
Вопросы общей патологии

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ПЛАЗМЕННЫХ ФАКТОРОВ НА ХАРАКТЕР НАРУШЕНИЙ РЕОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Блохина Т.А., Пахрова О.А., Назаров С.Б.
ГОУ ВПО ИвГМА Росздрава
Кафедра нормальной физиологии
Научно-исследовательский центр
Лаборатория системы микроциркуляции крови

РЕЗЮМЕ Исследовали значение физико-химических и биологических свойств плазмы крови в регуляции реологических характеристик эритроцитов человека. Установили, что показатели агрегации в большей степени зависят от белкового состава плазмы крови, деформируемость — от pH, а форма эритроцитов — от осмотического давления и ионного состава плазмы.

Ключевые слова: эритроцит, агрегация, деформируемость, цитоархитектоника, плазменные факторы.

Реологические свойства крови определяют нормальное функционирование организма здорового человека, обеспечивая микроциркуляцию и снабжение клеток кислородом и питательными веществами. Главную роль в формировании реологических параметров крови играют эритроциты, их свойства (форма, агрегация, деформируемость).

Вместе с тем, остается неясным, какие факторы определяют характер нарушений реологических свойств эритроцитов. Тот факт, что эти изменения выявляются при негематологических заболеваниях, позволяет предположить важную роль физико-химических и биологических свойств плазмы крови в их возникновении.

Результаты многочисленных исследований нарушений реологических характеристик эритроцитов при различных заболеваниях демонстрируют разнонаправленные сдвиги показателей в зависимости от нозологической формы, активности процесса и других факторов [4, 6, 14]. Следует отметить, что большинство этих исследований проводилось без стандартизации модельного эксперимента, что затрудняет их сопо-

ставление и не позволяет сравнивать действие различных факторов.

Не получил должного освещения в литературе и вопрос о влиянии на реологические характеристики эритроцитов свободных радикалов кислорода и оксида азота, играющих ключевую роль как в регуляции физиологических процессов, так и в патогенезе многих заболеваний.

В связи с изложенным целью исследования является установление значения физико-химических и биологических свойств плазмы крови в регуляции реологических характеристик эритроцитов человека.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проводилось исследование крови у 72 здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 25 лет. Забор крови проводился в утренние часы путем венепункции. В качестве антикоагулянта использовали 3,8% раствор цитрата натрия. Путем центрифугирования в течение 10 минут при 3000 об./мин кровь разделяли на плазму и форменные элементы, которые затем однократно отмывали от остатков плазмы в растворе с фосфатным буфером (PBS, «Sigma», USA).

Blokhina T.A., Pakhrova O.A., Nazarov S.B.

CHARACTER OF DISORDERS OF HUMAN ERYTHROCYTE RHEOLOGICAL PROPERTIES: INFLUENCE OF SOME PLASMATIC FACTORS

Abstract We studied the significance of physicochemical and biological properties of plasma in regulation of human erythrocyte rheological characteristics. It was determined that the aggregation indices depended on plasma protein content, deformability depended on pH, erythrocyte form depended on osmotic pressure and plasma ion content to the greater extent.

Key words: erythrocyte, aggregation, deformability, cytoarchitectonics, plasmatic factors.

Отмытые эритроциты инкубировали в растворах различных концентраций исследуемых веществ: натрий хлор, хлорид кальция, альбумин, глюкоза, фибриноген, билирубин, нитропруссид натрия, перекись водорода, морин, токоферол. Контролем служили эритроциты, находившиеся в PBS. Дополнительно проводилась серия экспериментов изучению старения эритроцитов. Кровь инкубировали при 37°C в течение 24 часов.

Деформируемость эритроцитов изучали фильтрационным методом с определением начальной скорости фильтрации клеток через ацетатцеллюлозные мембраны с диаметром пор 3,5 мкм, изготовленные Владимирским научно-производственным объединением «Полимерсинтез», рассчитывали показатель деформируемости по H.L. Reid в модификации P.P. Шиляева, С.В. Шibaева, В.Е. Ложкина, С.Б. Назарова [15]. Агрегацию эритроцитов определяли прямым оптическим методом, рекомендованным для использования комитетом экспертов ВОЗ по стандартизации в гематологии (ICSH, 1988). Прямой оптический метод, помимо вычисления индекса агрегации, позволяет определить средний размер агрегата и процент неагрегированных эритроцитов. Для оценки структурно-функциональных свойств мембраны эритроцитов исследовалась их цитоархитектоника методом световой фазово-контрастной микроскопии. Нами использовалась классификация формы эритроцитов, предложенная Г.И. Козинцом с соавторами [7]. Количественную оценку соотношения патологических и нормальных форм эритроцитов рассчитывали с помощью индекса трансформации.

Статистическая обработка материалов проводилась методами вариационного анализа на ПЭВМ с использованием программы «Microsoft Excel 2005».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среди физико-химических свойств крови наибольшее значение имеют осмотическое давление, онкотическое давление, коллоидная стабильность, суспензионная устойчивость, удельный вес и вязкость [3].

Осмотическое давление является одной из жестких гомеостатических констант и у здорового человека поддерживается в строгом диапазоне. Изменение осмотического давления плазмы крови возможно при различных заболеваниях и сказывается в первую очередь на эритроцитах. Наше исследование показало, что снижение осмотического давления приводит к резкому уменьшению деформируемости эритроцитов.

Поверхностная цитоархитектоника нарушается как при увеличении, так и при снижении осмотического давления. Эти процессы, вероятно, объясняются переходом растворителя через полупроницаемую мембрану из менее концентрированного в более концентрированный раствор, то есть распределением жидкости между внутренней средой и эритроцитами. Это может приводить к развитию эхиноцитоза и стоматоцитоза, вносящих большой вклад в деформируемость красных клеток крови [24].

Известно, что кальций занимает центральное место среди других неорганических компонентов плазмы крови, основные биологические эффекты кальция обусловлены его ионизированной формой. Нами установлено ингибирующее действие ионов кальция на процесс агрегации эритроцитов и уменьшение процента дискоцитов, причем степень выраженности этих изменений возрастает по мере увеличения концентрации раствора. Снижение числа дискоцитов было обнаружено и B.T. Al-Gailani и D. Cotterrell [16]. Деформируемость эритроцитов в нашем исследовании не претерпевает существенных изменений, что расходится с литературными данными о снижении способности к деформации красных клеток крови [20] и может быть связано с разными исследуемыми концентрациями. Кальций оказывает действие на метаболизм мембранных белков и липидов, модулируя, таким образом, многие функциональные свойства клеточных мембран и вызывая изменение поверхностной геометрии клеток [21,26]. Важное значение концентрация ионов кальция имеет и для работы специальных транспортных мембранных механизмов: каналов, насосов, переносчиков [19].

Вязкость крови представляет собой сложный эффект взаимоотношений между водой и макромолекулами коллоидов, с одной стороны, плазмой и форменными элементами — с другой. Чем больше в плазме крови содержится крупномолекулярных белков, особенно фибриногена, тем выше вязкость плазмы. Решающее значение имеет не столько содержание какого-то одного белка, сколько соотношения альбумин/глобулин и альбумин/фибриноген. Эти соотношения изменяются как при физиологических процессах (беременность, физическая нагрузка), так и при патологических состояниях (например, болезни почек). Как следствие, изменяются физико-химические свойства крови, которые определяют изменения в поведении эритроцитов. Фибриноген уменьшает отрицательный заряд эритроцитов, с которым связано поддержание форменных элементов крови во

Таблица. Влияние плазменных факторов на реологические свойства эритроцитов человека

Показатели		ПА	ПД	ИТ
Контроль		1,23 ± 0,11	0,14 ± 0,013	0,05 ± 0,01
Осмотическое давление	250 мОсм/л	1,28 ± 0,07	0,034 ± 0,021*	0,50 ± 0,07*
	350 мОсм/л	1,37 ± 0,1	0,122 ± 0,011	0,66 ± 0,18*
Ca ²⁺ 5 мМ/л		1,11 ± 0,03*	0,116 ± 0,03	20,7 ± 5,08*
фибриноген 4 г/л		1,28 ± 0,07	0,04 ± 0,01*	83,3 ± 10,2*
билирубин 200 мкМ/л		1,50 ± 0,69	0,017 ± 0,013*	0,98 ± 0,012*
NO 1,0 мМ/л		1,10 ± 0,05*	0,13 ± 0,03	3,81 ± 1,15*
H ₂ O ₂ 0,1%		1,15 ± 0,07	0,28 ± 0,07	3,09 ± 0,42*
NO 1,0 мМ/л + H ₂ O ₂ 0,1%		1,24 ± 0,12	0,12 ± 0,015	1,61 ± 0,55*
NO 1,0 мМ/л + токоферол 2,0 мМ/л		1,27 ± 0,02	0,16 ± 0,05	3,01 ± 1,07*
старение 24 часа		1,00 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	100,0 ± 0,00*
глюкоза 5% р-р		1,02 ± 0,07*	0,07 ± 0,015*	0,76 ± 0,28

Примечание: ПА — показатель агрегации, ПД — показатель деформируемости, ИТ — индекс трансформации.

* — достоверность различий между показателями в контроле и экспериментальными группами $p < 0,05$

взвешенном состоянии в плазме. В нашем исследовании наблюдалась тенденция к увеличению агрегации с повышением фибриногена в растворе, угнетение деформируемости эритроцитов и существенное изменение формы клеток. Это может быть связано с изменением соотношения альбумин/фибриноген [22].

Под влиянием неконъюгированного билирубина наблюдалось дозозависимое ухудшение деформируемости и формы эритроцитов. Билирубин способен связываться с эритроцитарными мембранами и оказывать цитотоксический эффект [26] за счет подавления активности АТФаз [17] и нарушения состава и функции липидов мембран [18]. Подобные эффекты возникают при вирусных гепатитах и провоцируют метаболические расстройства, определяющие тяжесть и неблагоприятные исходы патологических процессов в печени [4].

Образование свободных радикалов в живых системах — это нормальный и важный биологический процесс. Перекись водорода и донатор NO нитропруссид натрия, являясь источниками свободных радикалов, тормозят процесс агрегации эритроцитов при максимальной концентрации каждого из этих веществ в изученных растворах [13], однако не оказывают существенного влияния на деформируемость эритроцитов. D. Starzyk с соавт. [25] приводит сведения о том, что небольшие концентрации NO в плазме крови поддерживают деформируемость эритроцитов в физиологическом диапазоне.

Изменение поверхностной цитоархитектоники эритроцитов, вызванное действием нитропруссида натрия и перекиси водорода, видимо, связано с тем, что свободные радикалы кислорода

и производные NO, являясь компонентом плазмы крови, оказывают влияние на липиды, входящие в состав мембран клеток. Как следствие, может возрастать интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и степень трансформации эритроцитов в эхиноциты [1].

Сочетанное действие таких эндогенных факторов интоксикации, как донатор NO нитропруссид натрия и перекись водорода, не оказывает существенного влияния на деформируемость и агрегацию эритроцитов, возможно, потому, что в присутствии O₂ и H₂O₂ оксид азота превращается в менее активные соединения, которые могут выводиться из организма через почки, и как бы смягчает действие перекиси водорода. С другой стороны, результаты исследований последних лет показывают, что NO может обладать антиоксидантными свойствами в отношении радикалов кислорода [9]. Появление стоматоцитов и дегенеративных форм может зависеть не только от усиления процессов ПОЛ, но и от изменения внутриклеточной концентрации ионов кальция, одним из механизмов регуляции которой является NO [12].

ПОЛ является нормальным физиологическим процессом — первой стадией образования эйкозаноидов, мощных регуляторов гормональной активности. ПОЛ выходит из-под контроля лишь в случае сбоя антиоксидантной системы [1], которая работает за счет эндогенных (ферментов и метаболитов) и экзогенных (витаминов, антиоксидантов растительного и животного происхождения, микроэлементов и лекарственных препаратов) антиоксидантов. Эта мощная система защиты клеток — составная часть патогенетической терапии при многих заболеваниях, а также профилактических схем [8].

Фармакопейная форма витамина Е — его синтетический аналог, сложный эфир — ацетат α -токоферол в 5 раз уменьшает число интактных дискоцитов при концентрации этого вещества 0,5мМ/л и в 3 раза при — 2,0 мМ/л. Токоферол не оказывает защитного влияния на эритроциты, подвергшиеся воздействию перекиси водорода. Максимальная концентрация витамина Е уменьшает количество стоматоцитов, появившихся после инкубации эритроцитов с нитропруссидом натрия, а минимальная — приводит к еще большему росту числа стоматоцитов. Уменьшение концентрации α -токоферола, вероятно, отражает изменения, связанные с дефицитом витамина Е в эритроцитах, так как они одни из первых истощают этот витамин, депонированный в мембранах [2, 8].

Старение эритроцитов сопровождается серьезными изменениями биофизических и биохимических параметров клеток, снижая их жизнеспособность, уменьшая заряд и нарушая рецепторный аппарат. Подобные процессы происходят и при консервации крови, и при некоторых заболеваниях (например, наследственных энзимопатиях, где изменения распространяются на часть систем, и это оставляет пути для компенсации нарушений), что, видимо, отражает общность патогенетических механизмов. Проведенное исследование показало, что с увеличением времени инкубации эритроцитов в аутоплазме происходит снижение деформируемости, агрегации, рост числа необратимо деформированных клеток. Подобные изменения связаны с уменьшением эластичности мембраны, повышением внутренней вязкости за счет увеличения внутриклеточного содержания гемоглобина и снижением АТФ [10,5].

Парадоксальным представляется тот факт, что эритроциты, важнейшая функция которых заключается в переносе кислорода для нужд других тканей, сами используют для выработки энергии только анаэробные механизмы. Известно, что старение эритроцитов сопровождается значительным снижением активности гликолиза, результатом этого процесса является уменьшение образования энергии и восстановительного потенциала в клетке, что ведет к вторичным нарушениям ее структуры. По нашим данным, глю-

коза не влияет на измененные в условиях старения реологические параметры красных клеток крови. В литературе есть сведения об использовании «старыми» эритроцитами экзогенной глюкозы как источника АТФ для восстановления деформируемости [11], но этот эффект не распространяется на форму красных клеток крови.

Влияние 5% раствора глюкозы на интактные эритроциты проявлялось в существенном угнетении деформируемости, агрегации и снижении процента клеток в форме двояковогнутого диска, за счет появления эритроцитов с множественными выростами. Побочным продуктом реакции гликолиза, который обнаруживается в эритроцитах в необычайно высоких концентрациях, является 2,3-дифосфоглицерат. Увеличение 2,3-дифосфоглицерата, с которым не справляются внутриклеточные факторы регуляции, может быть одной из причин полученных в эксперименте изменений.

Процесс старения затрагивает реологические параметры эритроцитов. Комплексность и взаимосвязанность наблюдаемых изменений затрудняет выделение начального звена процесса старения. Любое такое изменение, взятое даже в отдельности (сферуляция, потеря эластичности клетки и т. д.), способствует нарушению кислородтранспортной функции красных клеток крови.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование выявило зависимость реологических параметров эритроцитов от изменения плазменных факторов. Подводя итог обсуждению экспериментальных данных, касающихся значения физико-химических и биологических свойств плазмы крови в регуляции процессов агрегации, деформируемости и поверхностной цитоархитектоники эритроцитов, уместно напомнить, что в биофизике и биомеханике эритроцит играет роль важнейшей биологической модели. Полученные нами данные свидетельствуют о потенциальной возможности разработки путей управления реологическими свойствами эритроцитов в клинической практике на основе знаний об участии плазменных факторов в их регуляции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берберова Н.Т. Из жизни свободных радикалов // Соросовский образовательный журнал. — 2000. — Т. 6, № 5(54). — С. 39—44.
2. Блохина Т.А., Назаров С.Б., Савельева И.Е. Влияние окислительного повреждения и антиоксидантов на реологические свойства эритроцитов человека // Вестн. Костромского гос. ун-та им. Н.А. Некрасова. — № 6. — 2005. — С. 14—19.
3. Брин В.Б., Вартанян И.А., Данияров С.Б., и др. Основы физиологии человека: Учебник для высших учебных заведений: В 3 т. / под ред. акад. РАМН Б.И. Ткаченко. — СПб., 1994. — Т. 1.

4. Варникова О.Р. Гемореологические нарушения при вирусных гепатитах у детей и обоснование их коррекции: дис. ... канд. мед. наук. — Иваново, 2000. — 165 с.
5. Гущина Г.М. Влияние однократных тепловых нагрузок на реологические свойства крови // Материалы международной конференции по гемореологии. — Ярославль, 2001. — С. 8.
6. Дроздова Т.В. Комплексная оценка микроциркуляторных нарушений у больных ревматическими заболеваниями: дис. ... канд. мед. наук. — Иваново, 1998. — 189 с.
7. Козинец Г.И., Ряполова П.В., Шишканова З.Г. и др. Мофологическая характеристика эритроцитов периферической крови здоровых людей (сканирующая электронная микроскопия) // Пробл. гематологии. — 1977. — Т. 22, № 7. — С. 19—22.
8. Кудрин А.В., Скальный А.В., Жаворонков А.А., Скальная М.Г., Громова О.А. Иммунофармакология микроэлементов. — М.: Изд-во КМК, 2000. — 537 с.
9. Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Стресс, адаптация и оксид азота // Биохимия. — 1998. — Т. 63, вып. 7. — С. 992—1006.
10. Муравьев А.В., Борисов Д.В., Гужова П.А. Текучесть суспензии молодых и старых эритроцитов: вклад их агрегации // Материалы международной конференции по гемореологии. — Ярославль, 2001. — С. 20.
11. Панталер Е.Р., Руденко С.В. Влияние глюкозы на динамическую деформируемость одиночных эритроцитов в гипертонических средах // Холодовой анабиоз. — Киев: Ин-т проблем криобиол. и криомед, 1991. — С. 42—46.
12. Реутов В.П., Сорокина Е.Г. NO-синтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота // Биохимия. — 1998. — Т. 63, вып. 7. — С. 1029—1040.
13. Титов В.Н. Оксид азота в реакции эндотелийзависимой вазодилатации. Основы единения эндотелия и гладкомышечных клеток в паракринной регуляции метаболизма // Клин. лаб. Диагностика. — 2007. — № 2 — С. 23—24, 33—39.
14. Чемоданов В.В. Микрогемореологические нарушения при инфекционном токсикозе у детей с острыми заболеваниями респираторной системы (Патогенетические механизмы, диагностика, дифференцированная терапия): дис. ... д-ра мед. наук. — Иваново, 1996. — 481с.
15. Шиляев Р.Р., Шибяев С.В., Назаров С.Б., Ложкин В.Е. Метод определения деформируемости эритроцитов // Лаб. дело. — 1991. — № 5. — С. 5—7.
16. Al-Gailani B.T., Cotterrell D. Intracellular calcium and deformability of human red blood cell ghosts // J. Physiol. — 1988. — Vol. 396. — P. P48.
17. Ali M.K., Tayyab S. Differential resistance to calcium-induced bilirubin-dependent hemolysis in mammalian erythrocytes // Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. — 1999. — Vol. 122, № 1. — P.109—113.
18. Brito M.A., Silva R.M., Matos D.C., da Silva A.T., Brites D.T. Alterations of erythrocyte morphology and lipid composition by hyperbilirubinemia // Clin. Chim. Acta. — 1996. — Vol. 249, № 1-2. — P. 149—165.
19. Cubitt A.B., Reddy I., Lee S., McNally J.G., Firtel R.A. Coexpression of a constitutively active plasma membrane calcium pump with GFP identifies roles for intracellular calcium in controlling cell sorting during morphogenesis in Dictyostelium // Dev. Biol. — 1998. — Vol. 196, № 1. — P. 77—94.
20. Friederichs E., Winkler H., Tillmann W. Influence of the red blood cell Ca^{2+} -ion concentration on the erythrocyte aggregation in stasis // Biochem. Med. and Metabol. Biol. — 1989. — Vol. 41, № 2. — P. 85—92.
21. Lin S., Yang E., Huestis W.H. Relationship of phospholipid distribution to shape change in $Ca(2+)$ -crenated and recovered human erythrocytes // Biochemistry. — 1994. — Vol. 33, № 23. — P. 7337—7344.
22. Linde T., Sandhagen B., Backman U., Fellstrom B. Altered flow properties of blood and increased plasma fibrinogen in cyclosporin-treated renal allograft recipients // Nephrol. Dial. Transplant. — 1999. — Vol. 14, № 6. — P.1525—1529.
23. Mireles L.C., Lum M.A., Denney P.A. Antioxidant and cytotoxic effects of bilirubin on neonatal erythrocytes // Pediatr. Res. — 1999. — Vol. 45, № 3. — P. 355—362.
24. Reinhart W.H., Singh-Marchetti M., Straub P.W. The influence of erythrocyte shape on suspension viscosities // Eur. J. Clin. Invest. — 1992. — Vol. 22, № 1. — P. 38—44.
25. Starzyk D., Korbut R., Gryglewski R.J. The role of nitric oxide in regulation of deformability of red cells in acute phase of endotoxaemia in rats // FEBS Lett. — 1997. — Vol. 413, № 2. — P. 236—242.
26. Zaidi A., Khan M.T., Mirza M., Ahmad I., Saleemuddin M. Studies on the differential morphological alterations in human and goat erythrocytes against ATP depletion and $Ca(2+)$ -induced stresses // Biochem. Mol. Biol. Int. — 1995. — Vol. 37, № 3. — P. 517—526.

Поступила 15.10.2008 г.