3]. В каждой серии исследования проводили спустя полсутки, 1 сутки и 3 суток. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10.0 для Windows (США), непараметрическими методами.

Результаты и обсуждение

В крови крыс с ЭП выявлено увеличение общего содержания лейкоцитов и изменение их количественного состава. В свою очередь, у крыс с ЭП и введением ингибитора индуцируемой изоформы NOS –

AG отмечено уменьшение общего количества лейкоцитов в крови спустя полсуток – в 1,3 раза ($p<0,05$), спустя 1 сутки – в 1,4 раза ($p<0,05$), а спустя 3 суток – в 1,5 раза ($p<0,05$), по сравнению со значениями показателя у животных с ЭП без его введения, что указывает на меньшую выраженность реакции со стороны красного костного мозга. Изменения в абсолютном содержании различных видов лейкоцитов у крыс с ЭП выражались в уменьшении количества нейтрофилов в крови спустя полсуток: сегментоядерных форм – в 1,3 раза ($p<0,05$), палочкоядерных форм – в 1,7 раза ($p<0,05$), метамиелоцитов – в 4,8 раза ($p<0,01$). При этом, как и при ЭП без введения AG, в данный срок миелоциты не обнаружены. Спустя 1 сутки ЭП содержание нейтрофилов в крови, по сравнению с результатами у животных с перитонитом без введения модулятора NOS, уменьшилось: палочкоядерных форм – в 2,5 раза ($p<0,01$), метамиелоцитов – в 2,4 раза ($p<0,01$), появившихся в данный срок миелоцитов – в 3,8 раза ($p<0,01$). Спустя 3 суток ЭП у крыс с применением AG в крови отмечено уменьшение количества нейтрофилов: сегментоядерных – в 1,6 раза ($p<0,01$), палочкоядерных – в 2,6 раза ($p<0,01$), метамиелоцитов – в 2,6 раза ($p<0,01$), миелоцитов – в 10,3 раза ($p<0,01$), по сравнению со значениями при ЭП без использования ингибитора NOS. Выявленные изменения со стороны нейтрофилов крови свидетельствуют о меньшей выраженности ядерного сдвига лейкоцитарной формулы крови влево в условиях введения AG у крыс с перитонитом. Изучение реакции со стороны эозинофилов и базофилов, выполняющих важную роль в регуляции микроциркуляции и экссудации, у крыс с ЭП и введением AG выявило увеличение количества эозинофилов в крови спустя 3 суток, $p<0,05$, что является признаком благоприятного течения воспалительного процесса [3], в отсутствие очевидных различий в количестве эозинофилов и базофилов в остальные изучаемые сроки ($p>0,05$). В крови крыс с ЭП и введением AG не обнаружено изменения количества моноцитов ($p>0,05$), однако выявлено увеличение содержания лимфоцитов, реализующих механизмы специфической иммунной защиты, спустя 3 суток ЭП – в 1,5 раза ($p<0,05$), по сравнению со значениями у крыс с перитонитом без введения амингуанидина.

Таким образом, применение ингибитора индуцируемой изоформы NOS – AG у крыс с ЭП приводило к менее выраженным изменениям показателей крови, характеризующих состояние

лейкоцитарного звена иммунной защиты. Об этом свидетельствовало уменьшение общего количества лейкоцитов и их видов – сегментоядерных нейтрофилов, палочкоядерных форм, метамиелоцитов и миелоцитов, наряду с увеличением количества лимфоцитов.

Благодарности. Выражаем благодарность Организаторам конференции.

Библиографический список

1. Савельев В. С., Петухов В. А. Перитонит и эндотоксиновая агрессия. – Москва, 2012. – 326 с.

2. Valko M., Moncol J., Mazur M., Leibfritz D., Cronin M.T.D., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. – 2007. – Vol. 39, № 1. – P. 44-84.

3. Методы клинических лабораторных исследований / под ред. проф. В. С. Камышникова. Москва: МЕДпресс-информ, 2016. – 736 с.

УДК 796.01:612.13

А. А. Доможилова Ф. К. Макоева

ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ У СПОРТСМЕНОВ ПОСЛЕ ВЫПОЛНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ПРОБЫ С ЛОКАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ НАГРУЗКОЙ

Аннотация. В статье продемонстрировано, что выполнение пробы с локальной мышечной нагрузкой у спортсменов вызывает статистически значимое снижение показателей средней линейной скорости кровотока по сечению сосуда на 28,6 % ($p < 0,05$) и средней линейной скорости кровотока в систоле на 35,9 % ($p < 0,05$), которые регистрировались в микрососудистом русле ногтевого ложа пальца кисти работающей конечности.

Ключевые слова: спортсмены, микроциркуляция, скорость кровотока, проба с локальной мышечной нагрузкой, ультразвуковая высокочастотная доплерография.

A. A. Domozhilova F. K. Makoeva

CHANGES IN MICROCIRCULATION IN ATHLETES AFTER A FUNCTIONAL TEST WITH LOCAL MUSCLE LOAD

Abstract. We demonstrated that a test with local muscle load in athletes causes a decrease of average mean linear blood flow velocity during cardiac cycle (V_{am}) by 28.6 % ($p < 0.05$) and average linear systolic velocity (V_{as}) by 35.9 % ($p < 0.05$). Thus, it is shown that local muscle load provides a significant change in microcirculation in the working limb.

Keywords: athletes, microcirculation, blood flow velocity, test with local muscle load, high-frequency ultrasonic dopplerography.

Введение

Известно, что систематическое выполнение физических упражнений может приводить к изменению функциональных свойств сосудистой стенки артерий конечностей [1]. Кроме того, имеющиеся на сегодняшний день литературные данные указывают на то, что даже кратковременная нагрузка для мышц предплечья и кисти, повторяющаяся в течение нескольких дней, способствует приросту показателей поток-зависимой вазодилатации плечевой артерии, которые регистрируются при проведении окклюзионной пробы [2].

В то же время, функциональные особенности адаптации системы микроциркуляции при выполнении мышечных нагрузок изучены в меньшей степени, при этом важно помнить, что даже при использовании сходного тестирующего воздействия в исследованиях не всегда удастся выявить корреляционную связь между показателями кровотока, зарегистрированными на различных уровнях сосудистой сети [3].

Методика

В исследовании принимали участие спортсмены ($n=10$, специализация – футбол и легкая атлетика, квалификация – I разряд-КМС), систематически занимающиеся избранным видом спорта. Всем испытуемым была подробно представлена информация о целях и этапах проведения тестирования, после чего они давали письменное добровольное согласие на участие в нем. В состоянии покоя у спортсменов с помощью высокочастотного ультразвукового доплерографа Минимакс-Допплер-К (ООО «СП Минимакс») проводили оценку микроциркуляции в области ногтевого ложа III пальца кисти правой руки. В качестве исследуемых параметров микрокровотока были использованы значения индекса Гослинга (PI , усл. ед.) и индекса Пурсело (RI , усл. ед.), а также показатели средней линейной скорости: по сечению сосуда (V_{am} , см/с), в систоле (V_{as} , см/с), в диастоле (V_{ad} , см/с) и минимальной конечной диастолической (V_{akd} , см/с).

После получения исходных доплерограмм атлетам предлагалось выполнить оценку силовых показателей правой кисти с помощью прибора «МЕГЕОН-34090». На основании полученных данных динамометрии рассчитывалась индивидуальная нагрузка (70 % от максимального значения, кг), которая устанавливалась на кистевом эспандере и использовалась в качестве тестирующего воздействия. Условием прекращения пробы являлась субъективная оценка состояния утомления, не позволяющего испытуемому выполнять сгибание пальцев. Повторная регистрация параметров микроциркуляции проводилась непосредственно после завершения упражнений.

Для оценки статистической значимости изменений параметров микроциркуляции использовали критерий Вилкоксона, расчет которого производился автоматически в программе Statistica 6.0. Уровень значимости определяли при $p < 0,05$. Данные в работе представлены как медиана и квартили (25 % и 75 %) для описания результатов исследований микроциркуляции, и как $M \pm \sigma$ для всех остальных анализируемых показателей.

Результаты и обсуждение

Силовые показатели правой кисти по данным динамометрии у спортсменов были равны $47,6 \pm 7,9$ кг и таким образом, значения нагрузки, предъявляемой в рамках функционального теста, соответствовали $39,4 \pm 13,1$ кг. Следует подчеркнуть, что общее количество выполненных циклов чередования сгибания/разгибания пальцев кисти у атлетов в среднем составило $73,6 \pm 24,4$ раз. В свою очередь, результаты оценки показателей микрокровотока до и после выполнения нагрузки, представленные в таблице, демонстрируют, что для всех скоростных показателей кровотока, кроме средней скорости в диастоле, было зарегистрировано снижение значений: V_{as} на 35,9 % ($p < 0,05$), V_{am} на 28,6 % ($p < 0,05$) и V_{akd} на 27,0 %. Таким образом, можно предполагать, что отмеченная динамика скоростей кровотока после тестирующего воздействия ассоциирована с увеличением числа функционирующих капилляров [4]. Кроме того, у всех атлетов наблюдалось изменение периферического сосудистого сопротивления, на что указывало снижение показателей индекса Гослинга на 15,2 % и индекса Пурсело на 2,1 % после функциональной пробы.

Согласно данным, полученным с помощью метода ультразвуковой высокочастотной доплерографии, известно, что

глобальная мышечная работа приводит к значительным изменениям микроциркуляции ногтевого ложа пальцев кисти. Так, в работе Д. А. Слеповой и А. В. Калинина (2016) было показано, что выполнение функциональной пробы с субмаксимальной нагрузкой на эргоспирометре ассоциировано со спазмом сосудов микроциркуляторного русла и ограничением кровоснабжения дистальных отделов верхних конечностей [5].

Таблица

Результаты оценки микроциркуляции у спортсменов до и после выполнения функциональной пробы с локальной мышечной нагрузкой

Показатель	До нагрузки	После нагрузки	Уровень значимости различий
Vas, см/с	1,89 (1,57; 2,83)	1,21 (0,70; 1,95)	0,02*
Vam, см/с	0,49 (0,39; 0,71)	0,35 (0,29; 0,44)	0,02*
Vad, см/с	0,12 (0,12; 0,13)	0,13 (0,12; 0,14)	0,45
Vakd, см/с	0,37 (0,27; 0,66)	0,27 (0,23; 0,40)	0,11
PI, у.е.	2,77 (2,55; 2,98)	2,35 (2,08; 2,91)	0,11
RI, у.е.	0,94 (0,91; 0,94)	0,92 (0,91; 0,94)	0,24

Примечание: Средние линейные скорости по кривой средневзвешенной скорости: Vas – средняя в систоле (см/с), Vam – средняя по сечению сосуда (см/с), Vad – средняя в диастоле (см/с), Vakd – минимальная конечная диастолическая (см/с); PI – индекс Гослинга (усл. ед.); RI – индекс Пурсело (усл. ед.); * – различия статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Однако в нашей работе в качестве тестирующего воздействия была выбрана локальная мышечная нагрузка, при выполнении которой активно задействованы только мышцы предплечья и кисти. Таким образом, на наш взгляд, полученные результаты, демонстрирующие снижение показателей скорости кровотока и периферического сосудистого сопротивления, могут указывать на состояние рабочей гиперемии, которая, как известно, сопровождается вазодилатацией прекапиллярных артериол и увеличением числа функционирующих капилляров [6].

Библиографический список

1. Индекс отражения пульсовой волны у юных спортсменов / А.В. Скрипаль, А.С. Бахметьев, Н.Б. Брилёнок, С.Ю. Добдин, А.А.

Сагайдачный, Р.Т. Баатыров, А.Д. Усанов, А.С. Тихонова // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия : Физика. 2020. Т. 20. № 2. С. 125-133.

2. Влияние кратковременных физических упражнений на гемодинамический аспект функции эндотелия плечевой артерии человека / А.М. Мелькумянц, Т.В. Балахонова, О.А. Погорелова, М.И. Трипотень // Кардиологический вестник. 2019. Т. 14. № 3. С. 44-48.

3. Сагайдачный, А.А. Оклюзионная проба: методы анализа, механизмы реакции, перспективы применения / А. А. Сагайдачный // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2018. Т. 17. № 3 (67). С. 5-22.

4. Скедина, М.А. Исследование параметров кровотока в микроциркуляторном русле у подростков футбольных команд в ходе тренировочного процесса / М. А. Скедина, А. А. Ковалева // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2017. Т. 16. № 3 (63). С. 56-61.

5. Слепова, Д.А. Влияние физической нагрузки субмаксимальной мощности на региональный кровоток у высококвалифицированных спортсменов циклических видов спорта / Д. А. Слепова, А. В. Калинин // Ученые записки университета им. П. Ф. Лесгафта. 2016. № 7 (137). С. 128-133.

6. Микроциркуляция и гемореология : учебное пособие / А.В. Муравьев, И.А. Тихомирова, П.В. Михайлов, А.А. Муравьев. Ярославль : Издательство ЯГПУ, 2010. 198 с.

УДК 616.133-007.272-089:616.12-073.97

К.М. Дорохин¹, А.А. Балла², С.Д. Орехов¹, Е.В. Стасевич¹

ПАРАМЕТРЫ ЭХОКАРДИОГРАФИИ У ПАЦИЕНТОВ ПЕРЕД КАРОТИДНОЙ ЭНДАРТЕРЭКТОМИЕЙ

Аннотация. Эхокардиография (ЭХОКГ) используется для оценки функционального состояния сердца у пациентов с атеросклерозом. При атеросклеротическом поражении экстракраниальных сосудов показатели ЭХОКГ отличаются в разных группах предоперационного риска. В работе приведены данные различий параметров ЭХОКГ в зависимости от степени риска, определенного оценочными шкалами (ASA, Goldman, Lee, Detsky).

Ключевые слова: эхокардиография, фракция выброса, атеросклероз a.carotis, предоперационные шкалы риска

K.M. Dorokhin ¹, A.A. Balla ², S.D. Orekhov ¹, E.V. Stasevich ¹

ECHOCARDIOGRAPHY PARAMETERS IN PATIENTS BEFORE CAROTID ENDARTERECTOMY

Abstract. Echocardiography (ECHO CG) is used to assess the functional state of the heart in patients with atherosclerosis. In atherosclerotic lesions of extracranial vessels, ECHO CG parameters vary in different preoperative risk groups. The paper presents data on the differences in ECHO CG parameters depending on the degree of risk, determined by rating scales (ASA, Goldman, Lee, Detsky).

Key words: echocardiography, ejection fraction, a.carotis, atherosclerosis, preoperative risk scales

Введение

Атеросклероз является системным заболеванием и возникающий при этом стеноз экстракраниальных артерий часто сочетается с поражением коронарных сосудов. У пациентов с данной патологией повышен риск развития инфаркта миокарда и инсульта [1]. Нарушение мозгового кровообращения - одно из самых распространенных причин инвалидизации, причем треть инсультов возникает по причине атеросклеротического поражения экстракраниальных артерий. Современная хирургическая реваскуляризация доказала свою эффективность в профилактике и лечении пациентов с поражением каротидных артерий.

Для определения риска развития кардиальных осложнений при проведении некардиальных операций были разработаны и широко используются различные оценочные системы. Среди них такие как классификация предоперационного физического состояния – ASA, многофакторный индекс Goldman, индексы Detsky, Lee [2, 3, 4]. ЭХОКГ широко применяется для диагностики функции сердца [5, 6, 7]. Наиболее часто в мировой практике используется эхокардиографический показатель - фракция выброса левого желудочка. Хотя этот показатель не всегда адекватно характеризует систолическую деятельность левого желудочка, он введен в национальные протоколы обследования пациентов многих стран мира. Актуальность исследования состоит в том, что в доступной

литературе не обнаружено работ, в которых анализировались связи между ЭХОКГ и приведенными выше шкалами риска, а также параметры эхокардиограмм у пациентов с атеросклерозом перед эндартерэктомией в зависимости от показателя фракции выброса левого желудочка.

Методика

Проведен ретроспективный анализ 35 историй болезни пациентов от 44 до 78 лет, оперированных по поводу атеросклеротического поражения каротидных артерий (11 женщин и 24 мужчин), проходивших лечение в отделении сосудистой хирургии в 2020 году. Анамнестические данные, результаты ультразвукового исследования сердца, функциональные и лабораторные показатели, индексы риска (ASA, Goldman, Detsky, Lee) выкопированы из медицинской документации и подвергнуты статистической обработке с использованием программы «Statistica 10.0». Результаты представлены Me – медиана, 25 и 75 квартиль. Достоверность оценивали с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Среди 35 оперированных пациентов, умерших не было, их средний возраст составлял $61,57 \pm 1,58$ лет. Оценочные системы ASA, Goldman, Detsky и Lee по-разному характеризовали риск развития кардиальных осложнений у исследуемых. По шкалам ASA и Lee различий внутри группы не было выявлено, пациенты относились к ASA III (пациенты с тяжелым системным заболеванием) и к Lee IV (высокая категория риска). В дальнейшем по этим оценочным системам ЭХОКГ параметры не сравнивались. По шкале Goldman 7 человек получили до 6 баллов и были отнесены к I классу риска (группа G1), а 19 к III классу (группа G3) (13-25 баллов). У 7 пациентов, группа D1, индекс Detsky был до 15 баллов (I класс риска), у 19 – 20-30 баллов (II класс) (группа D2).

В зависимости от показателя выброса левого желудочка пациенты были подразделены на две группы. В группу F1 вошли лица с фракцией выброса от 42 до 59%, в группу F2 - 60 - 74%. При сравнении пациентов по шкале Goldman в группе G1 достоверно меньше передне-задний размер левого предсердия Me 36,00 [35,50; 39,50], по сравнению с G2 Me 38,00 [37,00; 43,00], $p=0,049$ и размер левого предсердия в четырехкамерной позиции Me 49,00 [45,50; 51,00], по сравнению с G2 Me 53,00 [50,00; 60,00], $p=0,01$. Также в группе G1 достоверно меньше размер правого предсердия в 4^x

камерной позиции Me 46,00 [41,50; 48,00], по сравнению с G2 Me 48,50 [48,00; 52,00], $p=0,027$. Конечный диастолический объем левого желудочка, измеренный в режиме M у пациентов G1 Me 112,00 [92,00; 124,00] меньше, чем у G2 Me 144,00 [109,00; 159,00], $p=0,046$. Конечный диастолический объем левого желудочка, измеренный в режиме В также меньше у пациентов G1 (Me 108,00 [96,00; 140,00]), против G2 Me 160,50 [126,50; 184,50], $p=0,034$.

При сравнении пациентов по шкале Detsky в группе D1 достоверно меньше размер левого предсердия в 4^х камерной позиции Me 50,00 [45,50; 51,00] по сравнению с D2 Me 53,00 [49,00; 60,00], $p=0,017$. У пациентов D1 конечное систолическое давление в левом желудочке 32,00 [30,00; 35,00] достоверно ниже, чем у пациентов из группы D2 38,00 [32,00; 44,00]; $p=0,046$. Также меньше конечный систолический объем левого желудочка в D1 41,50 [34,50; 50,00] достоверно ниже, чем у пациентов из группы D2 61,00 [41,00; 89,00]; $p=0,031$. Фракция выброса была выше у пациентов группы D1 62,50 [57,50; 65,00] по сравнению с группой D2 58,00 [51,00; 59,00]; $p=0,036$.

У пациентов F1, линейные показатели левого предсердия были достоверно больше, чем в группе F2 и составляли в передне-заднем размере соответственно Me 40 [37; 43] и Me 36,5 [35; 38], $p=0,01$; по короткой оси F1 Me 53 [50; 56], F2 Me 50,5 [45; 52], $p=0,049$, а по длинной оси показатели стремились к достоверности F1 Me 43 [36; 45], F2 Me 37,5 [35; 39], $p=0,08$. Размеры правого предсердия достоверно различались только по короткой оси F1 Me 49 [48; 54], F2 Me 47 [44; 48], $p=0,033$. Объемные показатели левого желудочка (кроме ударного объема) ожидаемо высоко и достоверно отличались в двух группах. Так в F1 конечный диастолический объем был выше (Me 154 [124; 186]), чем в F2 (Me 109,5 [97; 124], $p=0,006$), также, как и конечный систолический объем F1 Me 68 [54; 90], F2 Me 35,5 [34; 46], $p=0,001$, а отличия ударного объема в двух группах носило недостоверный характер F1 Me 78 [70; 89], F2 Me 70,5 [62; 78], $p=0,083$. Конечное систолическое давление в F1, было достоверно выше, чем в F2 (соответственно Me 40 [36; 45] и Me 30 [30; 33], $p=0,001$). Отличия между показателями конечного диастолического давления носили тот же характер (F1 Me 56 [51; 61], F2 Me 48 [46; 51]; $p=0,002$). Со стороны клапанного аппарата у пациентов F1 диаметр ствола легочной артерии был достоверно больше и составлял Me 26,5 [25; 28], против Me 24 [24; 24] в F2, $p=0,001$; диаметр на

уровне клапана легочной артерии F1 Me 25,5 [23; 28], а F2 Me 22 [20,5; 23,5], $p=0,088$. Отношение скоростей потока через митральный клапан в фазу ранней систолы и в фазу систолы левого предсердия у пациентов F1, было достоверно выше Me 1,13 [0,96; 1,3], против F2 - Me 0,84 [0,67; 0,9], $p=0,008$.

При помощи факторного анализа показано, что все показатели образуют 5 факторов. В 1 факторе ведущее значение имеют показатели характеризующие объемы и давление в левом желудочке (конечное диастолическое давление, конечное систолическое давление, конечный диастолический объем, конечный систолический объем, фракция выброса). Все переменные входят в этот фактор со знаком плюс, за исключением фракции выброса. Во второй фактор входят размеры обоих предсердий. Третий фактор формируют систолическое и диастолическое давление. Фактор 4 определяется ударным объемом. Пятый фактор независимо определяется пульсом.

Выводы

Таким образом, параметры ЭХОКГ не входят в системы оценки предоперационного состояния пациентов ASA, Goldman, Detsky, Lee, но пациенты с разными индексами риска по шкалам Goldman и Detsky достоверно отличаются по ряду показателей. Определено, что у лиц с более высокими значениями по шкалам Goldman и Detsky и меньшей фракцией выброса большие линейные размеры камер сердца и объемы предсердий и левого желудочка. Кроме того, у пациентов с меньшей фракцией выброса достоверно больше конечные систолические и диастолические объемы левого желудочка, а также выше показатели конечных систолического и диастолического давления. Факторный анализ показывает относительную независимость размеров, объемов камер сердца и сократительной активности левого желудочка.

Библиографический список

1. Jeevarethinam A. Usefulness of carotid plaques as redpictors of obstructive coronary artery disease and cardiovascular events in asymptomatic individuals with diabetes mellitus // Am. J. Cardiol. – 2018. – Vol. 121, № 8. – P. 910–916.
2. Александрович Ю.С., Гордеев В.И. Оценочные и прогностические шкалы в медицине критических состояний // Сотис. – 2007. – С. 140.

3. Owens W.D. American society of anesthesiologists physical status classification system is not a risk classification system // Anesthesiology. – 2001. – Vol. 94. – P. 378.

4. Heinisch R.H. et al. Prospective assessment of different indices of cardiac risk for patients undergoing noncardiac surgeries // Arq. Bras. Cardiol. – 2002. – Vol. 79, № 4. – P. 327–338.

5. Hametner C. et al. Noninvasive cerebral oximetry during endovascular therapy for acute ischemic stroke: an observational study // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2015. – Vol. 35, № 11. – P. 1722–1728.

6. Kertai M.D. et al. A meta-analysis comparing the prognostic accuracy of six diagnostic tests for predicting perioperative cardiac risk in patients undergoing major vascular surgery // J. J. Heart. – 2003. – Vol. 89. – P. 1866–1872.

7. Shouten O., Bax J.J., Poldermans D. Assessment of cardiac risk before non-cardiac general surgery // J. Heart. – 2006. – Vol. 92. – P. 1866–1872.

УДК 612.111.1:[613.84:663.974-028.27]-057.875

*Л.В. Дорохина, С.Д. Орехов, П.А. Дашкевич, У.Н. Косяк,
Н.А. Редькин*

ОСОБЕННОСТИ КИСЛОРОДНОГО ГОМЕОСТАЗА У ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ ЭЛЕКТРОННЫХ И ОБЫЧНЫХ СИГАРЕТ

Аннотация. В мире насчитывается более 1 млрд курящих людей. В последнее время электронные сигареты стали модным гаджетом, особенно среди молодежи, хотя их влияние на организм еще детально не изучено. Было обследовано 56 юношей Гродненского медицинского университета в возрасте 18-20 лет. Проведено сравнение показателей спирограммы и сатурации артериальной крови студентов, после выкуривания одной электронной или обычной сигареты. Показано, что использование электронных сигарет, по сравнению с обычными, оказывает более выраженный негативный эффект на сатурацию артериальной крови кислородом и параметры дыхания.

© Л.В. Дорохина, С.Д. Орехов, П.А. Дашкевич, У.Н. Косяк,
Н.А. Редькин, 2022

Ключевые слова: гемоглобин, сатурация, спирограмма, студенты, электронные сигареты

L.V. Dorokhina, S.D. Orekhov, P.A. Dashkevich, U.N. Kosyak, N.A. Redkin

FEATURES OF OXYGEN HOMEOSTASIS IN USERS OF ELECTRONIC AND CONVENTIONAL CIGARETTES

Abstract. There are more than 1 billion smokers in the world. Recently, electronic cigarettes have become a fashionable gadget, especially among young people, although their effect on the body has not yet been studied in detail. 56 young men of the Grodno Medical University at the age of 18-20 were examined. Comparison of spirogram and saturation indicators of arterial blood of students after smoking one electronic or conventional cigarette was carried out. It has been shown that the use of electronic cigarettes, compared with conventional ones, shows a more pronounced negative effect on oxygen saturation of arterial blood and respiratory parameters.

Key words: hemoglobin, saturation, spirogram, students, electronic cigarettes

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения в настоящее время насчитывается более 1 млрд заядлых курильщиков. Число людей, использующих электронные сигареты (ЭС), возрастает и по данным Euromonitor в 2021 году составило 55 млн. Производители нового продукта позиционируют его, как безвредную альтернативу классическим сигаретам и достаточно легкий способ бросить курить, однако их ингаляционная токсичность на организм еще детально не изучена [1]. Жидкость для ЭС состоит в основном из пропиленгликоля и глицерина в сочетании с ароматизаторами и никотином. Эти молекулы аэрозолируются и конденсируются в капли субмикронного размера, которые можно вдыхать в легкие («парить») [2].

Пероральный прием пропиленгликоля и глицерина не связан со значительной системной токсичностью [3, 4]. Однако мало что известно об их ингаляционном воздействии, которое нельзя предсказать на основании исследований при приеме внутрь [5]. Будучи высокогигроскопичными пропиленгликоль и глицерин могут

обезвоживать слизистую дыхательных путей [4, 6], нарушать мукоцилиарный клиренс, приводить к обструкции и воспалению в легких [7]. Кроме того, вызывать гиперосмотический стресс, индуцировать экспрессию и секрецию провоспалительных цитокинов в легочной ткани [3, 4], сужение бронхов путем стимуляции специфических рецепторов гладкомышечных клеток [6, 8]. Вместе эти эффекты могут нарушать реологические свойства сурфактанта, повышать поверхностное натяжение и приводить к коллапсу мелких бронхов [2, 9], что в свою очередь изменяет вентиляционно-перфузионные отношения, сосудистый тонус и, следовательно, нарушает легочный газообмен [10]. Кроме того, никотин также может вызывать бронхоконстрикцию крупных дыхательных путей [11].

Показано, что парение электронных сигарет как с никотином, так и без него, вызывает местное воспаление, нарушение легочного газообмена у молодых, здоровых курильщиков. Chaumont M. et al. показали, что снижение сатурации и повреждение эпителия дыхательных путей у молодых курильщиков при потреблении ЭС обусловлен в первую очередь пропиленгликолем и глицерином, а не никотином [12]. По данным Caporale A. et al. установлено, что даже вдыхание безникотинового аэрозоля ЭС временно нарушало функцию эндотелия у некурящих людей [13]. Однако некоторые исследователи отмечают меньшую токсичность ЭС в сравнении с традиционными [14]. В связи с этим является актуальным оценить влияние обычных сигарет (ОС) и ЭС на функции легких и кислородный гомеостаз.

Методика

Было анкетировано 273 студента 2 курса Гродненского государственного медицинского университета, а также обследовано 56 студентов ГрГМУ мужского пола в возрасте 18-20 лет. Среди испытуемых выделены 3 группы. В первую вошли 22 некурящих студента, во вторую – 16 курильщиков ЭС, со стажем курения 1-3 года, в третью группу – 18 человек, употребляющих ОС, с аналогичным стажем курения. С помощью автоматизированного многофункционального спирометра МАС-1 определяли жизненную емкость легких (ЖЕЛ), форсированную жизненную емкость легких (ФЖЕЛ), максимальную вентиляцию легких (МВЛ). В режиме пульсоксиметрии определяли частоту сердечных сокращений (ЧСС) и процентное содержание оксигемоглобина в артериальной крови (SpO_2). Методом Короткова измеряли систолическое артериальное

давление (АДсист.), диастолическое артериальное давление (АДдиаст.) и рассчитывали пульсовое АД (АДпульс.). Данные параметры измеряли в контрольной группе однократно, а у курильщиков до нагрузки курением и после выкуривания одной ЭС или ОС.

Все полученные результаты обработаны методами вариационной статистики с помощью прикладных программ "Excel" и "Statistica 10.0". Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При анализе анкетных данных установлено, что 52,4% студентов курят постоянно. Среди курильщиков 51% потребляют ЭС, 26,5% - ОС, а 22,5% являются двойными пользователями. Считают ЭС безопасными только 12,8% респондентов, 43,2% - не считают их безопасными, а 44% студентов медицинского вуза не знают ответа на этот вопрос.

Установлено, что у контрольной группы студентов МВЛ составила $106,82 \pm 8,11$, а у использующих ЭС - $81,88 \pm 8,99$ л/мин ($p = 0,049$). SpO_2 также достоверно была выше в контроле $97,82 \pm 0,24\%$, чем у курильщиков ЭС $97,00 \pm 0,29\%$ ($p = 0,036$). Достоверных различий по частоте пульса и АД между первой и второй группой испытуемых не выявлено. При исходном сравнении показателей контрольной группы с курильщиками ОС (3 гр.) хочется отметить, что ЖЕЛ и ФЖЕЛ оказались выше у курильщиков: $4,08 \pm 0,19$ л против $4,93 \pm 0,3$ л ($p = 0,018$) и $4,62 \pm 0,18$ л против $5,18 \pm 0,15$ л ($p = 0,026$). В то время как МВЛ у контроля выше, чем у курильщиков ОС ($106,82 \pm 8,11$ против $86,0 \pm 7,41$ л/мин, $p = 0,071$). Сатурация, как и в случае употребления ЭС, была ниже - $96,67 \pm 0,36\%$ против $97,82 \pm 0,24\%$ в контроле ($p = 0,01$). Во 2 гр. исходно была недостоверно выше ЧСС $78,88 \pm 2,13$ уд/мин, чем в контроле $71,15 \pm 5,72$ уд/мин ($p = 0,275$); в 3 гр. ЧСС $85,0 \pm 2,4$ уд/мин была значительно выше, чем в контроле $71,15 \pm 5,72$ уд/мин ($p = 0,045$). Показатели АД при этом отличались не достоверно.

После нагрузки (выкуривание одной сигареты) у 2 гр. студентов выявлено ухудшение кислородтранспортной функции крови, SpO_2 снизилась еще более выраженно и достигла значения $95,13 \pm 0,7\%$, от исходного значения - $97,00 \pm 0,29\%$ ($p = 0,019$). Кроме того, отличия между исходным состоянием и после нагрузки ЭС по показателям ССС стали еще более выраженными. ЧСС - $78,88 \pm 2,13$ уд/мин, а после нагрузки - $90,62 \pm 3,38$ уд/мин ($p = 0,006$); АДсист. - $124,38 \pm 1,76$

мм рт. ст., а после нагрузки - $133,13 \pm 2,73$ мм рт. ст. ($p=0,012$); АДдиаст. исходное - $73,12 \pm 1,93$ мм рт. ст., а после потребления ЭС - $78,88 \pm 2,04$ мм рт. ст. ($p=0,05$).

При сравнении исходных данных и показателей после нагрузки у курильщиков ОС установлено достоверное увеличение ЧСС с $85,0 \pm 2,4$ уд/мин до $97,33 \pm 2,85$ уд/мин ($p=0,002$) и АДсист. с $126,11 \pm 1,79$ мм рт. ст. до $134,44 \pm 3,15$ мм рт. ст. ($p=0,028$).

При сравнении двух групп курильщиков также выявлены достоверные отличия. Показано исходное более низкое значение ФЖЕЛ у студентов 2 гр. $4,03 \pm 0,38$ л против $5,18 \pm 0,15$ л ($p=0,006$) у 3 гр. испытуемых. Также следует отметить, что у пользователей ЭС изначально наблюдался более низкий пульс $78,88 \pm 2,13$ уд/мин, чем в 3 гр. - $85,0 \pm 2,40$ уд/мин ($p=0,069$); показатель АДдиаст. также был ниже во 2 гр. - $73,12 \pm 1,93$ мм рт. ст. против $79,44 \pm 2,94$ мм рт. ст. ($p=0,09$), хотя данные различия не достигали уровня значимости. После нагрузки (выкуривание одной сигареты) выявленные достоверные различия ФЖЕЛ сохранялись: у 2 гр. $4,09 \pm 0,35$ л против $5,19 \pm 0,16$ л ($p=0,005$) у 3 гр. испытуемых. Кроме того, у 2 гр. SpO_2 стал достоверно ниже, чем в 3 гр. $95,13 \pm 0,7\%$ против $97,44 \pm 0,35\%$ ($p=0,004$).

Выводы

Таким образом, в наших исследованиях показана худшая сбалансированность кислородного гомеостаза у курильщиков обеих групп по сравнению с некурящими студентами. При парении электронных сигарет отмечены более низкие показатели внешнего дыхания до нагрузки по сравнению с контролем и пользователями обычных сигарет. При потреблении электронных сигарет сатурация крови кислородом после курения ухудшается, показатели внешнего дыхания демонстрируют выраженную негативную динамику, что не выявлено у потребителей обычных сигарет. У курильщиков обеих групп до нагрузки наблюдается тенденция к повышению ЧСС и артериального давления по сравнению с контролем, а после курения эти показатели повышаются достоверно.

Библиографический список

1. Davis L.C., Sapey E., Thickett D.R. et al. Predicting the pulmonary effects of long-term e-cigarette use: are the clouds clearing? //Eur. Respir. Rev. – 2022. – Vol. 31, № 163. – P. 1–16.
2. Sosnowski T.R., Jabłczyńska K., Odziomek M. et al. Physicochemical studies of direct interactions between lung surfactant and

components of electronic cigarettes liquid mixtures // *Inhal. Toxicol.* – 2018. – Vol. 30. – P. 159–168.

3. Fowles J.R., Banton M.I., Pottenger L.H. A toxicological review of the propylene glycols // *Crit. Rev. Toxicol.* – 2013. – Vol. 43. – P. 363–390.

4. Frank M.S., Nahata M.C., Hilty M.D. Glycerol: a review of its pharmacology, pharmacokinetics, adverse reactions, and clinical use // *Pharmacotherapy.* – 1981. – № 1. – P. 147–160.

5. Phillips B., Titz B., Kogel U. et al. Toxicity of the main electronic cigarette components, propylene glycol, glycerin, and nicotine, in Sprague-Dawley rats in a 90-day OECD inhalation study complemented by molecular endpoints // *Food Chem. Toxicol.* – 2017. – Vol. 109. – P. 315–332.

6. Chun L.F., Moazed F., Calfee C.S. et al. Pulmonary toxicity of e-cigarettes // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2017. – Vol. 313. – L193–L206.

7. Palazzolo D.L., Nelson J.M., Ely E.A. et al. The effects of electronic cigarette (ECIG)-generated aerosol and conventional cigarette smoke on the mucociliary transport velocity (MTV) using the bullfrog (*R. catesbiana*) palate paradigm // *Front Physiol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 1023–1028.

8. Iskandar A.R., Gonzalez-Suarez I., Majeed S. et al. A framework for in vitro systems toxicology assessment of e-liquids // *Toxicol Mech. Methods.* – 2016. – Vol. 26. – P. 392–416.

9. Przybyla R.J., Wright J., Parthiban R. et al. Electronic cigarette vapor alters the lateral structure but not tensiometric properties of calf lung surfactant // *Respir. Res.* – 2017. – Vol. 18. – P. 193–200.

10. Petersson J., Glenny R.W. Gas exchange and ventilation-perfusion relationships in the lung // *Eur. Respir. J.* – 2014. – Vol. 44. – P. 1023–1041.

11. Lee L.Y., Lin R.L., Khosravi M., Xu F. Reflex bronchoconstriction evoked by inhaled nicotine aerosol in guinea pigs: role of the nicotinic acetylcholine receptor // *J. Appl. Physiol.* – 2018. – Vol. 125. – P. 117–123.

12. Chaumont M., Philippe Van de Borne P., Alfred Bernard A. et al. Electronic cigarettes: not all good news? Fourth generation e-cigarette vaping induces transient lung inflammation and gas exchange disturbances: results from two randomized clinical trials // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2019. – Vol. 316, № 5. – L. 705–719.

13. Caporale A., Langham M.C., Guo W. et al. Acute effects of electronic cigarette aerosol inhalation on vascular function detected at quantitative MRI // Radiology. – 2019. – Vol. 293, № 1. – P. 97–106.

14. Barna S., Rózsa D., Varga J. et al. First comparative results about the direct effect of traditional cigarette and e-cigarette smoking on lung alveolocapillary membrane using dynamic ventilation scintigraphy // Nucl. Med. Commun. – 2019. – Vol. 40, № 2. – P. 153–158.

УДК 578.834:616.24-002.6

В.В. Зинчук¹, Н.В. Глуткина¹, Е.Я Кулага²

КИСЛОРОДТРАНСПОРТНАЯ ФУНКЦИЯ КРОВИ ПРИ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Аннотация. Исследовались показатели кислородтранспортной функции крови и газотрансмиттеры (NO, H₂S) у пациентов с коронавирусной инфекцией. Установлено повышение сродства гемоглобина к кислороду, сопровождающееся увеличением концентрации монооксида азота и снижение уровня сероводорода, что имеет значение для обеспечения процессов массопереноса кислорода к тканям.

Ключевые слова: кислородтранспортной функции крови, коронавирусная инфекция, монооксид азота, сероводород

V.V. Zinchuk, N.V. Glutkina, E.I Kulaga

OXYGEN TRANSPORT FUNCTION OF BLOOD IN CORONAVIRUS INFECTION

Abstract. The indicators of the oxygen transport function of the blood and gas transmitters (NO, H₂S) were studied in patients with coronavirus infection. An increase in the affinity of hemoglobin for oxygen was established, accompanied by an increase in the concentration of nitrogen monoxide and a decrease in hydrogen sulfide, which is important for ensuring the processes of mass transfer of oxygen to tissues.

Key words: oxygen transport function of blood, coronavirus infection, nitric oxide, hydrogen sulfide

Введение

Пандемия коронавирусной инфекции характеризуется тем, что у большого количества пациентов наблюдаются серьезные поражения легких, в связи с чем, актуальным является обнаружение и уточнение физиологических признаков этого заболевания, чтобы не допустить его тяжелое развития и летального исхода [1]. Проведение широкомасштабных научных клинических и фундаментальных исследований, для более углублённого изучения поражения сосудов на фоне COVID-19, в настоящее время считается весьма актуальным. В связи с этим, представляется важным осуществление исследований по важнейшим аспектам патогенеза, особенностям течения, диагностики и лечения пациентов с COVID-19. Выяснение и уточнение механизмов патогенеза новой коронавирусной инфекции, стратификация и точная диагностика стадии (фазы) заболевания позволит выбрать наиболее целесообразную схему лечения с обоснованным набором лекарственных средств для успешного лечения данного заболевания [4].

Серьёзную проблему представляет острый респираторный дистресс-синдром, обладающий молниеносной скоростью развития и высокой летальностью вызывающий SARS-CoV-2 для которого характерно первичное поражение бронхо-лёгочной системы и проявляющееся развитием тяжелой вирусной пневмонии, дыхательной недостаточности, а на поздних стадиях – развитием сепсиса и инфекционно-токсического шока, сопровождающегося нарушением NO-синтезирующей функции [5]. Учитывая большую важность доставки кислорода в ткани, восполнение пробелов знаний в особенностях формирования кислородтранспортной функции крови целесообразно для получения более полного понимания в этой области и разрешения имеющихся противоречий при коронавирусной инфекции. В организме в условиях гипоксии доставка O_2 в ткани осуществляется путем изменения разнообразных механизмов регуляции сродства гемоглобина кислорода (СГК), которые способны максимально увеличить артериовенозную разницу по O_2 и оптимизировать его транспорт в ткани [9]. Имеются отдельные противоречивые работы о характере изменения СГК при коронавирусной инфекцией. По данным Daniel Y. et al. [6] наблюдается тенденция к уменьшению СГК у пациентов с тяжелой степенью течения данной патологии. Согласно другим автором Vogel D.J. et al. [10] у этих пациентов отмечается повышение СГК.

Известно, что газотрансмиттеры (NO и H₂S) играют роль аллостерического эффектора функциональных свойств гемоглобина, который изменяет его сродство к кислороду и таким образом влияет на транспорт O₂ [7]. Изменение содержания газотрансмиттеров (NO, H₂S) может вносить вклад в изменение кислородтранспортной функции крови. Влияние NO, как и другого газотрансмиттера сероводорода на формирование кислородсвязующих свойств крови может иметь важное значение для обеспечения процессов газообмена и иных его физиологических функций. В этом аспекте представляет интерес работа Mortaz E. et al. [8] в которой показано увеличение содержания внутриэритроцитарного NO у пациентов с COVID-19.

Цель

Изучить показатели кислородтранспортной функции крови и газотрансмиттеры (NO, H₂S) у пациентов с коронавирусной инфекцией.

Методика

Объектом исследования являлись пациенты с коронавирусной инфекцией (15 человек), диагноз был установлен на основании верификации вируса при качественном определении РНК SARS-CoV-2 в соскобе клеток ротоглотки методом полимеразной цепной реакции, а также на основании типичной клинической картины и характерных для данной патологии изменений в легких по данным рентгеновской компьютерной томографии (КТ) органов грудной клетки. Степень тяжести вирусной пневмонии определяли по регионарной классификации диагностики и лечению COVID-19, согласно которой отсутствие признаков вирусной пневмонии определялась как – КТ-0; пневмония с участками «матового стекла», выраженность патологических изменений менее 25% – КТ-1; пневмония, поражено 25-50% легких – КТ-2; пневмония, при котором поражено 50-75% легких – КТ-3; пневмонии, при которой поражено >75% легких – КТ-4. Группа сравнения состояла из 15 соматически здоровых лиц.

Значения pH, pO₂, pCO₂, sO₂ и p50_{реал} в венозной крови определялись на микроанализаторе Stat Profile pHox plus L. СГК оценивалось по p50_{реал}. Концентрация нитрат/нитритов в плазме определялась с помощью реактива Грисса, сероводорода (H₂S) – на реакции между сульфид-анионом и раствором N,N-диметил-парафенилендиамина солянокислого в присутствии хлорного железа.

Статистическая обработка цифровых данных проведена с использованием программы Statistica 10.0. Нормальность распределения полученных результатов оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Результаты считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Согласно полученным данным пациенты с коронавирусной инфекцией COVID-19 характеризовались по сравнению со здоровыми лицами, снижением SO_2 , pO_2 и увеличением показателя $p50_{\text{станд}}$ (на 14,0 %, $p < 0,05$). Отмечался сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина к кислороду вправо. Это связано с некоторым истощением компенсаторной реакции организма, на что указывает уменьшение содержания pO_2 и SO_2 .

Изменение СГК является важным фактором компенсации кислородной недостаточности при различных патологических состояниях, лежит в основе процессов адаптации к гипоксии. Увеличение $p50$ выше физиологических значений благоприятствует оптимальному транспорту кислорода к тканям преимущественно в условиях нормоксии или умеренной гипоксии. Регуляция СГК и, соответственно, изменение положения кривой диссоциации оксигемоглобина осуществляется за счет взаимодействия гемоглобина с CO_2 , H^+ , органическими фосфатами и некоторыми другими модуляторами, а также газотрансммиттерами, влияющими на его взаимодействие с лигандами [2].

Система газотрансммиттеров формируют своеобразный щит, ограничивающий действие повреждающих факторов, определяя в конечном итоге, устойчивость живых организмов. При создании средств коррекции, изменяющих содержание NO, необходимо учитывать, что данный фактор участвует, как в нормальной регуляции, так и во многих патологических процессах [3], в связи, с чем оптимальным будет ограничение гиперпродукции или компенсации недостатка NO в организме, не затрагивая его существенные регуляторные и защитные функции.

Анализ сатурации умерших пациентов при коронавирусной инфекции демонстрирует его значение в пределах 86,2-79,9%, его снижение с возрастом, а для пациентов старше 50 лет сатурация меньше 50% является маркером летальности [1]. Для практической медицины перспективным является разработка средств, влияющих на содержание NO, однако разнообразие функции этого фактора ставит

вопрос о поиске целенаправленных терапевтических воздействий на физиологические механизмы [3], в связи с чем, важно представляется оценить содержание таких газотрансмиттеров, как монооксид азота и сероводород.

Установлен рост концентрации содержания $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ плазме крови у данных пациентов и снижение H_2S . Газотрансмиттеры вовлечены во внутри- и межклеточную коммуникацию с высокой специфичностью во многих клетках, тканях и органах, так как они, хорошо растворимы в липидах, легко проходят через клеточные и субклеточные мембраны. Эти посредники играют важную роль в центральных и периферических механизмах регуляции процессов транспорта кислорода, образуя единую систему, синергически взаимодополняя друг друга, обеспечивая в конечном итоге достижение положительного приспособительного результата [2].

Система газотрансмиттеров (сероводород и монооксид азота) вносит вклад в модификацию SGK, что достигается через различные механизмы: образование различных дериватов гемоглобина (нитрозо-, метрозил, мет- и сульфурформы), модулирование внутриэритроцитарной системы, а также опосредовано через системные механизмы формирования функциональных свойств гемоглобина. Нарушения кислородтранспортной функции крови, связанное с нарушением системы газотрансмиттеров, может способствовать потере согласованности функционирования антиоксидантной системы, вызывая прооксидантно-антиоксидантный дисбаланс и развитие окислительного стресса.

Выводы

Таким образом, на основании проведенных исследований установлено, что при коронавирусной инфекции отмечается повышение SGK, сопровождающееся увеличением концентрации монооксида азота и снижение сероводорода, что имеет значение для обеспечения процессов массопереноса кислорода к тканям. Поиск средств коррекции возникающей дыхательной недостаточности и гипоксии при коронавирусной инфекции должно быть направлено на улучшение кислородтранспортной функции крови и системы газотрансмиттеров.

Библиографический список

1. Громов М.С., Рогачева С.М., Барулина М.А. и др. Анализ некоторых физиологических и биохимических показателей у больных пневмонией COVID-19 математическими методами // Российский

физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2021. – Т. 107, № 11. – С. 1422–1439.

2. Зинчук В.В. Кислородтранспортная функция крови и газотрансмиттер сероводород // Успехи физиологических наук. – 2021. – Т. 52, № 3. – С. 41–55.

3. Ивашкин В.Т., Драпкина О.М. Клиническое значение оксида азота и белков теплового шока. ГЭОТАР-Медиа, Москва. – 2011. – 369 с.

4. Карева Е.Н., Булгакова В.А., Сереброва С.Ю. и др. Пандемия COVID-19: особенности механизма действия лекарственных средств // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2021. – № 3. – С. 28–40.

5. Сережина Е.К., Обрезан А.Г. Патофизиологические механизмы и нозологические формы сердечно-сосудистой патологии при COVID-19 // Кардиология. – 2020. – Т. 60, № 8. – С. 23–26.

6. Daniel Y., Hunt B.J., Retter A., Henderson K., Wilson S., Sharpe C.C., Shattock M.J. Haemoglobin oxygen affinity in patients with severe COVID-19 infection // Br. J. Haematol. – 2020. – Vol. 190, № 3. – P. 126–127.

7. Kolluru G.K., Prasai P.K., Kaskas A.M. et al. Oxygen tension, H₂S, and NO bioavailability: is there an interaction? // J. Appl. Physiol. – 2016. – Vol. 120, № 2. – P. 263–270.

8. Mortaz E., Malkmohammad M., Jamaati H., Naghan P.A., Hashemian S.M., Tabarsi P., Varahram M., Zaheri H., Chousein E.G.U., Folkerts G., Adcock I.M. Silent hypoxia: higher NO in red blood cells of COVID-19 patients // BMC Pulm Med. – 2020. – Vol. 20, № 1. – P. 269–272. DOI: 10.1186/s12890-020-01310-8.

9. Storz J.F. Hemoglobin-oxygen affinity in high-altitude vertebrates: is there evidence for an adaptive trend? // Journal of Experimental Biology. – 2016. – Vol. 219. – P. 3190–3203.

10. Vogel D.J., Formenti F., Retter A.J., Vasques F., Camporota L. A left shift in the oxyhaemoglobin dissociation curve in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) // Br. J. Haematol. – 2020. – Vol. 191, № 3. – P. 390–393.

*В.В.Зинчук¹, Е. С. Билецкая¹, А.В. Приезжев³, И.А.Тихомирова,
П.В.Михайлов², А.В.Муравьев*

**ИЗМЕНЕНИЕ МИКРОРЕОЛОГИИ ЭРИТРОЦИТОВ
И КИСЛОРОДТРАНСПОРТНОЙ ФУНКЦИИ КРОВИ
ПРИ СОЧЕТАННОМ ДЕЙСТВИИ ОЗОНА
И ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ**

Аннотация. Эффективная деформируемость эритроцитов (ДЭ), при умеренно сниженной их агрегации (АЭ), может способствовать лучшей перфузии тканей и в целом положительно влиять на кислородтранспортную функцию (КТФ). Известно, что озон оптимизирует объемный кровоток и, в том числе, за счет влияния на реологические свойства эритроцитов. Газотрансммиттеры (ГТ), оксид азота (NO) и сульфид водорода (H₂S) также оказывают положительное влияние на микрореологию эритроцитов. Однако остается не изученной проблема взаимодействия озона и ГТ. Это и стало целью настоящего исследования. Для исследования роли ГТ в изменениях микрореологии эритроцитов (человеческие эритроциты, взятые из крови здоровых доноров, n=24), их инкубировали с донорами ГТ (НПН, 100 мкМ и NaHS, 100 мкМ), отдельно и в комбинации с озоном (О₃, 6 мг/л) с последующей регистрацией ДЭ и АЭ. В другой серии опытов на образцах крови, взятых от белых крыс-самцов массой 250-300 г (n=15), регистрировали показатели КТФ цельной крови. Создавали гипокапнические условия и определяли изменения КТФ крови, содержание NOx и концентрацию H₂S в сыворотке под влиянием ее инкубации с озоном, с донорами ГТ и при сочетанном воздействии ГТ и озона. Были найдены позитивные изменения ДЭ и АЭ под влиянием как доноров ГТ и озона отдельно, так и при их совместном добавлении в среду инкубации клеток. На другой экспериментальной модели было установлено, что при добавлении озона в кровь происходит изменение КТФ. Это проявлялось в увеличении рО₂, SO₂ и уменьшении сродства гемоглобина к кислороду. Озон повышал содержание NO и H₂S в сыворотке. Таким образом, результаты исследования показали, что озон оказывает положительное влияние на микрореологию

эритроцитов, от состояния которой, зависит капиллярная перфузия. Совместное действие доноров ГТ и озона несколько больше увеличивало микрореологические ответы эритроцитов. На фоне предварительной обработки крови гипокапнической газовой смесью, влияние озона на КТФ крови заметно увеличивалось.

Ключевые слова: *кислородтранспортная функция крови, газотрансмиттеры, озон, эритроциты, деформируемость, агрегация*

V.V. Zinchuk¹, E. S. Biletskaya¹, A.V. Priezzhev³, I.A. Tikhomirova², A.V. Muravyov², P.V. Mikhailov²

CHANGES IN ERYTHROCYTE MICRORHEOLOGY AND BLOOD OXYGEN TRANSPORT FUNCTION UNDER THE COMBINED ACTION OF OZONE AND GAS TRANSMITTERS

Annotation. The effective deformability of erythrocytes (DE), with their moderately reduced aggregation (AE), can contribute to better tissue perfusion and, in general, positively affect the oxygen transport function (OTF). It is known that ozone optimizes blood flow and, in particular, due to the effect on the rheological properties of erythrocytes. Gasotransmitters (GT), nitric oxide (NO) and hydrogen sulfide (H₂S) also have a positive effect on erythrocyte microrheology. However, the problem of the interaction between ozone and GT remains unstudied. This was the aim of the present paper. To study the role of GT in changes in erythrocyte microrheology (human erythrocytes taken from the blood of healthy donors, n=24), they were incubated with GT donors (SNP, 100 μM and NaHS, 100 μM), alone and in combination with ozone (O₃; 6 mg/l) with subsequent registration of DE and AE. In another series of experiments on blood samples taken from white male rats weighing 250-300 g (n=15), the parameters of OTF of blood were recorded. Hypocapnic conditions were created and changes in blood OTF, NO_x content, and serum H₂S concentration were determined under the influence of its incubation with ozone, with GT donors, and under the combined effect of GT and ozone. Positive changes in DE and AE were found under the influence of both GT and ozone donors separately, and when they were added together to the cell incubation medium. On another experimental model, it was found that when ozone is added to the blood, a change in OTF occurs. This was manifested in an increase in pO₂, SO₂ and a decrease in the affinity of

hemoglobin for oxygen. Ozone increased NO and H₂S levels in serum. Thus, the results of the study showed that ozone has a positive effect on the microrheology of erythrocytes, on the state of which capillary perfusion depend. The combined effect of GT and ozone slightly increased the microrheological responses of erythrocytes. Against the background of pre-treatment of blood with a hypocapnic gas mixture, the effect of ozone on blood OTF increased markedly.

Keywords: oxygen transport function, gasotransmitters, ozone, erythrocytes, deformability, aggregation

Введение

При уменьшении резервов дилатации артериол возрастает роль реологических свойств крови для обеспечения перфузии тканей. Для последней особенно важна деформируемость эритроцитов [1]. Микрореология эритроцитов – деформируемость (ДЭ) и агрегация (АЭ) могут существенно изменяться под влиянием сигнальных молекул в том числе, под действием газотрансмиттеров (ГТ) [2], к которым относятся: оксид азота (NO), монооксид углерода (CO) и сульфид водорода (H₂S)[3]. Известно, что озон имеет не только антигипоксический эффект, но и улучшает кислородтранспортную функцию крови (КТФ), а также оптимизирует её реологические свойства [4]. Добавление в кровь озонированного физиологического раствора существенно изменяло её КТФ, что проявлялось в увеличении рO₂, SO₂, уменьшении сродства гемоглобина к кислороду [5]. Это сочеталось с приростом концентрации нитратов/нитритов (NO_x) и сероводорода в плазме. Поскольку установлено, что озон стимулирует продукцию эндогенных ГТ, а последние положительно влияют на ДЭ и АЭ, то комплексный анализ сочетанного влияния ГТ и озона на микрореологию эритроцитов и кислородтранспортный потенциал крови, представляет собой важную научную задачу и её решение стало целью данного исследования.

Материалы и методы

Первый протокол исследования

Образцы цельной крови (9 мл) получали венопункцией у здоровых лиц (мужчины, n=20) в вакуумные пробирки (вакутайнеры с EDTA). Исследование было одобрено местным этическим комитетом университета (Протокол №5 от 13.05.2021) и было получено информированное согласие всех испытуемых. Эритроциты отделяли от плазмы центрифугированием, трижды отмывали в

изотоническом растворе NaCl. Затем готовили суспензии эритроцитов с постоянным гематокритом (Hct=40%). Агрегацию эритроцитов (ПАЭ) регистрировали с помощью агрегометра Myenne M1 (Германия). Для определения деформируемости эритроцитов, определяли их индекс удлинения (ИУЭ) в проточной микрокамере [6]. Суспензию эритроцитов делили на несколько аликвот и клетки инкубировали при 37°C в течение 30 мин с каждым из перечисленных ниже соединений:

- 1) с донором NO – нитропропруссидом натрия (НПН, в концентрациях 100 мкМ);
- 2) со стимулятором NO-синтазы (eNOS), L-аргинином (100 мкМ);
- 3) с донором H₂S – гидросульфидом натрия (NaHS, в концентрациях 100 мкМ);
- 4) с озоном (6 мг/л).
- 5) озон + НПН (донор NO, в концентрации 100 мкМ);
- 6) озон + L-аргинином (100 мкМ);
- 7) озон + NaHS (в концентрации 100 мкМ).

В каждом опыте в качестве контроля использовали суспензию эритроцитов, инкубируемых в течение 30 мин при 37°C в растворе Рингера без добавления указанных выше препаратов.

Раствор Рингера барботировали озонотоксической смесью при помощи озонотерапевтической установки УОТА-60-01 (ООО «Медозон», Россия), в которой предусмотрено измерение концентрации озона оптическим методом в ультрафиолетовом диапазоне. В опытах и в контроле проводилось по 20 параллельных измерений микрореологических характеристик эритроцитов.

Второй протокол исследования

Смешанную венозную кровь брали из правого предсердия от белых крыс-самцов массой 250-300 г (n=15), в объеме 8 мл с гепарином в качестве антикоагулянта. Животных наркотизировали, используя тиопентала натрия (50 мг/кг интраперитонеально). Опыты проводили в соответствии рекомендациями комитета по биомедицинской этике и деонтологии учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет». Кровь разделяли на 6 аликвот по 3 мл. Первая проба была *контрольной*. В пробах 2, 4, 5, 6 осуществляли обработку крови *гипокапнической газовой смесью* (4,2% CO₂; 5,3% O₂, 90,5% N₂). К пробам номер 3, 4, 5, 6 добавляли озонированный изотонический раствор NaCl с озоном 6 мг/л в объеме 1 мл (в 1-ю и 2-ю без озонирования) и 0,1 мл

растворов, содержащих доноры ГТ: в 5-ю – нитроглицерин (донор NO, 50 мкМ), 6-ю – NaHS (380 мкМ, Sigma-Aldrich, США); в 1-ю, 2-ю, 3-ю, 4-ю – по 0,1 мл раствора NaCl. Показатели КТФ крови определяли на газоанализаторе Stat Profile pHox plus L (США) при 37°C: парциальное давление кислорода (pO_2), степень оксигенации (SO_2) и кислотно-основное состояние (pCO_2 , pH и TCO_2). Сродство гемоглобина к кислороду оценивали спектрофотометрическим методом по показателю $p50_{\text{реал}}$ (pO_2 крови при 50% насыщении ее кислородом). По суммарному содержанию нитратов/нитритов NOx (NO_3^-/NO_2^-) в плазме крови оценивали продукцию эндогенного NO спектрофотометрическим методом. Уровень эндогенного сероводорода (H_2S) в плазме крови определяли спектрофотометрическим методом, основанном на реакции между сульфид-анионом и раствором N,N-диметил-парафенилендиамина солянокислого в присутствии хлорного железа при длине волны 670 нм. Концентрацию газотрансмиттеров выражали в мкмоль/л.

Статистическая обработка, полученных данных исследования

Все выборки показателей проверяли на тип распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка ("Statistica 10.0"). Достоверность полученных данных, с учетом размеров малой выборки, множественных сравнений, оценивалась с использованием U-критерия Манна-Уитни. При проведении парных сравнений уровней показателей внутри групп при повторных измерениях, использовали критерий Вилкоксона. В тексте приведены средние величины параметров и их стандартное отклонение ($M \pm \sigma$). В необходимых случаях (Протокол 2) результаты представлены как медиана (Me), 25-й и 75-й квартильный размах. Уровень статистической значимости принимали за $p < 0,05$ и $p < 0,01$.

Результаты

После инкубации эритроцитов в среде содержащий озон наблюдали прирост ДЭ на 6% ($p < 0,01$) и уменьшение АЭ на 17% (рис. 1). Добавление к озону НПН существенно не изменило величину прироста ДЭ, но в большей мере снизило АЭ, на 35% ($p < 0,01$).

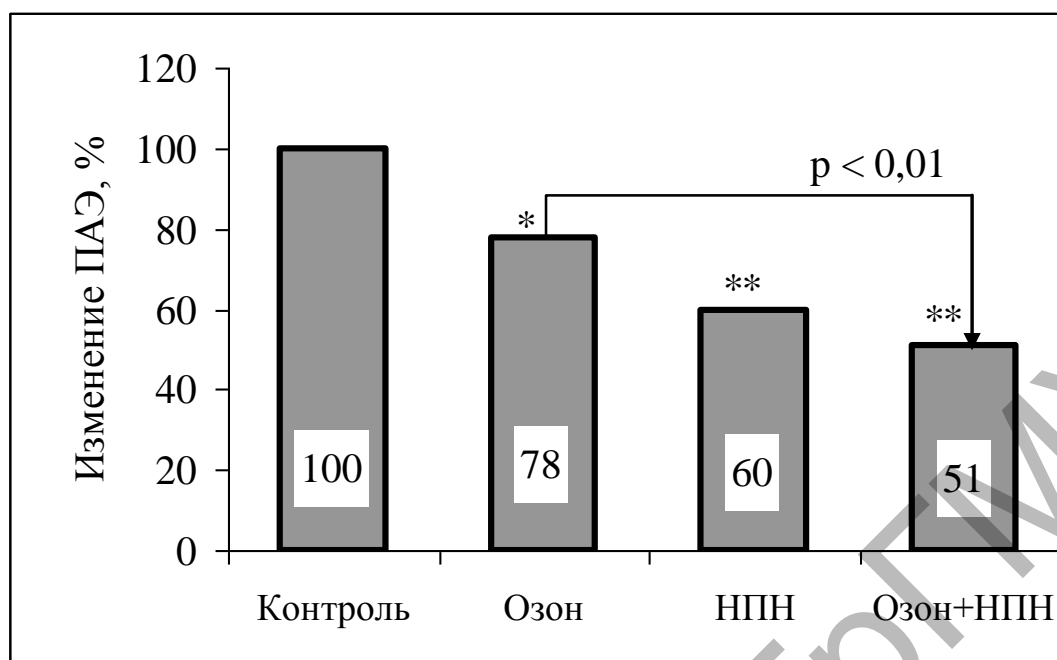


Рис. 1. Изменение микрореологии эритроцитов под влиянием их инкубации с озоном, нитропруссидом натрия (НПН), и их при сочетанном воздействии «озон+НПН».

Примечание: * - различия с контролем достоверны при $p < 0,01$, ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов

В этих условиях применения указанных соединений характер изменения агрегации был сходным с тем, что наблюдали при действии озона и НПН. Происходило достоверное снижение АЭ на 15-37% ($p < 0,01$). Сравнительный анализ показал, что при добавлении в среду инкубации к озону донора NO, НПН снижении АЭ было достоверно большим ($p = 0,005$), чем при инкубации клеток с одним озоном.

При оценке микрореологических ответов на озон и его сочетание с донором H_2S NaHS направленность сдвигом ДЭ и АЭ были сходными с таковыми при использовании NO и L-аргинина. Однако комбинация озона с NaHS давала достоверно больший эффект, чем один озон. Прирост ДЭ был на 2% ($p = 0,001$), а снижение АЭ на 11% ($p = 0,014$) было заметнее, чем отдельное действие озона. Следовательно, можно заключить, что добавление в среду инкубации, содержащей озон (6,0 мг/л) доноров газотрансмиттеров достоверно повышает микрореологический ответ эритроцитов.

3. Участие газотрансмиттеров в модификации механизмов транспорта кислорода крови под действием озона

Таблица 1

Влияние озона на кислородтранспортную функцию крови при добавлении доноров газотрансммиттеров в гипокапнических условиях (Me [25; 75])

Показатель	Контроль	Озон	Нитроглицерин + озон	NaHS+ озон
SO ₂ , %	30,15 [23,10; 32,10]	33,65 [31,0; 37,8]*#	62,00 [60,2; 66,7]*#Ψ\$	55,15 [47,1; 58,4]*#ΨΩ
pO ₂ , мм рт. ст.	20,35 [19,00;22,50]	24,25 [21,8; 25,6]*#	37,7 [34,2; 39,2]*#Ψ\$	337,5 [30,6; 34,7]*#ΨΩ
pH, ед.	7,411 [7,372; 7,431]	7,431 [7,417; 7,440]*	7,421 [7,376; 7,46]	7,431 [7,341; 7,492]
TCO ₂ , ммоль/л	21,45 [20,90; 24,00]	20,95 [20,7; 24,9]#	25,7 [25,2; 26,8]*Ψ\$	25,05 [24,6; 25,7]*Ψ\$
p50реал, мм рт. ст.	27,16 [26,26; 27,66]	30,84 [27,96; 37,21]*#	39,10 [38,08; 48,92]*#Ψ\$	38,92 [30,56;48,19]*#Ψ
p50станд, мм рт. ст.	26,75 [26,60; 27,00]	31,95 [27; 36,8]*#	38,15 [37,7; 39,5]*#Ψ\$	36,95 [36,3; 42,4]*#Ψ

Примечание: достоверные изменения в сравнении с группами: контрольной (*), гипокапния (#), озон (Ψ), гипокапния + озон (\$), гипокапния + нитроглицерин + озон (Ω); pO₂ – парциальное давление кислорода; SO₂ – степень оксигенации; TCO₂ – общая углекислота плазмы крови; p50реал – pO₂ крови при 50% насыщении ее кислородом; p50станд – pO₂ крови при 50% стандартном насыщении ее кислородом.

В *in vitro* опытах исследовали характер изменения показателей кислородтранспортной функции (КТФ) крови под влиянием озона и газотрансммиттеров. На пробах крови была реализована модель гипокапнии и на ее основе изучали механизмы изменений КТФ крови у экспериментальных животных. Действие озона приводит к росту основных показателей, отражающих транспорт кислорода кровью.

Предварительная гипокания способствует усилению эффекта озона. На это указывал прирост pO_2 – на 32% ($p<0,05$) и SO_2 – на 68% ($p<0,05$) в сравнении с группой, в которой выполнялось только озонирование (без гипокании). Выявлен сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо. На это указывало увеличение $p50_{реал}$ на 23% (табл. 1, $p<0,05$). Добавление нитроглицерина привело к усилению эффекта озона, что сочеталось с приростом pO_2 на 18 % ($p<0,05$) и SO_2 на 10% (табл. 1, $p<0,05$). Было установлено, что NaHS подобным эффектом не обладает. При гипокании наблюдается снижение КТФ крови в сравнении с контролем (табл. 1).

Содержание ГТ: NO и H_2S в плазме крови, под действием озона возрастала в сравнении с контрольной группой (табл. 2). В условиях гипокании данные параметры не изменяются в сравнении с пробами, в которых содержался только озон. Добавление нитроглицерина сопровождалось увеличением содержания NOx на 94% ($p<0,05$), а NaHS повысил содержание этих продуктов метаболизма NO в крови на 57% ($p<0,05$). Концентрация H_2S в плазме возрастала на 82% ($p<0,05$) и на 127% ($p<0,05$), соответственно, в сравнении с данными группы «озонирование+гипокания».

Таблица 2

Влияние озона на концентрацию нитрат/нитритов и сероводорода в плазме крови при добавлении доноров газотрансмиттеров в гипоканических условиях (Ме [25; 75])

Показатель	Контроль	Гипокания	Озон	Гипокания + озон	Гипокания + нитроглицерин + озон	Гипокания + NaHS + озон
NO_3^-/NO_2^- , мкмоль/л	15,42 [14,12; 18,82]	22,21 [15,59; 28,82]*	27,50 [25,0; 28,53]*	26,21 [22,94; 29,12]*	50,8 [44,29; 54,41]*# Ψ\$	41,18 [40,47; 50,29]*#Ψ \$
H_2S , мкмоль/л	7,66 [7,13; 10,52]	10,86 [7,89; 20,40]	13,16 [11,18; 15,79]*	14,21 [11,84; 19,21]*	25,88 [23,82; 26,58]*# Ψ\$	32,31 [31,53; 33,21]*#Ψ \$Ω

Примечание: достоверные изменения в сравнении с группами: контрольной (*), гипокания (#), озон (Ψ), гипокания + озон (\$), гипокания + нитроглицерин + озон (Ω); NOx (NO_3^-/NO_2^-) –

содержание суммарных нитратов/нитритов в сыворотке крови; H_2S – концентрация сероводорода в сыворотке крови.

Обсуждение

Инкубация эритроцитов с озоном сопровождалась достоверным приростом ДЭ и выраженным уменьшением АЭ. Ранее указывалось на то, что озон нормализует реологические свойства крови, [4]. Озон может стимулировать синтез гемоксигеназы-1 (ГО-1) и NO клетками сосудистого эндотелия [7]. Кроме того, озонированная плазма способна повышать экспрессию ГО-1 в эндотелиальных клетках. В свою очередь гемоксигеназа-1 стимулирует образование газотрансммиттера – монооксида углерода (CO) [8]. Эта сигнальная молекула также как и два других ГТ достоверно и положительно влияют на микрореологические характеристики эритроцитов и их транспортный потенциал [9]. Было показано, что применение доноров газотрансммиттеров (НПН и NaHS) в сочетании с озоном увеличивало микрореологические эффекты указанных соединений. Это может быть связано с тем, что озон стимулирует эндогенный синтез как NO, так и H_2S [5]. Что касается влияния озона и его сочетания с донорами ГТ на кислородтранспортную функцию крови, то в наших опытах было показано увеличение эффекта озона на КТФ крови. Было обнаружено, что при проведении предварительной обработки крови гипокапнической газовой смесью прирост КТФ, при добавлении доноров газотрансммиттеров, был более выраженным. При этом можно было предположить по характеру изменения рН и pCO_2 , что вследствие эффекта Бора произойдет сдвиг КДО влево, однако, полученные нами результаты свидетельствуют об обратном. Снижение концентрации ионов водорода и парциального давления углекислого газа существенно уменьшает аффинность крови к кислороду, что затрудняет поступление кислорода в ткани на уровне капилляров большого круга кровообращения, и, наоборот, при увеличении этих параметров (эффект Бора). Как известно, действие озона приводит к увеличению уровня 2,3-дифосфоглицерата способствующего повышению СГК и это способствует ослаблению эффекта Бора [10]. Озон также способствует увеличению уровня монооксида азота, активируя механизмы его образования в эритроците. Сероводород и монооксид азота влияют на синтез друг друга, а также могут напрямую взаимодействовать с образованием новых соединений (HSNO , RSNOs и др.), которые, в свою очередь, модулируют их биологические эффекты и биодоступность [11]. В

ответ на действие озона в эритроцитах происходит изменение образования газотрансмиттеров NO и сероводорода, которое влияет непосредственно на модификацию свойств гемоглобина, так и опосредованно через гемоглобиннезависимые механизмы изменение структурной организации эритроцитарной мембраны, все это сочетается с повышением деформируемости эритроцитов и их транспортного потенциала.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке в рамках международного научного проекта Российского фонда фундаментальных исследований «БРФФИ–РФФИ-2020» (№ 20-515-00019- РФФИ) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований и (№ M20P-428 – БРФФИ)

Библиографический список

1. Propel A.S., Johnson P.C. Microcirculation and Hemorheology. *Annul. Rev. Fluid. Mech.* 2005; 37: 43–69. DOI: 10.1146/annurev.fluid.37.042604.133933.
2. Bor-Kucukatay M., Meiselman H.J., Başkurt O.K. Modulation of density-fractionated RBC deformability by nitric oxide. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2005; 33(4): 363-367.
3. Olas B. Gasomediators (NO, CO, and H₂S) and their role in hemostasis and thrombosis. *Clin. Chim. Acta.* 2015; 445: 115–121. DOI: 10.1016/J.CCA.2015.03.027.
4. Катюхин Л.Н. Влияние курсового лечения инъекциями озонированного физиологического раствора на реологические свойства эритроцитов у больных с комплексной патологией. *Физиология человека.* 2016;100(6):100–105.
5. Зинчук В.В., Билецкая Е.С. Эффект озона на кислородтранспортную функцию крови при различных режимах воздействия в опытах *in vitro*. *Биофизика.* 2020; 65(5): 15-919. DOI 10.31857/S0006302920050099.
6. Muravyov A.V., Antonova N., Tikhomirova I.A. Red blood cell micromechanical responses to hydrogen sulfide and nitric oxide donors: Analysis of crosstalk of two gasotransmitters (H₂S and NO) // *Series on Biomechanics.* - 2019. - Vol. 33. - 34-40.
7. Pecorelli A., Bocci V., Acquaviva A., Belmonte G., Gardi C., Virgili F., Ciccoli L., Valacchi G. NRF2 activation is involved in ozonated human serum upregulation of HO-1 in endothelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2013; 267(1): 30-40. DOI: 10.1016/j.taap.2012.12.001.

8. Bocci V., Aldinucci C., Mosci F., Carraro F., Valacchi G. Ozonation of human blood induces a remarkable upregulation of heme oxygenase-1 and heat stress protein-70. *Mediators of Inflammation*. 2007, Article ID 26785, 6. DOI:10.1155/2007/26785.
9. Muravyev A.V., Tikhomirova I.A., Bulaeva S.V., Petrochenko E.P., Malysheva Yu.V. Effect of carbon monoxide gasotransmitter on microrheology and elasticity of erythrocyte membranes. *Biological Membranes: Journal of Membrane and Cell Biology*. 2021; 38 (4): 217-224. DOI: DOI: 10.31857 / S0233475521030063. 6.
10. Clavo B., Santana-Rodríguez N., Llontop P., Gutiérrez D., Suárez G., López L., Rovira G., Martínez-Sánchez G., González E., Jorge I.J., Perera C., Blanco J., Rodríguez-Esparragón F. Ozone Therapy as Adjuvant for Cancer Treatment: Is Further Research Warranted? *Evid base Compl Alternative Med*. 2018: 1-11. DOI.org/10.1155/2018/7931849.
11. Lo Faro M.L., Fox B., Whatmore J.L., Winyard P.G., Whiteman M. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. *Nitric Oxide*. 2014;41:38-47. DOI: 10.1016/j.niox.2014.05.014.

УДК 616.13/.14-018.74:[613.268:665.353.4]-053.81

Л.В. Кежун, Л.В. Якубова, Ю.И. Белоус

НАРУШЕНИЕ ФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ У МОЛОДЫХ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОМ ПОТРЕБЛЕНИИ ПАЛЬМОВОГО МАСЛА

Аннотация. Обследовано 137 здоровых добровольцев, средний возраст 20 (20;21) лет, из них 33,6% (n=46) юношей и 66,4% (n=91) девушек. Сравнительный анализ показал, что потребление 25 граммов пальмового масла в суточном рационе питания в течении 12 недель приводит к нарушению функции эндотелия у молодых здоровых добровольцев.

Ключевые слова: пальмовое масло, функция эндотелия, молодые здоровые добровольцы

L.V. Kezhun, L.V. Yakubova, Yu.I. Belous
**ENDOTHELIAL FUNCTION DISORDER IN YOUNG HEALTHY
PERSONS WITH DIFFERENTIAL CONSUMPTION
OF PALM OIL**

Abstract. 137 healthy volunteers were examined, the average age is 20 (20; 21) years, 33.6% (n = 46) among them were boys and 66.4% (n = 91) were girls. A comparative analysis showed that the consumption of 25 grams of palm oil in the daily diet for 12 weeks leads to disorder endothelial function in young healthy volunteers.

Key words: palm oil, endothelial function, young healthy volunteers

Введение

Одним из факторов риска развития сердечно-сосудистой патологии, согласно результатам экспериментальных и клинических работ, является употребление пальмового масла. Пальмовое масло отличается от других растительных масел высоким содержанием насыщенных жирных кислот (НЖК) – пальмитиновая кислота ($C_{16:0}$) составляет 41-50% и близко по составу к животному жиру. В настоящее время возрастает удельный вес пальмового масла в пищевом рационе жителей ряда стран, включая республику Беларусь.

Анализ исследований 23 стран 2011 года показывает, что каждый килограмм пальмового масла, употребляемый ежегодно, достоверно увеличивал смертность от ишемической болезни сердца (ИБС) (68 смертельных случаев на 100000 (95% ДИ [21-115]) [1]. По данным крупного мета-анализа, выполненного Wang Q. и соавторами, в структуру смертности от сердечно-сосудистых заболеваний, достоверный вклад вносят избыточное потребление НЖК, повышая риск развития ИБС в возрасте 25-34 лет на 19% (Относительный риск (ОР) = 1,19 (95% ДИ 1,09-1,30) [2]. Так же, в экспериментальных исследованиях, проведённых на мышах, было показано негативное влияние пальмового масла на уровень артериального давления [3, 4], на морфометрию аорты и клеточную адгезию молекул сосудов [5], выработку эндогенных вазодилататоров, в частности оксида азота [6].

Цель

Оценить изменение функция эндотелия у молодых здоровых добровольцев при дифференцированном потреблении пальмового масла.

Методика

Обследовано 137 здоровых добровольцев – студентов Гродненского государственного медицинского университета (ГрГМУ), средний возраст 20 (20;21) лет, из них 33,6% (n=46) юношей и 66,4% (n=91) девушек. Методом случайной выборки здоровые добровольцы были разделены на пять групп: группа опытная – ГО (n=32) с добавлением в суточный рацион питания 25 граммов пальмового масла; группа опытная 1 – ГО-1 (n=20) (15 граммов пальмового масла), группа опытная 2 – ГО-2 (n=21) (7,5 граммов пальмового масла); группа сравнения – ГС (n=30) с добавлением в суточный рацион питания 25 граммов сливочного масла; группы контроля – ГК (n=34) с обычным рационом питания. Длительность наблюдения составила 12 недель.

С помощью аппаратно-программного комплекса «Импекард-М» (РБ) оценивалась функция эндотелия сосудов по эндотелий зависимой вазодилатации (ЭЗВД) при выполнении пробы с реактивной гиперемией. Диагностические заключения строились следующим образом: при $\Delta dz/dt/dz/dt \geq 12\%$ – ЭЗВД считалась не нарушенной, при $\Delta dz/dt/dz/dt < 12\%$ – расценивалась, как вазомоторная дисфункция эндотелия. Продукцию оксида азота (NO) эндотелием сосудов определяли по суммарному содержанию его конечных метаболитов – нитратов/нитритов в плазме крови, спектрофотометрическим методом с применением реактива Грисса [5].

Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием программы «STATISTICA 10.0».

Результаты и обсуждение

Проведен сравнительный анализ показателей функции эндотелия по ЭЗВД, уровню нитратов/нитритов в плазме крови, их динамик у здоровых добровольцев групп ГК, ГО, ГС, ГО-1, ГО-2 исходно и после 12 недель исследования. Как следует из данных, представленных в таблице, после 12 недель исследования снижение ($p < 0,05$) ЭЗВД произошло как в группе ГО, так и в группе ГС; в группе ГК снижение отмечено на 1 минуте, в группах ГО-1 и ГО-2 ЭЗВД не изменилась ($p > 0,05$). Наибольшим снижением ЭЗВД было в группе ГО, в которой динамика ЭЗВД на первой минуте была больше по сравнению с группой ГО-2 ($p = 0,02$), а динамика ЭЗВД на второй минуте была больше по сравнению с группами ГО-2 ($p = 0,02$) и ГО-1 ($p = 0,001$), соответственно. Признаки вазомоторной дисфункции

эндотелия после 12 недель исследования встречались достоверно чаще ($p < 0,05$) в группе ГО (100% случаев) по сравнению с группами ГО-1 (65% случаев) и ГО-2 (66,7% случаев).

Таблица 1.

Показатели функции эндотелия и их динамики в группах здоровых добровольцев исходно и после 12 недель наблюдения

Показатели, единицы измерения		Группы				
		ГК	ГС	ГО	ГО-1	ГО-2
ЭЗВД на 1 мин, %	исходно	5,3 (-6,0; 19,0)	8,9 (4,1; 18,2)	6,8 (3,1; 19,0)	1,0 (-1,3; 2,9)	0,9 (-4,4; 3,8)
	повторно	1,8 (-0,2; 4,9)* ³	0,8 (- 1,1;3,1)*	0,2 (-2,7; 2,7)* ⁰	4,1 (- 10,9;27,2)	-1,7 (- 9,2;22,5)
	динамика	-0,06 (-0,2; - 0,08)	-0,1 (-0,1; - 0,01)	-0,10 (-0,12; - 0,02) ₁	0,02 (- 0,16;0,28)	0,05 (-0,06; 0,16) ³
ЭЗВД на 2 мин, %	исходно	3,3 (-9,2; 12,1)	8,3 (1,9;24,0)	11,7 (2,4; 28,0)	-0,1 (-1,9; 0,6)	0,6 (-4,6; 2,2)
	повторно	2,4 (-3,3; 4,3) ³	0,4 (-1,7; 1,6)*	-0,6 (-4,0; 2,4)* ⁰	4,1 (- 10,9;27,2)	-1,7 (- 9,2;22,5)
	динамика	-0,03 (-0,1; - 0,1)	-0,07 (-0,2; - 0,02)	-0,17 (-0,30;- 0,06) ^{1,2}	0,03 (- 0,13;0,27) ³	0,03 (-0,06; 0,26) ³
Нитраты/нитриты, мкмоль/л	исходно	10,5 (9,5; 13,5)	10,0 (7,3; 12,4)	11,4 (9;14,2)	8,2 (6,9; 10,5)	8,2 (7; 12,3)
	повторно	8,9 (7,0; 11,4)	10,5 (7,2; 15,4)	10,2 (7,3;12,9)	12,6 (8,4; 14,2) *	13,2 (8,5; 15,5)
	динамика	-0,3 (-3,2;3,8)	-1,0 (-3,8;2,8)	-0,6 (-4,9;4,0)	3,7 (0,68;6,0)	1,7 (-1,2;7,4)

Примечание: * – различие в группе между показателями исходно и после 12 нед. исследования при $p \leq 0,05$; ⁰ – различие показателей с группой ГК при $p \leq 0,05$; ¹ – различие показателей с группой ГО-2 при $p \leq 0,05$; ² – различие показателей с группой ГО-1 при $p \leq 0,05$; ³ – различие показателей с группой ГО при $p \leq 0,05$; ⁴ – различие показателей с группой ГС при $p \leq 0,05$.

Установлено также, что ЭЗВД стала ниже ($p=0,008$) в группе ГО по сравнению с группой ГК. ЭЗВД не различалась между группами ГК и ГС ($p=0,07$), а также не получено различий по ЭЗВД между группами ГО и ГС ($p=0,50$), между динамиками ЭЗВД групп ГО, ГС и ГК ($p>0,05$), а также динамиками ЭЗВД групп ГО-1, ГО-2, ГК и ГС ($p>0,05$). Как представлено в таблице, в группе ГО-1 произошло увеличение ($p<0,05$) уровня нитратов/нитритов после 12 недель исследования, в группах ГК, ГС, ГО и ГО-2 данный показатель не изменился ($p>0,05$). Отличий между анализируемыми группами по уровню нитратов/нитритов и их динамике не было ($p>0,05$) во всех случаях. Полученные результаты проведённого нами исследования также согласуются с данными экспериментальных исследований, показавших ухудшение ЭЗВД у мышей при использовании неоднократно нагретого пальмового масла. Так, при приёме 5-тикратно разогретого пальмового масла зафиксировано ухудшение ЭЗВД на 25%, 10-тикратно разогретого – на 33%, что сопровождалось повышением ($p < 0,05$) у них уровня АД [3].

Таким образом, после 12 недель наблюдения ЭЗВД достоверно снизилась в группе ГО (25 граммов) и стала ниже по сравнению с группой ГК, находящейся на обычном рационе питания, также получена наибольшая динамика по ухудшению ЭЗВД в группе ГО по сравнению с группами ГО-1 и ГО-2, с добавлением 15 и 7,5 граммов пальмового масла в суточный рацион питания, что предполагает возможное негативное его влияние на функцию эндотелия у здоровых добровольцев, имеющее дозозависимый эффект.

Вывод

У здоровых добровольцев потребление 25 граммов пальмового масла в суточном рационе питания в течение 12 недель приводит к ухудшению вазомоторной функции эндотелия, что будет способствовать повышению риска развития ССЗ.

Библиографический список

1. Chen B.K. [et al.] Multi-Country analysis of palm oil consumption and cardiovascular disease mortality for countries at different stages of economic development: 1980-1997 // Global Health. – 2011. – Vol. 16, № 7. – P. 45.
2. Wang Q. [et al.] Impact of nonoptimal intakes of saturated, polyunsaturated, and trans fat on global burdens of coronary heart disease // J Am Heart Assoc. – 2016. Vol. 5, № 1. – e002891. Doi: 10.1161/JAHA.115.002891
3. Leong X.F. [et al.] Heated palm oil causes rise in blood pressure and cardiac changes in heart muscle in experimental rats // Arch. Med. Res. – 2008. – Vol. 39, № 6. – P. 567–572.
4. Jaarin K., Mustafa M.R., Leong X.-F. The effects of heated vegetable oils on blood pressure in rats // Clinics (Sao Paulo). – 2011. – Vol. 66, № 12. – P. 2125-2132. – doi:10.1590/S1807-59322011001200020
5. Ng C.Y. [et al.] Involvement of inflammation and adverse vascular remodelling in the blood pressure raising effect of repeatedly heated palm oil in rats // Int. J. Vasc. Med. – 2012. – doi: 10.1155/ 2012 /404025.
6. Mosage H., Kok B., Huizenga J.R. Nitrite and nitrate determination in plasma: a critical evaluation // Clin.Chem. – 1995. – Vol. 41. – P. 892–896.

УДК 616-001.17:618.2-06

Т.В. Ковальчук-Болбатун, И.Э. Гуляй

ВЛИЯНИЕ РАННЕЙ ХИРУРГИЧЕСКОЙ НЕКРЭКТОМИИ У БЕРЕМЕННЫХ КРЫС С ГЛУБОКИМ ТЕРМИЧЕСКИМ ОЖОГОМ КОЖИ НА ПРООКСИДАНТНО- АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС И СОДЕРЖАНИЕ NO В ОРГАНИЗМЕ МАТЕРИ

Аннотация. В опытах на 54 беременных крысах, которым производился глубокий термический ожог кожи (3-и сутки беременности) и выполнялась ранняя хирургическая некрэктомия (6-е сутки беременности) установлено влияние ранней хирургической некрэктомии на состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса (достоверное снижение активности каталазы и α -токоферола, рост

концентрации церулоплазмينا) и содержание NO в организме матери.

Ключевые слова: беременность, термический ожог кожи, перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита, оксид азота

T.V. Kovalchuk-Bolbatun, I.E. Gulyai

**INFLUENCE OF EARLY SURGICAL NECRECTOMY IN
PREGNANT RATS WITH DEEP THERMAL SKIN BURNS
ON PROOXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE
AND NO CONTENT IN THE MOTHER'S BODY**

Abstract. In experiments on 54 pregnant rats that underwent a deep thermal skin burn (3rd day of pregnancy) and early surgical necrectomy (6th day of pregnancy), the effect of early surgical necrectomy on the state of the prooxidant-antioxidant balance was established (a significant decrease in the activity of catalase and α -tocopherol, an increase in the concentration of ceruloplasmin) and the content of NO in the mother's body.

Key words: pregnancy, thermal skin burn, lipid peroxidation, antioxidant protection, nitric oxide

Введение

Одним из путей повышения эффективности лечения глубокого термического ожога кожи признается выполнение ранней хирургической некрэктомии (РХН) уже в остром периоде ожоговой травмы [1]. Гибель тканей в результате термического воздействия сопровождается образованием большого количества токсических продуктов. Раннее удаление ожогового струпа у обожженных уменьшает выраженность катаболических реакций, снижает интенсивность реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ), нарушений клеточного и гуморального звеньев иммунной защиты, предотвращает развитие сепсиса [2]. Однако хирургическое вмешательство является операционной травмой и может повлечь за собой ухудшение состояния, т.е. вызвать эффект «второго удара» [3]. Известно, что термическая травма сопровождается выраженной активацией процессов ПОЛ на фоне истощения антиоксидантной защиты (АОЗ), а также подъемом уровня нитрат/нитритов в плазме крови, в связи с этим, изучение влияния РХН при глубоком термическом ожоге кожи у беременных крыс на прооксидантно-

антиоксидантный баланс и содержание NO в организме матери является необходимым [4].

Методика

Экспериментальное исследование проведено на 54 беременных крысах массой 200-250г., которые были разделены на три группы. Контрольная группа – беременные интактные крысы, первая опытная группа – беременные крысы с глубоким термическим ожогом кожи (3-и сутки беременности), вторая опытная группа – беременные крысы с глубоким термическим ожогом кожи, которым выполнялась ранняя некрэктомия (6-е сутки беременности). С разрешения комитета по биомедицинской этике и деонтологии учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет» ожог наносили после введения тиопентала натрия (внутрибрюшинно, в дозе 50 мг/кг). Методика выполнения экспериментальной травмы предусматривала ожог III степени освобожденной от шерсти кожи спины. Ожог наносили на 3-и сутки беременности (первым днем беременности считался день обнаружения сперматозоидов во влагалищных мазках) горячей жидкостью (вода) 99-100°C в течение 15 секунд специально разработанным устройством [5]. В результате воздействия термического агента создавались стандартные по площади (около 12см²) ожоговые раны. После нанесения термического ожога на рану крепили предохранительную камеру [6]. Некрэктомию выполняли через трое суток после моделирования термической травмы, под обезболиванием (тиопентал натрия внутрибрюшинно, в дозе 40 мг/кг). Далее на рану накладывали D4 повязку, крепили предохранительную камеру. Под адекватным наркозом (50 мг/кг тиопентала натрия интраперитонеально) на 13-е и 20-е сутки беременности животные выводились из эксперимента, производился забор смешанной венозной крови, путем интракардиальной пункции. Активность процессов ПОЛ оценивали по содержанию первичных – диеновые конъюгаты (ДК) и промежуточных - малоновый диальдегид (МДА) продуктов. Уровень ДК в плазме определяли по интенсивности поглощения липидным экстрактом монохроматического светового потока в области спектра 232–234нм, характерного для конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов [7]. Оптическую плотность измеряли на спектрофлуориметре СМ 2203 «СОЛАР» (Беларусь) при длине волны 233нм по отношению к контролю. Концентрацию ДК выражали в

$\Delta D_{233}/\text{мл}$. Содержание МДА оценивали по взаимодействию с 2'-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), которая при нагревании в кислой среде приводит к образованию триметинового комплекса розового цвета [8]. Интенсивность окраски измеряли спектрофотометрически на спектрофотометре РV1251С «СОЛАР» (Беларусь) при длине волны 535нм по отношению к контролю. Концентрацию МДА выражали в мкмоль/л. Для определения активности каталазы в плазме использовали метод М. Королюк, основанный на спектрофотометрической регистрации количества окрашенного продукта реакции H_2O_2 с молибденово-кислым аммонием, имеющим максимальное светопоглощение при длине волны 410нм. Активность каталазы выражали в нмоль H_2O_2 /мин/мг белка. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 нмоль продукта за 1 минуту в условиях испытания. Для определения содержания церулоплазмينا в плазме крови использовали модифицированный метод Равина [7], принцип метода которого основан на окислении р-фенилендамина при участии церулоплазмينا. Концентрацию α -токоферола и ретинола определяли по методу S. L. Taylor [9], основанному на определении интенсивности флуоресценции гексанового экстракта при длине волны возбуждения 286нм и испускания 350нм (для α -токоферола) и при длине волны возбуждения 325нм и испускания 470 нм (для ретинола) на спектрофлуориметре СМ 2203 «СОЛАР» (Беларусь). В контрольную пробу вместо исследуемого материала вносили аликвоту бидистиллированной воды, а в стандартную – рабочего раствора, приготовленного из стандартов α -токоферола и ретинола («Sigma»). Концентрацию α -токоферола и ретинола в плазме выражали в мкмоль/л. Продукцию NO оценивали по концентрации нитрат/нитритов с помощью реактива Грисса [10].

Результаты и обсуждение

На 13-е сутки беременности в результате моделирования термического ожога кожи у экспериментальных животных отмечался значительный подъем концентрации ДК в плазме крови на 75% ($p<0,05$), МДА – на 44% ($p<0,05$), после проведения ранней некрэктомии уровень ДК вырос на 116,7% ($p<0,05$), МДА – на 59,3% ($p<0,05$) в сравнении с контрольной группой. Уровень ДК оставался увеличенным на 66,7% ($p<0,05$) и на 20-е сутки беременности в обеих опытных группах в сравнении с контролем. Содержание МДА на 20-е сутки не отличалось от контрольных значений в обеих опытных

группах. РХН оказала угнетающее воздействие на антиоксидантную систему, так активность каталазы снизилась до 0,35 (0,31; 0,37) нмоль H_2O_2 /мин/мг белка, содержание α -токоферола и ретинола уменьшилось на 28,5% ($p < 0,05$) и 12,5% ($p > 0,05$) соответственно в сравнении с группой беременных крыс с термической травмой без РХН. При этом отмечалась высокая концентрация церулоплазмينا в плазме крови экспериментальных животных после выполнения ранней некрэктомии (369 (339; 460) мг/л ($p < 0,05$)) в сравнении с первой опытной группой (282 (248; 319) мг/л) и контролем (238 (202; 246) мг/л). Значительное увеличение содержания церулоплазмينا можно объяснить тем, что данный антиоксидант является белком острой фазы воспаления, который реагирует в ответ на любое повреждение тканей. На 20-е сутки беременности дисбаланс прооксидантно-антиоксидантного состояния в группе экспериментальных животных, где проводилась РХН становился менее выраженным и значения большинства показателей процессов ПОЛ и АОЗ не отличались от таковых в группе беременных крыс с термическим ожогом кожи, где хирургическое вмешательство не проводилось.

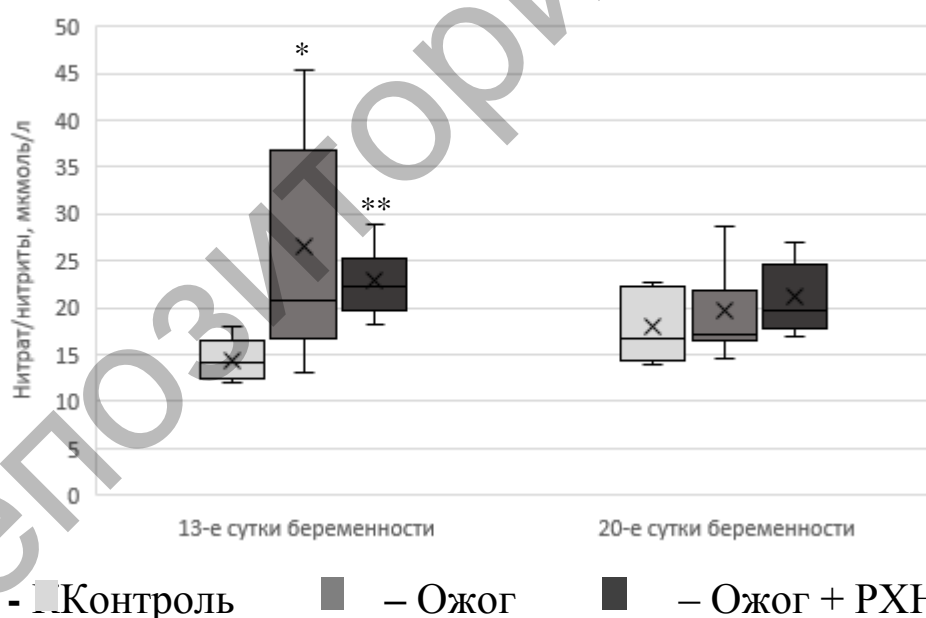


Рис. 1. Изменения концентрации нитрат/нитритов в плазме крови у беременных крыс с глубоким термическим ожогом кожи и после выполнения ранней хирургической некрэктомии (* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ изменения в сравнении с контролем)

Содержание нитрат/нитритов в плазме крови беременных крыс с термическим ожогом кожи (рис.1), которым выполнялась РХН, было

значительно повышено на 13-е сутки беременности 22,2 (19,7; 25,3) мкмоль/л ($p < 0,01$) в сравнении с контрольной группой (14,2 (13; 14,9) мкмоль/л), что указывает на активацию L-аргинин-NO системы. Однако в сравнении с группой беременных крыс с термическим повреждением без хирургического лечения достоверных различий не выявлено.

Таким образом, выполнение РХН у беременных крыс с глубоким термическим ожогом кожи сопровождается высокой активностью свободнорадикальных процессов (увеличение ДК, МДА, нитрат/нитритов), при этом наблюдается угнетающее действие на АОЗ (достоверное снижение активности каталазы и α -токоферола).

Библиографический список

1. Чичков О. В., Высоцкий С. А., Бекмуратов А. Я. Экспериментальное обоснование эффективности обширной некрэктомии и микроаутодермопластики в остром периоде ожоговой болезни // Вестник Новгородского государственного университета им. Ярослава Мудрого. – 2010. – № 59. – С. 72–77.

2. Рева И.В., Одинцова И.А., Усов В.В. и др. Оптимизация хирургической тактики лечения больных с глубокими термическими ожогами // Вестник хирургии имени И.И. Грекова. – 2017. – № 2. – С. 45–50.

3. Lasanianos N.G., Kanakaris N.K., Dimitriou R. et al. Second hit phenomenon: existing evidence of clinical implications // Injury. – 2011. – Vol. 42, № 7. – P. 617–29.

4. Ковальчук-Болбатун Т.В., Зинчук В.В., Смотрин С.М. и др. Состояние гомеостаза у крыс с термическим ожогом кожи, полученным в среднем периоде беременности // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2021. – Т. 19, № 4. – С. 418–423.

5. Патент № 7927 Республика Беларусь. Устройство для моделирования ожоговой раны у лабораторного животного: № и 20110576: заявлено 15.07.11: опубликовано 28.02.12. // А.В. Глуткин, Т.В. Ковальчук, В.И. Ковальчук; заявитель Грод. гос. мед. ун-т.

6. Патент № 7926 Республика Беларусь. Предохранительная камера для экспериментального исследования ожоговой раны у лабораторного животного: № и 20110577: заявлено 15.07.11: опубликовано 28.02.12. // А.В. Глуткин, Т.В. Ковальчук, В.И. Ковальчук; заявитель Грод. гос. мед. ун-т.

7. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике: 3-е изд. Москва: МЕДпресс-информ, 2009. – 896 с.

8. Bartosz G. Druga twarz tlenu. Warszawa: Wydawnictwo naukowe PWN, 2003. – 447 p.

9. Taylor S.L., Lamden M. P., Tappel A. L. Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis // Lipids. – 1976; Vol. 11, № 7. – P. 530–538.

10. Bryan N.S., Grisham M.B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples // Free Radical Biology and Medicine. – 2007. – Vol. 43, № 5. – P. 645–657.

УДК 612.13

В.И. Козловский, А.В. Акуленок

МИКРОГЕМОЛИЗ И РАССТРОЙСТВА МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Аннотация. В статье показано, что у пациентов с артериальной гипертензией II степени отмечается повышение маркеров повреждения эритроцитов и эндотелия (повышения в крови уровня свободного гемоглобина и шизоцитов, числа эндотелиальных клеток), что ассоциировано с повышением риска развития инсультов, инфарктов миокарда и летальных исходов в ближайшие 6 лет. Определена возможность использования этих показателей в комплексе с клиническим обследованием для выделения группы пациентов с повышенным риском неблагоприятных событий.

Ключевые слова: артериальная гипертензия микрогемолиз, прогноз неблагоприятных событий

V.I. Kozlovsky, A.V. Akulenok

MICROHEMOLYSIS AND MICROCIRCULATION DISORDERS IN PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION

Abstract. The article shows that in patients with arterial hypertension of the II degree, there is an increase in markers of damage to erythrocytes and endothelium (increase in the blood level of free hemoglobin and schizocytes, the number of endothelial cells), which is associated with an increased risk of stroke, myocardial infarction and death

in the next 6 years. The possibility of using these indicators in combination with a clinical examination to identify a group of patients with an increased risk of adverse events was determined.

Key words: arterial hypertension, microhemolysis, prognosis of adverse events

Введение

В настоящее время показано, что у пациентов с артериальной гипертензией отмечаются выраженные расстройства микроциркуляции, ассоциированные со снижением деформируемости эритроцитов, повышением их слажда, повышением агрегации тромбоцитов, адгезии лейкоцитов. Это обуславливает не только дисфункцию и повреждение эндотелия, но и повреждение эритроцитов с выходом свободного гемоглобина в системный кровоток. При этом существенно повышается перекисное окисление липидов с образованием токсичных продуктов, тонус гладкой мускулатуры артерий, снижается продукция NO.

Морфологическими эквивалентами этих изменений является спазм артериол, микроаневризмы, неравномерность и выраженная извитость сосудов, появление слажда эритроцитов со снижением, а в отдельных капиллярах и венулах с остановкой кровотока.

Следует отметить, что даже слабо выраженный гемолиз или низкоинтенсивный гемолиз в связи с повреждением эритроцитов ассоциирован с выраженными нарушениями микроциркуляции и нестабильностью гемодинамики [1]. Однако ассоциации описанных выше изменений с особенностями течения артериальной гипертензии, возникновением осложнений исследованы недостаточно.

Цель

Оценка роли маркёров повреждения эндотелия и эритроцитов в прогнозе развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий (ССС) при АГ.

Методика

Обследовали 74 пациента с АГ II степени, риск 3. Средний возраст $58 \pm 7,1$ лет, мужчин было 29, женщин – 45. Продолжительность повышений АД была $10,7 \pm 8,2$ лет. Все пациенты получали двух- или трехкомпонентную комбинацию антигипертензивных средств. Ингибиторы АПФ (эналаприл, лизиноприл, каптоприл) - 66 (89,2%) пациентов, β -адреноблокаторы (атенолол, метопролол) – 43 (58,1%), амлодипин – 21 (28,4%),

гипотиазид – 59 (79,7%) пациентов. Кроме традиционного клинического обследования с ЭКГ, ультразвуковым обследованием сердца, почек, аорты, церебральных артерий, рассчитывали скорость клубочковой фильтрации, в крови определяли содержание свободного гемоглобина (СГ) [2], числа шизоцитов [3] и циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) [4]. В течение $6,4 \pm 1,7$ лет отслеживали развитие неблагоприятных ССС: инфаркты миокарда, мозговые инсульты, летальные исходы. Диагнозы уточнялись на основании результатов аутопсий, обследования в специализированных отделениях.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью Excel 7, Statistica 10.0 и MedCalc 10.2.

Результаты и обсуждение

У пациентов число ЦЭК составило $140,6 \pm 36,4$ клеток/100 мкл, содержание СГ – $56 \pm 38,1 \times 10^{-3}$ г/л, число шизоцитов – 0,18% [95% ДИ 0,14-0,21]. Стационарное применение АГС сопровождалось статистически значимым снижением числа ЦЭК, содержания СГ, числа шизоцитов до $114,5 \pm 37,2$ клеток/100 мкл ($p < 0,01$), $42 \pm 23 \times 10^{-3}$ г/л ($p < 0,001$), 0,1% [95% ДИ 0,08-0,12] ($p < 0,05$), соответственно. За $6,4 \pm 1,7$ лет наблюдения в группе пациентов с АГ зарегистрировано: 9 инфарктов миокарда, 7 мозговых инсультов, 15 летальных исходов. Комбинированная конечная точка (сумма неблагоприятных ССС) выявлена у 30% пациентов. Число неблагоприятных ССС, произошедших за $6,4 \pm 1,7$ лет наблюдения, положительно ассоциировано с числом ЦЭК ($r = 0,51$, $p < 0,05$) и шизоцитов ($r = 0,34$, $p < 0,05$), содержанием СГ ($r = 0,61$, $p < 0,05$). Определены пороговые значения факторов, статистически значимо ассоциированные с увеличением относительного риска (ОР) развития неблагоприятных ССС у пациентов с АГ II степени в течение $6,4 \pm 1,7$ лет (таблица).

Таблица

Пороговые значения факторов, ассоциированные с повышением ОР неблагоприятных ССС у пациентов с АГ II степени

Фактор	Пороговые значения	Se %	Sp %	ОР	95% ДИ
Частота сердечных сокращений	> 80 ударов в минуту	68,2	57,7	2,1	1,1-4,6
	> 72 ударов в минуту	57,1	73,5	2,4	1,2-4,7
Гипертрофия миокарда левого желудочка (по ЭКГ)	наличие	86,4	59,6	5,4	1,7-16,6
Расчётная скорость клубочковой фильтрации (по СКД-EPI)	≤ 57 мл/мин/1,73 м ²	81,8	61,5	4,3	1,6-11,4
Число ЦЭК	> 132 клеток/100 мкл	81,8	63,5	4,5	1,7-12
	> 118 клеток/100 мкл	77,3	75	5	2,1-12,1
Число шизоцитов	> 0,1 %	72,7	53,8	2,3	1,1-5,1
Содержание СГ	> 75×10^{-3} г/л	68,2	92,3	6,2	3-12,9
	> 43×10^{-3} г/л	68,2	84,6	4,8	2,2-10,1

Примечание — Значения показателей при ГК выделены полужирным курсивом; Se — чувствительность, Sp — специфичность, ОР — относительный риск, 95% ДИ — доверительный интервал.

Учитывая данные факторы, с помощью логистического регрессионного анализа сформировали модель среднесрочного прогноза риска суммарного числа неблагоприятных сердечно-сосудистых событий (инфаркт миокарда, инсульт, летальный исход) у пациентов с АГ II степени с учётом повреждения эндотелия и эритроцитов:

$$Y = -7,35 + 2,9 \times \text{СГ}_1 + 2,61 \times \text{рСКФ} + 2,6 \times \text{ЧСС}_1 + 2,4 \times \text{шизоцит}_1 + 2 \times \text{ЦЭК}_1$$

где: Y — натуральный логарифм отношения шансов (ОШ) для развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий; СГ₁ —

содержание СГ при ГК более 75×10^{-3} г/л (ОШ 18,1 [95% ДИ 2,6-125,5]; $p=0,003$); $pCKF$ – расчётная скорость клубочковой фильтрации (по формуле СКД-EPI) менее или равно 57 мл/мин/1,73 м² (ОШ 13,6 [95% ДИ 1,9-95,7]; $p=0,009$); ЧСС₁ – частота сердечных сокращений при ГК более 80 ударов в минуту (ОШ 13,5 [95% ДИ 1,5-123,6]; $p=0,02$); шизоцит₁ – число шизоцитов при ГК более 0,1% (ОШ 11,4 [95% ДИ 1,1-122,8]; $p=0,044$); ЦЭК₁ – число ЦЭК при ГК более 132 клеток/100 мкл (ОШ 7,2 [95% ДИ 1,2-41,9]; $p=0,03$).

Вероятность развития неблагоприятных ССС для конкретного пациента вычисляли по формуле $P=e^Y/(1+e^Y)$, где P – вероятность исхода со значениями на отрезке $[0;1]$. При значении до 0,25 – низкая вероятность, 0,26-0,75 – средняя, 0,76 и более – высокая; e – математическая константа ($= 2,72$). Полученные результаты указывают, что имеются выраженные связи числа ЦЭК, поврежденных эритроцитов (шизоцитов), уровня свободного гемоглобина и увеличения сердечно-сосудистого риска при АГ [5]. Это может быть результатом участия ЦЭК, имеющих провоспалительный и протромботический потенциал, в запуске тромботических реакций в артериях. В основе установленной положительной ассоциации между содержанием СГ, числом шизоцитов и развитием неблагоприятных ССС может быть гемолиз-индуцированная дисфункция и повреждение эндотелия [1], что может сопровождаться вазоконстрикцией и существенным повышением АД [6].

Выводы

1. У пациентов с АГ II степени отмечается достоверное повышение уровня маркёров повреждения эндотелия (число циркулирующих эндотелиальных клеток) и эритроцитов (содержание свободного гемоглобина, число шизоцитов).

2. Увеличение числа циркулирующих эндотелиальных клеток, содержания свободного гемоглобина и числа шизоцитов свыше определённых пороговых значений ассоциировано с повышением относительного риска инфарктов миокарда, мозговых инсультов, летальных исходов у пациентов с АГ II степени в течение $6,4 \pm 1,7$ лет, что позволяет обосновать метод выделения пациентов с АГ II степени группы с повышенным относительным риском неблагоприятных сердечно-сосудистых событий в среднесрочном периоде.

Библиографический список

1. Minecci P.C. et al. Hemolysis-associated endothelial dysfunction mediated by accelerated NO inactivation by decompartmentalized oxyhemoglobin // J. Clin. Invest. – 2005. – Vol. 17. – P. 34–40.
2. Козловский В.И., Акулёнок А.В., Быковский П.П., Николайкин С.В. Перспективы использования в клинической практике бензидинового метода определения свободного гемоглобина в крови // Вестник ВГМУ. – 2009. – Т. 8, № 3. – С. 53–60.
3. Камышников В.С. Методы клинических лабораторных исследований: учебник / под ред. В.С. Камышникова. – 3-е изд., перераб. и доп. – Москва: МЕДпресс-информ, 2009. – 752 с.
4. Hladovec J. Circulating endothelial cells as a sign of vessel wall lesions // Physiol. Bohemoslov. – 1978. – Vol. 27, № 2. – P.140–144.
5. Boos C.J. et al. Circulating endothelial cells, arterial stiffness, and cardiovascular risk stratification in hypertension // CHEST. – 2007. – Vol. 132, № 5. – P. 1540–1547.
6. Rother R.P. et al. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease // JAMA. – 2005. – Vol. 293. – P. 1653–1662.

УДК 796.01; 577.27

Ю.Л. Масленникова

АНАЛИЗ ХАРАКТЕРА ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ОТДЕЛЬНЫМИ ПАРАМЕТРАМИ ГЕМОДИНАМИКИ, СОСТАВА КРОВИ, ФУНКЦИИ ВНЕШНЕГО ДЫХАНИЯ И ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ У ТРЕНИРОВАННЫХ И ДЕТЕНИРОВАННЫХ ЛИЦ

Аннотация. У спортсменов с преимущественно аэробным энергообеспечением мышечной деятельности выявляли возможные корреляции показателей иммунной системы с параметрами кровообращения, состава крови и функции внешнего дыхания в процессе долговременной адаптации к аэробным физическим нагрузкам и после прекращения регулярных занятий спортом. Показано, что регулярные мышечные напряжения вносят существенный вклад в обеспечение оптимального уровня работы этих жизнеобеспечивающих функций организма, потеря тренированности,

сопровождается потерей ранее приобретённых адаптационных приспособлений, обеспечивающих оптимизацию, как каждой из рассматриваемых функций в отдельности, так и их функционального взаимодействия.

Ключевые слова: система крови, кровообращение, сосудистый тонус, кислородное обеспечения организма, тренированность.

Yu.L. Maslennikova

ANALYSIS OF THE NATURE OF THE RELATIONSHIP BETWEEN INDIVIDUAL PARAMETERS OF HEMODYNAMICS, BLOOD COMPOSITION AND EXTERNAL RESPIRATORY FUNCTION IN TRAINED AND DETAINED PERSONS

Annotation. In athletes with aerobic energy supply of muscular activity, possible correlations of the immune system parameters with parameters of blood circulation, blood composition and external respiration function were revealed in the process of long-term adaptation to aerobic physical activity and after the cessation of regular sports. It is shown that regular muscle tensions make a significant contribution to ensuring the optimal level of work of these life-supporting functions of the body, the loss of fitness is accompanied by the loss of previously acquired adaptive devices that ensure the optimization of both each of the considered functions separately and their functional interaction.

Key words: blood system, blood circulation, vascular tone, oxygen supply of the body, fitness.

Введение

Известно, что приспособительные эффекты при адаптации к физическим нагрузкам в значительной мере выражаются в различных изменениях в деятельности системы крови, кровообращения, внешнего дыхания и иммунологической резистентности [1]. С другой стороны клетки иммунной системы помимо обеспечения высокого уровня защиты организма от агентов разной природы способны осуществлять регуляторные функции и оказывать модулирующее влияние на деятельность вегетативных систем организма и поддержание гомеостаза в целом [2]. В специальной литературе рассматриваются разные виды такой взаимосвязи и обращается внимание на то, что поддержание адекватного обеспечения организма кислородом реализуется путём изменения как иммунологии, так и дыхания, и гемодинамики, и гематологии, что проявляется, прежде

всего, в изменении показателей, характеризующие эти процессы [1,2,3,4]. Вместе с тем, имеющиеся на сегодняшний день данные не позволяют конкретизировать причины и механизмы такой взаимосвязи, они остаются на уровне предположений. Обращается внимание на необходимость дальнейших предметных исследований в этой области [3,4,5,6,7]. В связи с этим нам показалось интересным проанализировать возможные корреляции показателей иммунной системы с параметрами кровообращения, состава крови и функции внешнего дыхания в процессе долговременной адаптации к аэробным физическим нагрузкам и после прекращения регулярных занятий спортом.

Методы исследования

Обследованы студенты-спортсмены ($n=63$, возраст от 18 до 24 лет, рост $168,83 \pm 1,78$ см, МТ - $57,53 \pm 1,65$ кг.) с различным уровнем двигательной активности. Они были распределены на 3 группы: Контрольная – условно здоровые студенты с обычным уровнем двигательной активности, регулярно посещающие основные занятия физической культурой; 1 – группа спортсменов, ежедневно занимающихся спортивной тренировкой преимущественно аэробной направленности (горный бег, лыжные гонки); 2 – группа детренированных лиц, бывших спортсменов, прекративших регулярные занятия более двух лет назад.

Оценили состояние функциональных возможностей ССС в покое и при стандартной физической нагрузке (велоэргометрический тест по В.Л. Карпману [8]). Его проводили с использованием кардиотеста «Аверон – КТ-02» с программным обеспечением тест PWC – 170 (АО «Пульс», г. Челябинск, Россия). Регистрировали и рассчитывали ряд характеристики: артериальное давление (АД), двойное произведение (ДП), максимальное потребление кислорода (МПК) и величину физической работоспособности (PWC170).

Состояние функции внешнего дыхания оценивали методами пикфлоуметрии и спирометрии («Erich Jaeger», Германия). Измеряли: ЖЕЛ (л), РОВ – резервный объём выдоха (л), ЁВ - ёмкость вдоха (л), ГД - глубина дыхания по спирограмме, МВЛ - максимальная вентиляция лёгких (л/мин), ВФ – частота дыхания во время МВЛ.

Содержание форменных элементов крови определяли в венозной крови на гематологическом анализаторе DANAM HC – 5710 (Dallas, Texas, США), при этом регистрировали: WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW.

Иммунологические характеристики определяли методом проточной цитометрии на лазерном цитофлюориметре *FACS* – Калибур (фирмы Бэктон-Диккинсон, США) с программой Симул-тест для анализа данных. В результате для каждого испытуемого был получен пакет комплексного иммунологического исследования «иммунный статус базовый», включающий основные параметры клеточного и гуморального иммунитета. Определение содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови проводили иммуноферментным методом, основанным на использовании пар моноклональных антител, направленных к разным антигенным участкам молекул IgG, IgM, IgA.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0. Проверку выборочного распределения выполняли с помощью теста Шапиро–Уилка. Значимость различий определяли, используя непараметрический критерий Краске-ла–Уоллиса. За уровень статистически значимых различий принимали изменения при $p < 0,05$ и $p \ll 0,01$. Данные в тексте представлены как $M \pm \sigma$ (среднее \pm стандартное отклонение).

Результаты исследования

Анализ гемодинамических показателей свидетельствовал о том, что средние величины изучаемых параметров в группе 1 свидетельствуют о признаках экономизации функции в покое. Так средние величины ДП и ЧСС, как в покое, так и в ответ на стандартную велоэргометрическую нагрузку были ниже в сравнении с контролем на 23%, 12% и 15%, соответственно ($p < 0,05$). Значимо ($p < 0,05$) отличалась величина МПК/МТ и PWC_{170}/MT – больше на 10% и 56%, соответственно. Достоверных отличий гемодинамических показателей лиц группы 2, как в покое, так и при нагрузке не обнаружено.

Наибольшее число значимых взаимосвязей ДП с другими параметрами обнаружено в группе 1. Так у тренированных лиц отчётливо прослеживается взаимосвязь ДП с ЧСС при нагрузке и покое ($r = 0,9$ и $r = 0,55$), с АДс во время нагрузки ($r = 0,65$), временем восстановления после стандартной нагрузки ($r = 0,52$), с САД ($r = 0,49$), с МВЛ ($r = 0,54$), с ёмкость вдоха ($r = - 0,52$). Также был обнаружены корреляции ДП с гематологическими показателями, а именно с объёмом эритроцита (MCV) и концентрацией в нём гемоглобина (MCHC) ($r = 0,64$ и $r = - 0,59$, соответственно). Такая взаимосвязь свидетельствует о согласованности в работе нескольких

ведущих систем организма в ответ на стандартную физическую нагрузку, об оптимизации процессов газообмена и транспорта кислорода в организме высокотренированных лиц.

Величина МПК/МТ и PWC 170/МТ, кроме выше перечисленных параметров, выражено коррелировала с общим числом эритроцитов ($r = 0,65$) и гематокритным числом ($r = 0,73$). Это может свидетельствовать о том, что взаимодействие между системами оптимально. У детренированных лиц (группа 2) не обнаружено значимых зависимостей между ДП, МПК/МТ и PWC 170/МТ и другими параметрами. Интересно рассмотреть показатели эффективности работы функции внешнего дыхания в обозначенных группах. Оказалось, что в группе тренированных лиц достоверно отличалась частота, глубина дыхания и резервный объём вдоха на 43%, 23% и 36%, соответственно ($p < 0,05$), от данных группы контроля.

Анализ взаимосвязи РОВ (объём выдоха) с другими параметрами свидетельствовал о том, что у тренированных лиц он коррелировал с объёмом вдоха ($r = 0,75$) и ЖЕЛ ($r = 0,9$), МВЛ ($r = 0,5$), частотой дыхания во время пробы ($r = 0,5$), временем восстановления ($r = 0,54$), ЧСС при нагрузке ($r = 0,47$) и АДд нагрузка ($r = -0,6$), гематокритным числом ($r = 0,48$), MCV ($r = 0,49$), RDW ($r = -0,5$). Кислородная ёмкость крови была достоверно выше в сравнении с контролем в группе 1 на 15% ($p < 0,05$), КЁК/МВЛ на 20% ($p < 0,05$). Показатель КЁК/МВЛ высоко коррелировал с МПК/МТ ($r = 0,74$).

Таким образом, можно говорить о том, что у тренированных лиц изменение структуры дыхательного акта обеспечивает большую работоспособность за счёт сокращения времени диастолы и увеличения её эффективности во время работы и изменения (эффективности) работы эритроцитарного компонента: меньшей ширины распределения эритроцитов (более компактный и направленный кровоток), большим гематокритным числом и объёмом эритроцита.

Анализ иммунологического профиля обнаружил наибольшее число отличий в группах. Так у спортсменов достоверно больше оказалось число ЦИК, моноцитов, натуральных киллеров и CD3+CD4 (на 32%, 22%, 6% и 8% соответственно при $p < 0,05$) и ниже оказались средние значения Ig A и M, общего числа лейкоцитов и иммунорегуляторного индекса CD4/CD8 (на 12%, 16%, 6% и 5% соответственно при $p < 0,05$). Такая картина свидетельствует о

напряжённой работе как клеточного, так и гуморального компонентов иммунного ответа. В группе детренированных лиц иммунная защита оказалась оптимальна: в сравнении с контролем в группе 2 большее число лимфоцитов, Ig A и M, ниже число ЦИК (на 4%, 10%, 11% и -25% соответственно при $p < 0,05$). Наиболее тесная взаимосвязь обнаружена между МПК в группе 1 и такими параметрами иммунной защиты как WBC, ЦИК, Ig A и M, CD3+CD4 и иммунорегуляторный индекс CD4/CD8 ($r = -0,63$, $r = 0,8$, $r = -0,63$, $r = -0,7$, $r = 0,66$, $r = -0,80$).

Заключение

Полученные результаты позволяют считать, что обеспечение оптимальной работы целостного организма осуществляется тонкими процессами регуляции ведущих систем жизнеобеспечения, причём у разных групп лиц адаптационные механизмы к особым условиям приводят к различному по характеру и направленности взаимодействию между собой. Реализуется это путём изменения, структуры и функции внешнего дыхания, гемодинамики и состава крови, что проявляется, прежде всего, в изменении общей работоспособности и величине показателей, характеризующие эти процессы.

Регулярная мышечная нагрузка приводит к общей экономизации деятельности организма, осуществляется это через регуляцию и перераспределения нагрузки на различные системы. У детренированных лиц при прекращении действия постоянного фактора теряется необходимость в том типе регуляции и взаимодействия, что компенсаторно вырабатывается у тренированных лиц, характер и направленность взаимосвязи между системами в большей степени схож с таковыми у лиц контрольной группы.

Показано, что у лиц, прекративших испытывать влияние фактора высоких мышечных напряжений включаются механизмы реадаптации. При этом адаптационные процессы направляются по пути снижения специфического компонента жизнеобеспечения организма, в первую очередь снижается энергетическая производительность работы кардиореспираторной системы, как в покое, так и в ответ на стандартную мышечную нагрузку. Но, вместе с тем, оптимизируется неспецифический компонент иммунологического статуса такого организма.

Библиографический список

1. Фомин Н.А. Адаптация: общебиологические и психофизиологические основы : Монография – М.:ТиПФК, 2003 – 383 с.
2. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю. Иммунологические и патофизиологические механизмы системного воспаления // Медицинская иммунология. – 2012. - 14(1-2). С. 9-20.
3. Артеменко М.В., Устинов А.Г. Моделирование взаимосвязей кардиореспираторных параметров // Моделирование в клинической практике.- М, 1988. – С.80.
4. Taylor E.W., Jordan D, Coote J.H. Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interaction in vertebrates // Physiol. Rev. – 1999. – v.79. - № 3. – P.855.
5. Герасимов И.Г., Самохина Е.В. Взаимосвязь между показателями гемодинамики и дыхания у человека // Физиология человека, 2000 – т.29. - №. 4. – С. 72-75.
6. Геселевич, В.А. Актуальные вопросы спортивной медицины: Избранные труды / Сост. Г.А.Макарова. – М.: Советский спорт, 2004. – 232 с.
7. Солодков, А. С. Адаптация в спорте: состояние, проблемы, перспективы [Текст] / А. С. Солодков // Физиология человека. – 2000. – Т. 26. – № 6. – С.87 – 93.
8. Корниенко И.А., Сонькин В.Д., Воробьев В.Ф. Эргометрическое тестирование работоспособности //Моделирование и комплексное тестирование в оздоровительной физической культуре: Сб. научн. трудов ВНИИФК. - М., 1991. С.68.

616.1/.9:618.173]-055.2 УДК

Т.С. Милош, И.Э. Гуляй

СОМАТИЧЕСКАЯ ПАТОЛОГИЯ У ЖЕНЩИН В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВИДА МЕНОПАУЗЫ

Аннотация. Изучена распространенность соматических заболеваний у 200 женщин с разными видами менопаузы. Оценив степень тяжести климактерия, уровень коморбидности установлены характерные для разных видов менопаузы особенности течения экстрагенитальной патологии и многопрофильность соматических

отклонений. Данные обстоятельства требуют совместных усилий врачей различных специальностей по ведению женщин в этот период для выявления и коррекции климактерических расстройств.

Ключевые слова: женщины, виды менопаузы, экстрагенитальная патология, коморбидность

T.S. Milosh, I.E. Guliai

SOMATIC PATHOLOGY IN WOMEN DEPENDING ON THE TYPE OF MENOPAUSE

Abstract. The prevalence of somatic diseases in 200 women with different types of menopause was studied. Having assessed the severity of menopause, the level of comorbidity, the features of the course of extragenital pathology characteristic of different types of menopause and the versatility of somatic abnormalities were established. These circumstances require joint efforts of doctors of various specialties in the management of women during this period to identify and correct menopausal disorders.

Key words: women, types of menopause, extragenital pathology, comorbidity

Введение

В жизни каждой женщины климактерический период занимает продолжительный и значимый отрезок времени. В ходе климактерия на фоне неизбежных возрастных изменений в женском организме развиваются инволюционные процессы в репродуктивной системе, вызывая прекращение генеративной и менструальной функции. Гормональнообусловленное возникновение гипоестрогении вызывает развитие широкого спектра соматических заболеваний – артериальной гипертонии (АГ), дислипидемии [1], ишемической болезни сердца (ИБС) [2], сахарного диабета (СД) 2-го типа, желчнокаменной болезни (ЖКБ), а также психосоматических расстройств, депрессии [4]. Известно, что у женщины даже в начале климактерического периода есть несколько экстрагенитальных (коморбидных) заболеваний. Особенно значимые нарушения отмечаются после двусторонней овариоэктомии в молодом возрасте, поскольку гораздо выше риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе с летальным исходом, а также более выражены когнитивные нарушения в сравнении с женщинами с естественной менопаузой (ЕМ) [3]. Поэтому, исследование

механизмов возникновения патологических нарушений в менопаузе, возникающих при недостатке половых гормонов, позволит разработать и внедрить новые эффективные методы их лечения и профилактики, что теперь является актуальным [6]. Вместе с тем, в настоящее время не до конца изучены соматические данные у пациенток с различными типами менопаузы, диагностика и лечение климактерических расстройств данных групп женщин остаются проблемой. Поэтому, исследование соматических данных у пациенток с хирургической и естественной менопаузой представляет значительный интерес.

Цель

Изучить характер, частоту и особенности соматической патологии у женщин с разными видами менопаузы.

Методика

Исследования выполнены на базе кафедры акушерства и гинекологии УО «Гродненский государственный медицинский университет, УЗ «Городская клиническая больница №4 г. Гродно», ГУЗ «Городская поликлиника №7, г. Гродно». В период с 2017 по 2021 годы проводился анализ медицинской документации: «Медицинская карта амбулаторного больного» форма N 025/у, а также осмотр и обследование женщин, находившихся на амбулаторном и стационарном лечении с различной соматической патологией, с целью выявления у них коморбидной патологии, частоты обращаемости к врачам различных специальностей и определения выраженности климактерических симптомов. Обследовано 200 женщин перименопаузального возраста, разделенных на три группы: I группа – 88 женщин с хирургической менопаузой (ХМ), II группа контрольная – 47 женщин позднего репродуктивного и перименопаузального возрастов, III группа – 65 женщины с ЕМ. Критериями включения в I группу были: возраст 44-57 лет, в анамнезе тотальная аднексэктомия с гистерэктомией либо изолированное удаление яичников. Средний возраст женщин на момент обследования составил 51 (49;53) год, возраст проведения оперативного вмешательства – $49,1 \pm 3,1$ года, длительность менопаузы – давность операции от 1 года до 5 лет; наличие климактерических симптомов (КС). Показаниями к оперативному вмешательству явились миома матки, доброкачественные опухоли придатков матки, аденомиоз, воспалительные тубовариальные образования. Критерии включения пациенток во II группу

обследования: возраст 44-57 лет, аменорея 1 год и более, наличие клинических и лабораторных (уровень фолликулостимулирующего гормона в крови более 30 МЕ/л) признаков эстрогенного дефицита. Средний возраст пациенток на момент обследования составил 50 (48;52) года лет, возраст наступления менопаузы – $49,2 \pm 3,3$ года, длительность менопаузы – от 1 года до 5 лет, наличие КС. Критериями включения пациенток в контрольную группу исследования явились: возраст 43-55 лет, наличие менструаций. На время обследования средний возраст женщин данной группы – 46 (44;50) лет, у которых возрастная перестройка протекала без осложнений. Критерии исключения из исследования: артериальная гипертензия 3-й степени по классификации ВОЗ/МОАГ, 1999 (уровень систолического артериального давления ≥ 180 мм рт. ст. и/или диастолического ≥ 110 мм рт.ст.), симптоматическая артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, атеросклероз сосудов головного мозга, периферических артерий, сердечная недостаточность; бронхиальная астма и тяжелые заболевания легких, сопровождающиеся дыхательной недостаточностью; печеночная и почечная недостаточность; сахарный диабет, заболевания щитовидной железы, протекающие с нарушениями ее функции; мигрень, эпилепсия, нарушения мозгового кровообращения в анамнезе.

У всех женщин были изучены акушерско-гинекологический анамнез, соматические данные, выполнена антропометрия, расчет ИМТ. Для определения степени тяжести климактерия рассчитывался индекс Купермана. Индекс коморбидности определялся по шкале Чарлсон.

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программы «Statistica 6.0». После проверки данных на нормальность, рассчитывали медиану, межквартильный интервал (25-й и 75-й процентиля). Для оценки статистической значимости различий при неравномерном распределении признака использовался U-критерий Манна-Уитни. При описании относительной частоты бинарного признака рассчитывался доверительный интервал (95% ДИ) по формулам Клоппера–Пирсона (Clopper–Pearson interval). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Участники исследования: 200 женщин в возрасте от 43 до 55 лет. Возраст наступления менопаузы в 1-й и контрольной группах 50

(48;53), в 3-ей группе 48 (45;51). Среди женщин преобладали лица с и средним специальным и высшим образованием: среди 1 группы – 67 и 18 пациентки (75,3 и 20,2%) соответственно, среди 2 группы – поровну 20 (44,4 %) пациенток соответственно; в 3 группе – 38 и 16 (61,3 и 25,8%) пациенток соответственно. Лица с неполным средним и начальным образованием в исследуемых группах отсутствовали.

В результате проведенного исследования установлено, что у прооперированных женщин обращаемость к врачам различных специальностей выше, чем у пациенток с естественным угасанием репродуктивной функции (табл. 1).

Таблица 1

Обращаемость женщин с хирургической менопаузой (ХМ) и естественной менопаузой (ЕМ) в поликлинику для направления к узким специалистам

Показатель	Контроль n=47	ХМ n=88	ЕМ n=65
Терапевт	12	58	39
Гастроэнтеролог	10	36	27
Невропатолог	5	32	25
Эндокринолог	7	30	28
Уролог	2	36	22

Структура соматической патологии у женщин разных групп представлена в табл. 2.

Таблица 2

Структура заболеваемости по нозологии у женщин с хирургической менопаузой (ХМ) и естественной менопаузой (ЕМ)

Показатель	Контроль n=47	ХМ n=88	ЕМ n=65
АГ, аритмии	7	32	29
Анемия	8	49	15
Бронхит	5	6	10
Гастрит	9	20	17
Мочекаменная болезнь, пиелонефрит	1	14	7
Варикозная болезнь н/конечностей	2	13	9

Для всех пациенток рассчитывался индекс коморбидности Чарлсона. Было выявлено, что сочетание двух и более патологий

чаще отмечается у прооперированных пациенток и женщин с естественной менопаузой (табл. 3). Установлено, что три и более заболевания отмечались у 33,7% прооперированных женщин, в 20,9% в менопаузе, и в 3,3% в контрольной группе. Среднее значение индекса коморбидности Чарлсона в общей группе - $2,4 \pm 0,14$ балла.

Таблица 3

Индексы коморбидности патологий у женщин с хирургической менопаузой (ХМ) и естественной менопаузой (ЕМ)

Показатель	Контроль n=47	ХМ n=88	ЕМ n=65
Возраст (лет)	46 (44;50)	51 (49;53)	50 (48;52)
Возраст начала менопаузы (лет)	50 (50;51)	50 (48; 53)	48 (45;51)
Длительность менопаузы	1,1 (0,99;1,11)	1,3 (1,1;1,5)	2,5 (1,9;2,7)
Индекс Купермана	9 (6;11)	38 (28;45)*	27 (23;36)*
Индекс коморбидности Чарлсона	0,38 (0,23;0,44)	1,9 (0,85;2,2)*	0,86 (0,77;1,36)*

Примечания: 1 – Данные представлены в виде медианы Ме (25-й; 75-й процентиля) 2 – * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$ – различия статистически значимы между показателями контрольной и опытных групп.

При проведении корреляционного анализа выявлена корреляционная зависимость между индексом коморбидности и возрастом пациенток ($r=0,78$; $p<0,05$) сильная корреляционная зависимость между индексом коморбидности и длительностью наступления менопаузы ($r=0,74$; $p<0,05$).

Индекс Купермана у прооперированных пациенток составил в среднем 38 (28;45) баллов (умеренная степень тяжести климактерия), в менопаузе – 27 (23;36) баллов (умеренная степень тяжести климактерия). Таким образом, у прооперированных пациенток определяется нарастание симптомов и более тяжелое течение климактерия.

Проведенный корреляционный анализ между показателями, характеризующими особенности течения менопаузы и индексом Купермана, выявил статистически достоверные значения

коэффициентов корреляции, позволяющие судить о степени и характере взаимосвязи изучаемых параметров.

Выводы

Итак, частота экстрагенитальной патологии выше среди прооперированных пациенток и с естественным угасанием репродуктивной функции, в сравнении с практически здоровыми женщинами. Кроме того, у женщин с хирургической менопаузой преобладали заболевания сердечно-сосудистой системы, патологии дыхания и эндокринные заболевания в сравнении с пациентками с естественной менопаузой.

Многопрофильность соматической патологии, развивающейся на фоне гормонального дисбаланса, требует совместных усилий врачей различных специальностей по ведению женщин в этот период.

Благодарности - при поддержке гранта БРФФИ № №М21-158 от 01.07.2021

Библиографический список

1. Ворвуль В.Н., Афолина М.А., Бобарыкина А.А. и др. Метаболические расстройства у женщин в зависимости от продолжительности менопаузы // Интернаука. – 2019. – Т. 111, № 29. – С. 20–22.
2. Kachalina T.S., Abramova S.V., Novikova L.V. The Perimenopause: epidemiological features and immunopathological processes in women with climacteric syndrome // Medical almanac. – 2015. – № 4. – P. 25–28.
3. Manukhin I.B., Taktarov V.G., Shmelev S.V. Women's Health in menopause: a guide for physicians // Moscow: Littera. – 2014. – 256 p.
4. Noble S.V., Emelyanov D.I., Jagovkina N.V. Menopausal syndrome: current status of the issue // Vyatka medical Bulletin. – 2017. – Vol. 53, № 1. – P. 6–9.

*П.В. Михайлов, Р.С. Остроумов, И.А. Тихомирова, А.В. Муравьев,
И.А. Осетров*

ГЕМОРЕОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОСОСУДИСТЫЕ МЕХАНИЗМЫ ТРАНСПОРТА КИСЛОРОДА У ЛИЦ С РАЗНЫМ АЭРОБНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ ОРГАНИЗМА

Аннотация. Для оценки аэробного потенциала человека часто используют величину максимального потребления кислорода, которая преимущественно определяется возможностями системы транспорта кислорода. На сегодняшний день к наименее изученным отделам этой функциональной системы относят уровень микроциркуляции. В статье представлен сравнительный анализ микрососудистых характеристик и гемореологических параметров у лиц с разным уровнем максимального потребления кислорода.

Ключевые слова: максимальное потребление кислорода, микроциркуляция, вязкость крови, агрегация эритроцитов, деформируемость эритроцитов.

*P.V. Mikhailov, R.S. Ostroumov, I.A. Tikhomirova, A.V. Muravyev,
I.A. Osetrov*

HEMORHEOLOGICAL AND MICROVASCULAR MECHANISMS OF OXYGEN TRANSPORT IN INDIVIDUALS WITH DIFFERENT AEROBIC POTENTIAL

Abstract. To assess the aerobic potential of a person, the maximum oxygen consumption is often used, which is mainly determined by the capabilities of the oxygen transport system. To date, the least studied departments of this functional system include the level of microcirculation. The article presents a comparative analysis of microvascular characteristics and hemorheological parameters in individuals with different levels of maximum oxygen consumption.

Keywords: maximum oxygen consumption, microcirculation, blood viscosity, erythrocyte aggregation, erythrocyte deformability.

Введение. Одним из основных показателей, используемых для оценки аэробного потенциала человека, является максимальное потребление кислорода (МПК) [1–2]. МПК характеризует предельно достижимую мощность аэробной энергопродукции, и зависит от трех основных компонентов: минутного объема кровообращения, кислородной емкости крови и функции митохондрий [3]. При этом систему транспорта кислорода выделяют в качестве ключевого звена, определяющего аэробную производительность организма [4, 5]. На сегодняшний день системный уровень интеграции гемодинамики относят к наиболее изученным отделам кровообращения, а уровень микроциркуляции (МЦ), включающий сосудистые факторы и реологические свойства крови остается недостаточно исследованным.

С учетом выше сказанного **целью** настоящего исследования был сравнительный анализ комплекса показателей центральной гемодинамики, гемореологии и микроциркуляции у лиц с разным уровнем максимального потребления кислорода.

Материал и методы

В исследовании приняли участие практически здоровые мужчины-добровольцы в возрасте 20-30 лет. Все испытуемые были разделены на три группы в соответствии с величиной МПК, которую определяли с использованием прямого газоанализа при проведении велоэргометрического теста со ступенчато возрастающей нагрузкой. В группу 1 включали лиц с величиной МПК 30-40 мл/мин./кг ($n=14$), в группу 2 – 41-50 мл/мин./кг ($n=24$), в группу 3 – 51-60 мл/мин./кг ($n=15$). Параметры МЦ регистрировали с применением биомикроскопии ногтевого ложа. Оценивали плотность функционирующих капилляров (ПФК) и диаметр их переходной части (DK). С помощью метода лазерной доплеровской визуализации (ЛДВ) определяли перфузию кожи на середине предплечья (ПМ). Регистрацию всех параметров МЦ проводили в покое и сразу после окончания велоэргометрического теста. Показатели вязкости крови, плазмы и суспензии эритроцитов определяли с помощью ротационного вискозиметра Брукфилда. Агрегацию эритроцитов регистрировали агрегометром Myrenne. Для оценки деформируемости эритроцитов определяли индекс их удлинения (ИУЭ) в проточной микрокамере [6]. Для проверки различий в трех группах наблюдения использовали критерий Краскела-Уоллиса. За уровень статистически значимых принимали изменения при $p<0,05$. Уровень взаимосвязи различных параметров выявляли при помощи

ранговой корреляции Спирмена. Числовые данные в группах представляли в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей 25% и 75% соответственно (Q1; Q3).

Результаты

По данным биомикроскопии были установлены статистически значимые различия между группами в значениях ДК кожи в состоянии покоя ($p < 0,05$) (табл. 1). У лиц группы 3 он был больше на 33%, чем в группе 1, а разница между группами 1 и 2 составила 13%. При этом ПФК существенно не различалась. В условиях покоя также не было выявлено значимых различий в перфузии кожи.

Таблица 1

Показатели микроциркуляции и реологии крови у лиц с разным уровнем МПК (Me (Q1; Q3))

Показатели	Группа 1 (n=14)	Группа 2 (n=24)	Группа 3 (n=15)
ПФК покой, 1/мм ²	61,5 (54,5; 70,5)	57,4 (51,8;64,3)	58,0 (52,0; 62,5)
ПФК нагрузка, 1/мм ²	67,0 (57,8; 79,8)	64,0 (56,0; 75,0)	62,0 (59,0;66,5)
ПФК изменения, %	8,4 (5,0; 11,1)	9,6 (7,8; 15,7)	10,0 (7,9; 14,5)
ДК покой, мкм	13,9 (13,2; 15,6)	15,7 (15,0; 18,6)	18,5 (16,9; 20,8)*
ДК нагрузка, мкм	15,3 (14,0; 16,8)	18,3 (15,2; 20,3)	18,6 (16,6; 20,1)*
ДК изменения, %	6,4 (3,5; 8,6)	4,3 (0,5; 25,8)	0,6 (-3,3; 4,0)*
ВК, мПа·с	2,97 (2,74; 3,27)	2,70 (2,61; 2,75)	2,54 (2,41; 2,86)*
ВП, мПа·с	1,96 (1,92; 2,02)	1,93 (1,88; 2,05)	1,88 (1,79; 1,98)
Нст, %	48,5 (47,0; 48,9)	48,0 (46,0; 49,0)	47,0 (46,0; 48,0)
ПАЭ, отн.ед.	30,1 (26,8; 32,9)	23,0 (20,7 (24,5)	21,0 (17,3; 36,6)*
ИУЭ, отн.ед.	1,99 (1,91; 2,15)	2,05 (1,84; 2,23)	2,15 (2,05; 2,24)
ВС, мПа·с	3,08 (2,03; 3,41)	3,07 (1,58; 3,32)	2,41 (1,46; 3,32)

Обозначения: * - межгрупповые различия статистически значимы при $p < 0,05$; ПФК – плотности функционирующих капилляров; ДК – диаметр капилляров; ВК – вязкость крови при скорости сдвига ($>100 \text{ с}^{-1}$); ВС – вязкость суспензии эритроцитов ($\text{Hct}=40\%$) при скорости сдвига ($>100 \text{ с}^{-1}$); ВП – вязкость плазмы; Нст – гематокрит; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов при скорости сдвига 3 с^{-1} ; ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов; ВС – вязкость суспензии эритроцитов с гематокритом 40% и вязкостью суспензионной среды $1,1 \text{ мПа}\cdot\text{с}$.

После интенсивной мышечной работы было зарегистрировано сходное по величине и статистически значимое увеличение ПФК во всех группах наблюдения (8-10%; $p < 0,05$), при этом выраженность изменений ДК различалась. В первой и второй группах увеличение ДК составило 6% и 4% ($p < 0,05$) соответственно, а в группе 3 ДК практически не изменился. Важно отметить, что несмотря на указанные различия в изменениях ДК в ответ на мышечную нагрузку, у лиц групп 2 и 3 он оставался на 20-22% больше, чем в группе 1 ($p < 0,05$). Была найдена корреляционная взаимосвязь между ПФК и ДК в объединенной группе ($-0,55$; $p < 0,05$). Наиболее выраженные и статистически значимые различия в комплексе микроциркуляторных показателей были выявлены в резервах кожного кровотока. Прирост ПМ после мышечной нагрузки у лиц группы 1 был наименьшим и составил 35%, в группе 2 – 67%, а в группе 3 – 80% (рис. 1А).

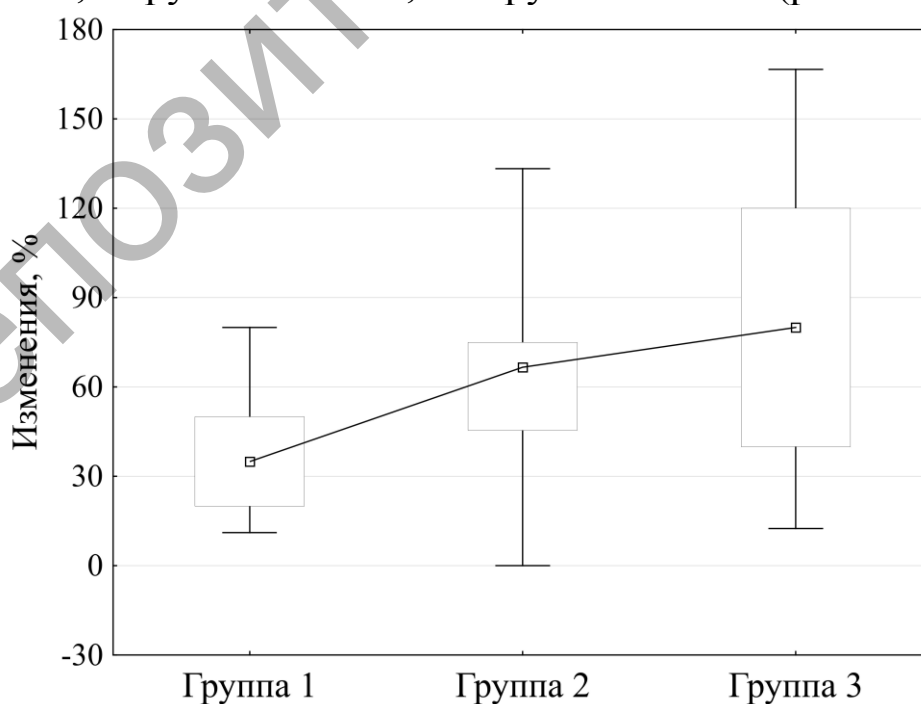


Рис. 1 А

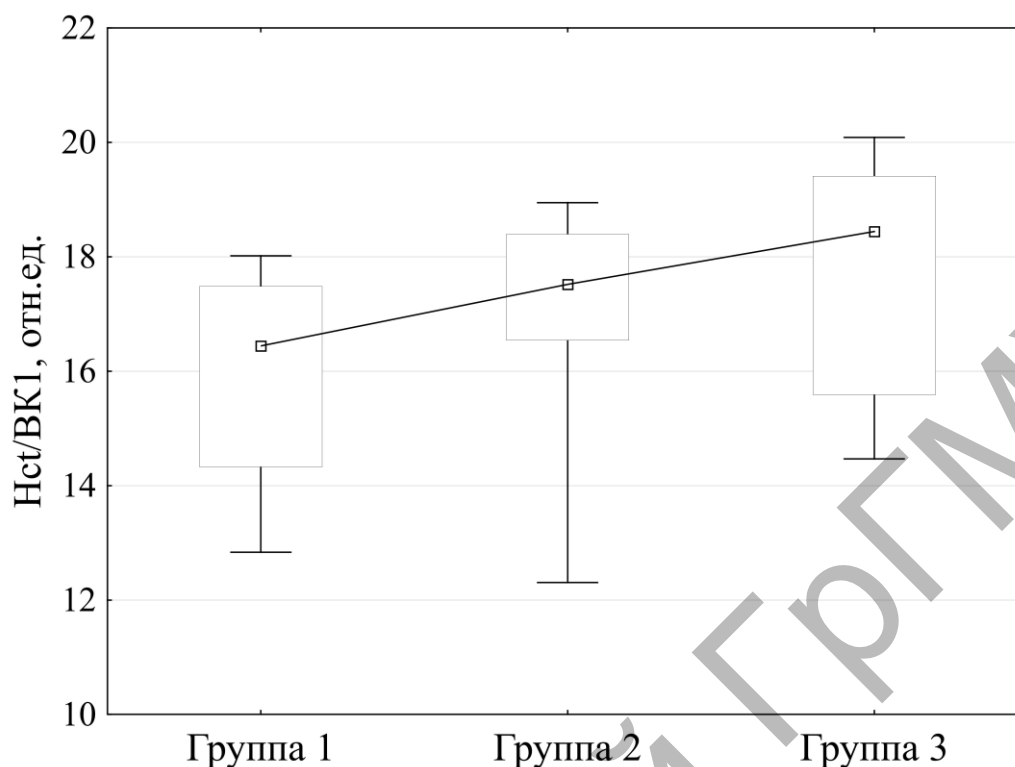


Рис.1 Б

Рис. 1. А – Изменения (%) показателя микроциркуляции (ПМ) в ответ на мышечную нагрузку у лиц с разным уровнем МПК ($p=0,0124$). Б – Показатель эффективности транспортной функции крови (Hct/BV1) у лиц с разным уровнем МПК ($p=0,012$). Данные на рисунке представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей 25%–75%, минимального и максимального значений.

В комплексе гемореологических показателей (табл. 1), статистически значимые различия между группами наблюдения были зарегистрированы в вязкости крови ($p<0,05$). У лиц группы 1 она была больше, чем в группах 2 и 3 на 9% и 14% соответственно. Известно, что вязкость крови как интегральная характеристика зависит от комплекса факторов, среди которых гематокрит, вязкость плазмы, агрегация и деформируемость эритроцитов [7, 8]. Поскольку различия в значениях гематокрита были незначительными (табл. 1), то вероятной причиной сниженной вязкости крови у лиц групп 2 и 3 является умеренно сниженная вязкость плазмы. Об этом свидетельствует типичная корреляционная взаимосвязь между ВК и ВП $r=0,79$ ($p<0,05$). Агрегация эритроцитов в группе была больше, чем в группах 2 и 3 на 23% и 30% соответственно ($p<0,05$; табл. 1). Что касается другой важной микрореологической характеристики

эритроцитов – деформируемости, оцениваемой по индексу удлинения клеток (ИУЭ), то имелась тенденция к ее увеличению в группах с более высоким уровнем МПК. Сходные тенденциозные различия были получены при определении вязкости суспензии (ВС) со стандартным гематокритом и вязкостью суспензионной среды, которая отражает общую потоковую деформацию большой массы эритроцитов [9]. Наибольшие значения ВС были зафиксированы у лиц группы 1, а наименьшие в группе 3. В гемореологии в качестве интегрального показателя, объединяющего комплекс макро- и микрореологических характеристик, и часто используемого для оценки эффективности транспортной функции крови, применяют отношение $Hct/BC1$. Его значения, а следовательно, и эффективность транспортной функции крови, была самой низкой в группе 1. В группе 2 и 3 данный показатель был на 7% и 12% больше соответственно ($p < 0,05$; рис. 1Б).

Таким образом, показатели МЦ и гемореологического профиля свидетельствовали о потенциальной возможности более существенно повышать объемный кровоток и доставку кислорода в ткани у лиц с более высоким аэробным потенциалом организма.

Заключение. Таким образом, сравнительный анализ комплекса параметров системы кровообращения показал, что высокий аэробный потенциал организма сочетается с более экономичным функционированием системы кровообращения в состоянии покоя как на уровне макро-, так и микроциркуляции. В условиях интенсивной мышечной работы у лиц с большей величиной МПК зарегистрированы повышенные резервы перфузии кожи, которые, вероятно, достигались благодаря увеличенному просвету обменных сосудов и умеренно сниженной вязкости крови. Последняя была связана с меньшей агрегацией и большей деформируемостью эритроцитов. Можно полагать, что выявленные особенности МЦ являются частью более эффективно организованной функциональной системы транспорта кислорода у лиц с более высокой аэробной производительностью.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и БРФФИ в рамках научного проекта № 20-515-00019 Бел_а

Библиографический список

1. Sartor F., Vernillo G., de Morree H.M. et al. Estimation of maximal oxygen uptake via submaximal exercise testing in sports, clinical, and

home settings // Sports Med. 2013. V. 43. P. 865–873. doi.org/10.1007/s40279-013-0068-3

2. Bennett H., Parfit, G., Davison K. et al. Validity of submaximal step tests to estimate maximal oxygen uptake in healthy adults // Sports Med. 2016. V. 46. P. 737–750. doi.org/10.1007/s40279-015-0445-1

3. Bassett D.R.Jr, Howley E.T. Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance // Med. Sci. Sports Exerc. 2000. V. 32. № 1. P. 70-84. doi: 10.1097/00005768-200001000-00012

4. Löllgen H., Leyk D. Exercise testing in sports medicine // Dtsch. Arztebl. Int. 2018. V. 115. № 24. P. 409-416. doi: 10.3238/arztebl.2018.0409

5. Lee J., Zhang X.L. Physiological determinants of VO₂max and the methods to evaluate it: A critical review Revue critique des déterminants physiologiques du VO₂max et de ses critères de détermination // Science & Sports. 2021. V. 36. № 4. P. 259-271. doi.org/10.1016/j.scispo.2020.11.006

6. Муравьев А.В. Михайлов П.В., Тихомирова И.А. Микроциркуляция и гемореология: точки взаимодействия // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2017. Т. 16. № 2 (62). С. 90–100.

7. Schierbauer J., Hoffmeister T., Treff G. et al. Effect of exercise-induced reductions in blood volume on cardiac output and oxygen transport capacity // Front Physiol. 2021. V. 12. P. 679232. doi: 10.3389/fphys.2021.679232.

8. Kang J., Ratamess N.A., Faigenbaum A.D. et al. Use of heart rate index to predict oxygen uptake – a validation study // Int. J. Exerc. Sci. 2020. V 13. № 7. P. 1705–1717.

9. Artmann G.M. Microscopic photometric quantification of stiffness and relaxation time of red blood cells in a flow chamber // Biorheology. 1995. V. 32. P. 553–570. doi: 10.1016/0006-355X(95)00032-5.

*П.В. Михайлов, Р.С. Остроумов, Е.А. Кузнецова, Е.Л. Волкова,
С.В. Булаева, А.А. Муравьев, Комлев В.Л.*

РОЛЬ МИКРОРЕОЛОГИИ ЭРИТРОЦИТОВ В МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ

Аннотация. В статье рассматриваются основные теоретические и экспериментальные исследования по микроциркуляции и микрореологии эритроцитов с акцентом на механизмы их взаимосвязи и о влиянии отдельных гемореологических характеристик на регуляцию микрососудистой перфузии тканей. Выполнен анализ микрореологии эритроцитов – их деформируемости и агрегации, показаны сигнальные молекулярные механизмы, ассоциированные с изменением этих микромеханических показателей. Приведены данные, свидетельствующие о роли эритроцитов в регуляции тонуса артериол и функциональной плотности капилляров. Обсужден механизм этой регуляции путем выделения аденозинтрифосфата (АТФ) и его стимулирование синтеза оксида азота (NO) эндотелиальными клетками. Кроме того, в статье выполнен комплексный анализ участия основных гемореологических характеристик в регуляции микрососудистой перфузии и в том числе показана роль оптимальной вязкости цельной крови и вязкости плазмы для эффективной тканевой перфузии и оксигенации.

Ключевые слова: гемореология, микроциркуляция, эритроциты, деформируемость и агрегация, сигнальные молекулы, АТФ, NO, регуляция тонуса микрососудов.

P.V. Mikhailov, R.S. Ostroumov, E.A. Kuznetsova, E.L. Volkova, S.V. Bulaeva, A.A. Muravyov, Komlev V.L.

THE ROLE OF ERYTHROCYTE MICRORHEOLOGY IN MICROCIRCULATION

Abstract. The review considers the main theoretical and experimental studies on microcirculation and hemorheology with an emphasis on the mechanisms of their interrelation and on the influence of individual hemorheological characteristics on the regulation of microvascular tissue perfusion. The analysis of the leading

microrheological characteristics of erythrocytes - deformability is performed, the signal molecular mechanisms associated with the change of this cell parameter are shown. Data on the role of erythrocytes in the regulation of arteriolar tonus and functional density of capillaries are given. The mechanism of this regulation by exocytosis with erythrocytes adenosine triphosphate (ATP) and its stimulation of nitric oxide synthesis by endothelial cells are discussed. The review performed a comprehensive analysis of the participation of major hemorheological characteristics in the regulation of microvascular perfusion, including the role of the optimal viscosity of whole blood and the viscosity of plasma for effective tissue perfusion and oxygenation.

Keywords: hemorheology, microcirculation, erythrocytes, deformability, aggregation, signaling molecules, ATP, NO, microvascular tone regulation.

Введение. Микрососудистое русло представляет собой систему мельчайших кровеносных сосудов и включает *капилляры, артериолы* – микрососуды диаметром до 100 мкм и вены – сосуды несколько большего, чем артериолы диаметра [1]. Основной функций микроциркуляции является регуляция и распределение кровотока в отдельных органах и трансапикалярный обмен в тканевых микрорайонах. Именно на этот отдел приходится около 80% падения давления между аортой и полыми венами [2, 3]. Также отличием микрососудов является то, что они входят в состав органов, как их структурные элементы, тогда как магистральные сосуды таковыми не являются. Это обеспечивает эффективную коммуникацию между клетками паренхимы и микрососудистым руслом органов. Важным предметом исследования микроциркуляции является необходимость понимания того, как особые характеристики крови в целом и микрореологическое поведение ее клеточных элементов обеспечивают эффективное решение транспортных задач и трансапикалярный обмен.

Кровь является концентрированной суспензией форменных элементов, таких как эритроциты, лейкоциты и тромбоциты [1]. Эритроциты являются двояковогнутым диском с типичными размерами 6-8 мкм в диаметре и толщиной 2 мкм; у млекопитающих эритроциты лишены ядра и их внутренне содержимое представляет концентрированный раствор гемоглобина, заключенный в очень эластичную мембрану, при этом в кровотоке, эритроциты

подвергаются значительным деформациям. Кроме того в системе кровообращения имеется несколько типов лейкоцитов, например, гранулоциты такие как: нейтрофилы, базофилы и эозинофилы, моноциты, лимфоциты, макрофаги. Они изменяются по размерам и свойствам, например, типичный неактивированный нейтрофил имеет сферическую форму с диаметром около 8 мкм. Тромбоциты представляют собой по форме дискоидные частицы с диаметром около 2 мкм. Детальное понимание потоковых свойств крови обеспечивает *гемореология*, наука о деформации и течении крови и ее форменных элементах. Тогда как термин *микрореология* используется для того, чтобы подчеркнуть масштаб изучаемых процессов и явлений, обычно на микроскопическом уровне [4]. Реологические свойства крови зависят от скорости сдвига, его времени, а также размеров и геометрии системы в которой находится изучаемый образец крови [5]. Основные реологические свойства крови, включая ее неньютоновские характеристики, известны давно из вискозиметрических измерений, которые используют ротационные вискозиметры и капиллярные приборы. Такие исследования создают ценную информацию о свойствах крови при определенных хорошо контролируемых условиях. При этом было показано, что низких скоростях сдвига вязкость крови связана с выраженной агрегацией эритроцитов, тогда как в зоне высоких скоростей сдвига — доминирует их потоковая деформация [5]. Реологические свойства крови в такой сложной сети как микрососудистое русло с огромным количеством сосудистых сегментов разной длины, диаметра, скоростей сдвига, не могут быть спрогнозированы на основе данных, полученных из таких простых систем как вискозиметры. Кроме того, внутри микрососуды покрыты фиброзным материалом, который замедляет скорость течения вблизи сосудистой стенки, а эндотелиальные клетки, расположенные в венах, обеспечены рецепторами, которые взаимодействуют с лигандами на лейкоцитах. Это дает им возможность адгезии к сосудистому эндотелию, с последующей трансмиграцией в ткани [6]. Также не маловажно и то, что артериолы участвуют в регуляции кровотока, благодаря тому, что в их стенку вмонтированы сенсорные механизмы, способные регистрировать изменение напряжения сдвига, созданного движущейся по сосуду кровью. Эти механизмы обеспечивает входную информацию сократительным элементам сосудистой стенки и таким образом, этот механизм поддерживает постоянство их

напряжения. Хронические изменения баланса этих сил, в течение дней и недель, ведут к адаптивным изменениям сосудистой стенки и реорганизации всей сосудистой сети (как например, при ангиогенезе и сосудистом ремоделировании). Поскольку эти силы передаются на сосудистую стенку кровью, то очевидно, что на механику этого взаимодействия будут оказывать существенное влияние ее *реологические свойства*.

Роль эритроцитов, как регуляторов сосудистого тонуса

Эритроциты – это клетки крови, ответственные за транспорт кислорода в организме, часто рассматриваются как простые емкости для перемещения Hb и дыхательных газов в системе кровообращения. Однако становится очевидным, что эти клетки также участвуют в регуляции тонуса артериол, посредством выделения потенциального вазодилататора – аденозинтрифосфата (АТФ) [7]. Действительно показано, что АТФ – является сигнальной молекулой, участвующей в регуляции сосудистого тонуса артериол [8]. Он стимулирует образование NO и простагландинов и, очень важно, что при этом могут компенсироваться местные симпатические вазоконстрикторные реакции. В регуляторном выделении АТФ из эритроцитов участвуют сигнальные молекулы аденилатциклазного каскада [9]. Вполне возможно, что активация этого сигнального пути реализует два адаптивно-регуляторных эффекта: 1) выделение АТФ как сигнальной молекулы для пуринергических рецепторов типа P_2U , и 2) фосфорилирование белка полосы 4.1 для повышения пластичности мембраны и деформируемости самих эритроцитов [8].

Анализ данных литературы показывает, что эритроциты могут выполнять функцию *сенсора* для регуляции тонуса артериол. Это реализуется путем ответа клетки на гипоксический или механический стимул с последующим выделением АТФ и/или NO. Следовательно, эритроциты играют значительную роль в регуляции доставки O_2 в окружение капилляров, артериол и венул. Это зависит от эффективности, с которой эритроциты передают сигнал эндотелию сосудов. Если предположить, что распределение пуринергических рецепторов (тип P_2U) равномерно в микрососудистом русле, то более эффективным местом для передачи сигнала на эндотелий должны быть *капилляры*, где эритроцитарная мембрана тесно контактирует с эндотелием. АТФ, освобождаемый из эритроцитов, должен диффундировать на короткое расстояние до P_2U рецепторов, индуцируя увеличение кровотока, возможно, в результате

эндотелиальной гиперполяризации [10]. Предполагают, что эта гиперполяризация изменяется по ширине капиллярного русла в зависимости от скорости доставки эритроцитов и потока кислорода из них, для обеспечения метаболизма. Поэтому капиллярное русло можно рассматривать как наиболее эффективное место коммуникации эритроцитов с тканями с целью обеспечения их потребностей в кислороде. Электрически связанные эндотелиальные клетки передают интегрированный сигнал вверх «по течению» к артериолам для регуляции сосудистого сопротивления. Таким образом, может осуществляться регуляция транспорта O_2 в ткани и его распределение с помощью освобождения АТФ из эритроцитов в капиллярных сетях [11].

Таким образом, микрореологические свойства эритроцитов могут быть факторами регуляции сосудистого тонуса: во-первых, за счет метаболической саморегуляции, компенсационного расширения сосудов, вследствие изменения в естественных условиях кровотока и органной/тканевой гипоксии, а во-вторых, благодаря активации эндотелиальной функции (например, производства NO) под влиянием напряжения сдвига, что приводит к изменениям сосудистого сопротивления [12]. Недавно было показано, что эритроциты могут обратимо связывать, транспортировать, и выделять NO в системе кровообращения [13]. Были получены доказательства того, что эритроциты человека экспрессируют активную и функциональную NOS (eNOS), которая локализована в мембране и цитоплазме клетки. Эта NOS регулируется ее субстратом L-аргинином, кальцием и при фосфорилировании PI3 киназы. Активность NOS эритроцитов влияет на их деформируемость, а также ингибирует активацию тромбоцитов. Эти данные показывают, что eNOS в эритроцитах обеспечивают регуляцию эритроцитов и тромбоцитов, что может стимулировать новые подходы в коррекции NO дефицитных состояний, присущих ряду сосудистых и гематологических заболеваний [14]. Было продемонстрировано, что NO выделяется эритроцитами при определенных обстоятельствах и показано, что eNOS может быть активирована механическими факторами, например изменением напряжения сдвига на стенке в диапазоне от 0,5 до 2,0 Па. Результаты этих исследований подтверждают предположение о том, что синтез NO в эритроцитах и экспорт этой молекулы из клеток повышается при механическом стрессе [7].

Заключение

Таким образом, проведенный анализ литературы по оценке исследований в двух близких научных дисциплинах: микроциркуляции и гемореологии, показал, что имеются объективно сосуществующие точки взаимодействия между микрососудистой перфузией и реологическими свойствами крови и микрореологией ее форменных элементов (рис. 1). В первую очередь это состояние микрореологических свойств самых клеток крови, деформируемости и агрегации эритроцитов, а также активации и адгезии лейкоцитов.



Рис. 1. Схема микрососудистых эффектов реологических характеристик крови.

Оптимальная величина вязкости цельной крови, вязкости плазмы и гематокрита тоже имеют регуляторное значение для обеспечения необходимой перфузии тканей, за счет генерации определенной величины напряжения сдвига на эндотелии сосудов и для последующего выделения оксида азота. Деформируемость эритроцитов в первую очередь является критическим фактором в обменных капиллярах, лишенных мышечных элементов своей сосудистой стенки для изменения сосудистого тонуса. Приrost деформируемости эритроцитов положительно сказывается на

капиллярной перфузии. Кроме того, увеличение деформируемости эритроцитов сочетается с их способностью к экзоцитозу сигнальных молекул (АТФ, NO).

Деформация эритроцитов в потоке способствует их ориентации, выходу на осевую позицию и тем самым реализуется эффект Фареуса-Линдквиста, следствием которого – снижение сопротивления кровотоку [1].

Другая микрореологическая характеристика эритроцитов – их агрегация обычно *in vivo* реализуется в посткапиллярных венулах и тем самым способствует приросту сопротивления в этом сосудистом отделе и активизации фильтрационного механизма в капиллярах. Выход агрегатов эритроцитов на осевую позицию в сосуде является частью эффекта Фареуса-Линдквиста. Таким образом, можно заключить, что каждая из основных гемореологических характеристик прямо или косвенно влияют на состояние микроциркуляции и, следовательно, на перфузию и оксигенацию тканей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и БРФИ в рамках научного проекта №20-515-00019\20-А

Библиографический список

1. Popel A.S. and Johnson P.C. Microcirculation and Hemorheology // *Annu Rev Fluid Mech.* 2005. V. 37. 43-69.
2. Куприянов В.В., Караганов Я.Л., Козлов В.И. Микроциркуляторное русло. М.: Медицина, 1975. 216 с.
3. Каро К., Педли Т., Шротер Р., Сид У. Механика кровообращения. М.: Мир, 1981. 623 с.
4. Dintenfass L. Theoretical aspects and clinical applications of the blood viscosity equation containing a term for the internal viscosity of the red cell // *Blood Cells.* 1977. Vol.3. 367-374.
5. Муравьев А.В., Чепоров С.В. Гемореология (экспериментальные и клинические аспекты реологии крови). Ярославль: Изд-во ЯГПУ, 2009. 178 с.
6. Menger M.D., Kerger H., Geisweid A. et al. Leukocyte-endothelium interaction in the microvasculature of postischemic striated muscle // *Adv Exp Med Biol.* 1994. V.361. 541-545.
7. Ulker P., Sati L., Celik-Ozenci C., Meiselman H.J., Baskurt O.K. Mechanical stimulation of nitric oxide synthesizing mechanisms in erythrocytes // *Biorheology.* 2009. V.46. 121-132.

8. Sprague R.S., Ellsworth M.L. Erythrocyte-derived ATP and perfusion distribution: role of intracellular and intercellular communication // Microcirculation. 2012. V.19, № 5. 430–439.

9. Adderley S.P. Sprague R.S., Stephenson A.H. Regulation of cAMP by phosphodiesterases in erythrocytes. Pharmacol. Rep. 2010. V. 62. 475–482.

10. Wang L., Olivecrona G., Gotberg M. ADP acting on P₂Y₁₃ receptors is a negative feedback pathway for ATP release from human red blood cells // Circ. Res. 2005. V. 96. 189–196.

11. Ellis C.G., Milkovich S., Goldman D. What is the efficiency of ATP signaling from erythrocytes to regulate distribution of O₂ supply within the microvasculature? // Microcirculation. 2012. V. 19. 440–450.

12. Hamlin S.K., Benedik P.S. Basic concepts of hemorheology in microvascular hemodynamics. Crit. Care Nurs. Clin. North Am. 2014. Vol. 26, № 3. P. 337–344.

13. Bor-Kucukatay M., Wenby B., Meiselman H.J., Baskurt O.K. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2003. V. 284(5). 1577–1584.

14. Kleinbongard P., Schulz R., Rassaf T., et al. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase // Blood. 2006. V.107. 2943–2951.

УДК. 612.1;591.11;577.353

А.В. Муравьев, И.А. Тихомирова, Е.П. Петроченко, С.В. Булаева, Е.Л. Волкова, А.В.Замышляев

КОРРЕКЦИЯ МИКРОРЕОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭРИТРОЦИТОВ ДОНОРАМИ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ

Аннотация. Стимулирование клеток с помощью α -1-агониста, фенилэфрина (ФЭ) широко применяется в экспериментальной практике. Поскольку основной механизм действия ФЭ на клетки связан с открытием Ca²⁺ каналов мембран, в том числе и эритроцитов, то целью данной работы было исследование, на модели микрореологических ответов эритроцитов на ФЭ, возможности коррекции их микрореологии с помощью газотрансмиттеров (ГТ) - оксид азота (NO) и сульфид водорода (H₂S).

© А.В. Муравьев, И.А. Тихомирова, Е.П. Петроченко, С.В. Булаева, Е.Л. Волкова, А.В.Замышляев, 2022

Для решения этой задачи отмытые эритроциты инкубировали с ФЭ (1,0 мкМ), донором NO, нитропруссидом натрия (НПН, 100 мкМ), донором H₂S (NaHS, 100 мкМ) и с их комбинациями: «ФЭ+НПН» и «ФЭ+ NaHS». После инкубации регистрировали деформируемость эритроцитов (ДЭ) и их агрегацию (ПАЭ). Результаты исследования показали, что ФЭ умеренно снижал ДЭ, на 4-5% ($p < 0,05$) и выражено повышал ПАЭ (на 63-91%, $p < 0,01$). Опыты подтвердили, что оба донора ГТ положительно влияют на микрореологию эритроцитов, повышая их деформируемость, и выражено снижая их агрегацию. При сочетании «ФЭ+НПН» или «ФЭ+ NaHS» наблюдалось полное восстановление оптимальных величин микрореологических характеристик эритроцитов.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности коррекции негативных микрореологических сдвигов с помощью доноров ГТ. Основным механизмом положительного влияния NO и H₂S является их способность стимулировать активность гуанилатциклазы, что в свою очередь ингибирует вход Ca²⁺ в клетки. **Ключевые слова:** эритроциты, микрореология, фенилэфрин, газотрансмиттеры, оксид азота, сульфид водорода

A.V. Muravyov, I.A. Tikhomirova, E.P. Petrochenko, S.V. Bulaeva, E.L. Volkova, A.V. Zamyshlyayev

CORRECTION OF MICRORHEOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ERYTHROCYTES BY GASOTRANSMITTER DONORS

Abstract. Cell stimulation with the α -1-agonist phenylephrine (PE) is widely used in experimental practice. Since the main mechanism of action of PE on cells is associated with the opening of Ca²⁺ channels of membranes, including erythrocytes, the purpose of this work was to study, on the model of microrheological responses of erythrocytes to PE, the possibility of correcting their microrheology using gasotransmitters (GT) - nitric oxide (NO) and hydrogen sulfide (H₂S). To solve this problem, washed erythrocytes were incubated with PE (1.0 μ M), NO donor, sodium nitroprusside (SNP, 100 μ M), H₂S donor (NaHS, 100 μ M) and with their combinations: "PE+SNP" and "PE+ NaHS". After incubation, the erythrocyte deformability (DE) and their aggregation (AE) were recorded. The results of the study showed that PE moderately reduced DE by 4-5% ($p < 0.05$) and significantly increased AE (by 63-91%, $p < 0.01$). Experiments have confirmed that both GT donors have a positive effect on

the erythrocyte microrheology, increasing their deformability and significantly reducing aggregation. With the combination of "PE + SPN" or "PE + NaHS", a complete recovery of the optimal values of the erythrocyte microrheological characteristics was observed. Taken together, the obtained data indicate the possibility of correcting negative microrheological changes with the help of GT donors. The main mechanism of the positive effect of NO and H₂S is their ability to stimulate the activity of guanylate cyclase in erythrocyte, which in turn inhibits the entry of Ca²⁺ into cells.

Keywords: erythrocytes, microrheology, phenylephrine, gasotransmitters, nitric oxide, hydrogen sulfide

Введение

Гормональное управление метаболизмом включает как регуляцию процессов ассимиляции и накопления вещества и энергии, так и их расход. При этом процессы использования энергии в клетках регулируют катехоламины. Поскольку на зрелых эритроцитах имеются функционально активные α - и β -адренорецепторы [1-3], то можно ожидать регуляторного изменения микрореологических свойств этих клеток при связывании рецепторами соответствующего агониста. Так, например, агонист α -1-адренорецепторов фенилэфрин в концентрации 1,0 μ M проявлял выраженный проагрегационный эффект и заметно влиял на деформируемость эритроцитов [4]. С другой стороны известно, что газотрансмиттеры – оксид азота (NO) и сульфид водорода (H₂S) позитивно влияют микрореологию эритроцитов [5]. Следовательно, инкубация эритроцитов с фенилэфрином с последующим негативным изменением их микрореологического ответа может быть удобной моделью для изучения коррекции этих нарушений с помощью доноров газотрансмиттеров. Сказанное выше и показывает основную цель настоящего исследования.

Методика

Образцы цельной крови (9 мл) получали венопункцией у здоровых доноров (n=24) в вакуумные пробирки (вакутайнеры с EDTA). Исследование было одобрено местным этическим комитетом университета и было получено информированное согласие всех субъектов. Эритроциты отделяли от плазмы центрифугированием (15 мин, 3000 об/мин), трижды отмывали в изотоническом растворе NaCl. Суспензию эритроцитов (в растворе Рингера) делили на несколько

аликвот и клетки инкубировали при 37°C в течение 30 мин с каждым из перечисленных ниже соединений:

- 1) с донором NO – нитропропруссидом натрия (НПН, в концентрациях 100 мкМ);
- 2) с донором H₂S – гидросульфидом натрия (NaHS, в концентрациях 100 мкМ);
- 3) с агонистом альфа-1-адренорецепторов – фенилэфрином (ФЭ, в концентрации 1,0 мкМ).
- 4) В каждом опыте в качестве контроля использовали суспензию эритроцитов, инкубируемых в растворе Рингера, без добавления указанных выше препаратов.

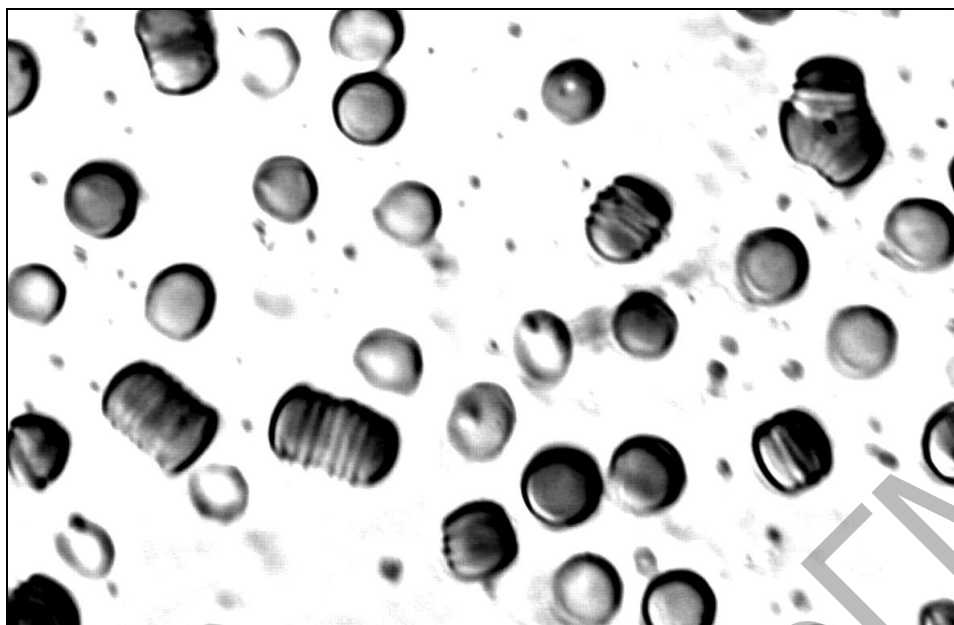
В опытах с исследованием агрегации эритроцитов (ПАЭ), (агрегометр Myrenne M1), для ее стимулирования, добавляли к изотоническому раствору Рингера декстран-200 (10% ХАЕС-стерил, Fresenius Kabi, Германия) в соотношении объемов 7:3. Для оценки деформируемости эритроцитов (ДЭ) определяли индекс их удлинения (ИУЭ) в проточной микрокамере [4]. Регистрировали индекс АЭ и ДЭ после инкубации с препаратами и сравнивали с их с данными контрольных опытов (инкубация эритроцитов без препаратов).

Статистическая обработка

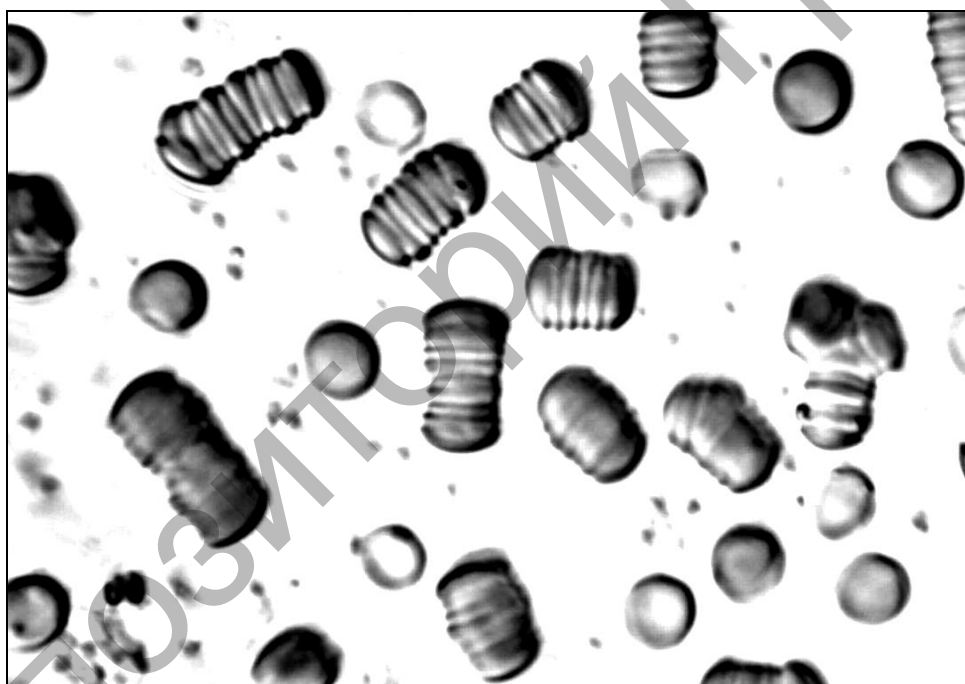
Весь цифровой материал обработан статистически с определением выборочной средней величины (М) и стандартного отклонения (σ). Полученные данные проверяли на соответствие признака закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. С учетом этого была использована непараметрические методы с применением программы “Statistica 10.0”. Достоверность полученных данных, с учетом размеров малой выборки, множественных сравнений, оценивалась с использованием U-критерия Манна-Уитни. При проведении парных сравнений уровней показателей внутри групп при повторных измерениях, использовали критерий Вилкоксона. За уровень статистически значимых принимали изменения при $p < 0,05$ и $0,01$.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что инкубация эритроцитов с фенилэфрином (ФЭ) выражено повышала агрегацию эритроцитов на 63% (табл. 1). При этом формировались более крупные агрегаты, чем в контрольных пробах (рис. 1).



А



Б

Рис. 1. Различие агрегации эритроцитов в контрольной суспензии (А) эритроцитов (без препаратов) и после инкубации с фенилэфрином (Б).

Тогда как инкубация эритроцитов с ФЭ несколько снизила деформируемость эритроцитов, в среднем на 0,09 отн. ед., что составило 4% ($p < 0,05$). Как видно из данных, приведенных в таблице 1, NaHS, повысил достоверно ИУЭ, на 9% ($p < 0,01$) и существенно снизил ПАЭ, на 38% ($p < 0,05$).

Таблица 1

Изменение микрореологии эритроцитов под влияние инкубации с гидросульфидом натрия (NaHS), фенилэфрином (ФЭ) и их совместным воздействием (ФЭ+NaHS; n= 24, $M \pm \sigma$)

Показатели	Контроль	NaHS (100 мкМ)	Фенилэфрин (ФЭ, 1,0 мкМ)	ФЭ+NaHS
ИУЭ, отн. ед.	2,05±0,04	2,24±0,03**	1,96±0,04*	2,20±0,05**
ПАЭ, отн. ед.	12,65±2,08	7,88±2,16*	20,65±1,19*	7,72±1,38*

Примечание: * – различия по сравнению с показателями контроля достоверны при $p < 0,05$; **при $p < 0,01$; ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов.

Добавление к эритроцитам, инкубированным с ФЭ, донора сульфида водорода практически не только восстановила их деформируемость до уровня контроля, но и существенно превысило его. При этом разница ИУЭ эритроцитов, обработанных ФЭ и сочетанным воздействием «ФЭ+ NaHS» составила 12% и была статистически значимой ($p < 0,01$, табл. 1). Такая же картина наблюдалась и в отношении агрегации эритроцитов, которая тоже не только снизилась до уровня контроля, а даже ниже его (табл. 1).

Поскольку газотрансммиттеры NO и H_2S проявляют сходные эффекты на клетки и реализуют кросс-общение, то важно было проанализировать влияние донора оксида азота на микрореологию эритроцитов, на фоне действия фенилэфрина. В этой серии опытов микрореологические ответы эритроцитов не отличались от таковых первой серии наблюдений (табл. 1 и 2). Инкубация с НПН также сопровождалась приростом ИУЭ на 11% и уменьшением агрегации клеток на 45% ($p < 0,01$).

Таблица 2

Изменение микрореологии эритроцитов под влияние инкубации с нитропруссидом натрия (НПН), фенилэфрином (ФЭ) и их совместным воздействием (ФЭ+НПН; n= 24, $M \pm \sigma$)

Показатели	Контроль	НПН (100 мкМ)	Фенилэфрин (ФЭ, 1,0 мкМ)	ФЭ+НПН
ИУЭ, отн. ед.	2,02±0,04	2,25±0,04**	1,93±0,04*	2,24±0,06**
ПАЭ, отн. ед.	14,32±1,64	7,88±2,16*	25,29±2,37**	8,02±1,58*

Примечание: * – различия по сравнению с показателями контроля достоверны при $p < 0,05$; **при $p < 0,01$; ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов.

При добавлении к суспензии эритроцитов, инкубированных с ФЭ донора NO, деформируемость клеток превысила уровень контроля на 11%, а по сравнению с действием одного ФЭ оказалась выше на 16% ($p < 0,01$, табл. 2). Что касается агрегации, то ее прирост под влиянием фенилэфрина, не только полностью устранялся, но величина ПАЭ была близкой к той, что наблюдали после инкубации клеток с НПН (табл. 2).

Основной механизм изменений микрореологических характеристик эритроцитов (деформируемости и агрегации) под влиянием фенилэфрина, вероятно, связан с обменом Ca^{2+} . Известно, что α -1-адренорецептор связан с Ca^{2+} сигнальным путем [6] и при его стимуляции происходит усиление входа кальция в клетку [7]. Кроме того, было показано, что фенилэфрин в концентрации 1,0 μ М проявлял выраженный проагрегационный эффект и заметно влиял на деформируемость эритроцитов [5]. С другой стороны, известно, что активация газотрансммитерами гуанилатциклазы сопровождается снижением входа Ca^{2+} в клетки [8].

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и БРФФИ в рамках научного проекта №20-515-00019\20-А

Библиографический список

1. Bree F., Gault I., P. d'Athis and Tillement J. P. Beta adrenoceptors of human red cells, determination of their subtypes // Biochem. Pharmacol. – 1984. – Vol. 33. – P. 4045–4050.

2. Sundquist J., Bias D.S., Hogan J.E. The α -1-adrenergic receptor in human erythrocyte membranes mediates interaction in vitro of epinephrine and thyroid hormone at the membrane Ca^{2+} -ATPase // Cellular Signalling. – 1992. - Vol. 4. - 795-799.
3. Tuvia S., Moses A., Gulayev N. Beta-adrenergic agonists regulate cell membrane fluctuations of human erythrocytes // J. Physiol. – 1999. - Vol. 77. - 781-787.
4. Muravyov A.V., Tikhomirova I.A. Role molecular signaling pathways in changes of red blood cell deformability // Clin Hemorheol Microcirc. - 2013. - Vol. 53. - 45-59.
5. Muravyov A.V., Antonova N., Tikhomirova I.A. Red blood cell micromechanical responses to hydrogen sulfide and nitric oxide donors: Analysis of crosstalk of two gasotransmitters (H_2S and NO) // Series on Biomechanics. - 2019. - Vol. 33. - 34-40.
6. Guimarães S. and Moura D. Vascular Adrenoceptors: An Update // Pharmacol. Rev. – 2001. – Vol. 53. – Issue 2. – P. 319–356.
7. Christophersen P., Bennekou P. Evidence for a voltage-gated, non-selective cation channel in the human red cell membrane // Biochim Biophys Acta. – 1991. – Vol. 1065. – P. 103–106.
8. Truss NJ, Warner TD. Gasotransmitters and platelets // Pharmacol Ther. – 2011. - Vol. 132. - 196-203.

УДК 616.13–007.64:616.15

*Н.И. Нечипуренко¹, Р.Р. Сидорович¹, И.Д. Пашковская¹,
Ю.И. Степанова², А.И. Ахремчук¹, Т.А. Прокопенко¹*

**ОСОБЕННОСТИ КИСЛОРОДТРАНСПОРТНОЙ ФУНКЦИИ
КРОВИ И ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО
РАВНОВЕСИЯ ПРИ РАЗРЫВЕ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ АНЕВРИЗМ**

Аннотация. Обследованы 23 пациента, оперированные на 8-е (6; 10) сутки после разрыва церебральных аневризм. Установлены алкалолитические изменения, снижение pCO_2 , повышение p50 с уменьшением сродства гемоглобина к кислороду, активация прооксидантных процессов в венозной крови относительно данных здоровых лиц. Выявленные нарушения указывают на особенности

© Н.И. Нечипуренко, Р.Р. Сидорович, И.Д. Пашковская,
Ю.И. Степанова, А.И. Ахремчук, Т.А. Прокопенко, 2022

кислородзависимых процессов у пациентов с разорвавшимися аневризмами головного мозга в дооперационном периоде.

Ключевые слова: кислородтранспортная функция крови, прооксидантно-антиоксидантные нарушения, разрыв церебральной аневризмы

N. Nechipurenko¹, R. Sidorovich¹, I. Pashkovskaya¹, J. Stepanova², A. Ahremchik¹, T. Prokopenko¹

FEATURES OF THE OXYGEN TRANSPORT FUNCTION OF BLOOD AND PROOXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE AT CEREBRAL ANEURYSM RUPTURE

Annotation. 23 patients, operated on the 8th (6; 10) days after cerebral aneurysms rupture were examined. An increase in the venous blood pH, a decrease in the pCO₂, an increase in the p50 index with a decrease in hemoglobin affinity and the activation of prooxidant processes relative to the norm were established. The revealed disorders indicate the peculiarities of the oxygen-dependent processes in patients with ruptured brain aneurysms in the preoperative period.

Keywords: oxygen transport function of blood, prooxidant-antioxidant disorders, cerebral aneurysm rupture

Введение

При разрыве церебральных аневризм (ЦА) с развитием аневризматического субарахноидального кровоизлияния (аСАК) у пациентов наблюдаются нарушения, вызванные гипоксией структур головного мозга, обусловленные вазоспазмом и церебральным отеком, ухудшением процессов клеточного энергообмена и нарастанием окислительного стресса [1]. Изучение показателей кислородтранспортной функции крови (КТФК) и про-, антиоксидантного состояния позволяет определить степень участия этих нарушений в развитии аСАК и его ишемических осложнений, что может способствовать улучшению диагностики и контроля коррекции кислородзависимых изменений при данной патологии.

Цель

Изучить показатели про-, антиоксидантного состояния и кислородсвязывающих свойств крови у пациентов с разрывом ЦА в дооперационном периоде.

Методы

Обследованы 23 пациента в возрасте $48,8 \pm 10,3$ лет, оперированные на 8-е (6; 10) сутки после разрыва аневризмы и развития аСАК. Максимальный размер аневризмы по данным КТ-ангиографии у них составил $6,2 \pm 1,9$ мм. Всем пациентам было проведено микрохирургическое клипирование шейки аневризмы. У 4-х пациентов (17%) до нейрохирургического лечения развился инфаркт мозга. Забор образцов крови для исследования показателей КТФК и про-, антиоксидантного состояния выполняли из кубитальной вены натошак в 1-е сутки после госпитализации в стационар. Определяли парциальное давление кислорода (pO_2) и углекислого газа (pCO_2) в крови, степень оксигенации (sO_2), парциальное давление кислорода, при котором гемоглобин насыщен кислородом на 50% ($p50$) и pH на газоанализаторе ABL-800 FLEX («Radiometer» Дания). Сродство гемоглобина к кислороду (СГК) определяли по показателю $p50$. Осуществляли построение кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО), отражающей нелинейную зависимость насыщения гемоглобина кислородом от pO_2 . Исследование выполнялось в режиме $37^\circ C$ из шприцевой пробы венозной крови в анаэробных условиях. Концентрацию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, (ТБК-П) в плазме крови изучали по методу В.А. Костюка [2]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) в цельной крови определяли по реакции супероксидзависимого окисления кверцетина [3]. Нормальные значения всех показателей были получены у 26 практически здоровых лиц ($49,4 \pm 14,6$ лет); $p > 0,05$ относительно возраста пациентов.

При статистической обработке полученных данных применяли программу Statistica 10.0. В таблице данные представлены в виде среднего арифметического (M) и стандартного отклонения (SD) в случае нормального распределения данных, либо в виде медианы (Me) и 25 и 75 перцентилей при распределении отличном от нормального. Сравнительный анализ количественных признаков в двух группах выполняли с использованием t-критерия Стьюдента либо U-критерия Манна-Уитни. Статистически значимыми считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В группе пациентов с разрывом ЦА установлено повышение уровня pH венозной крови до $7,4 \pm 0,006$ ед. ($p = 0,038$) относительно

нормальных данных (таблица). Сдвиг pH в щелочную сторону развился на фоне гипокапнии венозной крови обследуемых лиц – парциальное давления углекислоты снизилось до 42,1 (38,3; 46,2) мм рт.ст. ($p=0,040$), что отражает алкалолитические изменения кислотно-основного состояния крови с преобладанием респираторного компонента.

Таблица

Показатели pH и КТФК в венозной крови у пациентов с разорвавшимися ЦА

Параметры		Здоровые лица	Пациенты	Статистическая значимость различий
pH, усл. ед.		7,35±0,036	7,4±0,006	t=3,7, p=0,038
pCO ₂ , мм рт. ст.		49,0 (45,1; 52,1)	42,1 (38,3; 46,2)	U=56, p=0,040
pO ₂ , мм рт. ст.		34,5 (32,5; 36,2)	36,5 (28,0; 47,5)	НЗ
sO ₂ , %		61,1 (55,9; 64,1)	65,9 (45,1; 83,5)	НЗ
p50, мм рт. ст.		25,2 (24,3; 26,8)	27,3 (26,5; 29,4)	U=71; p=0,034

Примечание. t или U – сравнение данных пациентов с разорвавшимися ЦА и здоровых лиц

Значение p50 у пациентов возросло и значимо отличалось от нормальных данных, составляя 27,3 (26,5; 29,4) мм рт.ст. ($p=0,034$). При этом парциальное давление кислорода и сатурация венозной крови оставались в пределах нормы. Повышение p50 при аСАК свидетельствует о снижении СГК и развитии компенсаторной реакции, направленной на улучшение оксигенации ишемизированных тканей в дооперационном периоде. Эти изменения p50 венозной крови отражены смещением КДО вправо по сравнению с положением КДО в группе здоровых лиц, что представлено на рис. 1.

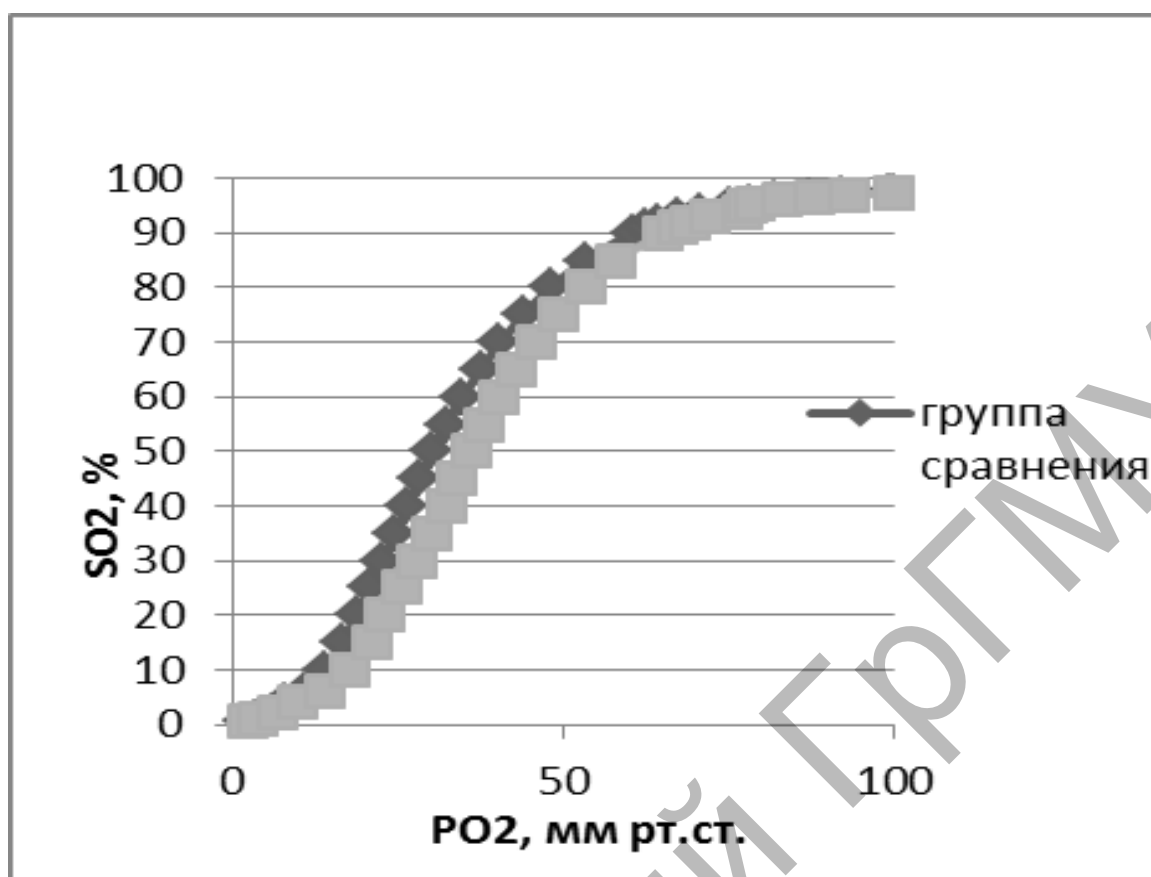


Рис. 1. Положение кривой диссоциации оксигемоглобина у пациентов с разорвавшимися ЦА и группой сравнения (норма)

При исследовании показателей про-, антиоксидантного баланса у пациентов установлено достоверное увеличение концентрации ТБК-П до 2,4 (1,46; 3,23) мкмоль/л ($p=0,017$) против 1,66 (1,31; 1,85) в норме, снижение активности СОД до 85,1 (78,3; 112) Ед/мл ($p=0,0004$) относительно здоровых лиц (115,5 (105,5; 129) Ед/мл), что указывает на интенсификацию процессов ПОЛ с уменьшением соотношения СОД/ТБК-П более чем в 2 раза ($p=0,0001$).

Важным компонентом дизоксии является нарушение внутриклеточной утилизации кислорода, возникающее вследствие блокады цепи дыхательных ферментов митохондрий под действием оксидантного стресса и медиаторов воспаления при геморрагическом повреждении тканей [4]. Следовательно, установленное изменение уровня $p50$ после разрыва ЦА до операции явилось, по-видимому, компенсаторно-приспособительным механизмом для поддержания адекватного уровня содержания кислорода в микроциркуляторном русле и предупреждения развития гипоксии мозга, что особенно важно для обеспечения жизнедеятельности мозговых структур.

Выводы

Таким образом, у пациентов оперированных на 8-е (6; 10) сутки после разрыва ЦА и развития аСАК установлены сдвиг рН венозной крови в щелочную сторону и значимое снижение $p\text{CO}_2$ при повышении показателя $p50$ относительно здоровых лиц, что отражает развитие смешанного алкалоза. Отмечалось снижение сродства гемоглобина к кислороду и сдвиг КДО вправо, что, вероятнее всего, обеспечивает улучшение оксигенации тканей головного мозга в дооперационном периоде. Выявлено статистически значимое возрастание концентрации ТБК-П и уменьшение соотношения СОД/ТБК-П в крови обследуемых лиц, свидетельствующее об активации прооксидантных процессов в организме. Выявленные нарушения указывают на особенности кислородзависимых процессов у пациентов с разорвавшимися аневризмами головного мозга.

Библиографический список

1. Jordan J.D., Nyquist P. Biomarkers and vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage // *Neurosurg. Clin. N. Am.* – 2010. – Vol. 21, № 2. – P. 381–391.
2. Костюк В.А., Потапович А.И. Определение продуктов перекисного окисления липидов с помощью тиобарбитуровой кислоты в анаэробных условиях // *Вопр. мед. химии.* – 1987. – № 3. – С. 115–118.
3. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // *Вопр. мед. химии.* – 1990. – Т. 36, № 2. – С. 88–91.
4. Molyneux A.J., Kerr R.S.C., Yu L. et al. International subarachnoid aneurysm trial (ISAT) of neurosurgical clipping versus endovascular coiling in 2143 patients with ruptured intracranial aneurysms: a randomised comparison of effects on survival, dependency, seizures, rebleeding, subgroups, and aneurysm occlusion // *Lancet.* – 2005. – Vol. 366. – P. 809–817.

*С.Ю. Никитин, М.С. Лебедева, Е.Г. Цыбров***КАЛИБРОВКА ЛАЗЕРНОГО ЭКТАЦИТОМЕТРА
ЭРИТРОЦИТОВ**

Аннотация. Рассматривается проблема измерения деформируемости эритроцитов методом лазерной дифрактометрии в сдвиговом потоке (эктацитометрии). Получено калибровочное уравнение, связывающее геометрические параметры линии изоинтенсивности дифракционной картины с уровнем интенсивности света на этой линии. Предложен упрощенный алгоритм измерения разброса эритроцитов по деформируемости, применимый для образцов крови с симметричной функцией распределения по деформируемости.

Ключевые слова: деформируемость эритроцитов, лазерная эктацитометрия, алгоритмы обработки данных.

*S. Yu. Nikitin, M. S. Lebedeva, E. G. Tsybrov***CALIBRATION OF LASER EKTACYTOMETER
OF ERYTHROCYTES**

Abstract. The problem of measuring the deformability of erythrocytes by laser diffractometry in shear flow (ektacytometry) is considered. A calibration equation is obtained that relates the geometric parameters of the isointensity line of the diffraction pattern to the level of light intensity on this line. A simplified algorithm for measuring the spread of erythrocytes in deformability is proposed, which is applicable to blood samples with a symmetrical distribution function in deformability.

Key words: deformability of erythrocytes, laser ektacytometry, measurement algorithms

Введение

Деформируемость эритроцитов, понимаемая как способность клеток крови обратимо изменять свою форму под действием внешних сил – важная реологическая характеристика крови. Этот параметр трудно поддается измерениям, однако важен для диагностики и лечения многих заболеваний, среди которых ишемические и инфекционные заболевания, сахарный диабет, малярия, серповидно-

клеточная анемия, наследственный сфероцитоз, сепсис и другие. Существуют коммерческие приборы для измерения деформируемости эритроцитов – LoRRca (Голландия) и RheoScan (Корея). Эти приборы измеряют только среднюю деформируемость эритроцитов в исследуемом образце крови, тогда как интерес представляет и функция распределения эритроцитов по деформируемости. В наших работах [1, 2] предложены алгоритмы измерения ширины и асимметрии распределения эритроцитов по деформируемости. Однако остается проблема калибровки лазерного эктацитометра, состоящая в измерении интенсивности света на линии изоинтенсивности, выбранной для измерений, по отношению к интенсивности центрального максимума дифракционной картины. Эта задача осложняется тем, что центр дифракционной картины засвечен прямым лазерным пучком. Поэтому целесообразны поиски косвенных методов калибровки, которые не требуют фотометрии дифракционной картины в ее центральной части. Один из таких методов предлагается в данной работе.

Схема лазерного эктацитометра показана на рисунке 1. Она включает в себя лазер, ячейку Куэтта и экран наблюдения. Сильно разбавленную суспензию эритроцитов заливают в ячейку Куэтта, где создается сдвиговый поток и эритроциты вытягиваются вдоль потока силами вязкого трения. Затем суспензию просвечивают лазерным пучком, который рассеивается на эритроцитах и дает на экране наблюдения дифракционную картину. Задача теории заключается в том, чтобы найти связь параметров этой картины с характеристиками деформируемости эритроцитов.

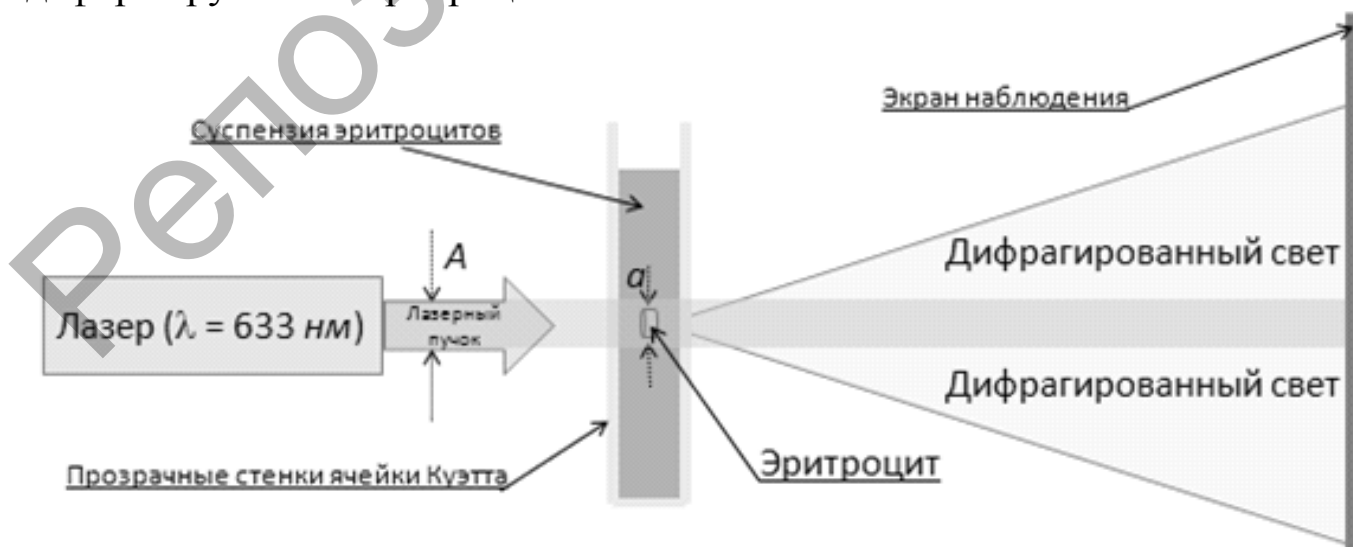


Рис.1. Схема лазерного эктацитометра эритроцитов

Примеры дифракционных картин, полученных для нормального образца крови, показаны на рисунках 2а, 2б. На рисунке 2а показана картина, полученная при низком напряжении сдвига, на рисунке 2б – картина, полученная при высоком напряжении сдвига. Вытягивание дифракционной картины демонстрирует деформацию эритроцитов в ячейке Куэтта под действием сил вязкого трения.



а

Рис. 2а. Дифракционные картины, полученные для нормального образца крови при низком напряжении сдвига



б

Рис. 2б. Дифракционные картины, полученные для нормального образца крови при высоком напряжении сдвига

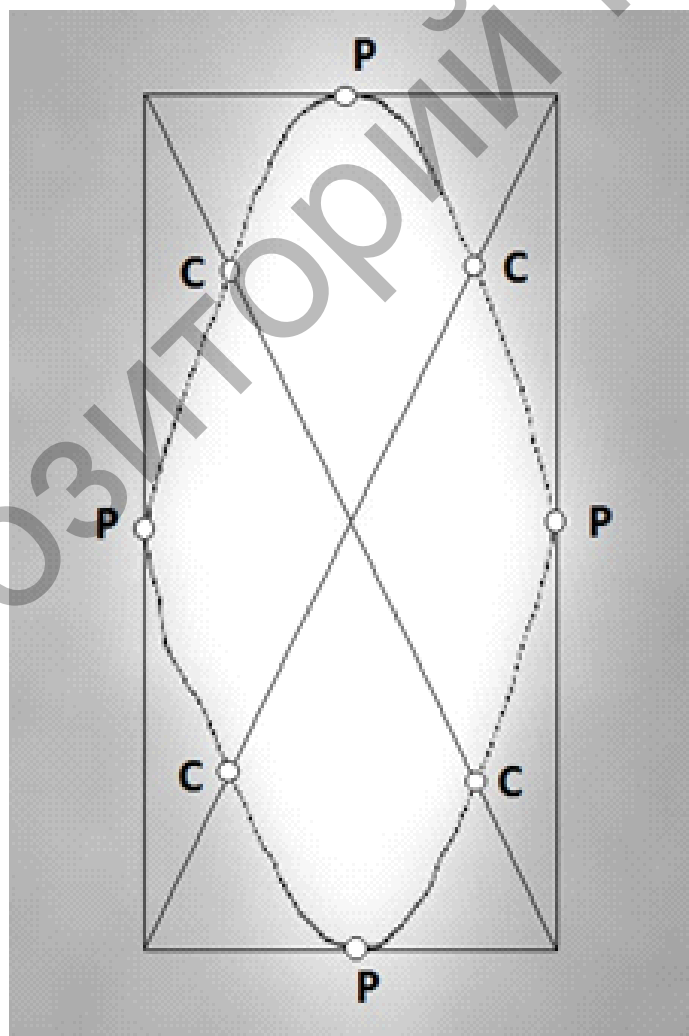
Методика

Алгоритмы обработки данных лазерной эктацитометрии строятся на основе решения задачи о рассеянии лазерного пучка на ансамбле эритроцитов. Аналитическое решение этой задачи возможно на основе ряда приближений. К их числу относятся приближение однократного рассеяния света эритроцитами, приближение аномальной дифракции, приближение малоуглового рассеяния,

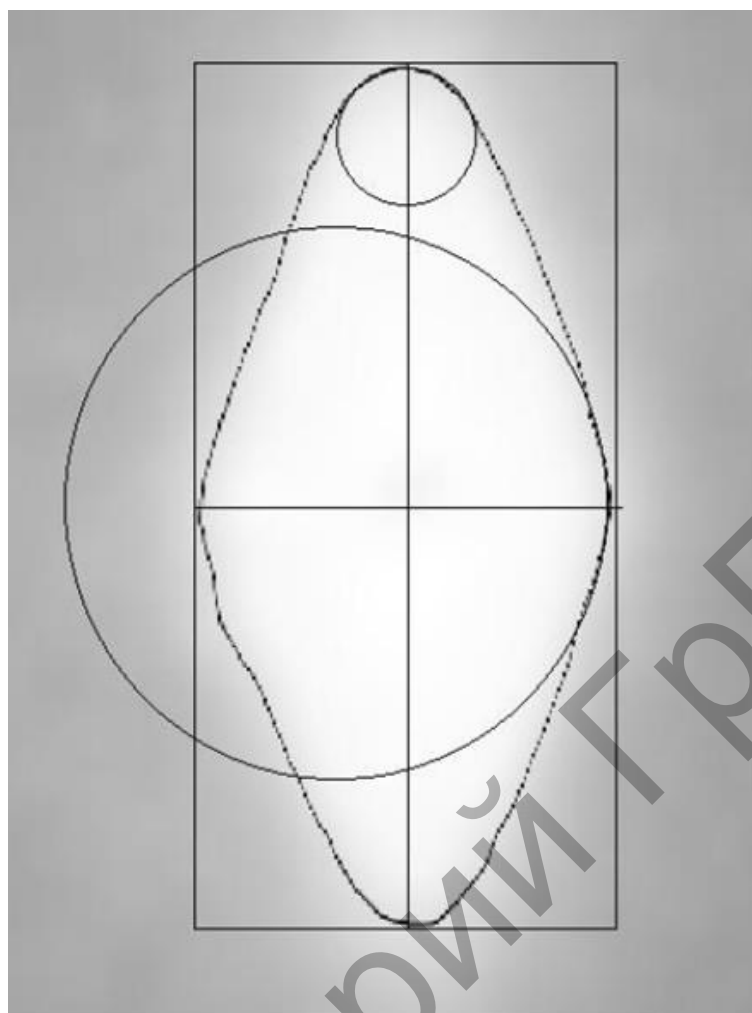
приближение дальней зоны дифракции, приближение слабой неоднородности ансамбля эритроцитов. Кроме того, мы ограничиваем расчет периферической частью дифракционной картины, в которой интенсивность света примерно на порядок ниже интенсивности центрального дифракционного максимума. Как показывает анализ, именно эта часть дифракционной картины наиболее чувствительна к параметрам ансамбля эритроцитов. В данной работе мы используем два алгоритма обработки дифракционных картин – алгоритм характеристической точки [1] и алгоритм кривизны линии [2].

Результаты и обсуждение

Анализ дифракционной картины проводим на основе понятия линии изоинтенсивности. Так называется совокупность точек дифракционной картины, в которых интенсивность света имеет одно и то же значение. Пример линии изоинтенсивности показан на рисунке 3.



а



б

Рис. 3. Линия изоинтенсивности дифракционной картины, полярные и характеристические точки (а), круги кривизны линии в полярных точках (б)

Выделим полярные и характеристические точки линии изоинтенсивности (рис. 3а) и построим круги кривизны линии в полярных точках (рис.3б). Введем декартову систему координат, поместив начало отсчета в центр дифракционной картины (точка падения на экран наблюдения прямого лазерного пучка) и направив оси координат вдоль осей симметрии линии изоинтенсивности. Обозначим относительную интенсивность света на линии изоинтенсивности f_0 , координаты полярной точки x_p , y_p , координаты характеристической точки x_c , y_c . Введем также радиусы кривизны линии изоинтенсивности в полярных точках, обозначив их $R(x_p)$ и $R(y_p)$. Используя формулы работ [1, 2] для ансамбля эритроцитов с симметричной функцией распределения по деформируемости получим

$$\frac{1}{\sqrt{f_0}} = \frac{32(1-Q) + (Q-5)C}{QC - 8(1-Q)} \quad (1)$$

Здесь

$$Q = \frac{1}{\sqrt{2}} \left(\frac{x_c}{x_p} + \frac{y_c}{y_p} \right) \quad C = \frac{C_2}{D} + C_1 D - 2$$

$$C_1 = \sqrt{\frac{x_p}{R(x_p)}} \quad C_2 = \sqrt{\frac{y_p}{R(y_p)}}$$

Формула (1) выражает энергетический параметр линии изоинтенсивности f_0 , через геометрические параметры этой линии Q и C . Уравнение (1) назовем калибровочным уравнением. На основе этого уравнения можно предложить упрощенный (комбинированный) алгоритм измерения средней деформируемости эритроцитов и ширины распределения эритроцитов по деформируемости. Этот алгоритм применим для ансамблей эритроцитов с симметричной функцией распределения по деформируемости и выражается формулами

$$s = \frac{y_p}{x_p} \quad \mu = \frac{2}{5} - \frac{QC}{20(1-Q)} \quad (2)$$

Здесь s и μ – параметры, характеризующие среднюю деформируемость эритроцитов и ширину распределения эритроцитов по деформируемости в исследуемом образце крови. Отметим, что комбинированный алгоритм не требует измерения относительной интенсивности света на линии изоинтенсивности, выбранной для измерений. В качестве входных данных нужны только геометрические параметры линии изоинтенсивности: координаты полярных и характеристических точек, а также радиусы кривизны линии в полярных точках. Это существенно упрощает процедуру измерений.

Итак, в настоящей работе рассмотрена проблема измерения деформируемости эритроцитов методом лазерной дифрактометрии в сдвиговом потоке (эктацитометрии). Получено калибровочное уравнение, связывающее геометрические параметры линии изоинтенсивности дифракционной картины с уровнем интенсивности света на этой линии. Предложен упрощенный алгоритм измерения разброса эритроцитов по деформируемости, применимый для образцов крови с симметричной функцией распределения по деформируемости. Алгоритм не требует измерения относительной интенсивности света на линии изоинтенсивности, выбранной для

измерений. В качестве входных данных нужны только геометрические параметры линии изоинтенсивности: координаты полярных и характеристических точек, а также радиусы кривизны линии в полярных точках.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ в рамках реализации программы Московского центра фундаментальной и прикладной математики по соглашению №075-15-2019-1621, а также стипендиального гранта фонда «БАЗИС» №21-2-1-33-1.

Библиографический список

1. Никитин С. Ю., Устинов В. Д. Алгоритм характеристической точки в лазерной эктацитометрии эритроцитов. Квантовая электроника, 2018, т. 48, N 1, с. 70.
2. Никитин С.Ю., Устинов В.Д., Шишкин С.Д., Лебедева М. С. Алгоритм кривизны линии в лазерной эктацитометрии эритроцитов. Квантовая электроника, 2020, т. 50, № 9, с. 888.

УДК 535.8; 577.352.336; 577.325.3

Е.С. Орешкин, П.Б. Ермолинский, А.Е. Луговцов, А.В. Приезжев

АНАЛИЗ СТЕПЕНИ АГРЕГАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ РАЗНЫХ СДВИГОВЫХ НАПРЯЖЕНИЯХ В ПРОТОЧНОЙ КАМЕРЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЦИФРОВОЙ ОБРАБОТКИ ИЗОБРАЖЕНИЙ

Аннотация: Эритроциты способны образовывать агрегаты при малых сдвиговых напряжениях потока. Эти агрегаты разрушаются при больших сдвиговых напряжениях, которые возникают в сосудах и капиллярах. Целью данной работы было получение зависимости степени агрегации эритроцитов от сдвиговых напряжений с использованием проточной камеры. Изображения суспензии эритроцитов обрабатывались с помощью компьютерной программы, разработанной в среде MATLAB.

Ключевые слова: эритроциты, агрегация эритроцитов, проточная камера, цифровая обработка изображений.

Oreshkin E.S., Ermolinskiy P.B., Lugovtsov A.E., Priezzhev A.V.
**ANALYSIS OF THE DEGREE OF RED BLOOD CELL
AGGREGATION AT DIFFERENT SHEAR STRESSES IN FLOW
CHAMBER USING DIGITAL IMAGE PROCESSING**

Abstract. Red blood cells (RBC) are able to form aggregates at low shear flow. Aggregates destroyed by high shear stress arising in blood capillaries and vessels. The aim of this work was to obtain the dependence of the degree of erythrocytes aggregation on shear stress using a flow chamber. The images of the RBC suspension were analyzed using a computer program developed in the MATLAB environment.

Key words: red blood cell, RBC aggregation, flow chamber, digital image processing.

Введение

Агрегация эритроцитов – это обратимый процесс образования линейных и более сложных структур при малых сдвиговых напряжениях потока. Агрегаты разрушаются при больших сдвиговых напряжениях. Агрегация эритроцитов – один из главных факторов, определяющих вязкость крови [1]. В этой работе исследовалась зависимость степени агрегации красных клеток крови от сдвиговых напряжений с использованием цифровой обработки изображений, полученных с помощью проточной камеры.

Материалы и методы

Эксперименты проводились на образцах крови, взятой из локтевой вены здорового донора и стабилизированной EDTA. Образец, используемый в исследовании, представлял собой суспензию эритроцитов, разбавленную смесью двух растворов: раствора гидроксиэтилированного крахмала (концентрация 6%, молекулярный вес 130 кДа) и раствора Рингера в объемном соотношении 4:6. Гематокрит суспензии оставался постоянным и составлял 1%. Полученная суспензия подавалась в проточную камеру, где к ней прикладывались различные сдвиговые напряжения. Изображения суспензии в камере фиксировались с помощью оптического микроскопа с увеличением 10х и обрабатывались с помощью программы, разработанной в среде MATLAB. Для каждого из трёх значений сдвигового напряжения было выбрано 6÷9 изображений, по которым проводилось усреднение. На каждом

изображении фиксировалось от 60 до 100 элементов, расположенных на площади $0,4 \text{ мм}^2$. В качестве параметров агрегации эритроцитов использовались средняя площадь агрегатов на обрабатываемом изображении и средний линейный размер агрегатов при данном сдвиговом напряжении. Все измерения проводились в течение 3 часов с момента забора крови.

Результаты

На рисунке 1 представлен пример обработки изображения суспензии и соответствующие ему значения параметров агрегации эритроцитов.

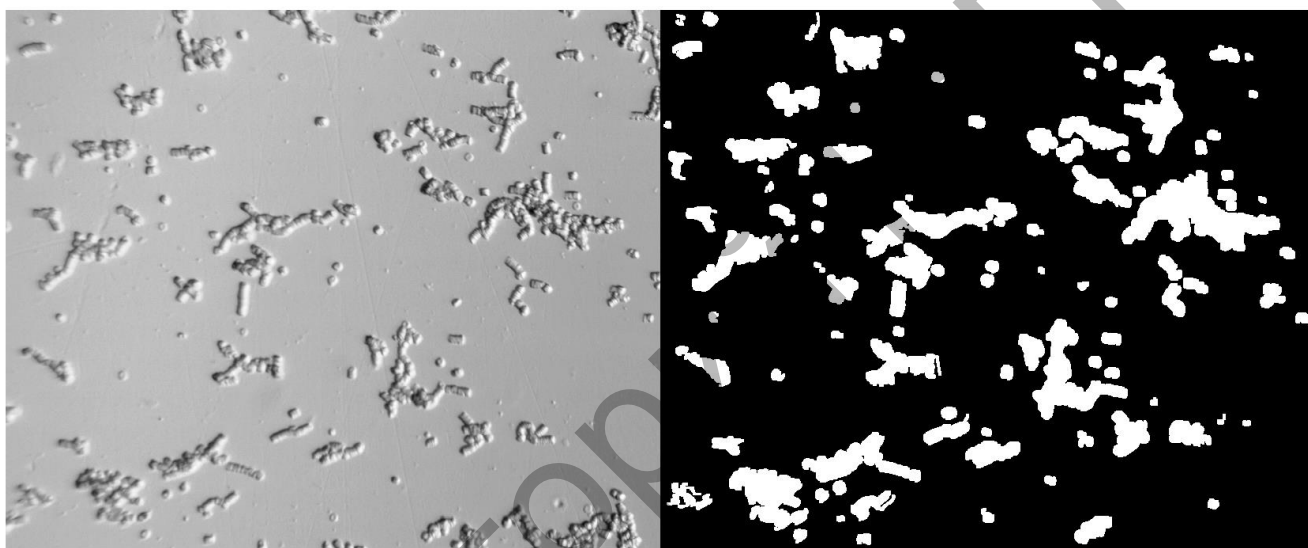


Рис. 1. Пример обработки изображения программой. Сдвиговое напряжение 13 Па, средняя площадь эритроцитарных агрегатов $621,5 \text{ мкм}^2$. Средний линейный размер агрегатов 34,7 мкм

На рис. 2 представлены полученные результаты: зависимость средней площади агрегатов (рисунок 2(a)) и среднего линейного размера агрегатов (рисунок 2(b)) от величины сдвигового напряжения. Представленные графики показывают, что с увеличением сдвиговых напряжений потока размеры агрегатов уменьшаются. Это связано с разрушением агрегатов (их дезагрегацией) под действием потока. Также можно заметить, что при одинаковом увеличении сдвигового напряжения, относительное изменение средней площади агрегатов больше относительного изменения линейного размера. Этот факт говорит о том, что методика измерения площадей обладает большей чувствительностью.

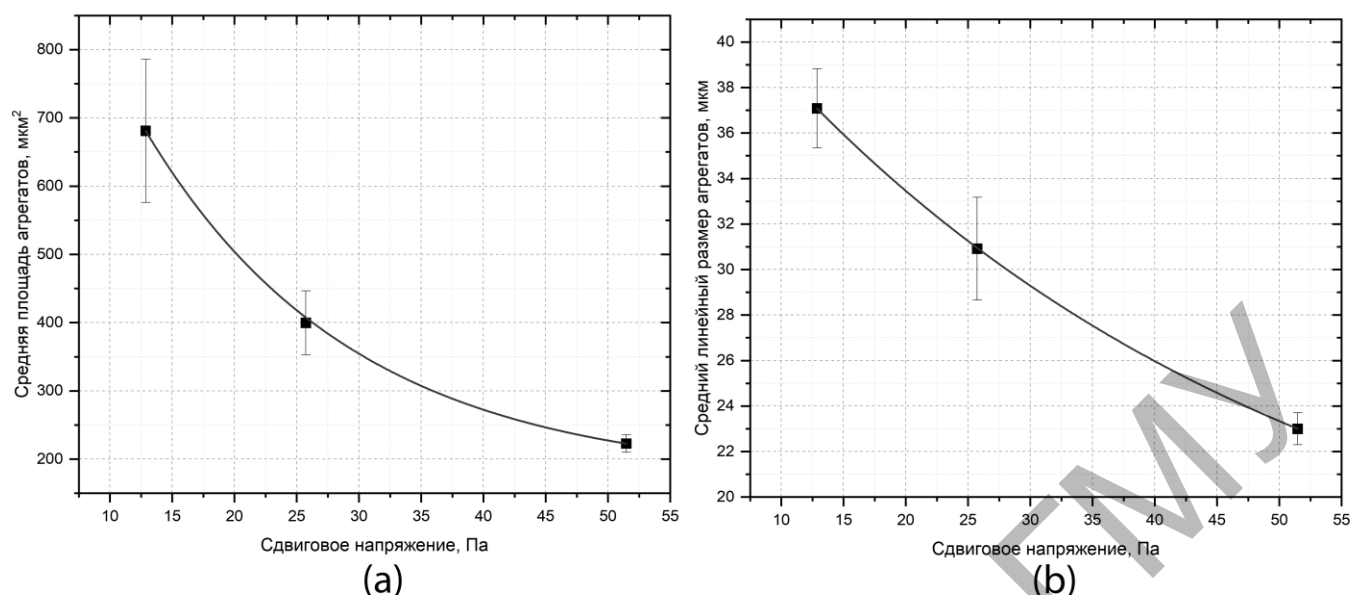


Рис. 2. Зависимость средней площади эритроцитарных агрегатов(а) и среднего линейного размера агрегатов (б) от величины сдвигового напряжения в Па. Погрешности на графиках являются стандартными отклонениями

Выводы

Таким образом, можно заключить, что предложенный метод обработки изображений с проточной камеры и программный код позволяют проводить оценку агрегации эритроцитов в образце крови. Использование этой методики может быть перспективно в клинической практике.

Исследование выполнено в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина» и при финансовой поддержке гранта РФФ № 20-45-08004.

Библиографический список

1. Baskurt O., Meiselman H. "Erythrocyte aggregation: basic aspects and clinical importance," Clinical Hemorheology and Microcirculation, v. 53(1-2), pp. 23-37 (2013).

*А.В. Приезжев, В.В. Зинчук, П.Б. Ермолинский, Ю.И. Гурфинкель,
Л.И. Дячук, К.Н. Корнеев, А.Е. Луговцов*

**РОЛЬ МИКРОРЕОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ
В ИЗМЕНЕНИИ ПАРАМЕТРОВ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ КРОВИ
ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ И АРТЕРИАЛЬНОЙ
ГИПЕРТЕНЗИИ**

Аннотация. Исследована взаимосвязь агрегационных свойств эритроцитов, измеренных *in vitro* в пробах цельной крови пациентов, страдающих артериальной гипертензией и сахарным диабетом, и здоровых доноров, а также сил парной агрегации эритроцитов, с одной стороны, и скорости капиллярного кровотока, с другой стороны. Установлена связь изменений этих параметров с изменениями кислород-транспортной функции крови.

Ключевые слова: агрегация эритроцитов, микроциркуляция крови, скорость капиллярного кровотока, транспорт кислорода, лазерная агрегометрия, лазерный пинцет.

*A.V. Priezzhev, V.V. Zinchuk, P.B. Ermolinskiy, Yu.I. Gurfinkel,
L.I. Dyachuk, K.N. Korneev, A.E. Lugovtsov*

**THE ROLE OF MICRORHEOLOGICAL PARAMETERS
IN CHANGING THE PARAMETERS OF BLOOD
MICROCIRCULATION IN DIABETES MELLITUS
AND ARTERIAL HYPERTENSION**

Abstract. The relationship between the aggregation properties of erythrocytes measured *in vitro* in whole blood samples of patients suffering from hypertension and diabetes mellitus and healthy donors, as well as the forces of paired aggregation of erythrocytes, on the one hand, and the capillary blood flow rate, on the other hand, was investigated. The relationship of changes in these parameters with changes in the oxygen transport function of blood has been established.

Key words: erythrocyte aggregation, blood microcirculation, capillary blood flow rate, oxygen transport, laser aggregometry, laser tweezers.

Введение

Состояние человеческого организма во многом зависит от микроциркуляции крови, которая, в свою очередь, зависит от микрореологических свойств эритроцитов, в частности, присущих эритроцитам свойств деформируемости и агрегации. Известно, что сердечно-сосудистые и метаболические заболевания, такие как артериальная гипертензия (АГ) и сахарный диабет второго типа (СД2), характеризуются нарушениями микрореологии и микроциркуляции крови. Доставка кислорода в ткани определяется величиной объемного кровотока, которая, в свою очередь, зависит от сосудистых и реологических факторов. Снижение вязкости крови (ВК) может способствовать приросту объемного кровотока и повышению эффективности доставки кислорода. Поскольку ВК тесно связана с микрореологическими свойствами эритроцитов, то можно полагать, что их положительные изменения будут способствовать улучшению кислород-транспортной функции крови.

Основной целью данной работы являлась оценка взаимосвязи агрегационных свойств эритроцитов, измеренных *in vitro* в пробах цельной крови пациентов, страдающих АГ и СД2, и здоровых доноров, а также сил парной агрегации эритроцитов с одной стороны и скорости капиллярного кровотока, с другой стороны. Кроме того, ставилась цель выполнить сравнительный анализ гемореологических профилей у лиц с разным уровнем обеспечения организма кислородом и определение роли газотрансммиттеров (ГТ) в изменениях микрореологических характеристик эритроцитов.

Методика

В этой работе была проведена серия измерений параметров агрегации эритроцитов *in vitro* на образцах крови, полученных от пациентов, страдающих СД2 и АГ. Индекс агрегации и характерное время образования агрегатов измеряли методом лазерной агрегометрии в образцах цельной крови [1]. Кроме того, силы и время агрегации на уровне отдельных клеток были измерены с помощью оптической ловушки [2]. Скорость капиллярной крови, наличие или отсутствие агрегатов эритроцитов и застоя в кровотоке оценивали *in vivo* с помощью витальной цифровой капилляроскопии (ВЦК) [3].

Взаимосвязи между параметрами, измеренными *in vitro*, демонстрируют хорошее соответствие результатов, полученных для пациентов, разделенных на подгруппы в соответствии с данными ВЦК, полученными *in vivo* [4]. Нарушение капиллярного кровотока при СД2 приводит к безусловному ухудшению агрегационных параметров клеток крови. Метод диффузного рассеяния света позволяет измерять параметры агрегации на больших ансамблях клеток и чувствителен к изменениям этих параметров в крови пациентов, страдающих СД2 и АГ. Для исследования влияния ГТ на микрореологию эритроцитов их инкубировали с донором NO (нитропруссидом натрия) и донором H₂S (гидросульфидом натрия) с последующей регистрацией деформируемости и агрегации эритроцитов [5].

Результаты и обсуждение

Нами показано, что в случае СД2 эритроциты обладают повышенной способностью к агрегации по сравнению с нормой, в то время как деформируемость эритроцитов существенно не изменяется. Было показано, что силы взаимодействия эритроцитов при агрегации в случае СД2 и АГ значительно больше, чем эритроцитов в крови здоровых доноров. Силы, возникающие при разделении агрегата в крови пациентов, страдающих СД2, статистически значимо не отличаются от контроля, в то время как сила дезагрегации больше, чем сила агрегации во всех группах. Это статистически значимое различие позволило ввести новый параметр для количественной оценки взаимодействия эритроцитов при агрегации и дезагрегации, который перспективен для использования в диагностике и мониторинге эффективности терапии как СД2, так и других сосудистых патологий. Оптические пинцеты показали себя удобным и перспективным инструментом для проведения исследований на уровне отдельных клеток, позволяя отслеживать кинетику взаимодействий эритроцитов при агрегации и дезагрегации и с высокой точностью измерять силы, возникающие при этих процессах. Изменения параметров агрегации эритроцитов, измеренные *in vitro*, могут быть использованы для оценки изменений жизненно важных параметров капиллярного кровотока в организме человека. Мы также показали, что у лиц с относительно высоким обеспечением тканей кислородом отмечалась пониженная вязкость крови, ее высокий кислородтранспортный потенциал, эффективная микрореология эритроцитов и их более высокая чувствительность к ГТ при

положительном влиянии последних на агрегацию и деформируемость эритроцитов.

Заключение

Методы диффузного рассеяния света и лазерного захвата и манипуляции эритроцитов являются эффективными для оценки агрегационных свойств в образцах цельной крови и на уровне отдельных клеток. Эти методы позволяют оценить *in vitro* нарушения микроциркуляции крови при патологиях. Метод витальной цифровой капилляроскопии позволяет регистрировать изменения скорости капиллярного кровотока, наличие или отсутствие агрегатов эритроцитов и застоя в кровотоке у пациентов *in vivo*. Нами показано, что взаимосвязи между параметрами, измеренными *in vitro*, хорошо соответствуют результатам, полученным для пациентов *in vivo*. Данные, полученные на моделях микрореологических ответов эритроцитов на доноры двух газотрансмиттеров, позволяют заключить, что, во-первых, эти ГТ, как сигнальные молекулы, положительно влияют на микрореологические характеристики эритроцитов и, следовательно, на их транспортный потенциал. Во-вторых, эритроциты лиц, имеющих высокий уровень обеспечения организма кислородом, более чувствительны к регуляторному действию газотрансмиттеров, поскольку их микрореологические ответы на доноры статистически значимо более выражены.

Благодарности

Исследование выполнено в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина» и при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда №20-45-08004.

Библиографический список

1. Ermolinskiy P., Lugovtsov A., Maslyanitsina A., Semenov A., Dyachuk L., and Priezzhev A., "In vitro assessment of microrheological properties of erythrocytes in norm and pathology with optical methods," *Series on Biomechanics* **32**, 20–25 (2018).
2. P. B. Ermolinskiy, A. E. Lugovtsov, A. I. Maslyanitsina, A. N. Semenov, L. I. Dyachuk, and A. V. Priezzhev, "Interaction of erythrocytes in the process of pair aggregation in blood samples from patients with arterial hypertension and healthy donors: measurements with laser tweezers," *J. of Biomedical Photonics and Eng.* **4**(3), 030303–1 – 030303–8 (2018).

3. A. E. Lugovtsov, Y. I. Gurfinkel, P. B. Ermolinskiy, A. I. Maslyanitsina, L. I. Dyachuk, A. V. Priezzhev, "Optical assessment of alterations of microrheologic and microcirculation parameters in cardiovascular diseases", *Biomedical Optics Express* **10**(8), 3974–3986 (2019).

4. A. Maslianitsyna, P. Ermolinskiy, A. Lugovtsov, A. Pigurenko, M. Sasonko, Y. Gurfinkel, A. Priezzhev, "Multimodal diagnostics of microrheologic alterations in blood of coronary heart disease and diabetic patients", *Diagnostics* **11**(1), 76(1-9) (2021).

5. Муравьев А., Михайлов П., Зинчук В., Тихомирова И., Остроумов Р. Гемореологические параметры у лиц с разным уровнем обеспечения организма кислородом: влияние оксида азота и сульфида водорода на микрореологические характеристики эритроцитов // *Тромбоз, гемостаз и реология* №4 (2021).

УДК 612.111.7:616.127-005.8

*Т.П. Пронько*¹, *В.А. Снежицкий*¹, *Т.В. Харитоненко*²,
*О.Г. Стемпковская*¹

АССОЦИАЦИЯ ТРОМБОЦИТАРНЫХ ИНДЕКСОВ С АГРЕГАЦИОННОЙ АКТИВНОСТЬЮ ТРОМБОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С NON-Q ИНФАРКТОМ МИОКАРДА

Аннотация. Для оценки функциональной активности тромбоцитов используют импедансную агрегометрию и морфометрические характеристики тромбоцитов (тромбоцитарные индексы). У пациентов с не-Q-ИМ выявлен достаточно высокий процент встречаемости высокой остаточной реактивности тромбоцитов к АСК - 17,9%, к клопидогрелю - 16,6%, к обоим препаратам одновременно - 6,4%. Различия между подгруппами с разной эффективностью антитромбоцитарной терапии по тромбоцитарным индексам получены только для тромбокрита, $p=0,046$. Выявлены ассоциации между показателями агрегатрограммы и тромбоцитарными индексами.

Ключевые слова: не-Q инфаркт миокарда, агрегация тромбоцитов, ацетилсалициловая кислота, клопидогрел, резистентность, тромбоцитарные индексы

© Т.П. Пронько, В.А. Снежицкий, Т.В. Харитоненко,
О.Г. Стемпковская, 2022

*TP. Pronko¹, V.A. Snezhitskiy¹, T.V.Kharitonenko²,
V.H. Stsiampkouskaya¹*

ASSOCIATION OF PLATELET INDICES WITH PLATELET AGGREGATION ACTIVITY IN PATIENTS WITH NON-Q MYOCARDIAL INFARCTION

Abstract. To assess the functional activity of platelets, impedance aggregometry and morphometric characteristics of platelets (platelet indices) are used. In patients with non-Q-MI, a fairly high percentage of occurrence of high residual platelet reactivity to ASA was revealed - 17.9%, to clopidogrel - 16.6%, to both drugs simultaneously - 6.4%. Differences between subgroups with different efficacy of antiplatelet therapy in terms of platelet indices were obtained only for thrombocrit, $p=0.046$. Associations between aggregation parameters and platelet indices were revealed.

Key words: non-Q myocardial infarction, platelet aggregation, acetylsalicylic acid, clopidogrel, resistance, platelet indices

Введение

Двойная антитромбоцитарная терапия (ДАТТ) ацетилсалициловой кислотой (АСК) и блокатором рецепторов аденозиндифосфата (АДФ) P2RY12 тромбоцитов (клопидогрелом) играет ключевую роль в профилактике атеротромбоза [1]. Одной из существенных проблем применения ДАТТ является недостаточная эффективность ДАТТ, которая ассоциирована с повышенным риском развития сердечно-сосудистых осложнений [2, 3]. Различают клиническую резистентность к ДАТТ, которая подразумевает развитие тромботических осложнений у пациентов на фоне приема препарата, и лабораторную резистентность – неспособность ДАТТ подавлять агрегацию тромбоцитов, выявляемую посредством функциональных тестов [4].

Для оценки функциональной активности тромбоцитов используют импедансную агрегометрию. В основе данного метода лежит измерение изменения электрического импеданса при агрегации тромбоцитов в цельной крови на плоских микроэлектродах. Метод не требует центрифугирования, т.е. проводится на интактных тромбоцитах в присутствии всех других клеток на поверхности, что

максимально близко к процессу агрегации *in vivo*. Интерпретация результатов импедансной агрегометрии аналогична с оптической [5].

Современные гематологические анализаторы позволяют определять не только количество тромбоцитов в периферической крови, но их морфометрические характеристики: MPV (Mean Platelet Volume) – средний объем тромбоцита, PDW (Platelet Distribution Width) – ширина распределения тромбоцитов по их объему, PCT (Platelet Crit) – тромбокрит, величина, отражающая процент объема тромбоцитов), P-LCR (Large Platelet Ratio) – процент объема больших тромбоцитов (размером более 30 фл) к общему объему тромбоцитов. Морфометрические характеристики тромбоцитов являются относительно новыми параметрами, но согласно данным литературы, они отражают оценку функциональной активности тромбоцитов и их тромбогенности [6].

Целью настоящего исследования явилась оценка особенностей агрегационной активности тромбоцитов и ее ассоциация с тромбоцитарными индексами у пациентов не-Q инфарктом миокарда (не-Q-ИМ).

Методика

В исследование включено 78 пациентов с острым не-Q-ИМ в возрасте от 33 до 74 лет 59 мужчин, 19 женщин, средний возраст $58,3 \pm 9,1$ лет. Часть пациентов была пролечена консервативно (34 человека, 43,6%), часть пациентов подвергалась процедуре первичного чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ) (44 человека, 56,4%). Все пациенты получали стандартную терапию, включающую АСК 75 мг/сутки, клопидогрел нагрузочная доза 300 мг, поддерживающая – 75 мг/сутки. Все исследования проводились при поступлении в стационар (через не менее 12 часов от назначения нагрузочной дозы клопидогрела). Все обследуемые подписывали информированное согласие на участие в исследовании, протокол которого был одобрен комитетом по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета №3 от 13.01.2016.

Оценку агрегации тромбоцитов проводили при помощи мультиэлектродной агрегометрии на импедансном 5-канальном агрегометре Multiplate (Verum Diagnostica GmbH, Германия) с несколькими индукторами агрегации. Аденозин-5'-дифосфат (АДФ) (ADP-test) – для выявления чувствительности к клопидогрелю, арахидоновая кислота (ASPI-test) – для выявления чувствительности

к АСК, пептид активатор тромбин рецепторов (Trap-6) – для отражения потенциальной способности тромбоцитов к агрегации. Показателем, наиболее полно отражающим тромбоцитарную активность, является площадь под агрегационной кривой (area under curve – AUC), представленная в виде единиц (unit – U). Высокая остаточная реактивность тромбоцитов (BOPT) – лабораторная резистентность, при приеме АСК определялась по данным ASPI-test при значении AUC выше 30 U, BOPT при приеме клопидогрела определялась по данным ADP-test при значении AUC выше 50 U [7].

Общий анализ крови и исследование морфометрических показателей тромбоцитов: MPV, PDW, PCT проводили цитопоточным методом на автоматическом гемоанализаторе Sysmex XS-500i, Япония.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета программ STATISTICA 10.0.

Результаты и обсуждение

В общей группе ASPI-test составил 17,0 [10,0; 25,5]U, ADP-test - 27,0 [19,0; 43,5] U, TRAP-test - 72,0 [59,5; 93,0] U. Выявлено 14 пациентов (17,9%) с BOPT по ASPI-test, 13 человек (16,6%) с BOPT по ADP-test, 5 человек (6,4%) были с BOPT к обоим препаратам одновременно (АСК и клопидогрел). В зависимости от наличия или отсутствия BOPT пациенты были поделены на подгруппы (ПГ). Пациенты с наличием BOPT к какому-либо из препаратов составили ПГ2, пациенты без BOPT – ПГ1. ASPI-test в ПГ1 был 14,0 [10,0; 21,0] U, в ПГ2 – 36,0 [18,0; 49,0] U, что выше ($p=0,000003$) по сравнению с ПГ1. ADP-test в ПГ1 был 23,0 [17,0; 31,0] U, в ПГ2 – 53,5 [38,0; 61,0] U, что выше ($p<0,000001$) по сравнению с ПГ1. TRAP-test в ПГ1 был 65,0 [51,0; 80,0] U, в ПГ2 – 94,5 [78,0; 106,0] U, что выше ($p=0,000003$) по сравнению с ПГ1.

Количество тромбоцитов в общем анализе крови в обеих ПГ было сопоставимо ($205,0 [170,0; 245,5] \times 10^9/\text{л}$ в ПГ1 против $217,0 [199,0; 238,0] \times 10^9/\text{л}$ в ПГ2). MPV в ПГ1 составил 4,9 [4,3; 5,5] фл, в ПГ2 – 4,9 [4,2; 5,8] фл, что сопоставимо с данными ПГ1. PDW в ПГ1 составил 18,1 [17,4; 18,7]%, в ПГ2 – 18,3 [17,3; 18,7]%, что не отличалось от данных ПГ1. Различия между подгруппами по тромбоцитарным индексам получены только для тромбокрита. Так PCT в ПГ1 составил 0,1 [0,08; 0,13]%, что ниже, по сравнению с ПГ2 – 0,12 [0,1; 0,13]%, $p=0,046$.

При проведении корреляционного анализа выявлены ассоциации между значениями ADP-test и количеством тромбоцитов ($R_s=0,23$; $p=0,049$), значениями ADP-test и значениями PCT ($R_s=0,42$; $p=0,00016$) значениями ADP-test и значениями MPV ($R_s=0,24$; $p=0,039$), а также ассоциации между значениями TRAP-test и количеством тромбоцитов ($R_s=0,36$; $p=0,0012$) и значениями TRAP-test и PCT ($R_s=0,46$; $p=0,000028$).

Согласно данным литературы отмечается связь размера тромбоцитов с их функциональной активностью [6]. В результате активации тромбоцитов их дискоидная форма меняется на сферическую, появляются псевдоподии, что ведет к увеличению размеров клетки, при этом увеличиваются показатели MPV и P-LCR в общем анализе крови. В нашем исследовании большие значения MPV практически не встречаются, хотя мы выявили ассоциации более высоких значений MPV с более высокими значениями ADP-test. Есть работы, в которых показана взаимосвязь низких значений MPV с худшим прогнозом у пациентов с периферическим атеросклерозом [8].

Выводы

Таким образом, выявлен достаточно высокий процент встречаемости ВОРТ у пациентов с не-Q-ИМ - 17,9% пациентов с ВОРТ к АСК, 16,6% пациентов с ВОРТ к клопидогрелу, 6,4% с ВОРТ к обоим препаратам одновременно. Различия между подгруппами по тромбоцитарным индексам получены только для тромбокрита, $p=0,046$. Выявлены ассоциации между значениями ADP-test и количеством тромбоцитов ($R_s=0,23$; $p=0,049$), значениями ADP-test и значениями PCT ($R_s=0,42$; $p=0,00016$) значениями ADP-test и значениями MPV ($R_s=0,24$; $p=0,039$), а также ассоциации между значениями TRAP-test и количеством тромбоцитов ($R_s=0,36$; $p=0,0012$) и значениями TRAP-test и PCT ($R_s=0,46$; $p=0,000028$).

Библиографический список

1. Collet J.-P. et al. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation // European Heart Journal. – 2021. – Vol. 42, iss. 14. – P. 1289–1367.
2. .Snoep J.D. et al. Association of laboratory-defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events: a systematic review and metaanalysis // Archives of Internal Medicine. – 2007. – Vol. 167, iss. 15. – P. 1593–1599.

3. Warlo, E.M.K., Arnesen H., Seljeflot I. A brief review on resistance to P2Y₁₂ receptor antagonism in coronary artery disease // *Thromb J.* – 2019. – Vol. 17, iss. 1. – P. 2–9.

4. Мальцева А.Н., Гринштейн Ю.И. Недостаточный ответ тромбоцитов на применение ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела при ишемической болезни сердца после коронарной реваскуляризации. Является ли резистентность к антитромбоцитарным препаратам обратимой? // *РМЖ.* – 2021. – № 9. – С.1–5.

5. Воробьева И.И. Современные методы оценки функции тромбоцитов и их клиническое значение у больных острым коронарным синдромом // *Креативная кардиология.* – 2012. – №1. – С. 50–63.

6. Sansanayudh N. et al. Prognostic effect of mean platelet volume in patients with coronary artery disease. A systematic review and meta-analysis. // *Tromb. Haemost.* – 2015. – Vol. 114. – P.1299–1309

7. McGlasson D.L., Fritsma G.A. Whole blood platelet aggregometry and platelet function testing // *Semin Thromb Hemost.* – 2009. – Vol. 35. - № 2. – P. 168–180.

8. Rief P. et al. Low mean platelet volume is associated with critical limb ischemia in peripheral arterial occlusive disease // *Sci Rep.* – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 6718.

УДК 535.8; 577.352.336; 577.325.3

А.А. Романова, П.Б. Ермолинский, А.Н. Семенов, А.Е. Луговцов, А.В. Приезжев

РОЛЬ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА И МАКРОМОЛЕКУЛ ДЕКСТРАНА В ПРОЦЕССЕ АГРЕГАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ

Аннотация. Агрегация эритроцитов является важным физиологическим процессом, влияющим на течение крови в организме и, как следствие, на транспорт кислорода к клеткам и тканям в организме. Различные белки и макромолекулы являются факторами, влияющими на агрегацию эритроцитов. Целью данного исследования является изучение влияния С-реактивного белка и макромолекул декстрана на агрегацию эритроцитов в растворах

© А.А. Романова, П.Б. Ермолинский, А.Н. Семенов, А.Е. Луговцов, А.В. Приезжев, 2022

методом диффузного светорассеяния.

Ключевые слова: агрегация, эритроциты, макромолекулы декстрана, С-реактивный белок, реоскан.

*A.A. Romanova, P.B. Ermolinskiy, A.N. Semenov, A.E. Lugovtsov,
A.V. Priezzhev*

THE ROLE OF C-REACTIVE PROTEIN AND DEXTRAN MACROMOLECULES IN THE PROCESS OF ERYTHROCYTE AGGREGATION

Abstract. The aggregation of erythrocytes is an important physiological phenomenon that affects the flow of blood in the body and, as a consequence, the transport of oxygen to the cells and tissues in the body. Various proteins and macromolecules are key factors affecting the aggregability of erythrocytes. The purpose of this work is to study the effect of C-reactive protein and dextran macromolecules on the aggregation of erythrocytes in solutions using diffuse light scattering technique.

Key words: aggregation, diffuse light scattering, erythrocytes, dextran macromolecules, C-reactive protein, rheoscan.

Введение

Агрегация эритроцитов - способность клеток обратимо образовывать многоклеточные агрегаты. Известно, что данный процесс происходит при участии различных белков или макромолекул плазмы крови. Силы агрегации и противоположные им силы дезагрегации клеток возникают вследствие неспецифической межклеточной адгезии макромолекул (белки плазмы крови – фибриноген, гамма-глобулин, альбумин и С-реактивный белок – или вводимые в кровоток синтетические макромолекулы – декстраны) на мембранах эритроцитов, возникновения обедненного слоя и, как следствие, сил осмотического давления у поверхности клеток, отталкивания между отрицательно заряженными клетками, а также в результате вынужденного сдвигового напряжения, которое возникает в потоке крови. По регистрируемым экспериментально с помощью оптических методов кинетическим и динамическим особенностям взаимодействия клеток можно характеризовать свойства эритроцитов агрегировать. С-реактивный белок – белок плазмы

крови, относящийся к группе белков острой фазы, концентрация которых повышается при воспалениях и инфекциях в организме. Декстраны — полисахариды, разветвлённые полимеры глюкозы, могут изменять агрегационные свойства крови за счет межклеточной адгезии в соответствии с мостиковой моделью взаимодействия клеток [1].

Методика

Целью настоящего исследования является изучение агрегации эритроцитов в растворах С-реактивного белка и растворах декстранов в образцах плазмы крови методом диффузного светорассеяния [2]. Это метод базируется на анализе интенсивности света, диффузно рассеянного от суспензии эритроцитов или цельной крови *in vitro*. Эритроциты в процессе измерений спонтанно агрегируют и вынужденно дезагрегируют в сдвиговом потоке, вследствие чего параметры регистрируемого рассеянного излучения изменяются. По изменениям интенсивности рассеянного света можно судить о параметрах, характеризующих способность клеток агрегировать.

Эксперименты проводились на лазерном агрегометре эритроцитов RheoScan AnD-300 (Реомедтех, Республика Корея). Данный прибор позволяет измерить следующие параметры: индекс агрегации AI (характеризует количество клеток, проагрегировавших за 10 секунд в процентном соотношении), характерное время агрегации T1/2 (время, необходимое, чтобы интенсивность рассеянного вперед света достигла половины от максимального значения), критическое напряжение сдвига (critical shear stress CSS), характеризующее гидродинамическую прочность агрегатов. Первая часть исследования проводилась с добавлением в кровь С-реактивного белка в различных концентрациях от 0 мкг/мл до 370 мкг/мл. Другая часть была проведена с добавлением в суспензию эритроцитов растворов плазмы с декстранами молекулярной массы 40, 70 и 500 кДа в концентрации 50 мг/мл. Гематокрит исследуемых проб – 40%. Раствор приготавливался с применением центрифугирования. Первоначально плазма крови выделялась методом центрифугирования в течение 10 минут при центробежном ускорении 1.6 g. Затем верхний слой плазмы отбирался при помощи микродозатора и повторно центрифугировался для осаждения тромбоцитов в течение 10 минут при центробежном ускорении 6.6 g. К полученной таким образом плазме (360 мкл) добавлялись 18 мг декстрана, после чего

добавлялась суспензия эритроцитов в объеме 240 мкл.

Результаты и обсуждения

В ходе проведенных исследований была получена зависимость индекса агрегации эритроцитов АІ от концентрации С-реактивного белка в плазме крови (рис. 1). Видно, что при увеличении концентрации С-реактивного белка индекс агрегации вначале резко уменьшается при небольших концентрациях до 50 мкг/мл, а затем увеличивается, выходя на насыщение.

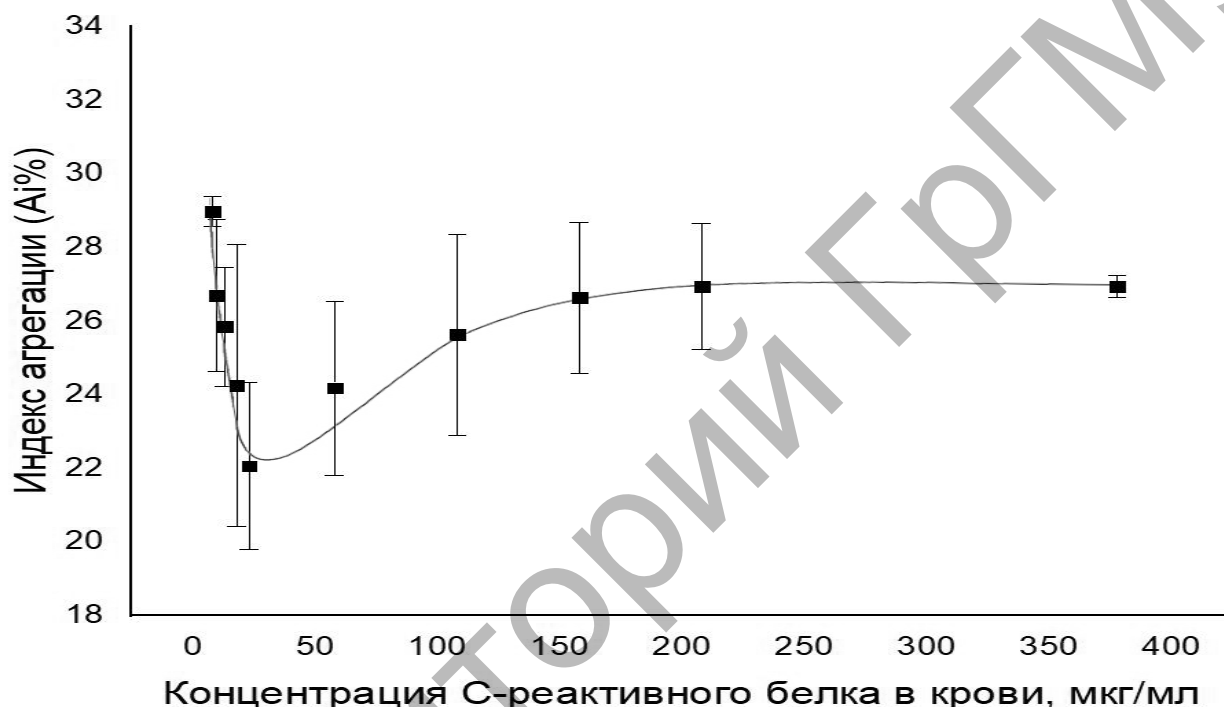


Рис. 1. Индекс агрегации эритроцитов АІ в зависимости от концентрации С-реактивного белка в плазме крови.

Также проводились эксперименты на суспензии эритроцитов в плазме с декстранами молекулярной массы 40, 70 и 500 кДа и в концентрации 50 мг/мл. Итоговый гематокрит при измерениях составлял 40 %. Было получено, что декстран с молекулярной массой 40 кДа является ингибитором, а декстраны с молекулярными массами 500 кДа и 70 кДа являются индукторами агрегации эритроцитов в соответствии с полученными результатами (см. рис. 2 и 3).

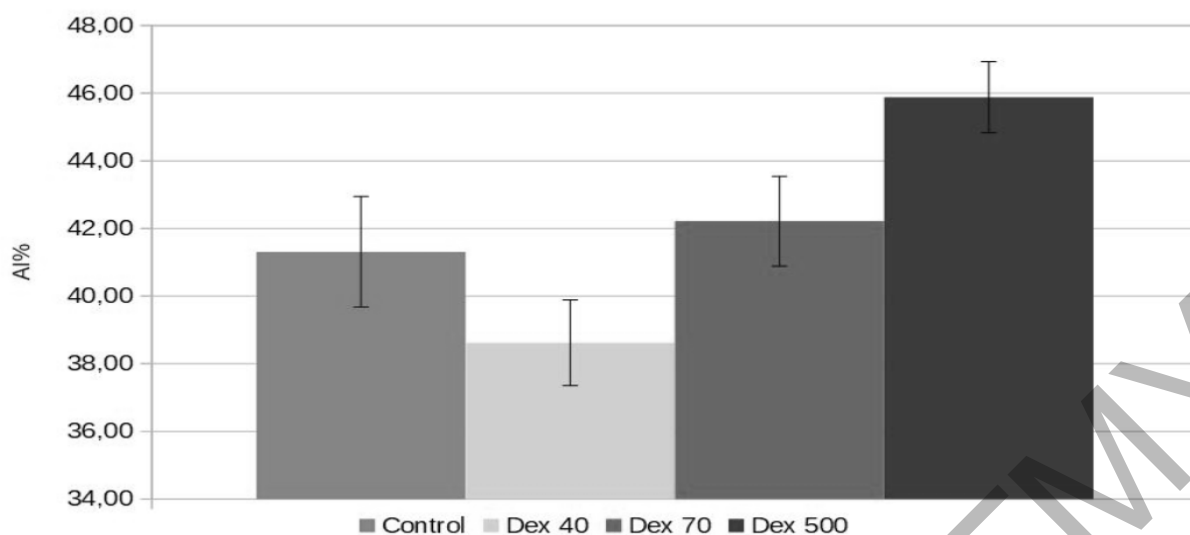


Рис. 2 Зависимость индекса агрегации крови с раствором декстрана в концентрации 50 мг/мл при гематокрите 40% от молекулярной массы декстрана

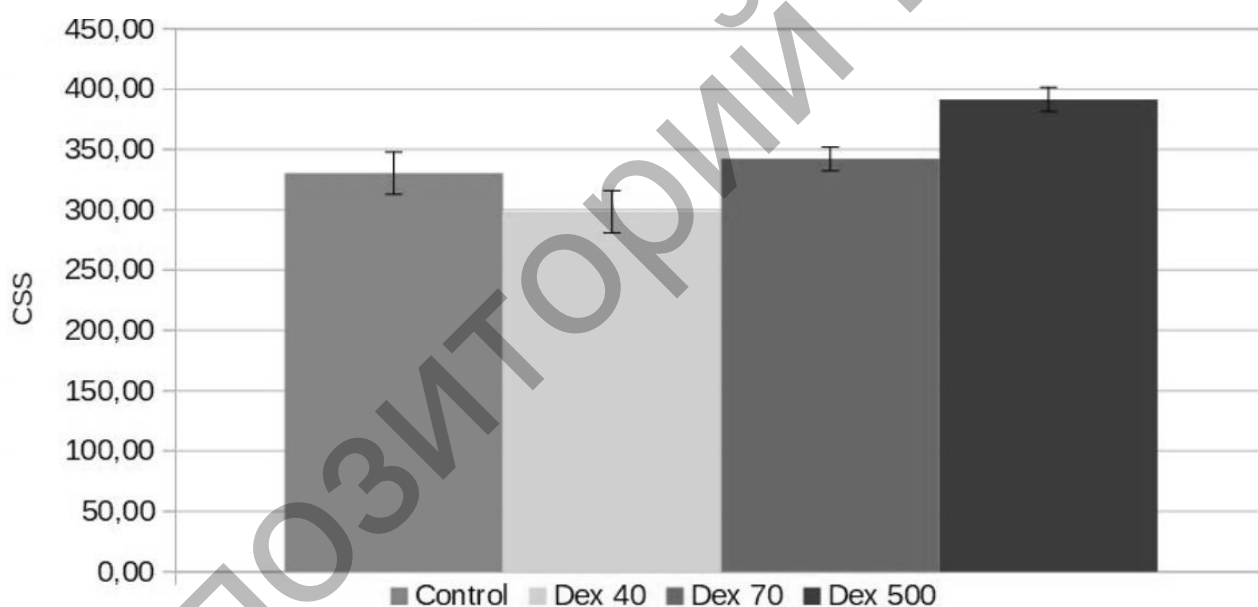


Рис. 3 Зависимость CSS крови с раствором декстрана в концентрации 50 мг/мл при гематокрите 40% от молекулярной массы декстрана.

Данные результаты совпадают с известными научными данными, например [3], где было показано, что декстраны малой молекулярной массы являются ингибиторами агрегации эритроцитов при гематокрите 40 %. Оптические методы предоставляют удобный инструментарий для изучения кинетических и динамических особенностей агрегации и деагрегации эритроцитов, что важно для контроля и коррекции параметров микроциркуляции крови при

социально значимых заболеваниях.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ №20-45-08004 в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина».

Библиографический список

1. Semenov A., Lugovtsov A., Shin S., Barshtein G., Priezzhev A. Red blood cells interaction mediated by dextran macromolecules: in vitro study using diffuse light scattering technique and optical tweezers", Proc. SPIE 11065, Saratov Fall Meeting 2018: Optical and Nano-Technologies for Biology and Medicine, 110651X (2019) <https://doi.org/10.1117/12.2523744>.
2. Lugovtsov A., Gurfinkel Yu., Ermolinskiy P., Maslyanitsina A., Dyachuk L., Priezzhev A. Optical assessment of alterations of microrheologic and microcirculation parameters in cardiovascular diseases// Biomed. Opt. Express 10, 3974-3986 (2019).
3. Baskurt O., Neu B., Meiselman H.. Red Blood Cell Aggregation. CRC Press, 2012.

УДК 616-07-08:616.16-008.1

А.В. Сергиевич, В.И. Козловский

РАССТРОЙСТВА МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ НЕКОТОРЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Аннотация. При метаболическом синдроме развиваются микроциркуляторные нарушения. У пациентов с полным и неполным метаболическим синдромом отмечается достоверное повышение агрегации лейкоцитарно-тромбоцитарной суспензии и снижение деформируемости эритроцитов, что следует учитывать в комплексной терапии.

Ключевые слова: метаболический синдром, микроциркуляция, деформируемость эритроцитов, агрегация лейкоцитарно-тромбоцитарной суспензии

MICROCIRCULATION DISORDERS IN PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME. SOME CLINICAL ASPECTS

Abstract. With metabolic syndrome, microcirculatory disorders develop. In patients with complete and incomplete metabolic syndrome, there is a significant increase in aggregation of the leukocyte-platelet suspension and a decrease in the deformability of erythrocytes, which should be taken into account in complex therapy.

Keywords: metabolic syndrome, microcirculation, erythrocyte deformability, aggregation of leukocyte-platelet suspension

Введение

Распространенность метаболического синдрома (МС) колеблется от 10% до 84%, отличается по расе и этнической принадлежности. В ближайшие 20 лет ожидается увеличение частоты метаболического синдрома на 50% [1].

Нарушение гликемии натощак и нарушение толерантности к глюкозе представляют собой ранние нарушения углеводного обмена со снижением утилизации глюкозы в тканях, не имеющие клинических проявлений [1, 2]. При метаболическом синдроме развиваются значительные нарушения микроциркуляции в виде извитости капилляров, уменьшения количества функционирующих капилляров, укорочения капиллярных петель, замедленности кровотока, увеличения зоны перикапиллярного отека, наличия сладж-феномена, увеличение количества артериоло-венулярных анастомозов, увеличение количества микротромбозов, увеличения числа липидных включений, снижении скорости капиллярного кровотока по сравнению с их здоровыми сверстниками. Снижается уровень напряжения кислорода в ткани [3, 4]. Полагают, что изменения микроциркуляции возникают задолго до появления симптомов заболевания, зачастую определяют как клинические проявления, поражение жизненно важных органов, так и исходы [5]. В связи с тем, что расстройства микроциркуляции определяют клинические нарушения и последствия, особенно при сахарном диабете, возникает закономерный вопрос, когда же надо начинать коррекцию этих нарушений и какие группы лекарственных средств рационально применить на начальных стадиях нарушений, при метаболическом синдроме.

Цель

Оценить изменения агрегации лейкоцитарно-тромбоцитарной суспензии (ЛТС) и деформируемости эритроцитов (ДЭ) у пациентов с метаболическим синдромом и обосновать возможности применения лекарственных средств для коррекции нарушений.

Методика

Обследованы 47 пациентов с метаболическим синдромом (25 мужчин, 22 женщины, средний возраст $32,2 \pm 4,4$ года) и 22 здоровых человека (мужчин 11, женщин 11, средний возраст $33,0 \pm 3,8$ лет). Обследование включало тщательный сбор анамнеза, измерение артериального давления, объем талии, индекс массы тела, оценку уровня общего холестерина, холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), триглицеридов (ТГ), глюкозы, гликированного гемоглобина (HbA1c), проведение перорального теста толерантности к глюкозе (ПТТГ), ультразвукового обследования сердца, экстра- и интрацеребральных сосудов, ЭКГ. Наличие метаболического синдрома регистрировали на основании критериев ADA/ESE, 2019 года [6]. Выделяли 1 группу с полным метаболическим синдромом (все 5 критериев) – 16 человек (мужчин 8, женщин 8); 2 группу с неполным метаболическим синдромом (нарушение углеводного обмена, повышенная окружность талии, дислипидемия) – 16 человек (мужчин 9, женщин 7); и 3 группу с неполным метаболическим синдромом (повышенная окружность талии, дислипидемия, артериальная гипертензия) – 15 человек (мужчин 8, женщин 7).

Агрегацию лейкоцитарно-тромбоцитарной суспензии под влиянием адреналина ($1 \cdot 10^{-5}$ г/л) определяли турбидиметрическим методом (по Борну) на анализаторе агрегации тромбоцитов «СОЛАР» AP2110 [7], деформируемость эритроцитов с помощью фильтрационных методов [8].

Статистическая обработка проведена с помощью пакета программ STATISTIKA 12,5. Статистически значимыми результаты признаны при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Как у здоровых, так и у пациентов с метаболическим синдромом клинических проявлений патологии сердечно-сосудистой системы не выявляли. Ожирение 2-3 степени было у всех пациентов с МС. Артериальная гипертензия 1-2 степени выявлялась у пациентов 1 и 3

группы. Нарушение углеводного обмена определялось в 1 и 2 группах (Табл. 1).

Определена агрегация лейкоцитарно-тромбоцитарной суспензии и деформируемость эритроцитов во всех обследуемых группах и подгруппах.

Таблица 1

Глюкоза и гликированный гемоглобин у здоровых и пациентов с МС

Группы обследованных	К-во	Глюкоза, ммоль/л	HbA1c, %
Здоровые	22	4,3±0,7	5,0±0,6
МС группа 1	16	6,6±0,4*	6,2±0,3*
МС группа 2	16	6,5±0,4*	6,1±0,2*
МС группа 3	15	5,1±0,9	5,2±0,5

Примечание: * – достоверное отличие от данных в группе здоровых ($p < 0,05$).

Проведена оценка достоверности различий степени агрегации лейкоцитарно-тромбоцитарной суспензии и деформируемости эритроцитов между группами метаболического синдрома с подгруппами и группой здоровых пациентов (табл. 2).

Таблица 2

Агрегация ЛТС и ДЭ у здоровых и пациентов с МС

Группы обследованных	К-во	Агрегация ЛТС, % в мин.	ДЭ, сек.
Здоровые	22	6,9±3,7	32,8±4,7
МС группа 1	16	14,9±6,8*	41,5±4,7*
МС группа 2	16	13,7±7,2*	40,7±4,2*
МС группа 3	15	14,8±5,8*	46,8±4,9*

Примечание: * – достоверное отличие от данных в группе здоровых ($p < 0,05$).

Определено количество людей с нарушением деформируемости эритроцитов в обследованных группах и подгруппах (Таблица 3).

Таблица 3

Нарушение деформируемости эритроцитов у здоровых и пациентов с МС

Группы обследованных	Снижение ДЭ	Нормальная ДЭ
Здоровые	11	11
МС группа 1	15*	1*
МС группа 2	14*	2*
МС группа 3	13*	2*

Примечание: * – достоверное отличие частоты по сравнению с данными у здоровых ($p < 0,05$).

Полученные данные указывают на то, что у пациентов как с полным, так и неполным с метаболическим синдромом отмечается достоверное повышение агрегации ЛТС и снижение ДЭ, что указывает на значительные расстройства микроциркуляции, несмотря на отсутствие клинических проявлений патологии сердечно-сосудистой системы за исключением артериальной гипертензии.

Результаты исследования позволяют обосновать необходимость начала коррекции не только проявлений метаболического синдрома, но и коррекции повышенной агрегации ЛТС и сниженной ДЭ. По-видимому, наиболее рационально применение аспирина, снижающего агрегацию тромбоцитов, и блокаторов фосфодиэстеразы-1, улучшающих эластичность мембран.

Заключение

У пациентов, как с полным, так и с неполным метаболическим синдромом отмечается достоверное повышение агрегации лейкоцитарно-тромбоцитарной суспензии и снижение деформируемости эритроцитов, что следует учитывать в комплексном лечении.

Библиографический список

1. Aquilante C. L., Griend J. P. V. Aquilante C. L. Metabolic Syndrome. Pharmacotherapy: Self-Assessment Program, 6th Edition. – 109-128 p.

2. Рекомендации по ведению больных с метаболическим синдромом : Клинические рекомендации. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Москва. – 2013. – 43 с.

3. Метаболический синдром: учебно-методическое пособие по специальности «Лечебное дело» (31.05.01) / составители: А. А. Низов,

Н. С. Асфандиярова, Т. Е. Филатова. ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России. Рязань: РИО РязГМУ. – 2016. – 81 с.

4. Новые направления ангиопротекции при диабетических микроангиопатиях / В.В. Трусков [и др.]: Успехи современного естествознания. – 2010. – № 4. – С. 88-91.

5. Бубликов Д.С. Гемореологические и микроциркуляторные нарушения при ревматоидном артрите и их коррекция пентоксифиллином в режиме индивидуализированного дозирования: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Барнаул. – 2016. – 121 с.

6. Primary Prevention of ASCVD and T2DM in Patients at Metabolic Risk : An Endocrine Society Clinical Practice Guideline / J.L. Rosenzweig [et al.]: The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2019. – Vol. 104, № 9. – P. 3939–3985.

7. Born G.V.R. Aggregation of blood platelet by adenosine diphosphate and its reversal: Nature. – 1962. – Vol. 194. – P. 927-929.

8. Козловский В.И., Атрощенко Е.С., Петухов И.В. Фильтрационные методы исследования деформируемости эритроцитов. Методические рекомендации. – Витебск, 1997. – 18 с.

УДК 612.014.3

*И.А. Тихомирова, А.В. Муравьев, Е.П. Петроченко,
Ю.В. Малышева, А.С. Петроченко*

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ РАЗНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ СЕРОВОДОРОДА НА АГРЕГАТНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК КРОВИ

Аннотация. В статье анализируется эффект разных концентраций донора сероводорода NaHS на агрегатные свойства клеток крови практически здоровых лиц. Изучение влияния содержания донора сероводорода в плазме крови на агрегатные свойства тромбоцитов и эритроцитов позволило определить рабочую концентрацию этого газомедиатора (10 мкМ), при которой реализуется регуляторный (снижение агрегации), а не токсический эффект.

© И.А. Тихомирова, А.В. Муравьев, Е.П. Петроченко,
Ю.В. Малышева, А.С. Петроченко, 2022

Ключевые слова: газомедиаторы, агрегация, тромбоциты, эритроциты, доза-эффект.

I.A. Tikhomirova, A.V. Muravyov. E.P. Petrochenko, Yu.V. Malysheva, A.S. Petrochenko

EVALUATION OF THE INFLUENCE OF DIFFERENT HYDROGEN SULFIDE CONCENTRATIONS ON THE AGGREGATION PROPERTIES OF BLOOD CELLS

Abstract. The article analyzes the effect of different concentrations of the hydrogen sulfide donor NaHS on the aggregate properties of blood cells in practically healthy individuals. The study of the influence of the hydrogen sulfide donor content in the blood plasma on the aggregate properties of platelets and erythrocytes made it possible to determine the working concentration of this gasotransmitter (10 μ M), at which the regulatory (decrease of aggregation) rather than toxic effect is realized.

Key words: gasotransmitters, aggregation, platelets, erythrocytes, dose-effect.

Введение

Эффект сероводорода на агрегатные свойства клеток крови изучен недостаточно. Публикации о влиянии этого газомедиатора на свойства эритроцитов единичны, что касается эффекта сероводорода на систему гемостаза, то опубликованные данные достаточно противоречивы, в отдельных источниках сообщается об ингибировании агрегации тромбоцитов [1], правда при этом использовались концентрации сероводорода, на несколько порядков превышающие его физиологический уровень. Другие источники сообщают об отсутствии эффекта сероводорода на процесс свертывания крови [2].

Методика

В исследовании по оценке влияния сероводорода на агрегатные свойства клеток крови (тромбоцитов и эритроцитов) было использовано 22 образца венозной крови (практически здоровых доноров-добровольцев), стабилизированной 3,8% цитратом натрия. Для приготовления обогащенной тромбоцитами плазмы цельную кровь центрифугировали при 200g в течении 7 минут, отбирали супернатант и использовали для оценки агрегатных свойств тромбоцитов. Оставшуюся кровь центрифугировали при 2000g в

течение 15 минут, отделяли эритроциты, трижды отмывали их в изотоничном буферном растворе (рН 7,4) и использовали для оценки их агрегируемости. Донор сероводорода NaHS использовали в конечных концентрациях в среде от 10^{-5} М до 10^{-2} М (10 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ и 10 мМ).

Параметры тромбоцитарного гемостаза оценивали с помощью лазерного анализатора агрегации тромбоцитов АЛАТ-2 «Биола» (Москва, ООО НПФ «Биола»). Данный анализатор представляет собой микропроцессорный прибор с программным обеспечением, позволяющий оценивать параметры агрегации тромбоцитов, фактор формы тромбоцитов, определять концентрацию тромбоцитов. Агрегация регистрируется как традиционным методом, предложенным Борном и О'Брайеном, так и флуктуационным методом, основанным на оценке среднего размера агрегатов в реальном времени, предложенным Габбасовым З.А. и соавт. [3]. С помощью анализатора АЛАТ-2 «Биола» в обогащенной тромбоцитами плазме крови измеряли параметры АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов по Борну и по кривой среднего размера агрегатов в отсутствие (контроль) и в присутствии NaHS (в 4 разных концентрациях). По Борну степень агрегации (Max Борн) определяется как максимальное приращение после добавления индуктора, и измеряется в процентах. Скорость агрегации ($V_{\text{Борн}}$) определяется как максимальный наклон кривой, и измеряется в процентах в минуту. По кривой среднего размера агрегатов степень агрегации (MaxR) определяется как максимальное значение среднего размера агрегатов после добавления индуктора, и измеряется в относительных единицах. Скорость агрегации (VR) определяется как максимальный наклон кривой среднего размера, и измеряется в относительных единицах в минуту. Показатель агрегации (IR) и ($I_{\text{Борн}}$) – значение среднего размера агрегатов или среднего приращения в заранее заданное время (2 мин) после добавления индуктора, измеряется в относительных единицах и процентах соответственно.

Для оценки процесса агрегации эритроцитов, трижды отмывые клетки ресуспендировали в обедненной тромбоцитами аутологичной плазме при стандартном показателе гематокрита $Hct=0,5\%$. Приготовленную суспензию эритроцитов помещали в камеру Горяева и определяли степень агрегации клеток с помощью метода оптической микроскопии с последующей видеорегистрацией и

компьютерным анализом изображения. Установка для агрегатометрии эритроцитов состояла из светового микроскопа (Micros, Австрия) с цифровым видеоокуляром (модель DCM-500) и компьютера, на экран которого выводилось получаемое изображение. С помощью этого метода и специальной программы для обсчета рассчитывались степень агрегации СА (отношение числа агрегатов к количеству одиночных клеток) и среднее число эритроцитов, приходящееся на один агрегат – размер агрегата РА.

Результаты и обсуждение

Оценка эффекта донора сероводорода в диапазоне концентраций от 10 мкМ до 10мМ на агрегатные свойства тромбоцитов. Из всех исследуемых концентраций NaHS устойчивое снижение агрегации тромбоцитов, измеренной и флуктуационным методом, и по Борну, отмечено для самой низкой концентрации – 10 мкМ, уменьшение в сравнении с контролем составило до 26,5% ($p < 0,05$). Скорость агрегации в присутствии 10 мкМ NaHS достоверно не изменилась в отличие от более высоких концентраций, которые привели к существенной интенсификации процесса агрегации (Рис. 1).

В целом в диапазоне концентраций NaHS от 10 мкМ до 10 мМ отмечено «куполообразное» изменение степени агрегации тромбоцитов – самые низкие показатели зафиксированы при 10 мкМ и 10 мМ NaHS, промежуточные концентрации (100 мкМ и 1 мМ) вызвали не только рост агрегируемости тромбоцитов, но и значительно ускорили этот процесс, обеспечив почти 3-кратное увеличение скорости процесса. По всей видимости, в данном диапазоне концентраций проявился так называемый «бифазный эффект» сероводорода, когда при разных его концентрациях его биологические эффекты могут быть прямо противоположными[4, 5], и если при низких концентрациях этого газомедиатора реализуется его регуляторное влияние, то при более высоких скорее всего преобладает токсический эффект.

Оценка эффекта донора сероводорода в диапазоне концентраций от 10 мкМ до 10мМ на агрегатные свойства эритроцитов. Дозозависимый эффект NaHS на процесс объединения эритроцитов в агрегаты зафиксирован в исследуемом диапазоне концентраций (от 10 мкМ до 10 мМ): в присутствии NaHS в низких концентрациях (10 мкМ и 100 мкМ) отмечено статистически значимое снижение степени агрегации эритроцитов (на 64,4% и

34,9%, $p < 0,05$, соответственно) и среднего размера агрегата на (на 20% и 22,3%, $p < 0,05$, соответственно) (Рис. 2). Донор сероводорода в концентрации 1 мМ не вызвал статистически значимых изменений показателей агрегации эритроцитов, а в самой высокой концентрации (10 мМ) привел к росту степени агрегации на 78%, $p < 0,05$, средний размер агрегатов увеличился на 50,9%, $p < 0,05$ (Рис. 2).

Проблема точного количественного определения содержания сероводорода в плазме крови на сегодняшний день окончательно не решена, в зависимости от метода определения и подхода разные исследовательские коллективы получили достаточно отличающиеся значения (Szabo C, Papapetropoulos A., 2016; Wang R., 2010), что не позволяет обозначить границы физиологической нормы этого показателя. Однако в последних публикациях (Wang G et al., 2021) на основании множества экспериментальных данных авторы пришли к выводу, что в условиях нормы содержание сероводорода в плазме крови колеблется в диапазоне от наномолярных значений до десятков мкМ.

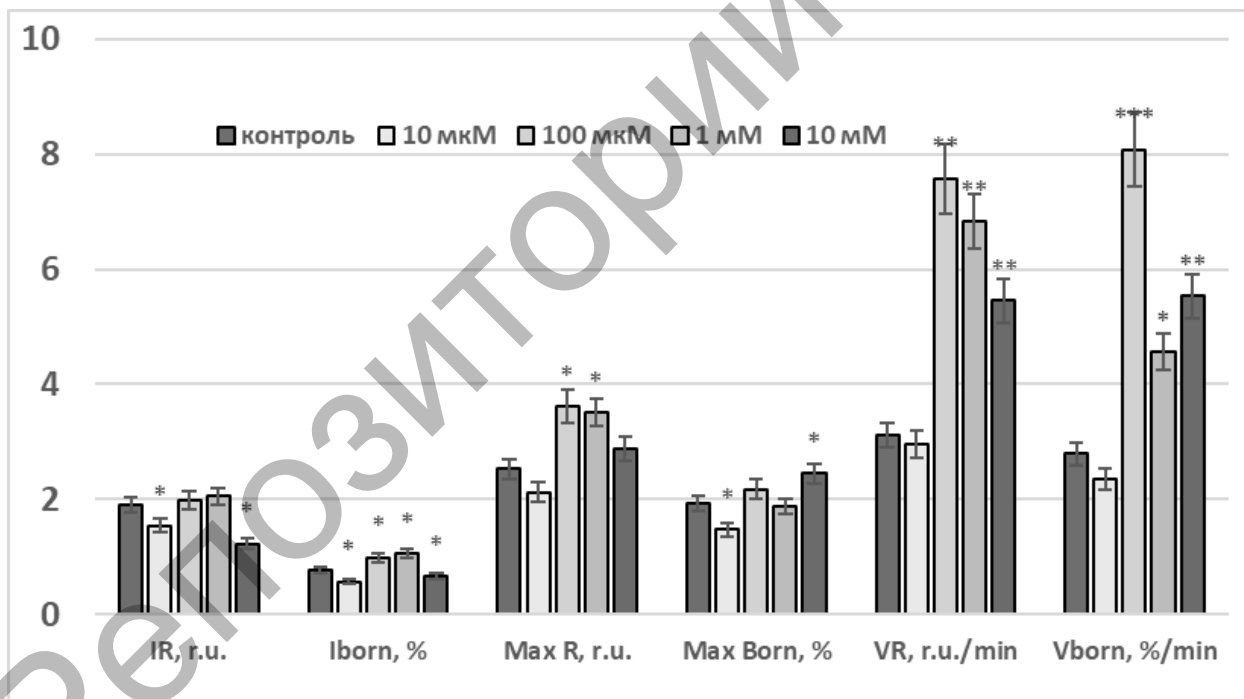


Рис. 1. Изменение АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в присутствии NaHS в диапазоне концентраций от 10 мкМ до 10 мМ.

Обозначения: IR – показатель агрегации, измеренный флукуационным методом (2 минуты); IBorn – показатель агрегации, измеренный по Борну (2 минуты); MaxR – максимальная степень агрегации, измеренная флукуационным методом; MaxBorn – максимальная степень агрегации по Борну; VR – скорость агрегации,

измеренная флукутационным методом; VBorn – скорость агрегации по Борну; * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,001$ в сравнении с АДФ-индуцированной агрегацией.

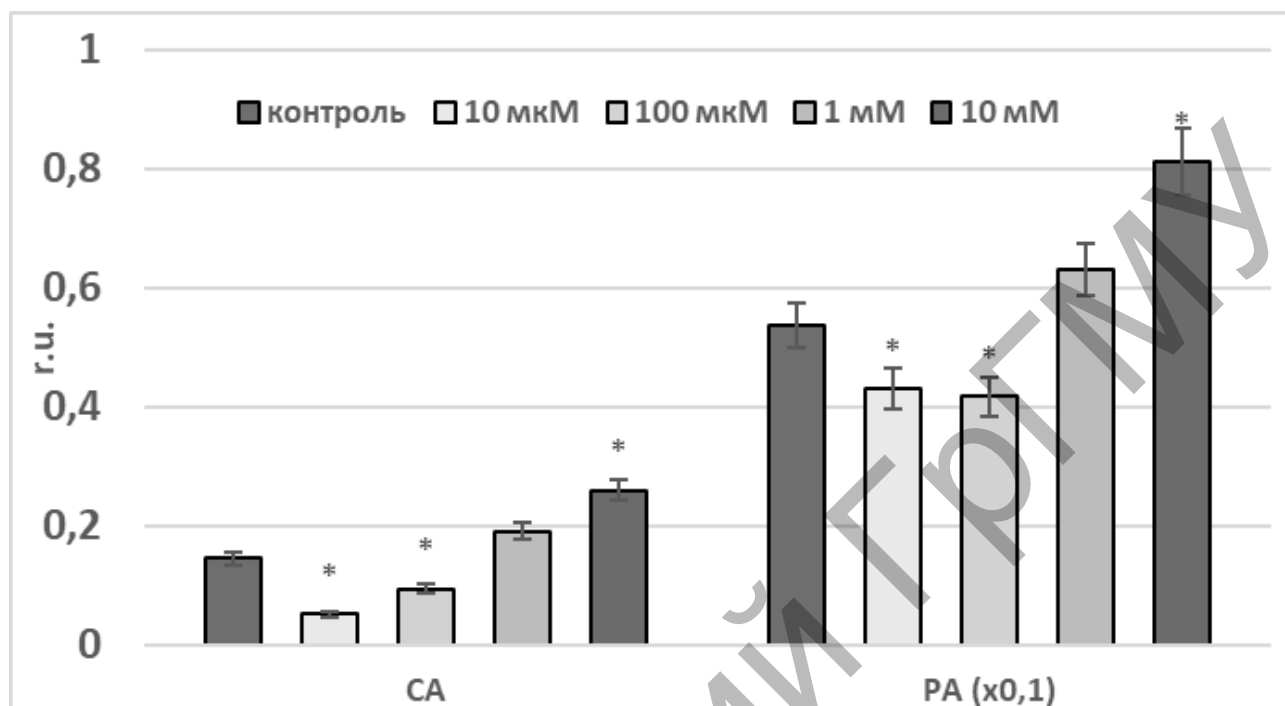


Рис. 2. Степень агрегации эритроцитов в присутствии NaHS в разных диапазонах концентраций (от 10 мкМ до 10мМ).

Обозначения: СА – степень агрегации эритроцитов; РА – средний размер агрегата; * - $p<0,05$ по отношению к контролю.

Исходя из этого, зарегистрированный нами эффект снижения агрегации клеток крови (тромбоцитов и эритроцитов) при концентрации донора сероводорода NaHS 10 мкМ можно считать проявлением его регуляторной физиологической роли. Супрафизиологические концентрации этого газомедиатора, по всей видимости, проявляют уже не регуляторное, а токсическое действие, что выражается в росте агрегируемости и тромбоцитов, и эритроцитов.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00143.

Библиографический список

1. Morel A, Malinowska J, Olas B. Hydrogen sulfide changes adhesive properties of fibrinogen and collagen in vitro. Platelets 2014, 5(2):147-9.

2.Olas B, Brodek P, Kontek B. The Effect of Hydrogen Sulfide on Different Parameters of Human Plasma in the Presence or Absence of Exogenous Reactive Oxygen Species. *Antioxidants* (Basel). 2019.- 3;8(12):610. doi: 10.3390/antiox8120610.

3.Габбасов З.А., Попов Е.Г., Гаврилов И.Ю., Позин Е.Я., Маркосян Р.А. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов. *Лабораторное дело*, 1989, N10, с.15-18.

4.Yagdi E, Cerella C, Dicato M, Diederich M. Garlic-derived natural polysulfanes as hydrogen sulfide donors: Friend or foe? *Food Chem Toxicol* 2016, 95:219-33.

5.Szabo C, Papapetropoulos A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H₂S Levels: H₂S Donors and H₂S Biosynthesis Inhibitors. *Pharmacol Rev* 2017, 69:497–564.

УДК 612.014.3

И.А. Тихомирова, Е.П. Петроченко, Ю.В. Малышева, Н.В. Кислов, В.А. Лемехова, А.В. Муравьев

**ВЛИЯНИЕ ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА И СЕРОВОДОРОДА
НА МИКРОРЕОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ЭРИТРОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ
НОВООБРАЗОВАНИЯМИ**

Аннотация. При злокачественных новообразованиях (ЗНО) происходит нарушения кровообращения и реологических свойств крови. При этом газотрансммиттеры (ГТ) положительно влияют на сосудистый тонус и микрореологию клеток крови. Целью данного исследования была оценка микрореологических ответов эритроцитов на доноры ГТ: нитропруссид натрия (НПН) и гидросульфид натрия (NaHS). Эритроциты и их восстановленные тени инкубировали в течение 30 мин., при 37° С с НПН (100 мкМ), с NaHS (100 мкМ) отдельно, и при их совместном применении. После инкубации регистрировали деформируемость эритроцитов путем измерения индекса удлинения (ИУЭ) и их агрегацию, а также вязкость суспензий клеток (Hct=40%) при высоких (BK1) и низких скоростях сдвига (BK2). Были получены данные, свидетельствующие о

© И.А. Тихомирова, Е.П. Петроченко, Ю.В. Малышева, Н.В. Кислов, В.А. Лемехова, А.В. Муравьев, 2022

положительном влиянии обоих доноров ГТ на микрореологию эритроцитов больных ЗНО. Также было показано, что совместное применение двух доноров ГТ одновременно давало, хотя умеренный, но достоверно больший эффект, чем отдельное воздействие каждого из этих двух ГТ соединений.

Ключевые слова: злокачественные новообразования, эритроциты, микрореология, газотрансммиттеры

I.A. Tikhomirova, E.P. Petrochenko, Yu.V. Malysheva, N.V. Kislov, V.A. Lemekhova, A.V. Muravyov

EFFECT OF DONORS OF NITROGEN OXIDE AND HYDROGEN SULFIDE ON ERYTHROCYTE MICRORHEOLOGICAL CHARACTERISTICS IN PATIENTS WITH MALIGNANT TUMOUR

Abstract. In malignant tumours, there is a violation of blood circulation and rheological properties of blood. At the same time, gas transmitters (GT) have a positive effect on vascular tone and microrheology of blood cells. The purpose of this study was to evaluate the microrheological responses of erythrocytes to GT donors: sodium nitroprusside (SNP) and sodium hydrosulfide (NaHS). Erythrocytes and their reconstituted shadows were incubated for 30 min at 37°C with SNP (100 μ M), with NaHS (100 μ M) separately, and when they were used together. After incubation, the erythrocyte deformability was recorded by measuring the elongation index (EI) and their aggregation, as well as the viscosity of cell suspensions (Hct=40%) at high (SV1) and low shear rates (SV2). Data were obtained indicating a positive effect of both GT donors on the erythrocyte microrheology in malignant neoplasm patients. It was also shown that the combined use of two GT donors simultaneously gave, although moderate, but significantly greater effect than the separate effect of each of these two GT compounds.

Keywords: malignant tumours, erythrocytes, microrheology, gasotransmitters

Введение

Газовые медиаторы или газотрансммиттеры (ГТ) играют важную роль в регуляции функций организма как в норме, так и патологии [1-3]. В том числе влияют на функции клеток крови [4]. Известно, что эритроциты при выполнении кислородтранспортной функции

должны реализовать свои микрореологические свойства – деформируемость и агрегацию [5]. Было показано, что эти клеточные характеристики положительно изменяются под влиянием донора NO, нитропруссид натрия, или при активации эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) с помощью *L*-аргинина [6-8]. Что касается других газотрансммиттеров, то имеются только данные о положительном влиянии сероводорода на агрегацию тромбоцитов [9, 10]. Тем не менее это может благоприятно сказаться на состоянии гемостаза у больных злокачественными новообразованиями (ЗНО), поскольку нарушение реологических свойств крови при ЗНО сочетается с повышением риска тромбозов [11].

С учетом вышесказанного целью настоящего исследования было изучение микрореологических ответов эритроцитов больных ЗНО на отдельное и сочетанное применение доноров оксида азота и сероводорода.

Материал и методы исследования

Пробы крови (9 мл) получали венопункцией у больных злокачественными новообразованиями (колоректальный рак, $n=16$) в вакуумные пробирки (вакутайнеры с EDTA). Эритроциты отделяли от плазмы центрифугированием (15 мин, 3000 об/мин), трижды отмывали в изотоническом растворе NaCl. Суспензию эритроцитов (в растворе Рингера с добавлением декстрана-150 в соотношении 7:3) делили на несколько аликвот и клетки инкубировали при 37°C в течение 30 мин с каждым из перечисленных ниже соединений:

- 1) с донором NO – нитропропруссидом натрия (НПН, в концентрациях 100 мкМ);
- 2) с донором H_2S – гидросульфидом натрия (NaHS, в концентрациях 100 мкМ);
- 3) с одновременным добавлением в среду инкубации НПН (100 мкМ) и NaHS (100 мкМ);
- 4) В каждом опыте в качестве контроля использовали суспензию эритроцитов, инкубируемых в растворе Рингера, без добавления указанных выше препаратов.

В опытах с исследованием агрегации эритроцитов (ПАЭ), (агрегометр Myrenne M1), для ее стимулирования, добавляли к изотоническому раствору Рингера декстран-150 (10% ХАЕС-стерил, Fresenius Kabi, Германия) в соотношении объемов 7:3. Для оценки деформируемости эритроцитов (ДЭ) определяли индекс их удлинения (ИУЭ) в проточной микрокамере. Регистрировали индекс АЭ и ДЭ

после инкубации с препаратами и сравнивали с их с данными контрольных опытов (инкубация эритроцитов без препаратов). Готовили суспензии эритроцитов с гематокритом 40% и измеряли ее вязкость при высоких (ВК1, $\gamma > 100 \text{ с}^{-1}$) и низких (ВК2, $\gamma < 20 \text{ с}^{-1}$) скоростях сдвига.

Для более точного выявления изменений микромеханики клеточных мембран эритроцитов под действием доноров ГТ, их добавляли к суспензии восстановленных теней эритроцитов. Эритроциты разрушали осмотическим шоком. Для этого к 1 мл клеток добавляли 7 мл охлажденной H_2O (при температуре 4°C) с последующей двукратной отмывкой в фосфатном буфере. Затем концентрат теней инкубировали в растворе Рингера с добавлением 30% декстран-150 (соотношение как 7:3, по объему). Суспензию восстановленных теней делили на несколько аликвот, добавляли указанные выше препараты, и после инкубирования с ними (30 мин при 37°C), регистрировали деформируемость в проточной микрокамере.

Статистическая обработка

Весь цифровой материал обработан статистически с определением выборочной средней величины (M) и стандартного отклонения (σ). Полученные данные проверяли на соответствие признака закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. С учетом этого была использована непараметрические методы с применением программы “Statistica 10.0”. Достоверность полученных данных, с учетом размеров малой выборки, множественных сравнений, оценивалась с использованием U-критерия Манна-Уитни. При проведении парных сравнений уровней показателей внутри групп при повторных измерениях, использовали критерий Вилкоксона. За уровень статистически значимых принимали изменения при $p < 0,05$ и $0,01$.

Результаты и обсуждение

Как видно из данных, приведенных в таблице 1, ВК1 несколько немного снизилась, на 4% под влиянием инкубации суспензии клеток с НПН. При низких скоростях сдвига уменьшение ВК2 было более заметным (- 16%), однако в обоих случаях – не достоверным (табл. 1). Тогда как ИУЭ увеличился на 6%, а ПАЭ был на 28% меньше, чем в контрольной суспензии и различия были достоверными ($p < 0,01$).

В ответ на донор сероводорода снижение ВК1 и ВК2 были достоверными и составили 6 и 22%, соответственно. При этом и позитивные изменения ИУЭ и ПАЭ были более выраженными (табл. 1).

Таблица 1

Изменение микрореологических характеристик эритроцитов под влиянием НПН и NaHS отдельно и при их совместном действии у больных злокачественными новообразованиями ($M \pm \sigma$, $n=16$)

Показатели	Контроль	НПН	NaHS	НПН+NaHS
BC1, мПа.с	3,93±0,95	3,76±0,69	3,69±1,05**	3,29±0,24**
BC2, мПа.с	15,85±4,28	13,24±3,72	12,29±5,34**	10,73±0,39**
ИУЭ, отн. ед.	2,02±0,05	2,14±0,02**	2,17±0,03**	2,22±0,05**
ПАЭ, отн. ед.	17,00±4,60	12,20±6,45**	10,72±6,09**	10,24±7,00**

Примечание: * – различия по сравнению с показателями контроля достоверны при $p < 0,05$; **при $p < 0,01$; ВК1 – вязкость крови при высоких скоростях сдвига; ВК2 – вязкость крови при низких скоростях сдвига; ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов.

Что касается комбинированного воздействия двух доноров ГТ, то все четыре микрореологические характеристики изменялись, в этих условиях, более существенно. Так ВК1 и ВК2 снижались на 16 и 32% ($p < 0,01$), соответственно. Прирост ИУЭ составил 10%, а ПАЭ снизился на 40% (табл. 1). Важно указать на то, что применение комплекса двух доноров привело к достоверно большему приросту ИУЭ, чем отдельно НПН. Разница составила 5% ($p = 0,007$). То же самое было получено при сравнении увеличения ИУЭ только на NaHS и на комбинацию «НПН+ NaHS», разница приростов была тоже достоверно большей при применении двух ГТ одновременно ($p = 0,026$).

При инкубировании теней эритроцитов с донором NO наблюдали прирост деформируемости на 8% ($p < 0,01$), тогда как донор сероводорода увеличил ИУтЭ на 11,7%. При их совместном действии на тени эритроцитов произошло увеличение деформируемости на 13% (рис. 1, $p < 0,01$). Если сравнить величины прироста деформируемости теней эритроцитов под влиянием НПН и при комбинации «НПН+ NaHS», то оказывается, что совместное применение двух доноров ГТ достоверно ($p = 0,008$) больше

увеличивает ИУтЭ. Совместный эффект двух доноров был также несколько более эффективен, чем влияние одного NaHS (рис. 2; $p=0,008$).

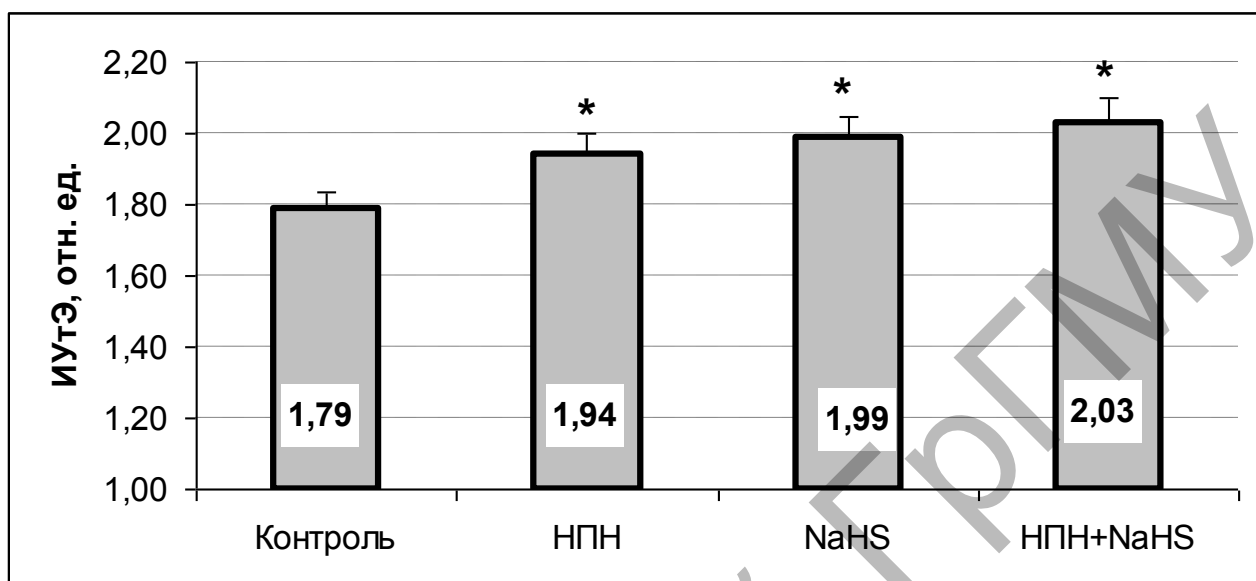


Рис. 1. Изменение деформируемости теней эритроцитов (ИУтЭ) под влиянием доноров газотрансмиттеров отдельно (НПН и NaHS) и при их совместном применении (НПН+NaHS)

Примечание: * – различия по сравнению с показателями контроля достоверны при $p<0,01$.

Расчет показал, что прирост ИУтЭ под влиянием НПН был равен $0,16 \pm 0,04$ отн. ед.; после инкубации с NaHS – $0,20 \pm 0,06$, а после пары «НПН+ NaHS» – $0,24 \pm 0,04$ отн. ед. Разница хотя и была меньшей, чем в первом случае, однако тоже достоверной (рис. 2, $p=0,007$).

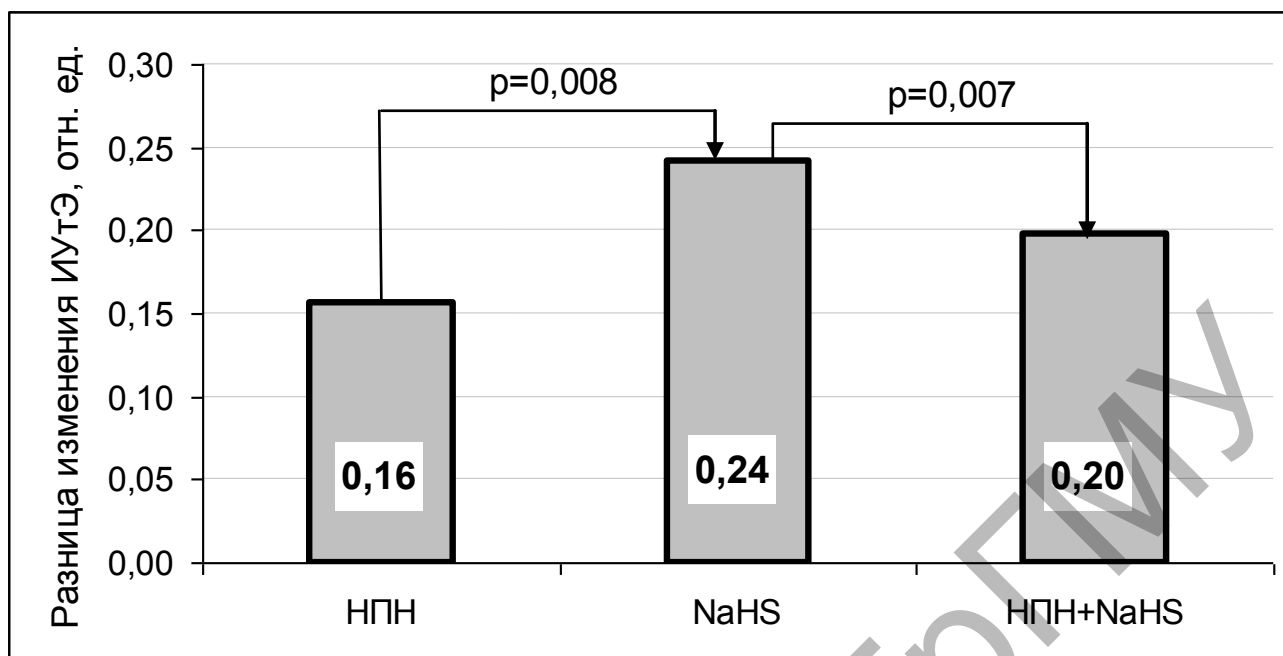


Рис. 2. Разница в приросте индекса удлинения теней эритроцитов (ИУТЭ) под влиянием отдельных доноров ГТ и при их совместном действии.

Заключение

Полученные результаты исследования свидетельствуют о положительном влиянии микрореологические характеристики эритроцитов больных ЗНО отдельно взятых доноров газотрансммиттеров, особенно гидросульфида натрия, а также показывают, что комбинация двух доноров проявляет больший положительный эффект и существенно улучшает транспортный потенциал эритроцитов больных лиц.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00143.

Библиографический список

1. Olas B. Gasomediators (NO, CO, and H₂S) and their role in hemostasis and thrombosis // Clin. Chim. Acta. 2015. 445, 115-121.
2. Balligand J.L., Cannon P.J. Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences // Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997.17, 1846-1858.
3. Wallace J.L., Ianaro A., Flannigan K.L., Cirino G. Gaseous mediators in resolution of inflammation // Semin Immunol. 2015. 27, 227-233.
4. Chen K. and Popel A.S. Nitric oxide production pathways in erythrocytes and plasma // Biorheology. 2009. 46, 107-119.

5. Muravyov A.V., Tikhomirova I.A. Role molecular signaling pathways in changes of red blood cell deformability // Clin Hemorheol Microcirc. 2013. 53, 45-59.
6. Bor-Kucukatay M., Wenby R.B., Meiselman H.J., Baskurt O.K. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2003. 284, 1577-1584.
7. Uyuklu M., Meiselman H.J., Baskurt O.K. Role of hemoglobin oxygenation in the modulation of red blood cell mechanical properties by nitric oxide // Nitric Oxide. 2009. 21, 20-26.
8. Mozar A., Connes P., Collins B., Hardy-Dessources M.D., Romana M., Lemonne N., Bloch W., Grau M. Red blood cell nitric oxide synthase modulates red blood cell deformability in sickle cell anemia // Clin Hemorheol Microcirc. 2016. 64, 47-53.
9. Gao L., Cheng C., Sparatore A., Zhang H., Wang C. Hydrogen sulfide inhibits human platelet aggregation in vitro in part by interfering gap junction channels: effects of ACS14, a hydrogen sulfide-releasing aspirin // Heart Lung Circ. 2015. 24, 77-85.
10. Truss NJ, Warner TD. Gasotransmitters and platelets // Pharmacol Ther. 2011. 132, 196-203.
11. Von Tempelhoff G.F., Niemann F., Heilmann L., Hommel G. Association between blood rheology, thrombosis and cancer survival in patients with gynecologic malignancy // Clin Hemorheol Microcirc. 2000. 22. 107-130.

УДК. 612.1; 591.11

Фадюкова О.Е., Кошелев В.Б.

КАЛИЕВЫЕ И ХЛОРНЫЕ КАНАЛЫ ОПОСРЕДУЮТ ЭФФЕКТЫ СЕРОВОДОРОДА НА ДЕФОРМИРУЕМОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫСЫ

Аннотация. *Цель исследования:* проанализировать участие калиевых и хлорных каналов в изменениях деформируемости эритроцитов (ДЭ) крысы в ответ на низкую и высокую концентрации донора газотрансмиттера сероводорода NaHS в опытах *in vitro*.

Материалы и методы исследования. Пробы крови крыс, полученные под наркозом (хлоралгидрат 450 мг/кг) из нижней полой вены (антикоагулянт ЭДТА, 2 мг/мл), инкубировали с исследуемыми

веществами в течение 15 мин при 37°C. ДЭ оценивали с помощью лазерного агрегометра-деформометра эритроцитов «РеоАДВ-КФ». Определяли индекс деформируемости эритроцитов (ID) при разных скоростях сдвига. Оценивали параметры деформируемости эритроцитов: предел текучести мембраны $\ln\gamma_0$, параметр $\text{tg}(\alpha)$, характеризующий вязкость внутриклеточного содержимого эритроцита, и IDmax при скорости сдвига 3065 с⁻¹.

Результаты. NaHS ($6 \cdot 10^{-5}$ М) вызывал снижение $\ln\gamma_0$ на 6% и $\text{tg}(\alpha)$ на 5% ($p < 0,05$). Неселективный блокатор кальций-зависимых калиевых каналов тетраэтиламмоний (ТЭА, 10^{-3} М) практически полностью подавлял изменения параметров ДЭ в ответ на NaHS ($6 \cdot 10^{-5}$ М). NaHS (10^{-3} М) увеличивал предел текучести $\ln\dot{\gamma}_0$ на 12%, однако ТЭА не влиял на этот эффект. В присутствии неселективного блокатора хлорных CFTR-каналов глибенкламида ($5 \cdot 10^{-5}$ М) эффекты низкой и высокой концентраций NaHS на предел текучести мембраны $\ln\dot{\gamma}_0$ полностью или частично снижались ($p < 0,05$).

Заключение. Таким образом, H₂S имеет разные пути действия на ДЭ, включающие CFTR-каналы и Ca²⁺-зависимые калиевые каналы.

Ключевые слова: деформируемость эритроцитов; сероводород

O.E. Fadyukova, V.B. Koshelev

POTASSIUM AND CHLORIDE CHANNELS MEDIATE THE EFFECTS OF HYDROGEN SULFIDE ON THE DEFORMABILITY OF RAT ERYTHROCYTES

The effects of NaHS, the donor of the gaseous biomodulator H₂S, on the rat erythrocyte deformability parameters were studied using laser aggregometer-deformometer "Reo ADV-KF" in experiments *in vitro*. The blood was incubated with studied substances for 15 min (37°C). The erythrocyte deformability index (ID) was determined at different shear rates. Erythrocyte deformability parameters were evaluated: the membrane yield strength $\ln\gamma_0$; $\text{tg}(\alpha)$, characterizing the viscosity of the intracellular content of the erythrocyte; and IDmax at a shear rate of 3065 sec⁻¹. NaHS ($6 \cdot 10^{-5}$ M) produced the decrease of $\ln\gamma_0$ by 6% and $\text{tg}(\alpha)$ by 5% vs control sample ($p < 0.05$). The non-selective calcium-dependent potassium channel blocker tetraethylammonium (TEA, 10^{-3} M) significantly weakened the change of deformability parameters in response to NaHS. NaHS (10^{-3} M) increased the yield strength $\ln\dot{\gamma}_0$ by 12%, but TEA did not affect this effect. In the presence of the non-selective CFTR chloride channel blocker

glibenclamide (5×10^{-5} M), the effects of low and high NaHS concentrations on the membrane yield strength $\ln \gamma_0$ were completely or partially reduced ($p < 0,05$). Thus, H_2S has different mechanisms of action on DE.

Keywords: erythrocyte deformability, hydrogen sulfide

Введение

Способность эритроцитов к деформации облегчает их проникновение в капилляры меньшего диаметра, чем диаметр эритроцита. Это способствует адекватному кровоснабжению органов и тканей, которое нарушается при снижении деформируемости эритроцитов (ДЭ) при различных патологических состояниях (сахарный диабет, артериальная гипертензия и др.) [1,2]. Газотрансмиттер сероводород (H_2S), образующийся и высвобождающийся из тканей кровеносных сосудов, влияет на деформируемость эритроцитов [3, 4]. В малых концентрациях H_2S участвует в регуляции функций нервной, сердечнососудистой, пищеварительной системы, оказывает протекторное действие при гипоксии, имеет антиоксидантные и противовоспалительные свойства и т.д. [3, 4]. При этом в высоких концентрациях H_2S токсичен и может образовываться на некоторых производствах, при приеме некоторых лекарственных препаратов, избыточно производиться некоторыми бактериями кишечника [5]. По-видимому, не только нормальные физиологические концентрации H_2S , но и его избыток могут влиять на микрореологические свойства крови, а, следовательно, и на кровоснабжение органов и тканей. В связи с этим в настоящем исследовании мы анализировали некоторые механизмы действия низкой (физиологической) и высокой (токсической) концентрации донора H_2S гидросульфида натрия (NaHS) на деформируемость эритроцитов крысы в опытах *in vitro*.

Методика

В опытах использовали самцов белых лабораторных крыс массой 322-365 г. Эксперименты на животных проводили в соответствии с Правилами лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. N 708н г. Москва «Об утверждении Правил лабораторной практики»). Животных наркотизировали (хлоралгидрат, 450 мг/кг, внутривенно), отбирали пробы крови из нижней полой вены, затем животных усыпляли передозировкой

наркоза. В качестве антикоагулянта использовали EDTA (2 мг/мл крови). Кровь каждой крысы делили на ряд проб и инкубировали их или с NaHS в концентрации или $6 \cdot 10^{-5}$, или 10^{-3} М в течение 15 мин при температуре 37°C . Пробы крови, на которых исследовали действие блокаторов, до добавления NaHS 10 мин инкубировали с неспецифическим блокатором CFTR- каналов глибенкламидом ($5 \cdot 10^{-6}$ М) или неспецифическим блокатором кальций-зависимых калиевых каналов тетраэтиламмонием хлоридом (ТЭА, 10^{-3} М). В опытах с ТЭА в контрольную пробу крови добавляли такой же объем растворителя для исследуемых веществ – раствор Рингера (147 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 2,25 мМ CaCl_2 , pH=7,4). В опытах с глибенкламидом использовали спирт для приготовления его раствора, поэтому в контрольную пробу и пробу с NaHS добавляли спирт до конечной концентрации спирта в каждой пробе 0,01%, как и в пробах с глибенкламидом. Образцы крови разбавляли в 500 раз раствором высокомолекулярного полиэтиленоксида ($\text{MM} = 4 \cdot 10^6$) вязкостью 30 сП до получения суспензии, а также добавляли туда исследуемые вещества для сохранения их концентрации. В опытах использовали реактивы фирмы «Sigma-Aldrich». Деформируемость эритроцитов в сдвиговом потоке при скоростях сдвига от 3 до 3065 c^{-1} оценивали методом эктацитометрии с помощью автоматического коаксиально-цилиндрического лазерного агрегометра-деформометра эритроцитов «РеоАДВ-КФ» (ООО «РеоМедЛаб», Россия; реологический зазор – 1,0 мм, $\lambda = 630 \text{ нм}$). Луч лазера, проходящий через взвесь эритроцитов, испытывает дифракцию Фраунгофера, и на чувствительный элемент видеокамеры, установленный в фокальной плоскости линзы, проецируется дифракционная картина, усредняемая по большому числу эритроцитов, попадающих в лазерный пучок при движении в потоке суспензии за единицу времени. Индекс деформируемости эритроцитов (вытянутости под действием сдвигового напряжения в потоке) определяли как $ID = (a-b)/(a+b)$, где a и b — большая и малая полуоси эллипсов соответственно, которыми моделируются уровни одинаковой интенсивности. Графики зависимости усреднённого индекса деформируемости эритроцитов от скорости сдвига в полулогарифмической шкале аппроксимировали прямой по методу наименьших квадратов и определяли точку перегиба $\ln \dot{\gamma}_0$ графика $ID(\ln \dot{\gamma})$, соответствующую пределу текучести мембраны эритроцитов, и тангенс угла наклона $\text{tg} \alpha$ этого графика, характеризующий вязкость внутреннего наполнения эритроцитов.

Предельную деформацию эритроцитов в потоке оценивали с помощью индекса деформируемости, ID_{max} при максимальной скорости сдвига $\dot{\gamma}_{max}=3065 \text{ c}^{-1}$ [6].

Статистическая обработка

Статистический анализ полученных данных выполнен с использованием критерия Фридмана и критерия Вилкоксона при помощи программы Statistica 10. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение. Различия считали значимыми при $p<0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Анализировали влияние неспецифического блокатора Ca^{2+} -зависимых K^{+} -каналов ТЭА (10^{-3} M) на эффекты NaHS в малой ($6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) и в высокой (10^{-3} M) концентрации. ID_{max} в контроле составлял $0,48 \pm 0,02$ и существенно не изменялся при действии исследуемых веществ ($p>0,05$). Параметр $\text{tg}\alpha$ в контроле составлял $0,078 \pm 0,002$. ТЭА снижал этот параметр на 4%, а NaHS ($6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) - на 5% по сравнению с контролем ($p<0,05$), при этом эффект NaHS на фоне ТЭА исчезал. Предел текучести мембраны $\ln \dot{\gamma}_0$ в контроле составлял $2,8 \pm 0,13$ и ТЭА не влиял на этот параметр. NaHS ($6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) снижал $\ln \dot{\gamma}_0$ на 6% по сравнению с контролем, но этот эффект исчезал на фоне ТЭА. NaHS (10^{-3} M) увеличивал предел текучести $\ln \dot{\gamma}_0$ на 12%, однако ТЭА не изменял этот эффект.

При деформации мембраны эритроцита активируются механочувствительные каналы, в клетку входят ионы Ca^{2+} , которые активируют Ca^{2+} -зависимые калиевых каналов средней проводимости, ответственные за Гардош-эффект – увеличение калиевой проводимости мембраны эритроцита при повышении концентрации ионов Ca^{2+} в клетке. Выход ионов K^{+} из клетки гиперполяризует мембрану эритроцита, снижает кальциевую проводимость, способствует дегидратации эритроцита и уменьшению его объема [7,8]. В нашем исследовании донор сероводорода NaHS ($6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) снижал параметр $\text{tg}\alpha$, как и блокатор Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов ТЭА, что, вероятно, отражает блокирование донором сероводорода кальций-зависимых калиевых каналов. Это согласуется с результатами Бирулиной с соавторами (2018), которые показали, что активация кальций-зависимых калиевых каналов приводит к сморщиванию эритроцитов, тогда как добавление NaHS восстанавливает объем клетки [9]. Предел текучести мембраны $\ln \dot{\gamma}_0$ не изменялся в присутствии ТЭА, но снижался при инкубации с

NaHS ($6 \cdot 10^{-5}$ M), вероятно, вследствие снижения жесткости мембраны. В присутствии ТЭА влияние NaHS на этот параметр полностью исчезало и возвращалось к значениям в контрольной пробе. Возможно, в присутствии ТЭА, как и при малой концентрации NaHS, прекращение выхода ионов калия из клетки и деполяризация мембраны способствует задержке в клетке и входу ионов кальция, оказывающему регуляторные эффекты на белки мембраны и цитоскелета, способствуя стабилизации устойчивой к деформации двояковогнутой формы эритроцитов, но вместе с этим повышается чувствительность к низким напряжениям сдвига.

Во другой серии экспериментов анализировали влияние неспецифического блокатора CFTR-каналов глибенкламида ($6 \cdot 10^{-5}$ M) на эффекты донора H_2S . Параметр $tg\alpha$ в контроле составлял $0,079 \pm 0,004$, $\ln \dot{\gamma}_0$ - $2,73 \pm 0,15$, ID_{max} - $0,49 \pm 0$. NaHS ($6 \cdot 10^{-5}$ M) не влиял на параметр $tg\alpha$, но снижал предел текучести мембраны $\ln \dot{\gamma}_0$ на 5%, однако на фоне глибенкламида этот эффект исчезал ($p < 0,05$). Параметр $tg\alpha$ увеличивался в ответ на NaHS (10^{-3} M) на 7% ($p < 0,05$) и практически не изменялся при действии глибенкламида. Параметр $\ln \dot{\gamma}_0$ в ответ на NaHS (10^{-3} M) увеличивался на 21%, и глибенкламид частично и значимо снижал эту реакцию.

Хлорные цАМФ-регулируемые CFTR-каналы типичны для клеток эпителия и необходимы для регуляции клеточного объема, однако обнаружены в мембране эритроцитов, их активация необходима для высвобождения эритроцитами АТФ при деформации, участвующего в регуляции сосудистого тонуса [10]. Глибенкламид предотвращал повышение чувствительности эритроцитов к низким напряжениям сдвига при низкой концентрации NaHS и частично снижал повышение предела текучести мембраны при его высокой концентрации. Противоположные эффекты низкой и высокой концентраций NaHS на чувствительность эритроцитов к низким скоростям сдвига, вероятно, можно объяснить может непосредственно модифицировать CFTR-каналов путем S-сульфгидрирования, а также воздействуя на них опосредованно через изменение активности аденилатциклазного сигнального пути. Вероятно, именно этим в наших экспериментах можно объяснить противоположные эффекты низкой и высокой концентраций NaHS на предел текучести мембраны

Таким образом, H_2S в малой концентрации $6 \cdot 10^{-5}$ M увеличивает ДЭ, блокируя кальций-зависимые калиевые каналы и способствуя

открытию хлорных CFTR-каналов. Блокада рГЦ только частично уменьшает эффект H_2S на ДЭ. В снижение ДЭ на высокую концентрацию H_2S 10^{-3} М вовлечены CFTR-каналы и рГЦ. Однако молекулярные клеточные мишени H_2S не ограничиваются рассмотренными в нашей работе.

Библиографический список

1. Фирсов Н.Н., Джанашия П.Х. Введение в экспериментальную и клиническую гемореологию. М.: Изд-во РГМУ, 2008. 274 с.
2. Муравьев А.В., Чепоров С.В. Гемореология (экспериментальные и клинические аспекты реологии крови). Ярославль: Изд-во ЯГПУ, 2009. 178 с.
3. Сукманский О.И., Реутов В.П. Газотрансмиттеры: физиологическая роль и участие в патогенезе заболеваний // Успехи физиологических наук. - 2016;- 47 (3). - 30-58.
4. Гусакова С. В., Смаглий Л. В., Бирулина Ю.Г., Ковалев И. В., Носарева А. В., Петрова И. В., Реутов В. П. Молекулярные механизмы действия газотрансмиттеров NO, CO И H_2S в гладкомышечных клетках и влияние NO-генерирующих соединений (нитратов и нитритов) на среднюю продолжительность жизни // Успехи физиологических наук. – 2017. - 48 (1): 24–52.
5. Murphy K., Ryan C., Dempsey E.M., O'Toole P.W., Ross R.P., Stanton C. Ryan C. A. Neonatal Sulfhemoglobinemia and Hemolytic Anemia Associated With Intestinal *Morganella morganii* / Pediatrics. – 2015. - 136 (6). - e1641-e1645.
6. Фирсов Н.Н., Приезжев А.В., Климова Н.В., Тюрина А.Ю. Основные закономерности деформационного поведения эритроцитов в сдвиговом потоке // Инженерно-Физический Журнал. -2006. - 79(1). - 114 - 120.
7. Dyrda A., Cytlak U., Ciuraszkiewicz A., Lipinska A., Cueff A., Bouyer G., Ege'e S., Bennekou P., Lew V. L., Thomas S. L. Y.. Local Membrane Deformations Activate Ca^{2+} -Dependent K^{+} and Anionic Currents in Intact Human Red Blood Cells / PLoS ONE. – 2010.- 5(2). - e9447.
8. Muravyov A., Tikhomirova I. Role Ca^{2+} in Mechanisms of the Red Blood Cells Microrheological Changes / in a book “Calcium Signaling”, edited by Md. Shahidul Islam, Springer Science+Business Media Dordrecht 2012. 1267pp. P. 1017-1038.
9. Birulina Yu. G., Petrova I. V., Rozenbaum Yu. A., Shefer E. A., Smagliy L. V., Nosarev A. V., Gusakova S. V. H_2S -Mediated Changes in

Erythrocyte Volume: Role of Gardos Channels, Na⁺,K⁺,2Cl— Cotransport and Anion Exchanger / Bull. Exp. Biol. Med. – 2019. - 167(4). - 508-511.

10. Sprague R.S., Ellsworth M.L., Stephenson A.H., Kleinhenz M.E., Lonigro A.J. Deformation-induced ATP release from red blood cells requires CFTR activity / Am. J. Physiol. – 1998. - 275 (Heart Circ. Physiol. 44). - H1726–H1732.

УДК 612.662:612.172.2

М.М. Фатеев, Д.В. Лендоева, А.С. Смирнова

**ВОЗДЕЙСТВИЕ ФАЗ ОВАРИАЛЬНО-МЕНСТРУАЛЬНОГО
ЦИКЛА НА ПОКАЗАТЕЛИ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ
СЕРДЕЧНОГО РИТМА**

Аннотация. В статье продемонстрированы результаты исследований вегетативной регуляции сердца в разные фазы овариально-менструального цикла (ОМЦ) с использованием активной ортостатической пробы. Показано, что в состоянии покоя в фолликулярную фазу преобладают парасимпатические влияния на сердечный ритм по сравнению с другими фазами ОМЦ. При ортостатической пробе во все фазы ОМЦ повышается активность симпатoadренальной системы, но наибольшие изменения происходят в фолликулярную фазу.

Ключевые слова: Девушки-студентки, ЭКГ, овариально-менструальный цикл, ортостатическая проба, вариабельность сердечного ритма.

M.M. Fateev, D.V. Lendoeva, A.S. Smirnova

**THE EFFECT OF THE OVARIAN-MENSTRUAL CYCLE
ON HEART RATE VARIABILITY**

Abstract. The article demonstrates the results of autonomic regulation studies of cardiovascular system in different phases of the ovarian-menstrual cycle (OMC) during an active orthostatic test. It has been shown that parasympathetic effects on the heart rate variability prevail at rest in the follicular phase compared to other phases of the OMC. During orthostatic test the activity of the sympathoadrenal system increases in all phases of the OMC, but the biggest changes occur in the follicular phase.

Keywords: Female students, ECG, ovarian-menstrual cycle, orthostatic test, heart rate variability.

Введение

В настоящее время накоплено недостаточно данных, с помощью которых можно выявить взаимосвязь механизмов регуляции физиологических функций в разные фазы ОМЦ и процессов саморегуляции сердечно-сосудистой системы (ССС) у девушек-студенток. Влияние ОМЦ на показатели вариабельности сердечного ритма (ВСР) женщины исследуется в основном с учетом фолликулярной, овуляторной и лютеиновой фаз. [1].

Для оценки адекватности процессов адаптации ССС применяется ортостатическая проба [2]. Под влиянием ортостатической пробы наблюдается уменьшение интегральных показателей вариабельности сердечного ритма, что отражает преобладание активности симпатической нервной системы.

Методика

В исследовании принимали участие 16 девушек-студенток в возрасте $20 \pm 0,3$ лет, имеющих постоянный овариально-менструальный цикл. Регистрацию ЭКГ производили в середине весеннего семестра. Учитывались 3 фазы менструального цикла (МЦ): 1) фолликулярная (в среднем исследована на 7-й день МЦ); 2) фаза овуляции (16-й день МЦ); 3) лютеиновая (21-й день МЦ). Запись ЭКГ производили в I стандартном отведении в течение 5 минут с помощью диагностической системы «Валента» (Санкт-Петербург), а расчет показателей ВСР – в программе CRGraph. ВСР регистрировали в положении лежа в спокойном состоянии и при ортостатической пробе.

При анализе ВСР использовались следующие показатели [2, 3]: временной (статистический) анализ: ЧСС – частота сердечных сокращений (уд/мин), SDNN – стандартное отклонение нормальных RR интервалов (мс), CV – коэффициент вариации (%), RMSSD – квадратный корень из суммы квадратов разности величин последовательных пар интервалов RR (мс); геометрический анализ: MxDMn – вариационный размах (мс), Mo – мода (мс), AMo – амплитуда моды (%), ИВР – индекс вегетативного регулирования (усл.ед.), ВПР – вегетативный показатель ритма (усл.ед.), ПАПР – показатель адекватности процессов регуляции (усл.ед.), SI – стресс индекс (усл.ед.); корреляционная ритмография: EllSq – площадь скаттерограммы (мс^2), EllAs – соотношение ширины к длине

скаттерограммы (%); спектральный анализ: VLF – мощность волн очень низкой частоты (мс^2), LF – мощность волн низкой частоты (мс^2), HF – мощность волн высокой частоты (мс^2), TP – общая мощность спектра (мс^2), VLF% относительное значение мощности волн очень низкой частоты, LF% - относительное значение мощности волн низкой частоты, HF% - относительное значение мощности волн высокой частоты и LF/HF – индекс вагосимпатического баланса (усл.ед.).

Статистическая обработка результатов осуществлялась при помощи программы Statistica 10. Рассчитывали среднюю арифметическую и ошибку средней ($M \pm m$). Достоверность оценивалась по критерию t Стьюдента для парных данных.

Результаты и обсуждение

Результаты анализа показателей ВСР показали, что в состоянии покоя имеются достоверные различия только между фолликулярной и овуляторной фазами ОМЦ. При этом значимо увеличились такие показатели ВСР, как ЧСС – в 1.1 раза, АМо - в 1.2 раза и ПАПР – в 1.4 раза, а уменьшились – SDNN – в 1.2, CV – в 1.1, RMSSD – в 1.4, MxDMn – в 1.3, Мо – в 1.1, EllSq – в 2.6, HF – в 1.4 раза. Все это свидетельствует о том, что в овуляторную фазу ОМЦ преобладают симпатические влияния на сердечный ритм (табл. 1).

Во время проведения ортостатической зарегистрированы достоверные изменения в показателях ВСР во всех фазах ОМЦ (табл. 1). Так, ортостатическая проба в фолликулярную фазу по сравнению с покоем приводила к достоверным изменениям большинства показателей ВСР. Произошло уменьшение таких показателей, как SDNN – в 1.5, RMSSD – в 3.2, MxDMn – в 1.6, Мо – в 1.3, EllSq – в 4.3, EllAs – в 2.3, HF – в 7.5, TP – в 2.0, HF% - в 3.4 раза, а увеличение: ЧСС – в 1.3, ИБР – в 2.0, ВПР – в 2.1, ПАПР – в 1.8, LF% - в 1.8 и LF/HF – в 6.9 раза. В овуляторную фазу при ортостатической пробе по сравнению с покоем выявлены достоверные изменения идентичных показателей, раскрытые в фолликулярную фазу при ортостатической пробе (за исключением показателей MxDMn, HF, TP, ИБР, ВПР). Обнаружено уменьшение таких показателей, как SDNN - в 1.3, RMSSD – в 2.5 раза, Мо – 1.3, EllSq – в 1.9, EllAs – в 2.1, HF% - в 3.8 раза, увеличение: ЧСС – в 1.3 раза, ПАПР – в 1.7, , LF% - в 1.5, , LF/HF – в 4.4 раза.

Таблица 1

Влияние фаз ОМЦ на показатели ВСР в покое и при ортостатической пробе

Показатель	Фолликулярная		Овуляторная		Лютеиновая	
	Покой	Ортостатическая проба	Покой	Ортостатическая проба	Покой	Ортостатическая проба
ЧСС (уд/мин)	67.0±2.00	88.3±4.23***	73.72±2.84#	98.49±4.48***>	71.80±2.89	92.99±3.73**
SDNN (мс)	68.7±7.00	45.0±4.38*	55.17±7.18##	42.59±4.71*	55.84±7.94	43.40±5.80
CV (%)	7.6±0.79	6.5±0.54	6.66±0.83##	6.87±0.72	6.52±0.85	6.57±0.71
RMSSD (мс)	73.3±10.59	23.0±2.66**	51.04±9.81#	20.45±4.00**	52.96±11.10	22.21±2.75*
МхDMn (мс)	412.5±38.67	250.0±26.73**	312.50±41.99#	275.00±34.07	331.25±37.72	262.50±30.98
Мо (мс)	893.8±29.79	687.5±32.39** *	806.25±37.72#	625.00±32.73** *	837.50±38.67	643.75±28.25** ^
АМо (%)	32.0±3.56	42.9±3.42	38.22±4.41#	49.94±6.06	40.22±5.62	43.44±3.75
ИВР (ул./ед.)	92.7±25.02	187.8±23.10*	162.68±46.04	236.47±67.90	150.11±37.10	191.62±37.34
ВПР (ул./ед.)	3.0±0.46	6.3±0.55**	4.90±0.99	7.18±1.60	4.11±0.61	6.65±0.89*
ПАПР (ул./ед.)	35.9±4.24	64.6±7.91*	48.65±6.47#	83.46±13.44*	49.54±7.91	69.48±8.0*

SI (ул./ед.)	52.6±15.31	139.9±18.69**	106.19±32.21	201.60±62.88	93.60±24.70	155.48±33.98
EllSq (мс ²)	129379±2655 1	29634±6250**	49894±20710#	26741±6242*	86193±24036	29162±7546
EllAs (%)	61.5±5.26	27.0±2.65***	49.76±6.34	24.22±3.61**	50.35±5.42	27.91±2.42**
VLF (мс ²)	401.2±91.72	214.0±45.92	284.09±79.30	163.23±43.96	207.56±49.56	228.14±77.90
LF (мс ²)	347.7±79.19	319.3±101.33	292.43±90.79	231.52±73.49	187.49±51.30	257.41±82.25
HF (мс ²)	471.6±138.03	62.6±20.18*	343.43±152.45 #	38.58±12.56	383.60±148.5 8	52.05±11.22
TP (мс ²)	1220.6±238.2 2	595.9±150.80*	919.95±253.34	433.33±124.53	778.64±215.6 1	537.60±159.33
VLF (%)	37.1±5.32	39.6±4.57	38.66±5.76	43.19±4.13	34.61±5.75	42.39±5.11
LF (%)	27.6±2.55	50.0±3.82**	32.30±3.24	49.11±3.88*	27.99±3.54	42.28±5.11*
HF (%)	35.3±4.87	10.4±1.76**	29.04±5.80	7.71±0.86**	37.41±8.15	11.33±2.05**
LF/HF (усл.ед)	0.9±0.14	6.2±1.36**	1.65±0.47	7.48±1.69**	1.23±0.36	5.11±0.90***

*** - $p < 0.001$; ** - $p < 0.01$; * - $p < 0.05$ – покой по сравнению с ортостатической пробой; ## - $p < 0.01$; # - $p < 0.05$ – овуляторная фаза по сравнению с фолликулярной в покое; > - $p < 0.05$ – овуляторная фаза по сравнению с фолликулярной при ортостатической пробе; ^ - $p < 0.05$ – лютеиновая фаза по сравнению с фолликулярной при ортостатической пробе.

В лютеиновую фазу при сравнении состояний покоя и ортостаза наблюдались достоверные изменения по следующим показателям: уменьшение RMMSD - в 2.4 раза, Мо - в 1.3, EllAs – в 1,8, HF% – в 3.3 раза, увеличение ЧСС в 1.3 раза, ВПР – в 1.6, ПАПР – в 1.4, LF - в 1.5, LF/HF – в 4.2 раза. Во время проведения ортостатической пробы зарегистрированы достоверные изменения в показателях ВСР между фолликулярной и овуляторной только по ЧСС (увеличение в 1.1 раза), а между фолликулярной и лютеиновой фазами ОМЦ только по Мо (уменьшение в 1.1 раза). Эти изменения указывают на незначительное преобладание тонуса симпатической нервной системы при ортостатической пробе в овуляторную и лютеиновую фазы ОМЦ над фолликулярной.

Таким образом, в ходе нашего исследования были получены результаты, свидетельствующие о том, что фолликулярная фаза в отличие от овуляторной фазы ОМЦ характеризуется более высоким тонусом парасимпатического отдела автономной нервной системы. По показателям ВСР лютеиновая фаза не отличается от других фаз ОМЦ. Ортостатическая проба приводит к повышению активности симпато-адреналовой системы, и наибольшее воздействие она оказывает на фолликулярную фазу ОМЦ. Обнаруженные достоверные изменения в ВСР являются отражением особенностей действия половых гормонов на работу ССС в различные фазы ОМЦ [4].

Библиографический список

1. Воронова Н.В., Мегайл А.Ю., Елаева Л.Е., Кузьмина Г.И. Влияние сезона года и фазы менструального цикла женщины на параметры кардиоинтервалограммы // Экология человека. 2015. Т. 22. № 2. С. 20-26.
2. Бабунц И.В., Мириджанян Э.М., Мшаех Ю.А. Азбука variability сердечного ритма. Ставрополь. 2002. 152 с.
3. Баевский Р.М. Анализ variability сердечного ритма в космической медицине // Физиология человека. 2002. Т.28. № 2. С. 70-82.
4. Хасанов А.А., Журавлева В.И. Современные представления о регуляции менструальной функции // Практическая медицина. 2009. Т. 34. № 2. С. 57–59.

М.Н. Ходосовский, В.В. Зинчук

**УЧАСТИЕ ГЕМОГЛОБИНА В РЕГУЛЯЦИИ
РЕДОКС-СОСТОЯНИЯ ТКАНЕЙ ПРИ
ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ПЕЧЕНИ**

Аннотация. Окислительный стресс является важным механизмом повреждения гепатоцитов при синдроме ишемии-реперфузии печени. Гемоглобин является не только мощным фактором поддержания гомеостатических констант, таких как показатель кислотности, но и способен участвовать в регуляции прооксидантно-антиоксидантного баланса. В работе проведен анализ литературных и собственных данных об участии гемоглобина и кислородсвязывающих свойств крови в коррекции окислительных повреждений печени при ишемии-реперфузии.

Ключевые слова: гемоглобин, окислительный стресс, печень, ишемия-реперфузия, монооксид азота

M.N. Khodosovsky, V.V. Zinchuk

**PARTICIPATION OF HEMOGLOBIN IN THE REGULATION
OF THE REDOX-STATE OF TISSUES DURING HEPATIC
ISCHEMIA-REPERFUSION**

Abstract. Oxidative stress is an important mechanism of hepatocyte damage in ischemia-reperfusion syndrome of the liver. Hemoglobin is not only a powerful factor in maintaining homeostatic constants, such as an indicator of acidity, but is also able to participate in the regulation of prooxidant-antioxidant balance. In this article we analyzed literature and own data about participation of hemoglobin and blood oxygen-binding properties in the correction of oxidative liver damage during ischemia-reperfusion.

Key words: hemoglobin, oxidative stress, liver, ischemia-reperfusion, nitric monoxide

Введение

Окислительный стресс является важным механизмом повреждения гепатоцитов при синдроме ишемии-реперфузии печени

[1]. Активные формы кислорода (АФК) продуцируются тканями при ишемии, однако после реперфузии их генерация резко усиливается. Гидроксильный радикал (HO^{\bullet}), супероксидный анион-радикал ($\text{O}_2^{\bullet-}$) и гидропероксид водорода (H_2O_2) способствуют дисфункции митохондрий, хемотаксису, перекисному окислению липидов (ПОЛ), дезинтеграции белков и клеточных мембран. Кроме того, АФК способны вызывать повреждения и дисфункцию эндотелия, нарушая процессы микроциркуляции в печени после ишемии [2]. Во время ишемии распад аденозин-3-фосфата (АТФ) приводит к накоплению гипоксантина. Одновременно, ксантиндегидрогеназа превращается в ксантиноксидазу, которая в условиях реоксигенации разлагает гипоксантин на $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 и соль мочевой кислоты. Поэтому реперфузия печени неизбежно ведет к окислительному стрессу. Гемоглобин является не только мощным фактором поддержания гомеостатических констант крови, таких как показатель кислотности, но и способен участвовать в регуляции прооксидантно-антиоксидантного баланса [3]. Так, образование промежуточных оксиферрильной ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) или пероксиферрильной ($\text{Por}^{\bullet+}-\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) форм гемопротейна с участием H_2O_2 приводит к антиоксидантной активности гемоглобина. Однако, при высоком напряжении O_2 оксигемоглобиновая связь протонируется, что может вести к окислению гемма в трехвалентную форму и высвобождению пероксид радикала ($^{\bullet}\text{OOH}$) [4]. Кроме того, взаимодействие $\text{Por}-\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ с H_2O_2 может стать источником $\text{O}_2^{\bullet-}$ [5]. Важным аспектом сигнальных функций эритроцита является способность гемоглобина взаимодействовать с монооксидом азота (NO). NO может легко диффундировать через мембрану эритроцита и связываться с гемом, образуя нитрозилгемоглобин ($\text{Hb}-\text{Fe}(\text{II})\text{NO}$), либо взаимодействовать с SH-группами, формируя нитрозогемоглобин ($\text{SNO}-\text{Hb}$). Данные производные гемоглобина могут служить альтернативным источником NO в сосудистом русле при его дефиците [6]. $\text{SNO}-\text{Hb}$ и $\text{Hb}-\text{Fe}(\text{II})\text{NO}$ способны влиять на сродство гемоглобина к кислороду (СГК) крови, а также участвуют в формировании эндогенного пула NO . Таким образом, в результате взаимодействия гемоглобина с NO могут изменяться как условия доставки кислорода в ткани, так и соотношение вазоконстрикторов и вазодилататоров, что может иметь саногенетическое значение при коррекции синдрома ишемии-реперфузии. Вместе с тем повышенные уровни NO в сочетании с окислительным стрессом могут привести к образованию

пероксинитрита и оказать цитотоксическое действие на гепатоциты при ишемии-реперфузии [7]. Необходимость поддержания тонкого баланса между повреждающей и протективной сторонами действия NO требует всестороннего изучения влияния донаторов NO на параметры кислородтранспортной функции (КТФ) крови и прооксидантно-антиоксидантного баланса при ишемии-реперфузии печени.

Методика

Опыты выполнены на взрослых кроликах-самцах, весом 3,5-4,5 кг, предварительно выдержанных в стандартных условиях вивария. Моделировали ишемию-реперфузию печени путем временной окклюзии *a. hepatica propria* в течение 30 минут с последующим 2-х часовым периодом реперфузии. Вводили катетеры: один – в *v. hepatica* для взятия печёночной венозной крови, а другой – в правое предсердие для получения смешанной венозной крови. Забор образцов крови для оценки параметров КТФ крови осуществляли до, в конце ишемии и через 120 мин после её прекращения. Ткань печени для оценки показателей ПОЛ брали в конце реперфузии. В качестве контроля использовали образцы печени, взятые у животных до ишемии (n=6). Степень повреждения печени оценивали по активности в плазме крови АлАТ и АсАТ. Все опыты выполнены в условиях адекватной аналгезии (калипсол, тиопентал натрия) в соответствии с требованиями этического комитета по гуманному обращению с животными Гродненского государственного медицинского университета.

Животных разделили на 3 группы: в 1-й – моделировали ишемию-реперфузию печени (n=10), во 2-й – на фоне ишемии-реперфузии печени проводили внутривенную инфузию нитроглицерина в дозе 1,5 мкг/кг, которую начинали за 5 мин до начала реперфузионного периода (n=8); в 3-й – опыты выполняли как во 2-й группе, но вместо нитроглицерина вводили нитропруссид натрия (Sigma, США) в дозе 10 мкмоль/кг (n=8). Определение суммарного количества нитритов и нитратов (NOx) в плазме крови проводили с помощью реактива Грисса. Для восстановления нитратов в нитриты использовали металлический кадмий. На микрогазоанализаторе “Synthesis-15” (Instrumentation Laboratory Company) оценивали показатели КТФ крови: $p50_{\text{станд}}$, $p50_{\text{реал}}$, pO_2 , pCO_2 , pH, бикарбонат плазмы (HCO_3^-) и др. SGK определяли по показателю $p50$ (pO_2 крови, соответствующее 50% насыщению ее

кислородом). Изучали следующие показатели ПОЛ: диеновые конъюгаты (ДК), малоновый диальдегид (МДА), основания Шиффа (ОШ). Содержание ДК в биологическом материале определяли методом ультрафиолетовой спектрофотометрии при длине волны 233 нм, типичной для конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов; уровень ОШ – по интенсивности флуоресценции хлороформного экстракта при длинах волн возбуждения и эмиссии 344 и 440 нм соответственно. Содержание МДА (оценивали по взаимодействию с 2'-тиобарбитуровой кислотой, которая при нагревании в кислой среде приводит к образованию триметинового комплекса розового цвета.

Все полученные результаты обработаны методами вариационной статистики. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Установлено, что моделирование ишемии-реперфузии печени приводит к значительному ухудшению КТФ крови, прооксидантно-антиоксидантного состояния и повышению уровня биохимических маркеров повреждения гепатоцитов (АлАТ и АсАТ), тогда как введение нитроглицерина значительно улучшало изучаемые параметры [2]. Интересно отметить, что в конце реперфузионного периода в печеночной и смешанной венозной крови показатель $p50_{\text{реал}}$ у кроликов повышался по отношению к исходным уровням на 29,9% ($p < 0,001$) и 29,4% ($p < 0,001$), соответственно, свидетельствуя о снижении СГК крови. Данные изменения КТФ крови на 120-й минуте реперфузии сопровождалось повышением уровня диеновых конъюгатов (ДК), малонового диальдегида (МДА) и оснований Шиффа (ОШ) в тканях печени на 120,2% ($p < 0,001$), 101,1% ($p < 0,001$) и 212,0% ($p < 0,001$), соответственно, отражая активацию свободнорадикальных процессов ПОЛ.

Введение кроликам нитроглицерина при ишемии-реперфузии печени приводило к снижению показателя $p50_{\text{реал}}$ в конце реперфузии в печеночной и смешанной венозной крови понизился по отношению к животным, не получавшим нитроглицерин, на 15,6% ($p < 0,01$) и 11,9% ($p < 0,05$) соответственно. Повышение СГК крови в конце реперфузии у животных, получавших нитроглицерин, сопровождалось снижением ДК, МДА и ОШ в печени по отношению к кроликам, у которых ишемию-реперфузию печени моделировали без препарата, на 44,6% ($p < 0,001$), 42,0% ($p < 0,01$) и 64,1% ($p < 0,001$)

соответственно. Кроме того, введение нитроглицерина кроликам снижало активность АлАТ и АсАТ в смешанной венозной крови в конце реперфузии на 42,0% ($p < 0,001$) и 27,1% ($p < 0,05$) соответственно, по отношению к животным без препарата.

Схожие результаты получены при использовании нитропруссид натрия у кроликов при ишемии-реперфузии печени [8]. Введение данного препарата опытным животным приводило к снижению p50, активности АлАТ, АсАТ в крови и продуктов ПОЛ в крови и печени, а также улучшение параметров антиоксидантной защиты органа в конце реперфузионного периода. У животных, получавших доноры NO, в крови возрастало суммарное содержание нитрат/нитритов (NOx) при ишемии-реперфузии печени. Возможно, наряду с известными эффектами NO при реперфузии печени, такими как снижение экспрессии гена p53 и провоспалительных цитокинов - интерлейкина-1, фактора некроза опухолей- α [9], монооксид азота участвует в модификации кислородсвязывающих свойств гемоглобина путем соединения с его SH-группами и формируя SNO-Hb, что и повышает СГК крови опытах с нитроглицерином и нитропруссидом натрия.

Поскольку повышение СГК крови обычно приводит к снижению отдачи кислорода в ткани, модификация гемоглобина в SNO-Hb способна регулировать редокс-состояние тканей, результатом которого, по-видимому, является снижение окислительного стресса при реперфузии. Данное предположение согласуется с фактом протективного эффекта ингибирования процессов окисления в дыхательной цепи митохондрий с помощью доноров NO, что снижает выработку АФК при реперфузии печени [2]. Кроме того, в сосудистом русле большая часть NO переходит в эритроциты, диффундируя даже против концентрационного градиента [10]. Благодаря обратимости реакции образования SNO-Hb, последний может выступать в качестве донора NO в тканях, улучшая процессы микроциркуляции и баланс между вазоконстрикторами и вазодилататорами после ишемии [6].

Таким образом, изменение кислородсвязывающих свойств гемоглобина при использовании донаторов NO является важным механизмом регуляции редокс-состояния тканей при моделировании синдрома ишемии-реперфузии печени, что улучшает параметры прооксидантно-антиоксидантного баланса и биохимические маркеры повреждения гепатоцитов (АлАТ и АсАТ) при данной патологии.

Библиографический список

1. Nakazato P.C.G. et al. Liver ischemia and reperfusion injury. Pathophysiology and new horizons in preconditioning and therapy // *Acta Cir. Bras.* – 2018. – Vol. 33. – P. 723–735.
2. Datta G., Fuller B.J., Davidson B.R. Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: insights from transgenic knockout models // *World J. Gastroenterol.* – 2013. – Vol. 19, № 11. – P. 1683–1898.
3. Зинчук В.В. Участие сродства гемоглобина к кислороду в поддержании прооксидантно-антиоксидантного состояния организма // *Медицинские новости.* – 2002. – № 9. – С. 20–25.
4. Bonaventura C. et al. Molecular controls of the oxygenation and redox reactions of hemoglobin // *Antioxidants and Redox Signaling.* – 2013. – Vol. 18, № 17. – P. 2298–2313.
5. Rifkind J.M., Nagababu E. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging // *Antioxidants and Redox Signaling.* – 2013. – Vol. 18, № 17. – P. 2274–2283.
6. Salhany J.M. The oxidative denitrosylation mechanism and nitric oxide release from human fetal and adult hemoglobin, an experimentally based model simulation study // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2013. – Vol. 50, № 1. – P. 8–19.
7. *Free Radic. Biol. Med.* 2016; 95: 209-215.
8. Ходосовский М.Н. Участие газотрансммиттеров в коррекции реперфузионных повреждений печени. Гродно: ГрГМУ, 2017. – 212 с.
9. Zhang Y.Q., Ding N., Zeng Y.F. et al. New progress in roles of nitric oxide during hepatic ischemia reperfusion injury // *World J Gastroenterol.* – 2017. – Vol. 23, № 14. – P. 2505–2510.
10. Butcher J.T., Johnson T., Beers J. et al. Hemoglobin α in the blood vessel wall // *Free Radic. Biol. Med.* – 2014. – Vol. 73. – P. 136–142.

С.Ю. Никитин, Е. Г. Цыбров, М. С. Лебедева

ИЗМЕРЕНИЕ АСИММЕТРИИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПО РАЗМЕРАМ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ ДИФРАКТОМЕТРИИ МАЗКА КРОВИ

Аннотация. Предложен алгоритм для быстрого измерения параметров распределения эритроцитов по размерам на основе данных лазерной дифрактометрии мазка крови. Алгоритм предназначен для измерения среднего размера эритроцитов, ширины и асимметрии распределения эритроцитов по размерам.

Ключевые слова: распределение эритроцитов по размерам, лазерная дифрактометрия, алгоритм измерения.

S. Yu. Nikitin, E. G. Tsybrov, M. S. Lebedeva

MEASUREMENT OF THE ASYMMETRY OF ERYTHROCYTE SIZE DISTRIBUTION BY LASER DIFFRACTOMETRY OF A BLOOD SMEAR

Abstract. An algorithm for rapid measurement of erythrocyte size distribution parameters based on blood smear laser diffractometry data is proposed. The algorithm is designed to measure the average size of erythrocytes, the width and asymmetry of the size distribution of erythrocytes.

Key words: size distribution of erythrocytes, laser diffractometry, measurement algorithm.

Введение

Распределение эритроцитов по размерам – важная реологическая характеристика крови. Основные параметры этого распределения – средний объем эритроцита и ширина распределения (RDW – red blood cells distribution width) входят в стандартный анализ крови. Мы полагаем, что диагностическую ценность могут иметь и другие параметры этого распределения, такие как асимметрия и эксцесс распределения. В настоящей работе мы обсуждаем возможность измерения асимметрии распределения эритроцитов по размерам

методом лазерной дифрактометрии мазка крови. Достоинством этого метода является его простота и быстрота измерений.

Методика

На рисунке 1 представлена схема экспериментальной установки для лазерной дифрактометрии эритроцитов. Установка включает в себя лазер, мазок крови, экран наблюдения, видеокамеру. Цифровая фотография дифракционной картины с видеокамеры подается в компьютер, где обрабатывается с помощью специальной программы.

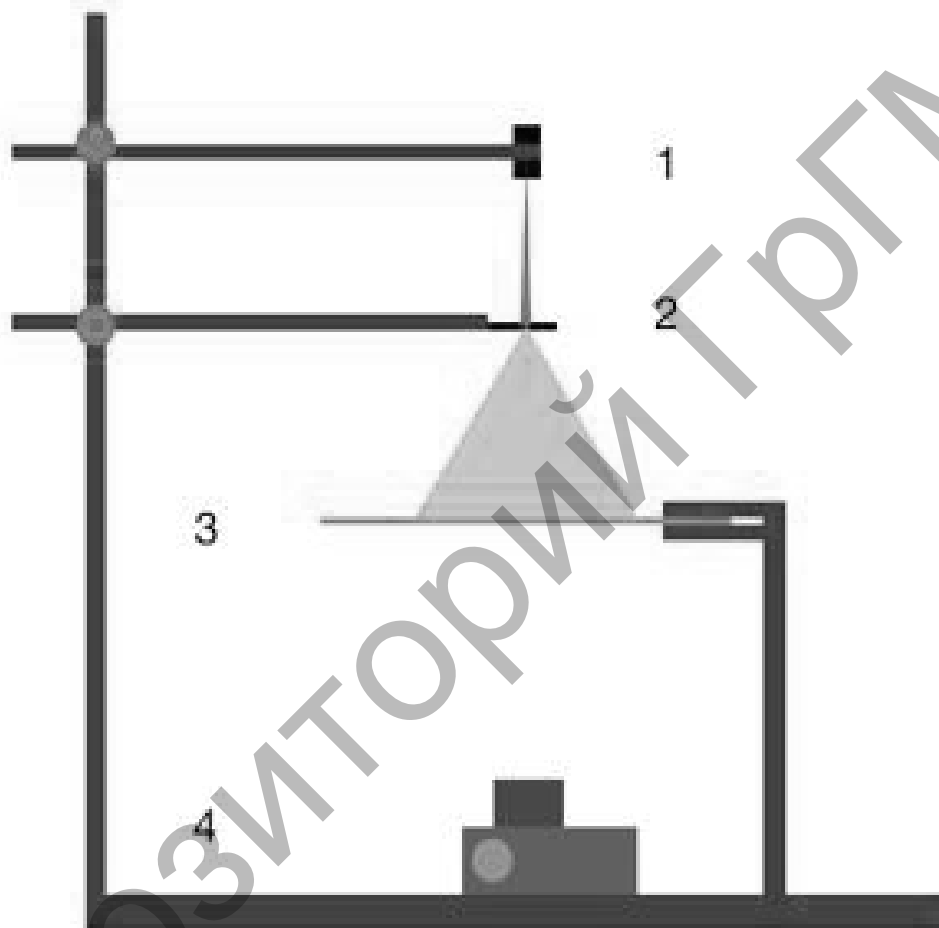
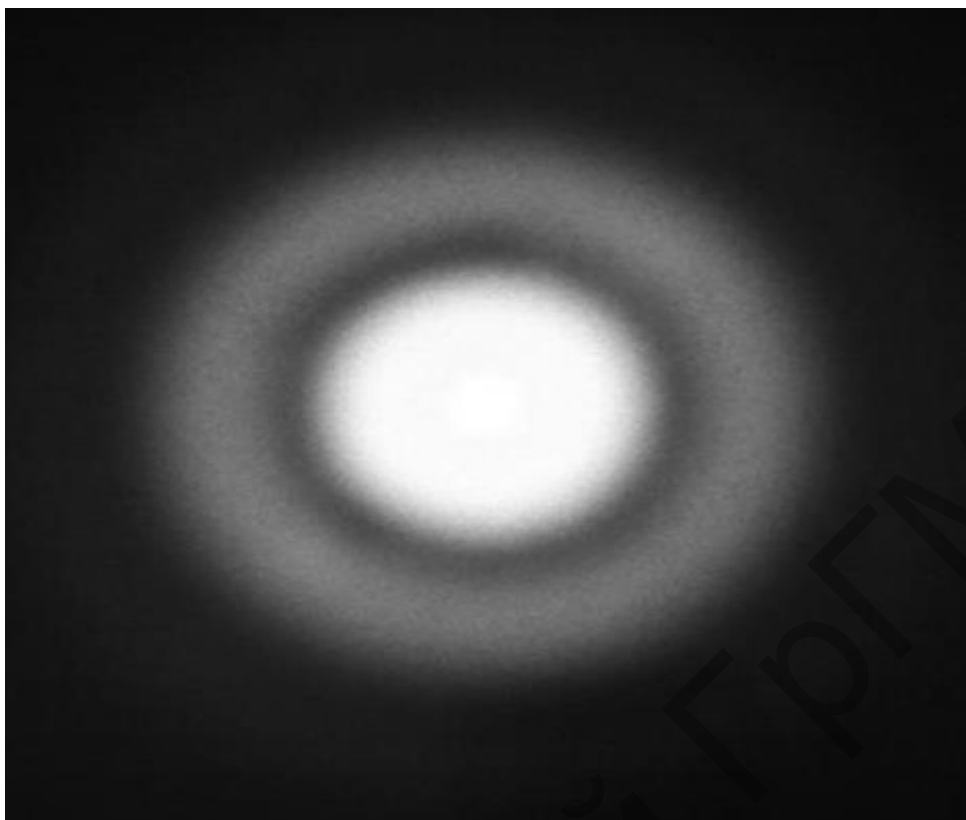


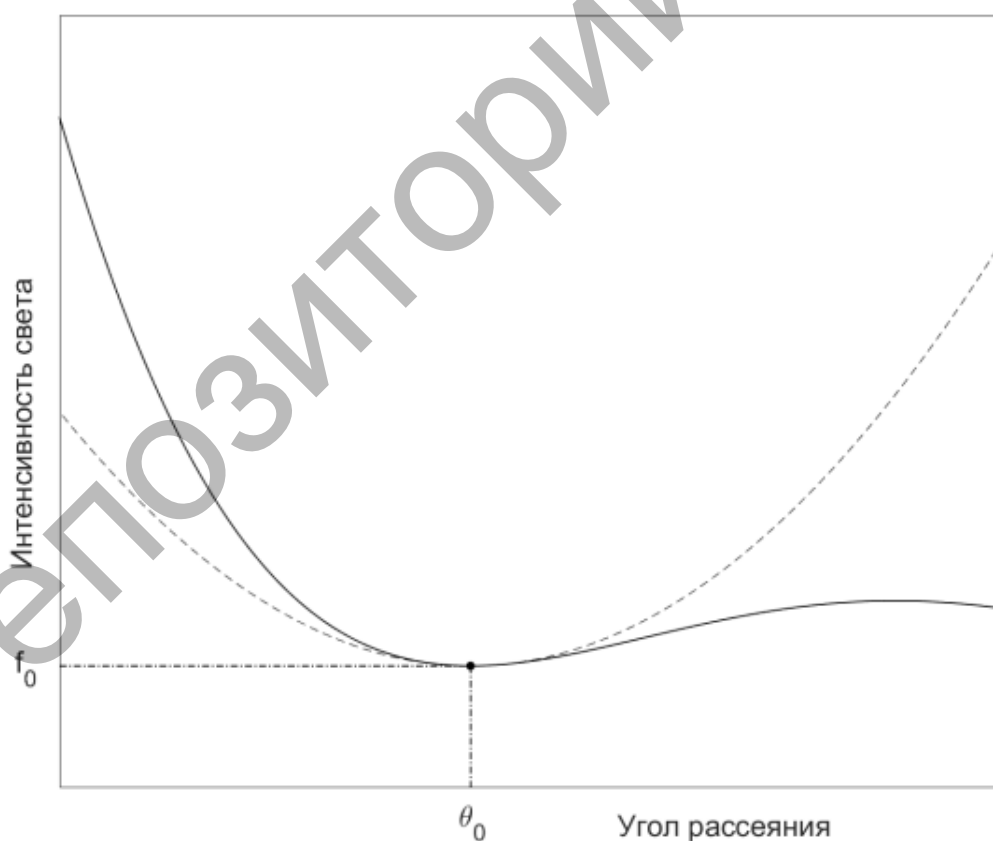
Рис.1. Схема установки для лазерной дифрактометрии мазка крови.

Установка включает в себя лазер (1), мазок крови (2), экран для наблюдения дифракционной картины (3), видеокамеру (4).

На рис. 2 показан типичный вид дифракционной картины, возникающей при рассеянии лазерного пучка на мазке крови (а) и фрагмент углового распределения интенсивности света в дифракционной картине (б).



а



б

Рис. 2. Дифракционная картина, возникающая при рассеянии лазерного пучка на мазке крови (а) и фрагмент углового распределения интенсивности света в дифракционной картине (б).

Экспериментально могут быть измерены следующие параметры дифракционной картины: угловая координата минимума интенсивности света (θ_0), относительная интенсивность света в минимуме (f_0) и кривизна углового распределения интенсивности в точке минимума (f_0''). Математически эти параметры определяются формулой

$$f(\theta) = f_0 + \frac{1}{2}f_0'' \cdot (\theta - \theta_0)^2 \quad (1)$$

где θ – угол рассеяния, f – интенсивность света в данной точке экрана наблюдения, нормированная на интенсивность центрального дифракционного максимума. На рисунке 2б сплошной линией показан фрагмент углового распределения интенсивности света в дифракционной картине, пунктиром – параболическая аппроксимация этого распределения, построенная по формуле (1). Пусть R_i – радиус отдельного эритроцита на мазке крови. Тогда средний радиус эритроцита

$$R_0 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N R_i$$

Моменты второго (μ) и третьего (ν) порядка для распределения эритроцитов по размерам определяются формулами

$$\mu = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left(\frac{R_i}{R_0} - 1 \right)^2 \quad \nu = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left(\frac{R_i}{R_0} - 1 \right)^3$$

Здесь N – полное число эритроцитов, освещаемых лазерным пучком на мазке крови. Ширину и асимметрию распределения эритроцитов по размерам определяют параметры

$$\mu' = \sqrt{\mu} \quad \nu' = \sqrt[3]{\nu}$$

Задача заключается в том, чтобы найти связь параметров дифракционной картины θ_0, f_0, f_0'' с характеристиками ансамбля эритроцитов R_0, μ', ν' , и на этой основе построить алгоритм измерения среднего радиуса эритроцитов на мазке крови, а также ширины и асимметрии распределения эритроцитов по размерам.

Результаты и обсуждение

Для решения задачи необходимо рассчитать дифракционную картину, возникающую при рассеянии лазерного пучка на мазке крови. Приближенный расчет возможен на основе ряда упрощающих предположений. Мы моделируем эритроциты круглыми плоскими

дисками, используем приближения однократного рассеяния света, аномальной дифракции, дальней зоны дифракции и слабой неоднородности ансамбля эритроцитов по размерам [1]. В этих условиях получаем систему уравнений, связывающих характеристики дифракционной картины с параметрами ансамбля эритроцитов. Решая эти уравнения, находим

$$\mu = \frac{(8\beta^2 - f_2)q_{2v} - f_0q_{3v}}{\Delta} \quad v = \frac{1}{q_{2v}}(f_0 - q_{2\mu}\mu)$$

$$\rho_0 = (1 - 0.5\mu + 9.784v) \frac{x_0}{\theta_0}$$

Здесь $\rho_0 = 2\pi R_0/\lambda$ – волновой параметр размера эритроцита, λ – длина волны лазерного излучения. Остальные параметры таковы

$$\begin{aligned} f_2 &= f_0'' \cdot \theta_0^2 & \Delta &= q_{3\mu}q_{2v} - q_{3v}q_{2\mu} \\ q_{2\mu} &= p_{2\mu} - p_{2\mu f}f_0 & q_{2v} &= p_{2v} - p_{2vf}f_0 \\ q_{3\mu} &= p_{3\mu} + p_{3\mu f}f_2 & q_{3v} &= p_{3v} + p_{3vf}f_2 \\ x_0 &= 3.8318 & \beta &= 0.40276 \\ p_{1\mu} &= -0.5 & p_{1v} &= 9.784 \\ p_{2\mu} &= 0.6489 & p_{2\mu f} &= 5 \\ p_{2v} &= 0.6489 & p_{2vf} &= 23.58 \\ p_{3\mu} &= 36.81 & p_{3\mu f} &= 5 \\ p_{3v} &= 120.4 & p_{3vf} &= 23.58 \end{aligned}$$

Полученные формулы выражают собой алгоритм измерения характеристик распределения эритроцитов по размерам: среднего размера эритроцитов, а также ширины и асимметрии распределения эритроцитов по размерам. Мы проверили этот алгоритм методом численного эксперимента: оценили его точность и определили область применимости. Для этого использовали модель бимодального ансамбля эритроцитов. Считали, что на мазке крови присутствуют эритроциты с параметрами размера ρ_1 и ρ_2 , при этом доля эритроцитов первого типа p_1 , второго типа p_2 . В частности, если

$$\rho_1 = 32 \quad \rho_2 = 43 \quad p_1 = 0.4 \quad p_2 = 0.6 \quad (2)$$

то

$$\rho_0 = 38.6 \quad \mu' = 0.14 \quad v' = -0.104 \quad (3)$$

Угловое распределение интенсивности света в дифракционной картине находили по формулам [1, 2]

$$f(\theta) = \frac{p_1\rho_1^4 G(\rho_1\theta) + p_2\rho_2^4 G(\rho_2\theta)}{p_1\rho_1^4 + p_2\rho_2^4} \quad G(u) = \left[\frac{2J_1(u)}{u} \right]^2$$

где $I_1(u)$ – функция Бесселя первого порядка. Параметры этой картины для условий (2)

$$\theta_0 = 0.0968 \quad f_0 = 0.009471 \quad f_2 = 0.7777$$

Используя эти величины как входные данные, с помощью предложенного алгоритма нашли

$$\rho_0 = 38.8 \quad \mu' = 0.129 \quad v' = -0.103 \quad (4)$$

Итак, формулы (3) дают точные значения параметров ансамбля эритроцитов, а формулы (4) – приближенные значения этих же параметров, найденные путем анализа дифракционной картины с помощью описанного выше алгоритма. Отметим высокую точность измерения. Погрешность измерения не превышает 8%. Полученные данные позволяют восстановить параметры бимодального ансамбля эритроцитов ρ_1, ρ_2, p_1, p_2 . Это можно сделать с помощью формул [3]

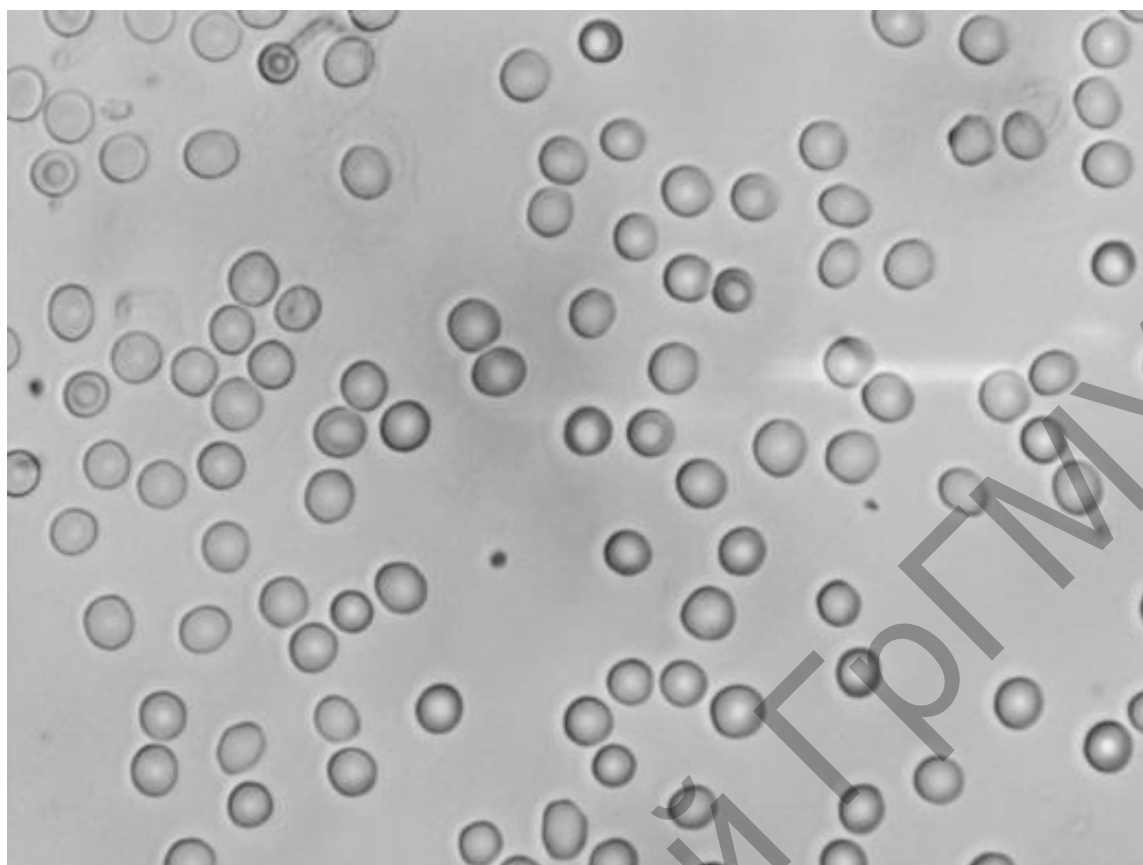
$$\begin{aligned} p_1 &= \frac{1}{2} \left(1 + \frac{v}{\sqrt{v^2 + 4\mu^3}} \right) & p_2 &= 1 - p_1 \\ \varepsilon_1 &= \frac{v - \sqrt{v^2 + 4\mu^3}}{2\mu} & \varepsilon_2 &= \frac{v + \sqrt{v^2 + 4\mu^3}}{2\mu} \\ \rho_1 &= \rho_0 \cdot (1 + \varepsilon_1) & \rho_2 &= \rho_0 \cdot (1 + \varepsilon_2) \end{aligned}$$

Для указанных выше условий мы получили на основе анализа дифракционной картины

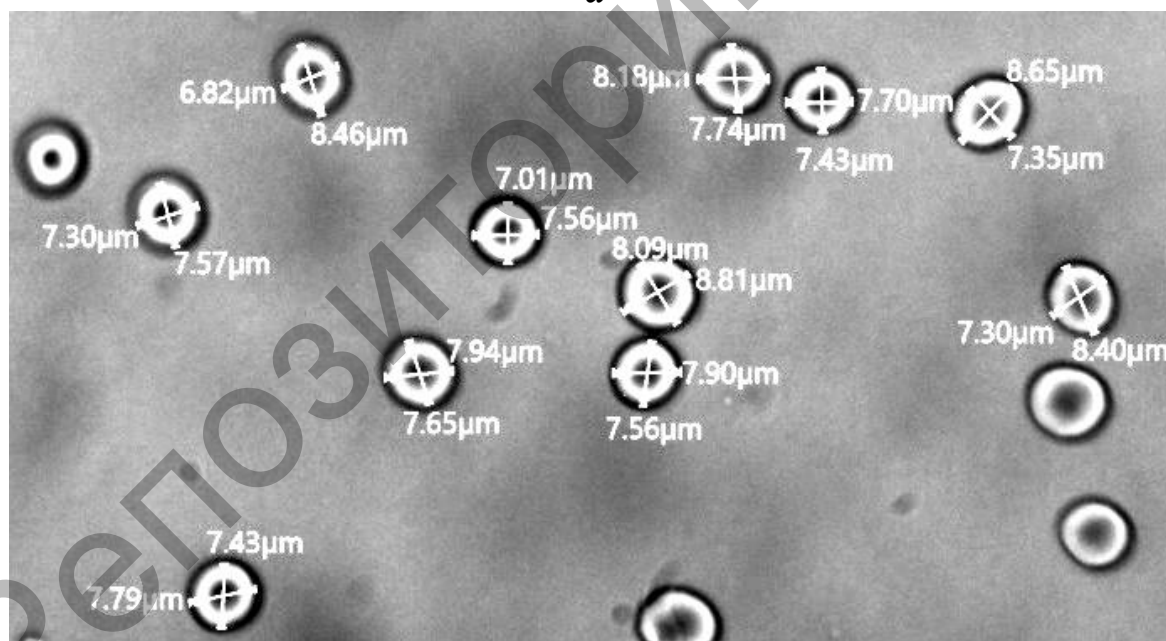
$$\rho_1 = 33.6 \quad \rho_2 = 43.9 \quad p_1 = 0.37 \quad p_2 = 0.63 \quad (5)$$

Сравнивая точные значения параметров (2) с приближенными значениями (5) находим, что погрешность измерения не превышает 7.5%. Отметим, что эти расчеты сделаны для параметра RDW, типичного для нормальных образцов крови $RDW = \mu' = 0.14 = 14\%$. Аналогичные расчеты, сделанные для других условий, показывают, что алгоритм дает приемлемую точность и для более неоднородных ансамблей эритроцитов. В частности, для $\mu' = 18.8\%$ погрешность определения величин ρ_0, μ', v' , а также параметров p_1, p_2, ρ_1, ρ_2 не превышает 17.5%.

Для экспериментальной проверки алгоритма мы разработали специальный протокол подготовки образцов крови [4]. Вид типичного мазка крови под микроскопом показан на рисунке 3а. Отметим, что мы используем влажные мазки крови, в которых эритроциты сохраняют свою естественную форму. С помощью оригинальной компьютерной программы мы определяем абсолютные размеры эритроцитов на мазке крови. Результат работы этой программы представлен на рис. 3б.



а



б

Рис. 3. Вид влажного мазка крови под микроскопом (а) и размеры эритроцитов (б).

Пример дифракционной картины, возникающей при рассеянии лазерного пучка на мазке крови, показан на рисунке 4.

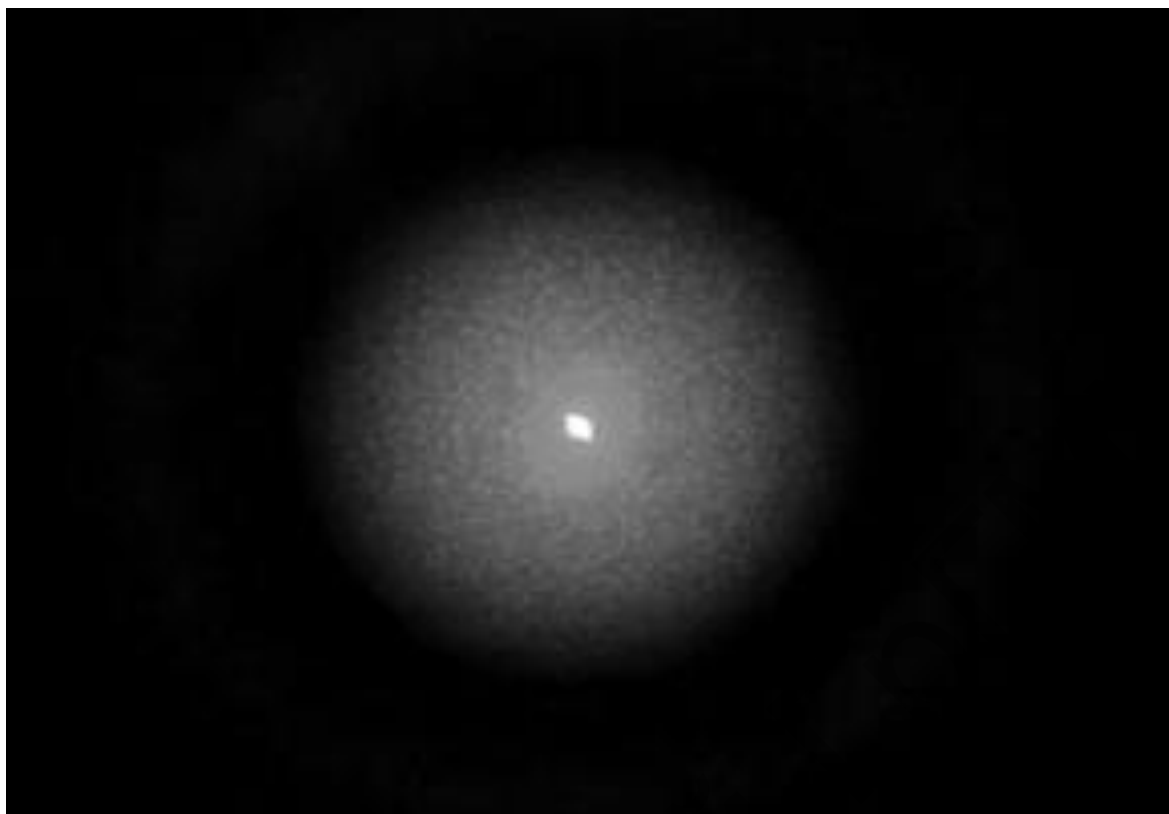


Рис. 4. Пример дифракционной картины, возникающей при рассеянии лазерного пучка на мазке крови

В настоящее время качество наших дифракционных картин недостаточно для того, чтобы обеспечить высокую точность измерений. Работа в этом направлении продолжается.

В заключение отметим, что в настоящей работе представлен алгоритм для измерения характеристик распределения эритроцитов по размерам на основе метода лазерной дифрактометрии мазка крови. Алгоритм позволяет измерять средний радиус эритроцита на мазке крови, а также ширину и асимметрию распределения эритроцитов по размерам. Достоинством этого способа является простота и быстрота измерений. Методом численного эксперимента показано, что алгоритм обеспечивает приемлемую точность измерений и имеет достаточно широкую область применимости.

Благодарность.

Работа поддержана Российским Научным Фондом, грант N 18-15-00422.

Библиографический список

1. Никитин С.Ю., Луговцов А.Е., Приезжев А.В. К проблеме видности дифракционной картины в лазерной дифрактометрии

эритроцитов. Квантовая электроника, 2010, том 40, N 12, с. 1074 – 1076.

2. Никитин С.Ю., Луговцов А.Е., Приезжев А.В., Устинов В.Д. Связь видности дифракционной картины с дисперсией размеров частиц в эктацитометре. Квантовая электроника, 2011, т. 41, N 9, с. 843-846.

3. Никитин С.Ю., Устинов В.Д., Шишкин С.Д., Лебедева М.С. Алгоритм кривизны линии в лазерной эктацитометрии эритроцитов. Квантовая электроника, 2020, т. 50, N 9, стр. 888 - 894.

4. Лебедева М.С., Цыбров Е.Г., Никандрова А.Е. Эксперименты по лазерной дифрактометрии мазков крови. Оптические методы исследования потоков: Труды XVI Международной научно-технической конференции, 28 июня - 02 июля 2021, Москва, «Перо», с. 175 – 182.

УДК 535.8; 577.352.336; 577.325.3; 539.2

Луговцов А.Е., Тучин В.В., Переведенцева Е.В., Ч.-Л. Ченг, Приезжев А.В.

МИКРОРЕОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА И ИХ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ИНКУБАЦИИ КРОВИ С НАНОЧАСТИЦАМИ Fe_2O_3 ПЕРСПЕКТИВНЫМИ ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ

Аннотация. При целенаправленном введении в кровотоки пациента наночастиц оксида железа Fe_2O_3 для целей диагностики и терапии заболеваний может возникать взаимодействие наночастиц с эритроцитами, что может приводить к изменениям как микро-реологических свойств отдельных клеток. Методами лазерной дифрактометрии и агрегометрии проведены исследования на пробах крови человека по влиянию наночастиц железа Fe_2O_3 без и с порфирином на поверхности в концентрациях от 0 до 1000 мкг/мл на деформационные и агрегационные параметры эритроцитов. Концентрации до 100 мкг/мл не оказывают влияние на деформируемость эритроцитов, а добавление НЧ в кровь замедляет агрегацию эритроцитов. С использованием флуоресцентной

© Луговцов А.Е., Тучин В.В., Переведенцева Е.В., Ч.-Л. Ченг, Приезжев А.В., 2022

микроскопии показано, что присутствие наночастиц в образцах крови приводит к их адсорбции на поверхности мембраны эритроцитов.

Ключевые слова: агрегация и деформируемость эритроцитов, лазерная аргеометрия и дифрактометрия, наночастицы оксида железа.

Lugovtsov A.E., Tuchin V.V., Perevedentseva E.V., Cheng C.-L., Priezzhev A.V.

MICROREOLOGICAL PARAMETERS OF HUMAN ERYTHROCYTES AND THEIR CHANGES UNDER BLOOD INCUBATION WITH Fe₂O₃ NANOPARTICLES PROMISING FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

Abstract. With the targeted administration of Fe₂O₃ iron oxide nanoparticles into the bloodstream for a diagnostic and treatment reasons, the interaction of nanoparticles with red blood cells may occur, which can lead to changes the microrheological properties of individual cells. The laser diffractometry and aggregometry techniques were used to study the effect of Fe₂O₃ iron oxide nanoparticles without and with porphyrin surface functionalization at concentrations from 0 to 1000 µg/ml on the deformation and aggregation parameters of red blood cells in human blood samples. Concentrations up to 100 µg/ml do not affect the deformability of erythrocytes, and the addition of NPs to the blood decrease red cells aggregation. Fluorescence microscopy technique demonstrate that the presence of nanoparticles in blood samples leads to their adsorption on the membrane surface.

Key words: aggregation and deformability of erythrocytes, laser argeometry and diffractometry, iron oxide nanoparticles.

ВВЕДЕНИЕ

При целенаправленном введении в кровоток пациента наночастиц (НЧ) оксида железа Fe₂O₃ для целей диагностики и терапии заболеваний может возникать взаимодействие НЧ с белками плазмы крови, мембранами эритроцитов а также внутреннем содержимым эритроцитов. Это взаимодействие может приводить к изменениям как микро-реологических свойств отдельных клеток, так и реологии крови в отдельно взятом образце (*in vitro*), а также непосредственно в живом организме (*in vivo*). Изменение реологии крови на микро- и на макроуровнях часто являются причиной и

следствием многочисленных сосудистых заболеваний и даже причиной смертности. Положительный эффект от использования НЧ должен превышать возможный вред, который может быть нанесен пациенту при использовании НЧ. Поэтому всестороннее и комплексное исследование безопасности НЧ оксида железа должно предшествовать их применению в медицинских целях.

В этой связи, данная работа была направлена на исследование влияния НЧ оксида железа Fe_2O_3 на реологию крови. Данный тип частиц считается перспективным для использования при фотодинамической терапии опухолей [1]. Покрытие частиц порфирином и его производными может увеличить качество терапии онкологических заболеваний, так как порфирин обладает высоким сродством к раковым клеткам, а также избирательно фотосенсибилизирует их. Благодаря этому локальное воздействие лазерного излучения приводит к редукции опухолевой ткани [2, 3].

Основной целью работы было проведение серии экспериментов по изучению *in vitro* влияния частиц Fe_2O_3 без и с функционализацией поверхности порфирином в различных концентрациях на микрореологические свойства цельной крови и эритроцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все измерения на образцах цельной крови человека, их инкубация с НЧ в различных концентрациях, измерения на суспензии эритроцитов были выполнены *in vitro*. Измерения микрореологических параметров эритроцитов проводились методами лазерного диффузного рассеяния света (лазерная агрегометрия) и лазерной дифрактометрии. Для этих целей использовался лазерный деформометр-агрегометр эритроцитов Реоскан (RheoScan-AnD300) компании Реомедитех (Республика Корея) [4-5].

Метод лазерной дифрактометрии основан на регистрации дифракционных картин от тонкого слоя сильноразбавленной суспензии эритроцитов присутствии сдвигового потока. По изменению формы дифракционной картины можно судить о способности клеток деформироваться. Данная методика позволяет получить зависимость индекса деформируемости DI (эксцентриситет эллипса линии изоинтенсивности - уровня одинаковой интенсивности – на дифракционной картине) от сдвигового напряжения потока. Чем больше индекс деформируемости, тем способность клеток крови изменять свою форму больше.

Метод лазерной агрегометрии основан на регистрации кинетики диффузного рассеяния света от слоя цельной крови. По полученной кинетике – зависимости от времени интенсивности света рассеянного вперед от слоя цельной крови – можно определять критическое сдвиговое напряжение (critical shear stress - CSS), характеризующие прочность эритроцитарных агрегатов, а также характерное время агрегации эритроцитов ($T_{1/2}$) и индекс их агрегации (AI), характеризующий относительное число эритроцитов проагрегировавших в первые 10 сек процесса спонтанной агрегации. Чем выше значение AI и ниже $T_{1/2}$, тем агрегация эритроцитов в образце цельной крови больше.

Для изучения взаимодействия между НЧ и эритроцитами, а именно для изучения сорбции на мембране и внутриклеточного проникновения, были проведены эксперименты с использованием метода флуоресцентной лазерной конфокальной микроскопии. Для этого была использована система Nikon A1R (Япония), и флуоресцентный сигнал был обнаружен как от порфирин-функционализированных частиц, так и от эндогенных флуорофоров эритроцитов.

Все измерения микрореологических параметров эритроцитов, их инкубация с НЧ проводились в течение первых 2-х часов после забора крови у добровольцев. Все пробы крови были стабилизированы антикоагулянтом ЭДТА, что позволило избежать свертываемости крови во время эксперимента. Инкубация и измерения проводились при температуре 37°C, что соответствует физиологическим условиям в организме человека. Доноры крови были в полной мере информированы об исследованиях и понимали цель исследований, ожидаемые результаты. Все добровольцы подписали добровольное согласие на взятие у них крови и проведение испытаний.

Известно, что НЧ легко образуют агрегаты с размерами в несколько раз больше их собственного. В этой связи, сразу перед инкубацией НЧ с эритроцитов мы разбивали суспензию НЧ в буферном растворе с помощью лабораторного шейкера в течении 3 мин, а затем с помощью УЗ-ванны Codyson CD-4820 мощностью 70 Вт на протяжении 5 мин. Эти манипуляции помогали нам избавиться от агрегатов частиц в исследуемых образцах.

Всего было выделено 7 экспериментальных групп крови: цельная кровь (контрольная группа), кровь инкубированная с не

покрытыми порфирином НЧ Fe_2O_3 в концентрациях 33, 100 и 100 мкг/мл, кровь инкубированная с покрытыми порфирином НЧ Fe_2O_3 в концентрациях 33, 100 и 100 мкг/мл. В каждой экспериментальной группе было исследовано по 10 образцов крови. Экспериментальные данные были статистически обработаны с использованием программного обеспечения Statistica. Для анализа использовался непараметрический статистический Т-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В экспериментах, проведенных методом лазерной дифрактометрии, было показано, что 45 минутная инкубация эритроцитов с покрытыми и непокрытыми порфирином НЧ Fe_2O_3 приводит к не большим (статистически не значимым $p > 0,05$) изменениям в деформируемости эритроцитов (зависимости индекса деформируемости от напряжения сдвига). Данные зависимости приведены на рисунке 1.

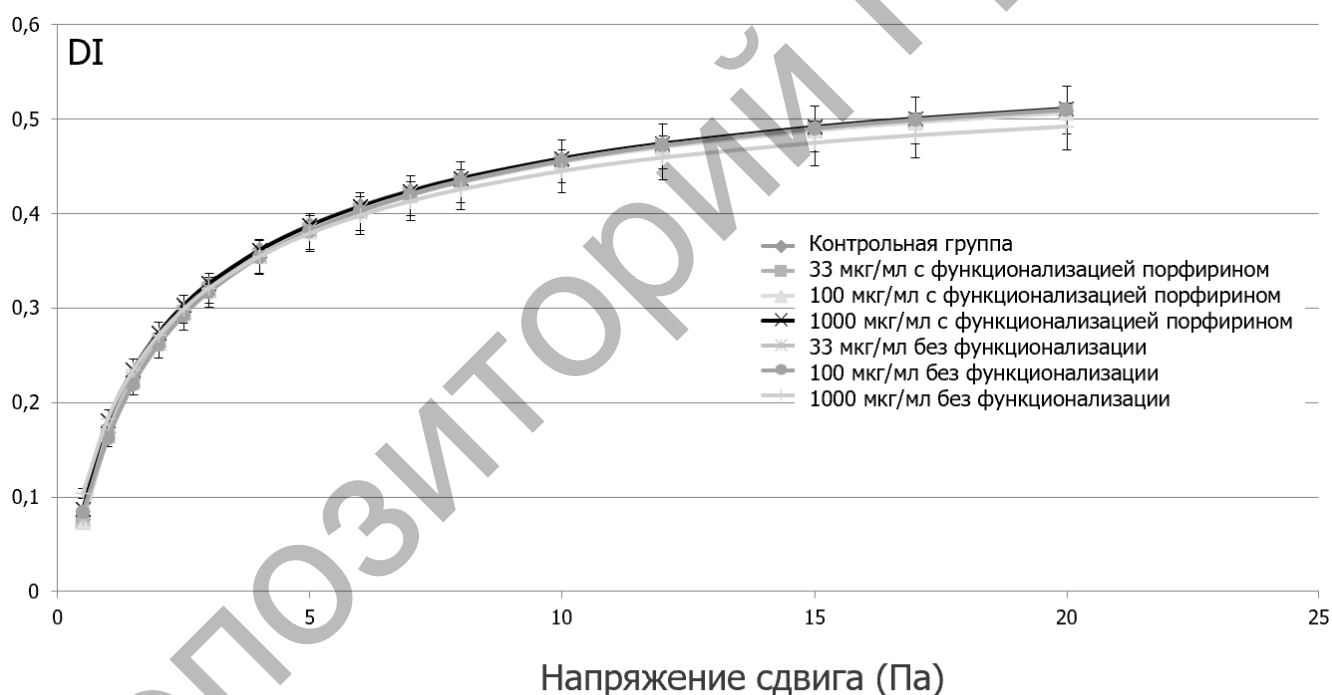


Рис. 1. Зависимость индекса деформируемости эритроцитов от сдвигового напряжения без и после 45 минутной инкубации крови с частицами Fe_2O_3 в различной концентрации. Изменения достоверно не значимо отличаются ($p > 0.05$) от контроля.

В экспериментах, проведенных методом лазерной агрегометрии, было показано, что 45 минутная инкубация эритроцитов с покрытыми и непокрытыми порфирином НЧ Fe_2O_3 приводит к значительным статистически значимым изменениям агрегационной

кинетики ($p < 0,05$). Способность эритроцитов агрегировать ухудшалась с возрастанием концентрации НЧ оксида железа (покрытых и непокрытых порфирином). Так было показано, что характерное время образования агрегатов эритроцитов $T_{1/2}$ возрастает на $13 \pm 4\%$, $80 \pm 11\%$ and $115 \pm 19\%$ при концентрациях 33 мкг/мл, 100 мкг/мл и 1000 мкг/мл НЧ Fe_2O_3 функционализированных порфирином по сравнению с контрольной группой (кровь без НЧ, чистая цельная кровь). Похожие результаты были получены для не покрытых порфирином НЧ: увеличение $T_{1/2}$ на $5 \pm 3\%$, $19 \pm 8\%$, $159 \pm 18\%$ (см. рис. 2).

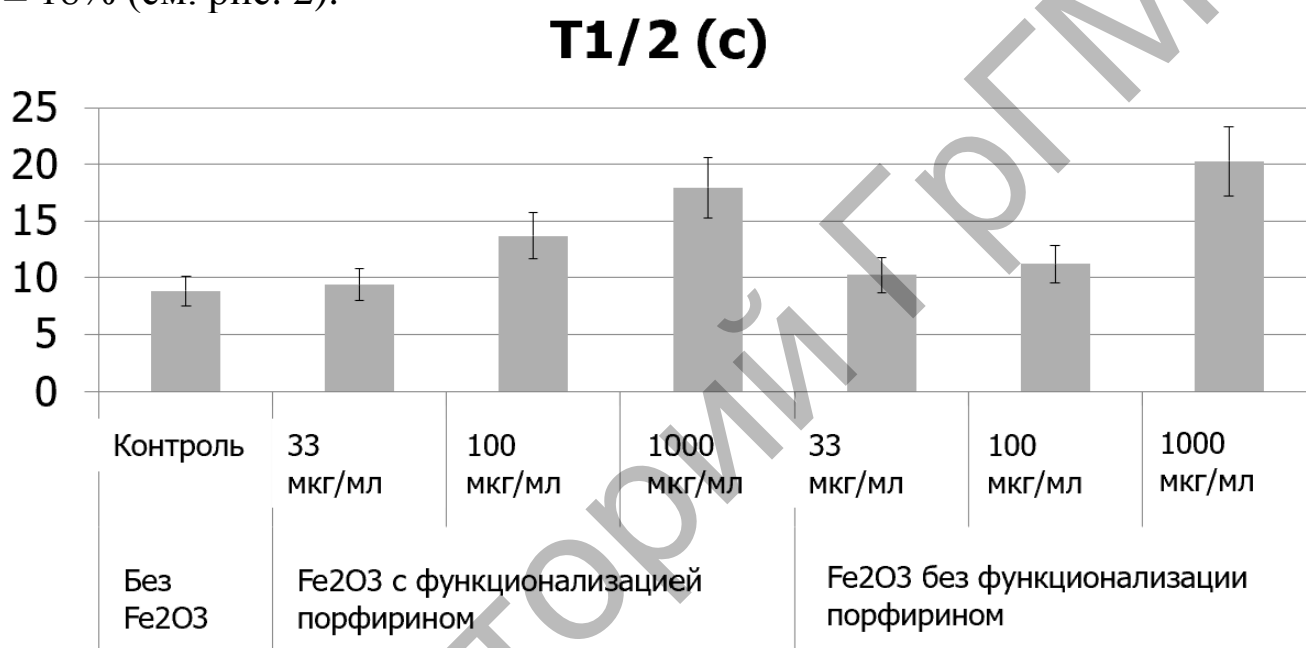


Рис. 2. Характерное время образования агрегатов эритроцитов без и после 45 минутной инкубации крови с частицами Fe_2O_3 в различной концентрации. Изменения достоверно значимы ($p < 0.05$) по сравнению с контролем.

Индекс агрегации (AI) эритроцитов достоверно уменьшался на $3 \pm 2\%$, $11 \pm 8\%$, $23 \pm 11\%$ для случая НЧ с порфирином и $2 \pm 1\%$, $7 \pm 4\%$, $30 \pm 14\%$ для чистых частиц Fe_2O_3 при концентрациях 33 мкг/мл, 100 мкг/мл и 1000 мкг/мл соответственно (см. рис. 3). Изменения агрегации (замедление скорости агрегации и уменьшение доли агрегированных частиц) были тем больше, чем больше концентрации НЧ. При одинаковых концентрациях изменения более выражены для не покрытых порфирином НЧ.

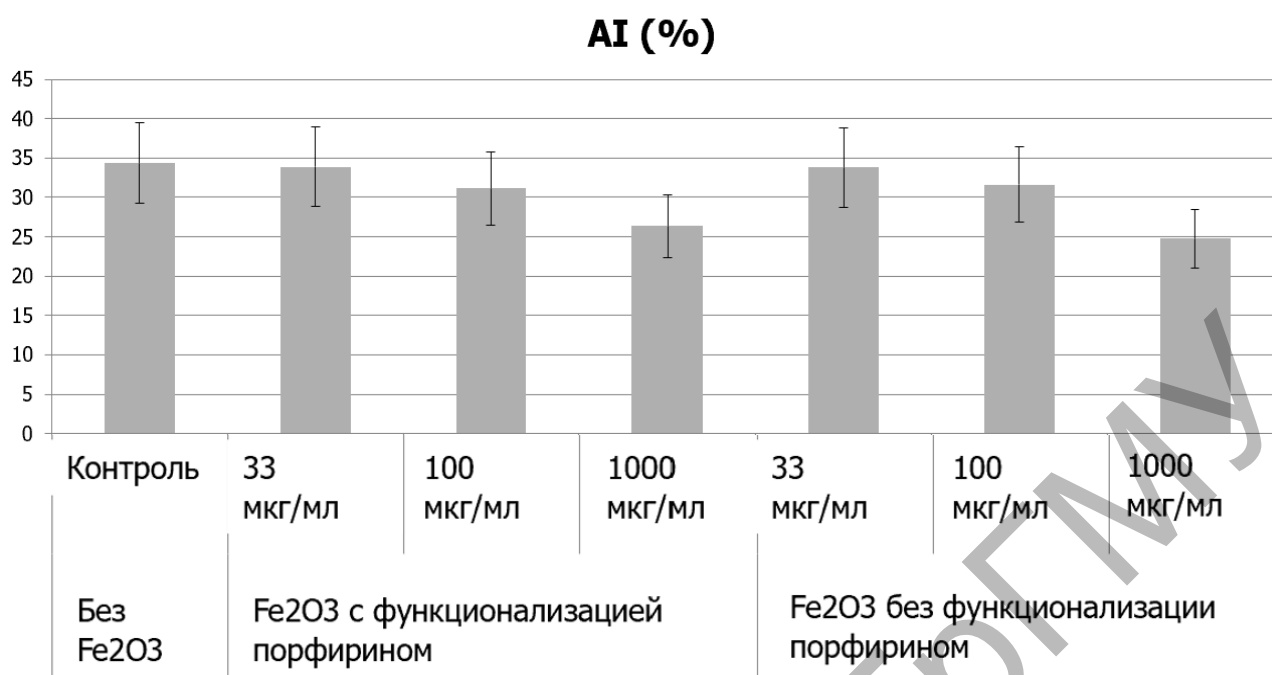


Рис. 3. Индекс агрегации (AI) крови без и после 45 минутной инкубации крови с частицами Fe_2O_3 в различной концентрации. Изменения достоверно значимы ($p < 0.05$) по сравнению с контрольной группой.

Было показано, что гидродинамическая прочность агрегатов (критическое сдвиговое напряжение – CSS) достоверно уменьшалось на 15-62% в зависимости от типа частиц и их концентрации (рис. 4).

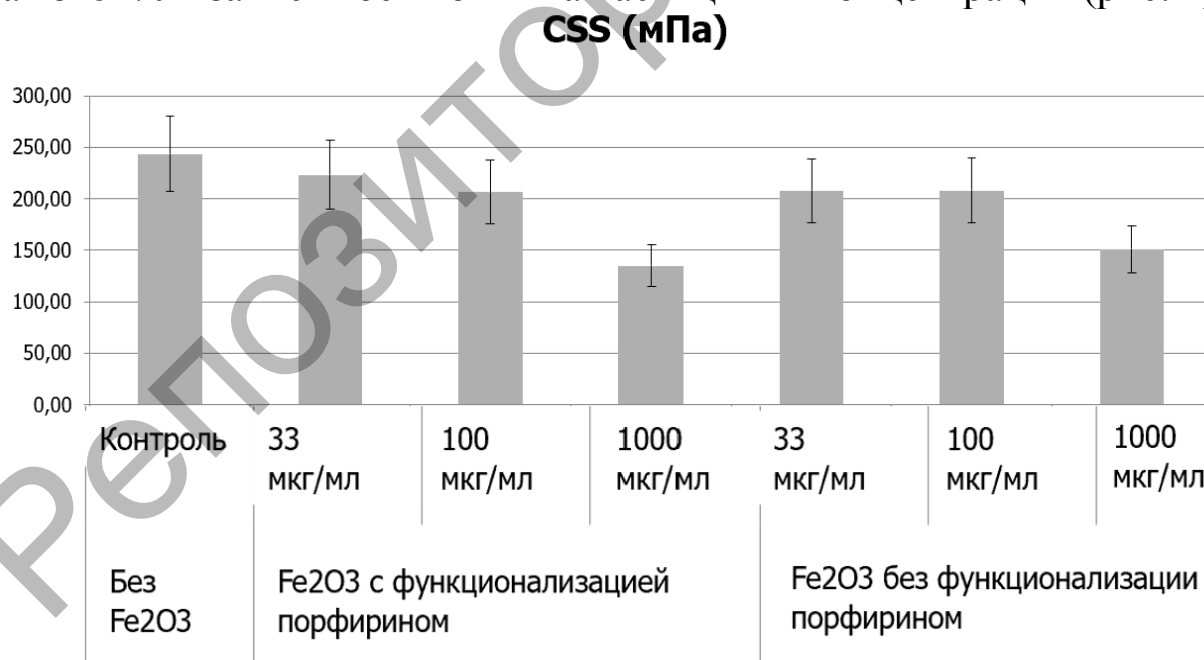


Рис. 4. Гидродинамическая прочность – CSS агрегатов эритроцитов без и после 45 минутной инкубации крови с частицами Fe_2O_3 в различной концентрации. Изменения достоверно значимы ($p < 0.05$) по сравнению с контрольной группой

На рисунке 5 представлено изображение, полученное методом флуоресцентной лазерной конфокальной микроскопии. По полученному от НЧ флуоресцентному сигналу видно, что НЧ оксида железа адсорбируются на мембране эритроцитов, что и приводит к изменению свойств эритроцитов агрегировать.



Рис. 5. Двухфотонная флуоресцентная визуализация суспензии эритроцитов инкубированной с НЧ Fe₂O₃.

Основываясь на полученных данных, можно сделать вывод о том, что НЧ оксида железа являются антиагрегантами, и их антиагрегационный эффект растет с концентрацией и более выражен для покрытых порфирином частиц. Принимая во внимание полученные результаты, можно сделать вывод о том, что введение НЧ Fe₂O₃ при соответствующих условиях и концентрациях ниже 100 мкг/мл не приведет к существенным изменениям микрореологических параметров и осложнениям в реологии крови.

Однако, необходим контроль микрореологических параметров при использовании НЧ оксида железа в медицинских применениях.

ВЫВОДЫ

Наночастицы Fe_2O_3 можно вводить в кровь в условиях окружающей среды при низких концентрациях (33 мкг/мл). Такие концентрации не приводят к существенным изменениям микрореологических параметров эритроцитов и не сказываются на микрореологии крови.

Исследование выполнено в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина» и при финансовой поддержке гранта РНФ № 20-45-08004.

Библиографический список

1. Куликова М., Кочубей В.И. Синтез и оптические свойства наночастиц оксида железа для фотодинамической терапии // Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 4(4), 206-209 (2012).
2. Petrov P.O. Photodynamic action on microorganisms using Fe_2O_3 nanoparticles and LED blue (405 nm) light // Proceeding of SPIE: Mechanisms of Low-Light Therapy VII, v. 8211, 82110L (2012).
3. Тучина Е.С. Фотодинамическое воздействие на микроорганизмы с использованием синего (405 нм) излучения и наночастиц оксида железа (III) // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия, биология, экология, 12(1), 61-66 (2012).
4. Baskurt O.K. et al. Comparison of three instruments for measuring red blood cell aggregation // Clin. Hemorheol. Microcirc., 43(4), 283-298 (2009).
5. Shin S., Hou J., Suh J., Singh M. Validation and application of a microfluidic ektacytometer (RheoScan-D) in measuring erythrocyte deformability // Clin. Hemorheol. Microcirc., 37(4), 319-328 (2007).

К.Н. Корнеев, П.Б. Ермолинский, А.Е. Луговцов, А.В. Приезжев

**СРАВНЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ФИБРИНОГЕНА
И ГАММА-ГЛОБУЛИНА НА АГРЕГАЦИЮ
ЭРИТРОЦИТОВ IN VITRO**

Аннотация. В работе исследовано отдельное влияние белков гамма-глобулина и фибриногена при их различных концентрациях в венозной крови человека на параметры агрегации эритроцитов с помощью лазерного пинцета и метода лазерной агрегометрии. Показано, что измеренные с помощью лазерного пинцета агрегационные параметры изменяются в зависимости от концентрации белков в крови: агрегация повышается с увеличением концентрации как фибриногена, так и гамма-глобулина, при этом влияние фибриногена на агрегацию оказывается сильнее, чем гамма-глобулина.

Ключевые слова: Агрегация эритроцитов, фибриноген, гамма-глобулин, лазерный пинцет, лазерная агрегометрия.

Korneev K.N., Ermolinsky P.B., Lugovtsov A.E., Priezzhev A.V.

**COMPARISON OF THE EFFECT OF FIBRINOGEN
AND GAMMA GLOBULIN ON RED BLOOD CELLS
AGGREGATION IN VITRO**

Abstract. The separate effect of gamma globulin and fibrinogen proteins in different concentrations in venous human blood on the parameters of red blood cells aggregation was investigated using laser tweezers and laser aggregometry techniques. It is shown that the aggregation parameters measured using laser tweezers vary depending on the concentration of proteins in the blood: aggregation increases with increasing concentrations of both fibrinogen and gamma globulin, while the effect of fibrinogen on aggregation is stronger than that of gamma globulin.

Keywords: red blood cells aggregation, fibrinogen, gamma globulin, laser tweezers, laser aggregometry.

ВВЕДЕНИЕ

Эритроциты в крови человека и животных в разной степени способны самопроизвольно образовывать линейные или более сложные структуры - трехмерные агрегаты. Агрегация эритроцитов (АЭ) существенным образом влияет на вязкость крови, что, в свою очередь, влияет на процесс течения крови в организме.

Процесс образования и разрушения таких структур называется АЭ и дезагрегацией эритроцитов. Механизм АЭ изучен не полностью и на данный момент нет четкого понимания почему эритроциты агрегируют. Однако, существуют две модели, с помощью которых можно описать взаимодействие эритроцитов, и, следовательно, механизм АЭ. В первой модели утверждается, что АЭ происходит из-за сил, вызванных адсорбцией макромолекул, растворённых в окружающей среде, на мембране клеток, которые при сближении эритроцитов образуют "мостики". В случае, когда силы со стороны мостиков становятся больше сил отталкивания отрицательно заряженных эритроцитов, происходит их агрегация. Вторая модель утверждает, что вблизи эритроцитов образуются слои с меньшим содержанием макромолекул, чем в целом в среде. Это приводит к появлению осмотических сил, которые вызывают АЭ [1].

Известно, что параметры и свойства АЭ зависят от множества факторов, например, от состава плазмы крови, в частности, от концентрации гамма-глобулина и фибриногена. При нормальных физиологических условиях концентрация в крови этих белков находится в пределах 5–10 мг/мл и 2–4 мг/мл соответственно, однако при некоторых заболеваниях их концентрация может принимать сильно повышенные значения.

Данная работа является продолжением нашей предыдущей работы [2], в которой рассматривалось влияние только гамма-глобулина в различных концентрациях на параметры АЭ.

В работе [3] были проведены эксперименты по определению степени влияния фибриногена на АЭ. Было показано, что концентрация фибриногена существенным образом влияет на АЭ и данный белок является проагрегантом. Однако методы, которые были использованы в работе [3], отличаются от наших.

Цель данной работы – сравнить влияние гамма-глобулина и фибриногена в различных концентрациях на агрегационные свойства эритроцитов.

МЕТОДИКА

В работе для оценки агрегационных свойств эритроцитов мы использовали два оптических метода – оптический пинцет и лазерную агрегометрию. Оптический пинцет — это прибор для захвата одиночных диэлектрических микрочастиц в оптическую ловушку и манипулирования ими. Оптическая ловушка представляет собой область перетяжки остросфокусированного лазерного пучка. Принцип работы лазерного пинцета основан на использовании сил, действующих на исследуемую частицу со стороны лазерного пучка. Полная сила, действующая на объект в точке захвата, имеет две составляющие: F_{scat} направлена вдоль переноса энергии в пучке света, и F_{grad} направлена вдоль градиента интенсивности света. Захват частицы возможен в случае, когда градиентная сила F_{grad} больше рассеивающей силы F_{scat} , поэтому для захвата частицы нужно создать такие условия, чтобы соотношение $F_{\text{grad}} > F_{\text{scat}}$ выполнялось [4].

Образец, который использовался для измерений, представлял собой суспензию отмытых эритроцитов, сильно разбавленную аутологичной плазмой, обедненной тромбоцитами. После отделения плазмы от осевших тромбоцитов эритроциты разводились в полученной плазме без тромбоцитов в соотношении 1:1000. Далее, производилось добавления белков гамма-глобулина и фибриногена в образец для достижения различных концентраций этих белков в плазме крови. Повышение концентрации белков происходило независимо: при увеличении концентрации одного, концентрация второго оставалась неизменной и была на уровне нормального физиологического значения.

После помещения суспензии в кювету, образованную предметным и покровным стеклами, с толщиной зазора между ними порядка 100 мкм, она помещалась под объектив. Далее следовала фокусировка объектива на дно кюветы, на котором оседали эритроциты. Затем, путем перемещения предметного столика два эритроцита захватывались в независимые оптические ловушки. В эксперименте измерялись три характерных параметра АЭ: время АЭ – время, начинающееся с момента контакта двух эритроцитов и заканчивающееся моментом образования парного агрегата; сила АЭ – минимальная величина силы оптического захвата, которая способна предотвращать агрегацию эритроцитов при их контакте; сила дезагрегации эритроцитов – минимальная величина силы, которая необходима для разделения агрегата.

Измерения микрореологических свойств крови проводились с помощью метода лазерной агрегометрии, реализованного с помощью прибора Rheoscan (RheoMedTekh, Rep. of Korea). Этот метод [5] основан на методе диффузного рассеяния света. В эксперименте измерялся параметр CSS (critical shear stress) - минимальное напряжение сдвига, необходимое для диспергирования агрегатов. Образцы венозной крови были взяты натошак из кубитальной вены здорового донора и стабилизированы ЭДТА для предотвращения свертывания крови. После этого были подготовлены образцы с различными концентрациями гамма-глобулина и фибриногена. Все эксперименты проводились в течение 2 часов после взятия крови.

Были проведены эксперименты на образцах цельной крови с концентрациями гамма-глобулина равными 4.2, 9.2, 14.2 и 19.2 мг/мл и с концентрациями фибриногена - 2.8, 5.8 и 10.8 мг/мл. Приведенные концентрации – результат сложения начальной концентрации белка в плазме крови с добавочной.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Измерения проводились на крови здорового донора (исходная концентрация гамма-глобулина – 4,2 мг/мл, фибриногена – 2,8 мг/мл). Было проведено 7 измерений сил агрегации эритроцитов и дезагрегации эритроцитов на разных парах эритроцитов, 5 измерений времени агрегации и CSS.

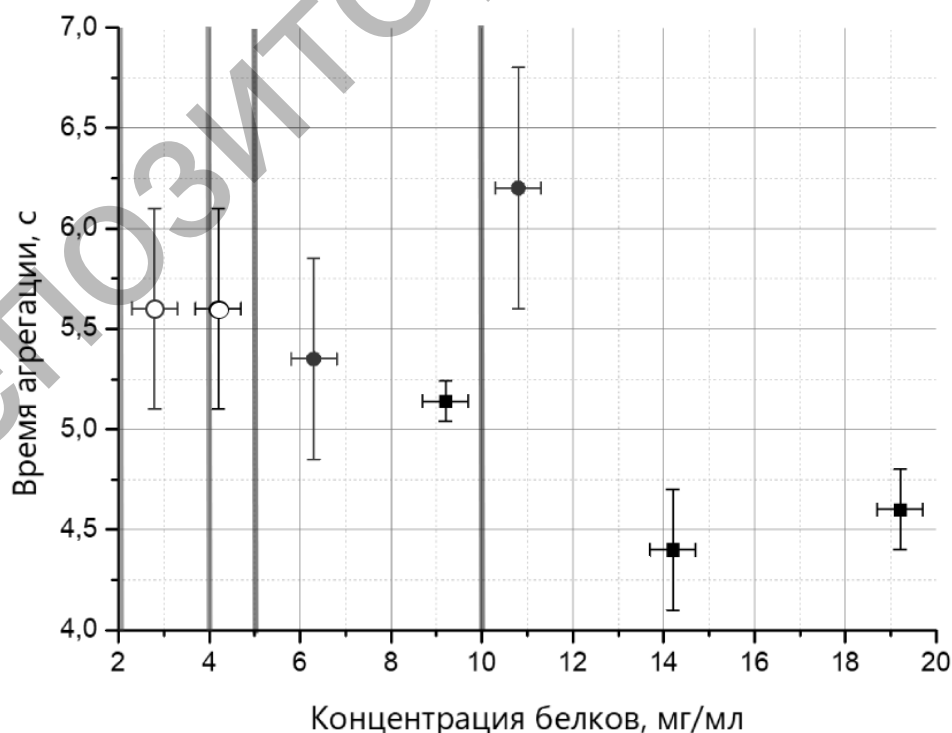


Рис.1: Зависимость времени агрегации эритроцитов (ТА) от концентрации белков (красные линии – границы физиологической

нормы для концентрации фибриногена, черные линии – для концентрации гамма-глобулина, красное кольцо – начальное значение ТА для исходной концентрации фибриногена, черное – для исходной концентрации гамма-глобулина, красные кружки – значения ТА для разных концентраций фибриногена, черные квадраты – для разных концентраций гамма-глобулина).

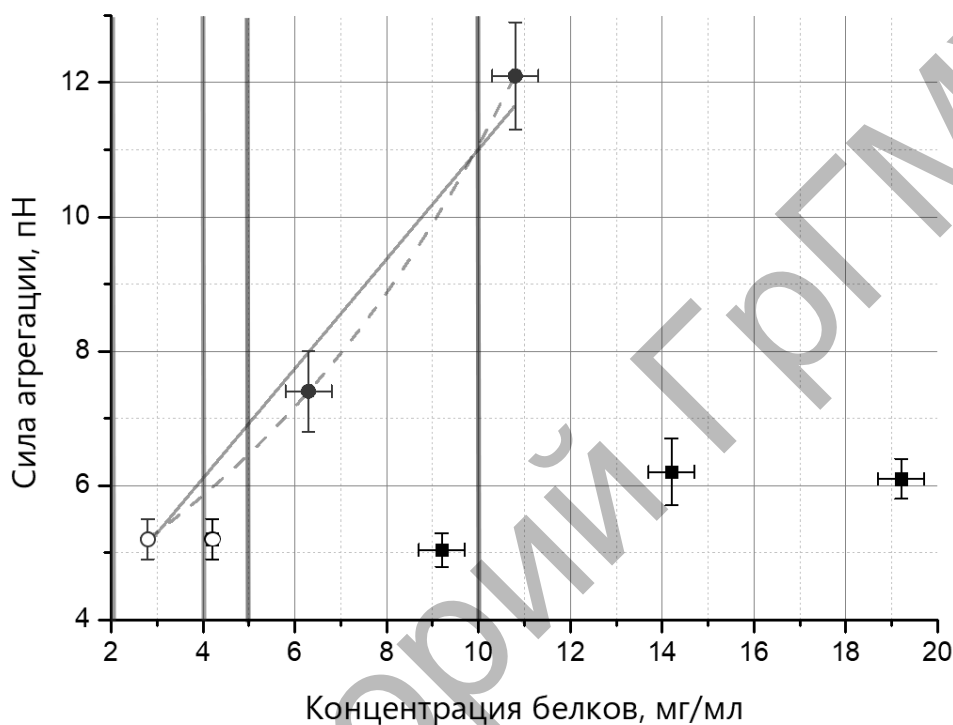


Рис.2: Зависимость силы агрегации эритроцитов (ФА) от концентрации белков (красные линии – границы физиологической нормы для концентрации фибриногена, черные линии – для концентрации гамма-глобулина, красное кольцо – начальное значение ФА для исходной концентрации фибриногена, черное – для исходной концентрации гамма-глобулина, красные кружки – значения ФА для разных концентраций фибриногена, черные квадраты – для разных концентраций гамма-глобулина).

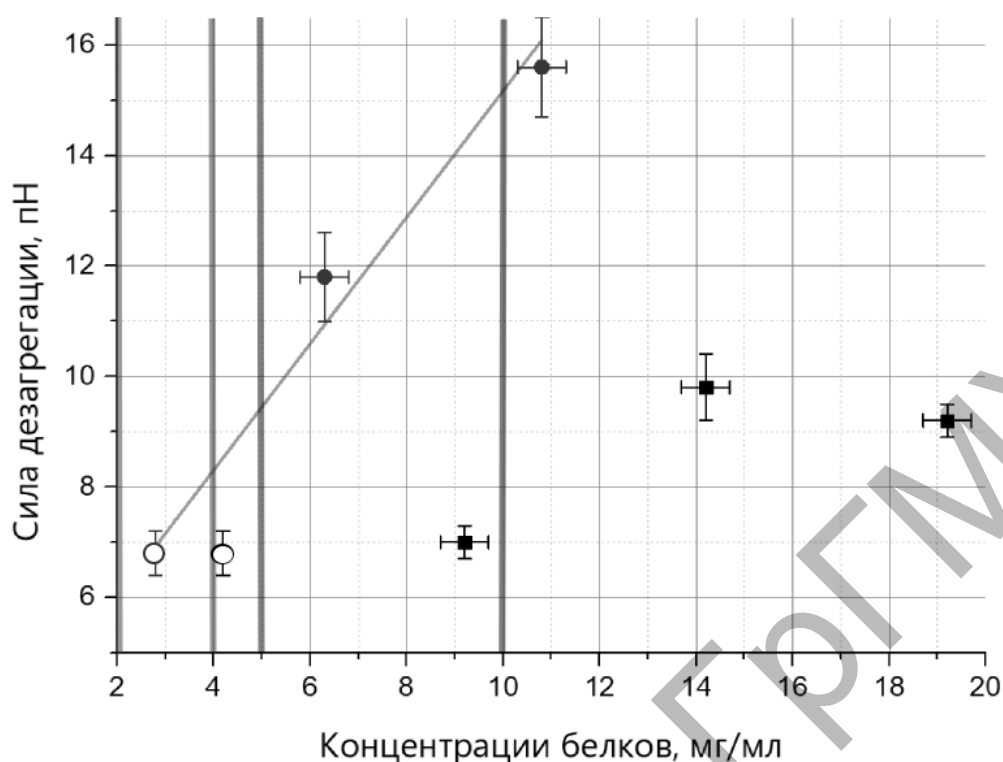


Рис.3: Зависимость силы дезагрегации эритроцитов (FD) от концентрации белков (красные линии — границы физиологической нормы для концентрации фибриногена, черные линии — для концентрации гамма-глобулина, красное кольцо — начальное значение FD для исходной концентрации фибриногена, черное — для исходной концентрации гамма-глобулина, красные кружки — значения FD для разных концентраций фибриногена, черные квадраты — для разных концентраций гамма-глобулина)

Было показано, что при нормальных физиологических концентрациях гамма-глобулина параметры АЭ (рис. 1, 2 и 3) статистически значимо не изменяются. Однако, при увеличении концентрации одного из белков, наблюдается статистически значимое увеличение параметров АЭ (рис. 1, 2 и 3). При сравнении влияния этих белков на АЭ было показано, что присутствие фибриногена в крови в повышенных концентрациях обладает более выраженным эффектом для повышения АЭ по сравнению с гамма-глобулином.

Основываясь на полученных результатах, можно сделать вывод, что гамма-глобулин и фибриноген проявляют себя в качестве белков проагрегантов эритроцитов сразу по нескольким параметрам АЭ, и их действие усиливается с увеличением их концентрации в плазме.

Исследование выполнено в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина» и при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22–15-00120.

Библиографический список

1. Meiselman H. et al., “Red blood cell aggregation”, CRC Press, Boca Raton, 2012.
2. Korneev K. et al., “Effect of blood plasma gamma globulin on erythrocytes aggregation in vitro: study by optical techniques”, Book of abstracts of International Symposium on Optics & Biophotonics within Saratov Fall Meeting (SMF-2021), Saratov, 27.09.2021-01.10.2021. <https://sfmconference.org/sfm/sfm21/workshops/optical-technologies-in-biophysics-medicine-xxiii/preliminary/1052/>
3. Ashkin A. et al., “Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles”, Optics Letters 11(5), 288-290, 1986.
4. Ronen Ben-Ami et al., “A synergistic effect of albumin and fibrinogen on immunoglobulin-induced red blood cell aggregation”, AJP Heart and Circulatory Physiology, 285, H2663–H2669, 2003.
5. Shin S. et al., “Measurement of erythrocyte aggregation in a microchip stirring system by light transmission”, Clinical Hemorheology and Microcirculation 41, 197–207, 2009.

УДК 535.8; 577.352.336; 577.325.3

Д.А. Умеренков, П.Б. Ермолинский, А.Е. Луговцов, А.В. Приезжев

ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ МИКРОРЕОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КЛЕТОК КРОВИ ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ ОПТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Аннотация. При сердечно-сосудистых заболеваниях, таких как артериальная гипертензия, могут изменяться микрореологические параметры, которые приводят к нарушению микроциркуляции крови. При использовании метода диффузного рассеяния света, а также турбидиметрического метода, основанного на исследовании изменений оптической плотности плазмы, было показано, что у пациентов с артериальной гипертензией способность эритроцитов и

© Д.А. Умеренков, П.Б. Ермолинский, А.Е. Луговцов, А.В. Приезжев, 2022

тромбоцитов агрегировать повышена по сравнению с контрольной группой.

Ключевые слова: агрегация, эритроциты, тромбоциты, артериальная гипертензия, лазерные методы

D.A. Umerenkov, P.B. Ermolinsky, A.E. Lugovtsov, A.V. Priezzhev
**ASSESSMENT OF CHANGES IN MICRORHEOLOGICAL
PARAMETERS OF BLOOD CELLS IN ARTERIAL
HYPERTENSION BY OPTICAL METHODS**

Abstract. In cardiovascular diseases, such as arterial hypertension, microrheological parameters may change, which lead to impaired blood microcirculation. When using the method of diffuse light scattering, as well as the turbidimetric method based on the study of changes in plasma optical density, it was shown that in patients with arterial hypertension, the ability of erythrocytes and platelets to aggregate is increased compared to the control group.

Keywords: aggregation, red blood cells, platelets, arterial hypertension, laser methods

Введение

Повышенная агрегация эритроцитов и тромбоцитов существенно изменяет вязкость крови, что влияет на процесс кровотока в организме. Оценка функции агрегации эритроцитов и тромбоцитов важна для мониторинга терапии различных социально-значимых заболеваний, в том числе артериальной гипертензии. Цель работы состояла в выявлении изменений параметров агрегации эритроцитов и тромбоцитов при артериальной гипертензии оптическими методами.

Материалы и методы

Агрегационные свойства эритроцитов исследовались с помощью метода лазерной агрегометрии, реализованного в приборе RheoScan AnD-300 (RheoMeditech, Корея). Этот метод, [1] основанный на регистрации кинетики диффузного рассеяния света от слоя цельной крови, также применялся в работе [2]. При измерениях использовалась цельная кровь, которая забиралась из локтевой вены у 50 пациентов с артериальной гипертензией и у 5 здоровых доноров. В качестве антикоагулянта использовался раствор ЭДТА КЗ.

Образец крови объемом 8 мкл помещали в кювету с плоским резервуаром, в котором с помощью магнитной мешалки создавалось сдвиговое напряжение, разрушающее агрегаты. Затем мешалку останавливали, и в резервуаре начинался процесс спонтанной агрегации эритроцитов, в ходе которого резервуар освещался лазерным пучком красного цвета (632 нм) и детектировалась интенсивность света, рассеянного вперед от слоя эритроцитов и их агрегатов. По полученной агрегационной кинетике определяли индекс агрегации (aggregation index - AI), характеризующий относительное количество клеток, проагрегировавших за 10 секунд в процентах.

Для измерения прочности образовавшихся эритроцитарных агрегатов использовались кюветы с двумя резервуарами объемом 0,5 мл, соединенными друг с другом микроканалом толщиной 0,2 мм. Канал освещался красным диодным лазером (632 нм) и регистрировалась интенсивность света, рассеянного назад от микроканала с кровью. В результате скачка давления начиналось течение крови, сопровождающееся как спонтанной агрегацией, так и преобладающей вначале сдвиговой дезагрегацией эритроцитов. По мере постепенного снижения давления между резервуарами в какой-то момент времени процесс агрегации эритроцитов становится более интенсивным по сравнению с их дезагрегацией, что приводит к уменьшению интенсивности света, рассеянного назад. Таким образом экстремум функции зависимости интенсивности света, рассеянного назад, от времени характеризует тот момент времени, когда процессы агрегации и дезагрегации уравниваются. Сдвиговое напряжение, соответствующее этому экстремуму, называют критическим сдвиговым напряжением (critical shear stress - CSS), характеризующим гидродинамическую прочность эритроцитарных агрегатов. На рис. 1 приведены диаграммы индекса агрегации эритроцитов и гидродинамической прочности агрегатов эритроцитов для контрольной группы и для группы с артериальной гипертензией. Видно увеличение агрегации эритроцитов и их прочности в случае артериальной гипертензии.

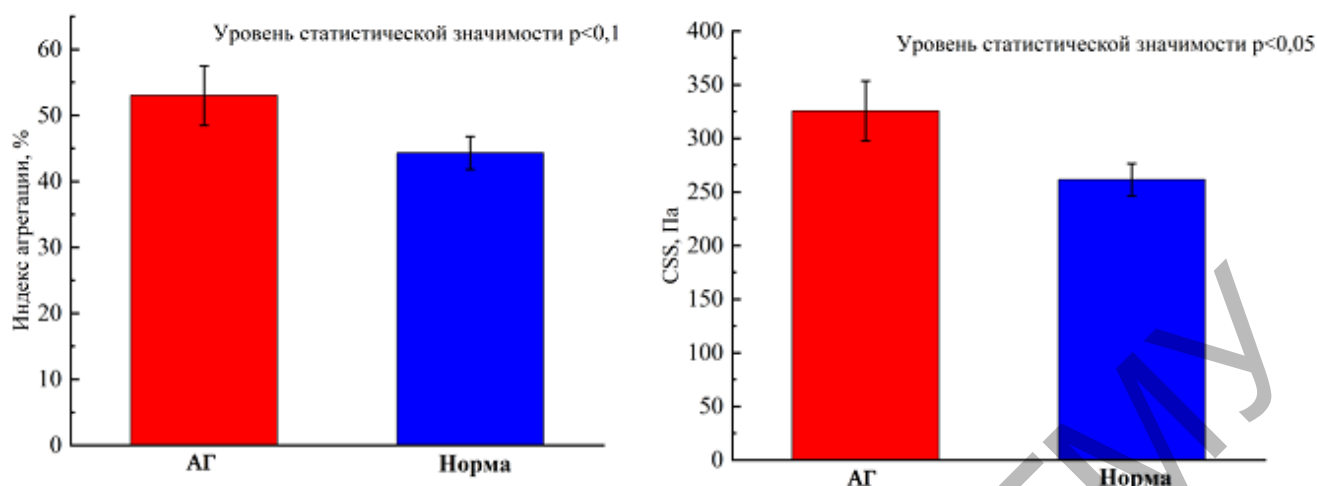


Рис. 1. Параметры агрегации эритроцитов при артериальной гипертензии и в норме

Параметры агрегации тромбоцитов оценивались по сигналу светорассеяния от суспензии этих клеток в плазме крови. Агрегометрию тромбоцитов, индуцированную аденозиндифосфатом (АДФ), проводили для обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП), регистрируя кинетику пропускания света. Венозную кровь для проведения экспериментов брали у 50 пациентов с артериальной гипертензией и у 5 здоровых доноров. В качестве антикоагулянта для исследования агрегации тромбоцитов использовался раствор цитрата натрия в концентрации 3,2%. Для приготовления ОТП цельную кровь центрифугировали в пробирках эппендорф при центростремительном ускорении 200g в течение 7 мин. Из каждой пробирки отбирали по 600 мкл супернатанта (верхний слой). Приготовленную для исследования ОТП переливали в измерительные кюветы в объеме 300 мкл. Через 10 секунд после начала измерения в измерительную кювету добавляли 15 мкл индуктора агрегации тромбоцитов АДФ в концентрации 5 мкМ или 1 мкМ. В процессе эксперимента при индуцированной агрегации тромбоцитов регистрировалась их агрегатограмма, по которой вычислялись параметры агрегации тромбоцитов. На графике отложены средние значения и среднеквадратичные отклонения. Видно, что агрегатограммы в норме и при артериальной гипертензии отличаются.

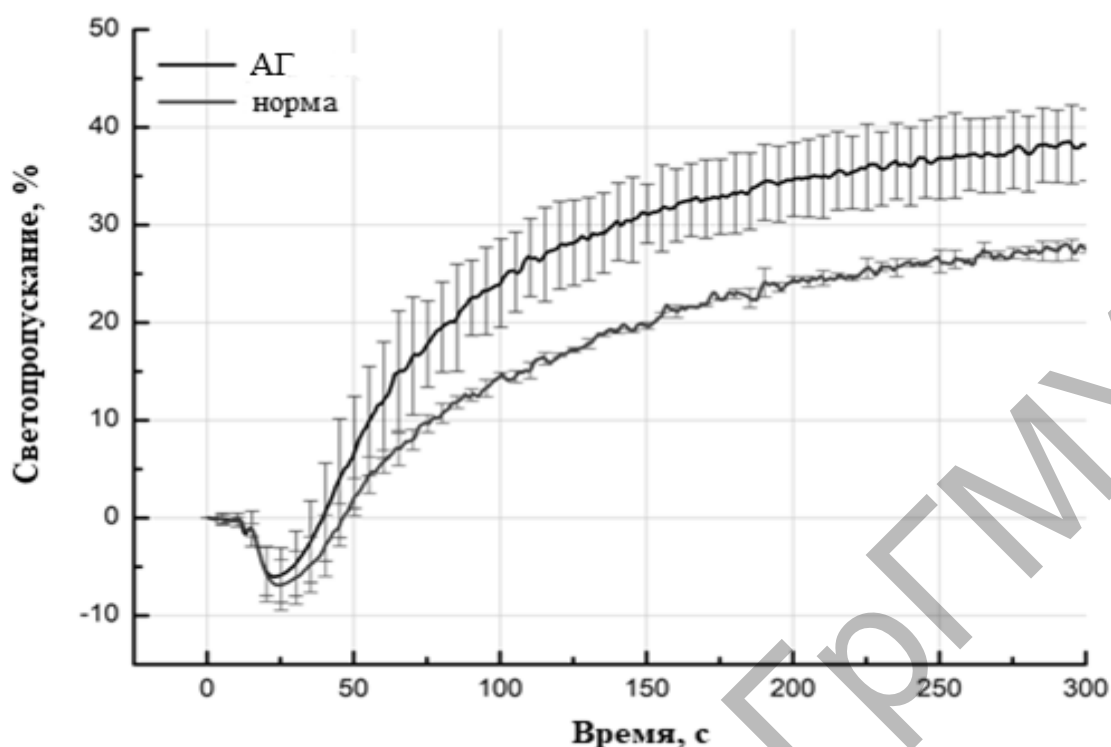


Рис. 2. Агрегатограмма тромбоцитов при артериальной гипертензии и в норме

Результаты и обсуждение

Результаты показывают, что AI и CSS у пациентов с артериальной гипертензией повышены по сравнению с контрольной группой (рис.1). Также результаты (рис.2) показывают, что у этих больных повышены степень и скорость агрегации тромбоцитов. Таким образом, можно сделать вывод, что при артериальной гипертензии изменяются микрореологические параметры сразу для двух разных клеток крови, и можно предположить, что эти изменения связаны между собой. При артериальной гипертензии и проведении терапии следует контролировать параметры агрегации эритроцитов и тромбоцитов с целью исключения рисков ухудшения микроциркуляции крови.

Исследование выполнено в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина» и при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-15-00120.

Библиографический список

1. Shin S., Yang Y., Suh J.-S. Measurement of erythrocyte aggregation in a microchip stirring system by light transmission. Clin. Hemorheol. Microcirc. 41(3). pp. 197-207 (2009).
2. Lugovtsov A. et al., «Optical assessment of alterations of microrheologic and microcirculation parameters in cardiovascular diseases», Biomed. Opt. Express 10(8), pp. 3974-3986 (2019).

Репозиторий ГРГМУ

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Акуленок Александр Владимирович – Республика Беларусь, к.м.н., доцент кафедры клинической фармакологии с курсом ФПК и ПК. Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет (ВГМУ). +375(29)-716-14-45, e-mail: alex.eagle78@gmail.com

Акулич Николай Васильевич – Республика Беларусь, 223040, г. Минск, а/г Лесной 31, УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория», +375(29)-366-37-92, e-mail: akulich_n@antidoping.by

Аль-Джебур Джаафар Шати Оваид – Республика Беларусь, г. Гродно, аспирант кафедры биохимии Гродненского государственного университета имени Я. Купалы, ул. Ожешко 22, +375(25)-698-09-00, e-mail: jaafarshati@gmail.com

Ахремчук Антон Игоревич – Республика Беларусь, врач-нейрохирург Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии (ул. Ф. Скорины, 24, 220114, г. Минск), +375(44)-546-93-53, e-mail: ahremen@mail.ru

Балла Александр Александрович – Республика Беларусь, заведующий отделения анестезиологии и реанимации № 1 УЗ «Гродненская университетская клиника», 230030, г. Гродно, Бульвар Ленинского комсомола, 52, +375(152)-43-62-30, e-mail: regclinic@mail.grodno.by

Белоус Юлия Ивановна – Республика Беларусь, старший преподаватель кафедры ОВП и поликлинической терапии, УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь, 230009, г. Гродно, ул. Горького, 80, +375(33)-654-43-98, mail: ivanowna@yandex.by

Билецкая Елена Степановна – аспирант, ассистент кафедры нормальной физиологии УО «Гродненский государственный медицинский университет». e-mail: biletskaya.e@inbox.ru.

Билецкая Елена Степановна – Республика Беларусь, г. Гродно, УО «Гродненский государственный медицинский университет», ул. Виленская 19, +375(29)-268-93-39, biletskaya.e@inbox.ru

Бонь Елизавета Игоревна – Республика Беларусь, г. Гродно, к.б.н., доцент кафедры патологической физиологии им. Д.А. Маслакова УО «Гродненский государственный медицинский университет», +375(33)-687-86-04, e-mail: asphodela@list.ru

Булаева Светлана Владимировна – канд. биол. наук, доцент кафедры спортивных дисциплин ФГБОУ ВО «ЯГПУ им. К.Д. Ушинского»

Булаева Светлана Владимировна – канд. биол. наук, доцент кафедры спортивных дисциплин ФГБОУ ВО «ЯГПУ им. К.Д. Ушинского», bulaevasw@yandex.ru

Водоевич Василий Петрович – Республика Беларусь, профессор 2-й кафедры внутренних болезней, д.м.н., 230011, г. Гродно, ул. Гагарина, д. 5, +375(29)-281-36-39, e-mail: vnutrbol2@gmail.com

Волкова Елена Леонидовна – аспирант кафедры медико-биологических основ спорта и теории физической культуры ФГБОУ ВО «ЯГПУ им. К.Д. Ушинского»

Волкова Елена Леонидовна – аспирант кафедры медико-биологических основ спорта и теории физической культуры ФГБОУ ВО «ЯГПУ им. К.Д. Ушинского», volkovaele-nal@mail.ru

Глуткин Сергей Викторович – Республика Беларусь, к.м.н., доцент кафедры нормальной физиологии УО «Гродненский государственный медицинский университет». 230009, Горького, 80, Гродно, +375(29)-786-41-78, e-mail: glutkin@mail.ru

Глуткина Наталья Викторовна – Республика Беларусь, г. Гродно, бульвар Ленинского Комсомола, 59, УЗ «Городская клиническая больница № 3 г. Гродно», +375(29)-785-08-72, e-mail: glutkina@mail.ru

Гуляй Ирина Эдвардовна – Республика Беларусь, к.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории УО «Гродненского государственного медицинского университета». 230009, Горького, 80, Гродно, +375(29)-283-78-45, e-mail: irinagulyai@gmail.com

Гуляй Ирина Эдвардовна – Республика Беларусь, канд. биол. наук, доцент, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской

лаборатории УО «Гродненского государственного медицинского университета», Гродно, +375(29)-283-78-45, e-mail: irinagulyai@gmail.com

Гурфинкель Юрий Ильич – зав. лабораторией Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, yugurf@yandex.ru

Гусаковская Э.В. – Республика Беларусь, Гродненский государственный университет, кафедра патологической физиологии им. Д.А. Маслакова, г. Гродно, ул. Горького, 80, 230009, +375(44)-596-61-56, e-mail: hirurg8700@mail.ru

Дашкевич Павел Александрович – Республика Беларусь, студент 2 курса УО «Гродненский государственный медицинский университет», +375(152)-62-16-05, e-mail: dpfizio@mail.ru

Доможилова Анна Александровна – кандидат биологических наук, доцент кафедры профилактической медицины и основ здоровья Национального государственного университета физической культуры, спорта и здоровья имени П. Ф. Лесгафта, Санкт-Петербург. Адрес: 190121, г. Санкт-Петербург, ул. Декабристов, д. 35. Телефон: (812) 495-02-78, e-mail: profmed@lesgaft.spb.ru.

Дорохин Константин Михайлович – Республика Беларусь, к.м.н., ассистент кафедры анестезиологии-реаниматологии УО «Гродненский государственный медицинский университет», 230009, г. Гродно, ул. Горького, 80, Беларусь, +375(33)-343-85-09, e-mail: dorokhin61@mail.ru

Дорохина Любовь Васильевна – Республика Беларусь, к.м.н., доцент кафедры нормальной физиологии УО «Гродненский государственный медицинский университет», 230009, г. Гродно, ул. Горького, 80, +375(152)-62-16-05, e-mail: dpfizio@mail.ru

Дремза Иосиф Карлович – Республика Беларусь, г. Гродно, доцент кафедры патологической физиологии им. Д.А. Маслакова УО «Гродненский государственный медицинский университет», 8(0152)-60-86-07, e-mail: mne@grsmu.by

Дрожжа С.Д. – Республика Беларусь, студент 3 курса педиатрического факультета ГрГМУ, Гродно, ул. Курчатова, 10/402, snezhanadrozhzha@yandex.by, +375297984469

Дячук Лариса Ивановна – зав. отделением Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, cardio-heart@yandex.ru

Ермолинский Петр Борисович – аспирант кафедры общей физики и волновых процессов, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, ermolinskiy.pb15@physics.msu.ru

Ермолинский Петр Борисович – аспирант МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, ermolinskiy.pb15@physics.msu.ru

Ермолинский Петр Борисович – аспирант МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, ermolinskiy.pb15@physics.msu.ru

Замышляев Андрей Владимирович – канд. мед. наук, доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России, dr.avz@mail.ru

Зинчук Виктор Борисович – зав. кафедрой, Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь, zinchuk@grsmu.by

Зинчук Виктор Владимирович – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии УО «Гродненский государственный медицинский университет». e-mail: zinchuk@grsmu.by.

Кежун Людмила Васильевна – Республика Беларусь, к.м.н., доцент кафедры ОВП и поликлинической терапии УО «ГрГМУ», доцент, УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь, 230009, г. Гродно, ул. Горького, 80, +375(29)-267-67-65, mail: kezhun.liudmila@yandex.by

Кислов Николай Викторович, канд. мед. наук., зам. главного врача областной онкологической больницы, г. Ярославль, пр. Октября, д.67, Ярославль, 7 (4852) 73-97-71, nikovik@mail.ru

Ковальчук-Болбатун Татьяна Викторовна – Республика Беларусь, аспирант, 2-я кафедра хирургических болезней, УО «Гродненский государственный медицинский университет». 230009, Горького, 80, Гродно, +375(29)-788-16-32, e-mail: 7881632@mail.ru

Козловский Владимир Иосифович – Республика Беларусь, зав. кафедрой факультетской терапии и кардиологии с курсом ФПК и ПК. Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет (ВГМУ) д.м.н., проф. +375(29)-593-41-47, e-mail: k_vlad@tut.by

Комлев Василий Леонидович - ассистент кафедры клинической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Ярославского государственного медицинского университета, olga2017@ysmu.ru

Корнеев Кирилл Николаевич – студент МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, kirill.corneew2017@yandex.ru

Косяк Устинья Николаевна – Республика Беларусь, студент 2 курса УО «Гродненский государственный медицинский университет», +375(152)-62-16-05, e-mail: dpfizio@mail.ru

Кошелев Владимир Борисович – докт. биол. наук, профессор, зав. кафедрой физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Кривонос Н.А. – Республика Беларусь, студент 3 курса медико-диагностического факультета ГрГМУ, Гродно, ул. Доватора, 25/331, krivonosik.n.a@mail.ru, +375292451337

Кузнецова Екатерина Александровна – аспирант кафедры медико-биологических основ спорта и теории физической культуры ФГБОУ ВО «ЯГПУ им. К.Д. Ушинского»

Кулага Елена Яновна – Республика Беларусь, г. Гродно, бульвар Ленинского Комсомола, 59, УЗ «Городская клиническая больница №3 г. Гродно», 8 (0152)-43-13-24, e-mail: regclinic@gosb.by

Лебедева Мария Сергеевна – студентка физического факультета, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия,

Лемехова Виктория Андреевна, врач-онколог областной онкологической больницы, г. Ярославль, пр. Октября, д.67, Ярославль, 7 (4852) 73-97-71

Лендоева Дарина Викторовна – студентка 5 курса Ярославского государственного медицинского университета (ЯГМУ) лечебного факультета, специальности «Медицинская биохимия».

Адрес: 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5. Тел.: (4852) 73-28-29. E-mail: auquel1002@yandex.ru.

Лещенок М.А. – Республика Беларусь, студент 3 курса педиатрического факультета ГрГМУ, Гродно, ул. Доватора, 25/507, leshenokmaks24@gmail.com, +375295857350

Луговцов Андрей Егорович – старший научный сотрудник кафедры общей физики и волновых процессов, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, anlug1@gmail.com

Луговцов Андрей Егорович – старший научный сотрудник кафедры общей физики и волновых процессов, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, anlug1@gmail.com

Луговцов Андрей Егорович – старший научный сотрудник кафедры общей физики и волновых процессов, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, anlug1@gmail.com

Лупеко П.Д. – Республика Беларусь, студент 3 курса медико-диагностического факультета ГрГМУ, Гродно, ул. Соломовой, 60, polinarezontova@mail.ru, +375291484195

Макоева Фатима Константиновна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры профилактической медицины и основ здоровья Национального государственного университета физической культуры, спорта и здоровья имени П. Ф. Лесгафта, Санкт-Петербург. Адрес: 190121, г. Санкт-Петербург, ул. Декабристов, д. 35. Телефон: (812) 495-02-78, e-mail: profmed@lesgaft.spb.ru.

Максимович Наталия Евгеньевна – Республика Беларусь, г. Гродно, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии им. Д.А. Маслакова УО «Гродненский государственный университет», +375(29)-867-25-53, e-mail: mne@grsmu.by

Малышева Юлия Викторовна, ассистент кафедры медицины ЯГПУ им. К.Д. Ушинского, 150000 г. Ярославль, ул. Республиканская, 108/1, (4852)726391,

Малышева Юлия Викторовна, ассистент кафедры медицины ЯГПУ им. К.Д. Ушинского, 150000 г. Ярославль, ул. Республиканская, 108/1, (4852)726391, yulichkinka@mail.ru

Маркова Анастасия Дмитриевна – Республика Беларусь, г. Гродно, студентка лечебного факультета УО «Гродненский государственный медицинский университет», 8(0152)-60-86-07, e-mail: mne@grsmu.by

Масленникова Юлия Львовна – канд. биол. наук, доцент, Рыбинская государственная авиационная технологическая академия имени П.А. Соловьева, maslennikova_j@mail.ru

Милош Татьяна Сергеевна – Республика Беларусь, УО «Гродненский государственный медицинский университет», кандидат медицинских наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии, ул. Горького 80, Гродно, 230009, 8(029)-354-35-68, e-mail: milashts@mail.ru

Михайлов Павел Валентинович – д.б.н., доцент кафедры медико-биологических основ спорта ФГБОУ ВО «ЯГПУ им. К.Д. Ушинского»

Муравьев Алексей Васильевич – д.б.н., профессор кафедры медико-биологических основ спорта ЯГПУ им. К.Д. Ушинского, 150000 г. Ярославль, ул. Республиканская, 108/1, (4852)728633, alexei.47@mail.ru

Муравьев Антон Алексеевич – канд. биол. наук, доцент ФГБОУ ВО «Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидов»

Нечипуренко Наталия Ивановна – Республика Беларусь, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии (ул. Ф. Скорины, 24, 220114, г. Минск), +375(29)-682-99-40, e-mail: prof_NIN@mail.ru

Никитин Сергей Юрьевич – доцент кафедры общей физики и волновых процессов физического факультета, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия, sergeynikitin007@yandex.ru

Орехов Сергей Дмитриевич – Республика Беларусь, к.м.н., доцент кафедры нормальной физиологии УО «Гродненский государственный медицинский университет», 230009, г. Гродно, ул. Горького, 80, +375(152)-60-86-07, e-mail: dpfizio@mail.ru

Орешкин Егор Сергеевич – студент 4 курса МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, eoresh@mail.ru

Осетров Игорь Александрович – канд. биол. наук, доцент ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского»

Остроумов Роман Сергеевич – ФГКВБОУ ВО «Ярославское высшее военное училище противовоздушной обороны»

Пашковская Ирина Дмитриевна – Республика Беларусь, канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии (ул. Ф. Скорины, 24, 220114, г. Минск), +375(29)-610-48-60, e-mail: irenapass@mail.ru

Переведенцева Елена Владимировна – старший научный сотрудник, Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН, Москва, Россия, perevedencevaev@lebedev.ru

Петроченко Александр Сергеевич, доцент кафедры фармакологии Ярославского государственного медицинского университета, 150000 г. Ярославль, ул. Революционная, 5, (4852)735633, asp.80@mail.ru

Петроченко Елена Петровна, доцент кафедры безопасности жизнедеятельности ЯГПУ им. К.Д. Ушинского, 150000 г. Ярославль, ул. Республиканская, 108/1, (4852)313941, ru

Приезжев Александр Васильевич – доцент кафедры общей физики и волновых процессов, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, avr2@mail.ru

Прокопенко Татьяна Анатольевна – Республика Беларусь, Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии (ул. Ф. Скорины, 24, 220114, г. Минск), +375(29)-508-17-41

Пронько Татьяна Павловна – Республика Беларусь, к.м.н., доцент, зав. кафедрой пропедевтики внутренних болезней УО «Гродненский государственный медицинский университет», г.

Гродно, ул. Горького, 80, 230009, +375-29-7-858-114,
tanya_pronko@mail.ru

Ранцевич П.И. – Республика Беларусь, студент 3 курса педиатрического факультета ГрГМУ, Гродно, ул. Курчатова, 10, 903Б, pasha_orange007@gmail.ru, +375444879111

Редькин Николай Андреевич – Республика Беларусь, студент 2 курса УО «Гродненский государственный медицинский университет», +375(152)-62-16-05, e-mail: dpfizio@mail.ru

Родцевич Анна Геннадьевна – Республика Беларусь, г. Гродно, студентка лечебного факультета УО «Гродненский государственный медицинский университет», 8(0152)-60-86-07, e-mail: mne@grsmu.by

Романова Анастасия Алексеевна – студент кафедры общей физики и волновых процессов, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, romanova.aa19@physics.msu.ru

Рудницкий Мирослав Конрадович – Республика Беларусь, заведующий оториноларингологическим отделением ГКБ № 2, 230011, г. Гродно, ул. Гагарина, д. 5

Семенов Алексей Николаевич – младший научный сотрудник, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, semenov@physics.msu.ru

Сергиевич Александр Владимирович – Республика Беларусь, 210009, г. Витебск, пр-т Фрунзе 29, УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», +375(29)-216-30-80, e-mail: sergievich-st@rambler.ru

Сидорович Рышард Ромуальдович – Республика Беларусь, д-р мед. наук, доцент, директор Республиканского научно-практического центра неврологии и нейрохирургии (ул. Ф. Скорины, 24, 220114, Минск)

Смирнова Анна Сергеевна – студентка 5 курса Ярославского государственного медицинского университета (ЯГМУ) лечебного факультета, специальности «Медицинская биохимия». Адрес: 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5. Тел.: (4852) 73-28-29. E-mail: smiranna1998@mail.ru

Снежицкий Виктор Александрович – Республика Беларусь, член-корр. НАН Беларуси, д.м.н., профессор, профессор 1-ой кафедры внутренних болезней УО «Гродненский государственный медицинский университет», г. Гродно, ул. Горького, 80, 230009, +375-152-68-71-10, vsnez@mail.ru

Стасевич Екатерина Владимировна – Республика Беларусь, студентка 5 курса УО «Гродненский государственный медицинский университет», 230009, г. Гродно, ул. Горького, 80, +375(152)-62-67-45, e-mail: pa@grsmu.by

Стемпковская Ольга Геннадьевна – Республика Беларусь, клинический ординатор кафедры пропедевтики внутренних болезней УО «Гродненский государственный медицинский университет», г. Гродно, ул. Горького, 80, 230009, propedvn@gmail.com

Степанова Юлия Игоревна – Республика Беларусь, канд. мед. наук, вед. научн. сотрудник НИЛ БелМАПО. (ул. П. Бровки, 3, кор. 3, 220013, г. Минск), +375(29)-190-43-95

Тихомирова Ирина Александровна – д.б.н., профессор, зав. кафедрой медицины ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского»

Тучин Валерий Викторович – профессор и зав. кафедрой оптики и биофотоники, Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия, tuchinvv@mail.ru

Умеренков Данила Алексеевич – студент кафедры общей физики и волновых процессов, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, kirill.corneew2017@yandex.ru

Фадюкова Ольга Евгеньевна – канд. биол. наук, старший преподаватель кафедры физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, olefa@hotmail.ru

Фатеев Михаил Михайлович – д.б.н., профессор, зав. кафедрой медицинской физики с курсом медицинской информатики Ярославского государственного медицинского университета (ЯГМУ). Адрес: 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5. Тел.: (4852) 73-28-29. E-mail: fateev52@mail.ru.

Харитоненко Татьяна Владимировна – Республика Беларусь, заведующий клинико-диагностической лаборатории, УЗ «Гродненская областная клиническая больница медицинской реабилитации», 230029, Гродно, ул. Коммунальная 2, gokbmr@gokbmr.by

Харук Юрий Евгеньевич – Республика Беларусь, заведующий отделением анестезиологии и реанимации ГKB № 2, 230011, г. Гродно, ул. Гагарина, д. 5

Ходосовский Михаил Николаевич – Республика Беларусь, д.м.н, доцент кафедры патологической физиологии УО «Гродненский государственный медицинский университет», 230009, г. Гродно, ул. Горького, 80, Беларусь, +375(29)-282-12-42, e-mail: hodosowsky@grsmu.by

Цыбров Евгений Германович – аспирант факультета вычислительной математики и кибернетики, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия, **Ченг Чиа-Лианг** – профессор, Национальный университет Донг-Хва, Хуалянь, Тайван, clcheng@gms.ndhu.edu.tw

Шульга Екатерина Владимировна – Республика Беларусь, г. Гродно, старший преподаватель 2-й кафедры внутренних болезней, к.м.н., +375(29)-885-99-84, e-mail: vnutrbo12@gmail.com

Щурко Александр Сергеевич – УО Республика Беларусь, «Гродненского государственного медицинского университета». 230009, Горького, 80, Гродно. +375(29)-797-88-75, e-mail: dpfizio@mail.ru

Якубова Людмила Валерьевна – Республика Беларусь, д.м.н., заведующий кафедры ОВП и поликлинической терапии УО «ГрГМУ», профессор УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь, 230009, г. Гродно, ул. Горького, 80, +375(29)-789-08-91, mail: yankovliuda@yandex.ru

Научное издание

МИКРОЦИРКУЛЯЦИЯ, РЕОЛОГИЯ КРОВИ И КИСЛОРОДНЫЙ ГОМЕОСТАЗ

Международный интернет-симпозиум в рамках ежегодной научно-практической конференции Ярославского государственного педагогического университета им. К.Д. Ушинского «Чтения Ушинского»

Сборник материалов международного интернет-симпозиума

Научные редакторы:

Алексей Васильевич Муравьев – доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры медико-биологических основ спорта Ярославского государственного педагогического университета им. К.Д. Ушинского;

Виктор Владимирович Зинчук – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии Гродненского государственного университета

Материалы публикуются в авторской редакции

Технический редактор сборника С.А. Сосновцева

Подписано в печать 27.05.2022.

Формат 60х90/16

Объем 15,75 усл. печ. л. ; 11,25 изд. л.

Тираж 100 экз. Заказ № 88

Издано в ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского» (РИО ЯГПУ)
150000, г. Ярославль, Республиканская ул., 108/1

Типография ЯГПУ

150000, г. Ярославль, Которосльская наб., 44

Телефоны: (4852) 72-64-05, 32-98-69