



Учредители:
Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет им. акад. И. П. Павлова
ООО «СП Минимакс»

Основан в ноябре 2001 года

научно-
практический
журнал

том 20

2021

№ 1 (77)

Содержание

Contents

Обзоры

Reviews

Тихомирова И. А., Петроченко Е. П., Петроченко А. С.
Сероводород как сигнальная молекула
в сердечно-сосудистой системе

5

Tikhomirova I. A., Petrochenko E. P., Petrochenko A. S.
Hydrogen sulfide as a signaling molecule
in the cardiovascular system

Оригинальные статьи (клинические исследования)

Original articles (clinical investigations)

Каданова И. М., Незнанов А. И., Луговцов А. Е.,
Гурфинкель Ю. И., Пигуренко А. А., Дячук Л. И.,
Приезжев А. В.

17

Kadanova I. M., Neznanov A. I., Lugovtsov A. E.,
Gurfinkel Yu. I., Pigurenko A. A., Dyachuk L. I.,
Priezzhev A. V.

Взаимосвязь параметров капиллярного кровотока,
измеренных *in vivo*, и микрореологических параметров
крови, измеренных *in vitro*, при артериальной
гипертензии и ишемической болезни сердца

Relationship between capillary blood flow parameters
measured *in vivo* and microrheologic parameters of blood
measured *in vitro* in arterial hypertension and coronary
heart disease

Антонова Н. М., Паскова В. К., Вельчева И. В.
Реологические и электрические свойства крови
и взаимосвязь с регуляцией тонуса микрососудов
у пациентов с сахарным диабетом II типа

25

Antonova N. M., Paskova V. K., Velcheva I. V.
Blood rheological and electrical properties and
relationships with the microvascular tone regulation in
patients with diabetes mellitus type 2

Скоркина М. Ю., Шевченко Т. С., Жернакова Н. И.
Микромеханические свойства и функциональная
активность гранулоцитов при моделировании
экзогенной нагрузки с АТФ *in vitro*

34

Skorkina M. Yu., Shevchenko T. S., Zhernakova N. I.
Micromechanical properties and functional activity
of granulocytes when simulating exogenous loading
with ATP *in vitro*

Вавилов В. Н., Зарицкий А. Ю., Полинцев Д. Г.,
Курьянов П. С., Крутиков А. Н., Зенкова Е. А.,
Ширитова Ф. З.

41

Vavilov V. N., Zaritskey A. Yu., Polyntsev D. G.,
Kurianov P. S., Krutikov A. N., Zenkova H. A.,
Shiritova F. Z.

Эффективность мезенхимных стромальных клеток
при лечении больных с критической ишемией
нижних конечностей

Efficiency of mesenchymal stromal cells (MSCs)
in the treatment of patients with critical limb-threatening
ischemia

**Андреев В. В., Зевахин С. В., Баранцевич Е. Р.,
Сычев А. И., Петришев Н. Н.**
Эффективность применения лазеротерапии для
лечения пояснично-крестцовых радикулоишемий

**50 Andreev V. V., Zevakhin S. V., Barantsevich E. R.,
Sychev A. I., Petrishev N. N.**
Effectiveness of laser therapy for the treatment
of lumbosacral radiculosischemias

**Трусов И. С., Нифонтов Е. М., Бирюков А. В.,
Базунов А. К.**
Факторы, влияющие на исходы стентирования
коронарных артерий эверолиму-содержащими
стентами при остром коронарном синдроме без
подъема сегмента ST

**62 Trusov I. S., Nifontov E. M., Biryukov A. V.,
Bazunov A. K.**
Factors influencing the outcomes of coronary artery
stenting with everolimus-eluting stents in acute coronary
syndromes without ST segment elevation

Оригинальные статьи (экспериментальные исследования)

Original articles (experimental investigations)

**Сидехменова А. В., Алиев О. И., Анищенко А. М.,
Дунаева О. И., Плотников М. Б.**
Влияние совместного введения метопролола
и дигидрокверцетина на реологические свойства
крови крыс SHR

**71 Sidekhmenova A. V., Aliev O. I., Anishchenko A. M.,
Dunaeva O. I., Plotnikov M. B.**
Effect of the combined administration of metoprolol
and dihydroquercetin on the rheological properties
of blood in spontaneously hypertensive rats (SHRs)

**Фабричнова А. А., Кошелев В. Б., Мисникова И. В.,
Ковалева Ю. А., Семенов А. Н., Луговцов А. Е.,
Каданова И. М., Незнанов А. И., Приезжев А. В.**
Исследование сил парного взаимодействия
эритроцитов при их агрегации методом оптического
захвата при сахарном диабете 1 и 2 типов

**77 Fabrichnova A. A., Koshelev V. B., Misnikova I. V.,
Kovaleva Y. A., Semenov A. N., Lugovtsov A. E.,
Kadanova I. M., Neznanov A. I., Priezzhev A. V.**
Assessment of the forces of pair interaction
of erythrocytes during their aggregation by the optical
tweezers in Type 1 and Type 2 diabetes mellitus

**Михайлов П. В., Муравьев А. В., Осетров И. А.,
Остроумов Р. С., Тихомирова И. А.**
Структура взаимосвязей показателей аэробной
работоспособности, центральной гемодинамики,
микроциркуляции и реологии крови

**84 Mikhaylov P. V., Muravyov A. V., Osetrov I. A.,
Ostroumov R. S., Tikhomirova I. A.**
The structure of the relationship between indicators
of aerobic performance, central hemodynamics,
microcirculation and hemorheology

Лекции

Lectures

Муравьев А. В.
Роль газовых медиаторов (CO, NO и H₂S) в регуляции
кровообращения: анализ участия микрореологии
клеток крови

91 Muravyov A. V.
The role of gaseous mediators (CO, NO and H₂S)
in the regulation of blood circulation: analysis
of the participation of blood cell microrheology

Правила для авторов 100 Author guidelines

Regional blood circulation and microcirculation

Editor-in-chief

N. N. Petrishchev (Saint-Petersburg, Russia)
Vice Editor,
T. D. Vlasov (Saint-Petersburg, Russia)
Senior Associate Editor,
S. N. Tultseva (Saint-Petersburg, Russia)
Scientific Editor,
V. A. Pugach (Saint-Petersburg, Russia)
Executive Secretary,
V. I. Amosov (Saint-Petersburg, Russia),
N. A. Bubnova (Saint-Petersburg, Russia),
M. M. Galagudza (Saint-Petersburg, Russia),
V. I. Kozlov (Moscow, Russia),
A. V. Muravyov (Yaroslavl, Russia),
G. G. Hubulava (Saint-Petersburg, Russia),
V. A. Tsyrlin (Saint-Petersburg, Russia),
E. V. Shlyakhto (Saint-Petersburg, Russia).

Editorial Board

V. V. Banin (Moscow, Russia),
E. R. Barantsevich (Saint-Petersburg, Russia),
N. A. Belyakov (Saint-Petersburg, Russia),
Alexander Brill (Birmingham, United Kingdom),
Jarle Vaage (Oslo, Norway),
A. Yu. Vasilyev (Moscow, Russia),
I. A. Vozniuk (Saint-Petersburg, Russia),
A. V. Gavrilenko (Moscow, Russia),
I. P. Dudanov (Petrozavodsk, Russia),
K. V. Zhmerenetsky (Khabarovsk, Russia)
O. G. Zverev (Saint-Petersburg, Russia)
V. B. Koshelev (Moscow, Russia),
A. I. Krupatkin (Moscow, Russia),
G. I. Lobov (Saint-Petersburg, Russia),
L. N. Maslov (Tomsk, Russia),
V. E. Milyukov (Moscow, Russia),
Nodar Mitagvaria (Tbilisi, Georgia)
K. M. Morozov (Moscow, Russia),
V. S. Nikiforov (Saint-Petersburg, Russia),
Axel Pries (Berlin, Germany),
Carlota Saldanha (Lisbon, Portugal)
D. A. Starchik (Saint-Petersburg, Russia),
S. K. Ternovoy (Moscow, Russia),
S. B. Tkachenko (Moscow, Russia),
A. N. Shishkin (Saint-Petersburg, Russia)

Научное медицинское издание

Регионарное кровообращение и микроциркуляция

Редакционная коллегия

д. м. н., профессор Петрищев Н. Н. — главный редактор (Санкт-Петербург),
д. м. н., профессор Власов Т. Д. — заместитель главного редактора (Санкт-Петербург),
д. м. н., профессор Тульцева С. Н. — научный редактор (Санкт-Петербург),
к. б. н. Пугач В. А. — ответственный секретарь (Санкт-Петербург),
д. м. н., профессор Амосов В. И. (Санкт-Петербург),
д. м. н., профессор Бубнова Н. А. (Санкт-Петербург),
чл.-корр. РАН, профессор Галагудза М. М. (Санкт-Петербург),
д. м. н., профессор Козлов В. И. (Москва),
д. б. н., профессор Муравьев А. В. (Ярославль),
акад. РАН, профессор Хубулава Г. Г. (Санкт-Петербург),
д. м. н., профессор Цырлин В. А. (Санкт-Петербург),
акад. РАН, профессор Шляхто Е. В. (Санкт-Петербург).

Редакционный совет

чл.-корр. РАН, профессор Банин В. В. (Москва),
д. м. н., профессор Баранцевич Е. Р. (Санкт-Петербург),
акад. РАН, профессор Беляков Н. А. (Санкт-Петербург),
профессор Бриль А. Г. (Бирмингем, Великобритания),
профессор Вааге Г. (Осло, Норвегия),
чл.-корр. РАН, профессор Васильев А. Ю. (Москва),
д. м. н., профессор Вознюк И. А. (Санкт-Петербург),
акад. РАН, профессор Гавриленко А. В. (Москва),
чл.-корр. РАН, профессор Дуданов И. П. (Петрозаводск),
чл.-корр. РАН, доцент Жмеренецкий К. В. (Хабаровск),
д. м. н., профессор Зверев О. Г. (Санкт-Петербург),
д. б. н., профессор Кошелев В. Б. (Москва),
д. м. н., профессор Крупаткин А. И. (Москва),
д. м. н., профессор Лобов Г. И. (Санкт-Петербург),
д. м. н., профессор Маслов Л. Н. (Томск),
д. м. н., профессор Милуков В. Е. (Москва),
профессор Митагвария Н. П. (Тбилиси, Грузия),
д. м. н., профессор Морозов К. М. (Москва),
д. м. н., профессор Никифоров В. С. (Санкт-Петербург),
профессор Прис А. (Берлин, Германия),
профессор Салдана Карлота (Лиссабон, Португалия),
д. м. н. Старчик Д. А. (Санкт-Петербург),
акад. РАН, профессор Терновой С. К. (Москва),
чл.-корр. РАН, профессор Ткаченко С. Б. (Москва),
д. м. н., профессор Шишкин А. Н. (Санкт-Петербург).

РИЦ ПСПбГМУ им. И. П. Павлова
197089, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6-8
Издательство ООО «СП Минимакс»
197376, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 7
Редакция: 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8
Лицензия: ЛП № 000141 от 08 апреля 1999 г.
Регистрационное удостоверение: ПИ № 77-9025

Подписано в печать: 24.02.2021 г.
Формат: А4
Печать офсетная
Тираж 1000
Заказ № 184

Глубокоуважаемые коллеги!



Перед вами тематический номер журнала «Регионарное кровообращение и микроциркуляция», посвященный проблемам гемореологии и микроциркуляции.

Традиционно результаты исследования микроциркуляции и текучести крови или ее реологии обсуждались на страницах разных периодических изданий. Вместе с тем совершенно очевидна связь сосудистого русла с текущей в нем кровью и взаимодействие ее элементов с сосудистым эндотелием и гладкомышечными клетками. Поэтому данный выпуск включает в себя статьи, в которых представлены материалы комплексных исследований микроциркуляции и реологии крови. Взаимодействие клеток сосудистой стенки и клеток текущей крови осуществляется паракринно за счет сигнальных молекул и, в том числе, газовых посредников, или газотрансммиттеров. Поэтому неслучайно номер начинается с обзорной статьи И. А. Тихомировой и др., в которой рассматривается роль сероводорода в функционировании сердечно-

сосудистой системы. Сероводород стал третьей газовой молекулой, которая, наряду с NO и CO, участвует в регуляции функций сердечно-сосудистой системы. Сигнальная роль АТФ в коммуникации между клетками крови проанализирована в статье М. Ю. Скоркиной и др. Известно, что при сердечно-сосудистых заболеваниях нарушается микроциркуляция, и это может быть связано с микрореологическими свойствами эритроцитов, например, с их агрегацией. Комплексный подход к этой проблеме реализован в статье И. М. Кадановой и др., где в прижизненных условиях регистрировали агрегацию в микрососудах ногтевого ложа и сопоставляли с данными агрегатометрии эритроцитов в опытах *in vitro*. Анализ взаимосвязи реологии крови и микроциркуляции продолжен в статье Н. М. Антонова и др., в которой показаны нарушения реологических свойств крови, ее электрических свойств и кожного кровотока у больных диабетом II типа. Этот раздел выпуска также включает в себя статьи, посвященные коррелятивным взаимосвязям реологии крови, гемодинамики и микроциркуляции, исследованию эффективности мезенхимных стромальных клеток при лечении больных с критической ишемией нижних конечностей, и работу по анализу эффективности применения лазеротерапии для лечения пояснично-крестцовых радикулоишемий.

Неменьший теоретический и практический интерес представляют исследования второго раздела выпуска (экспериментальные исследования). Так, в статье А. В. Сидехменовой и др. предложена интересная модель синдрома повышенной вязкости крови. С ее помощью авторы анализировали роль вязкости крови в формировании повышенного артериального давления у экспериментальных животных. Механизмы агрегации эритроцитов по-прежнему до конца не выяснены. Существует две основные рабочие гипотезы. В статье А. А. Фабричной и др. приведены данные исследования процесса «агрегации-деагрегации» эритроцитов с помощью тонкого метода – «лазерного пинцета». На эритроцитах больных диабетом I и II типов были получены данные, свидетельствующие о разных механизмах агрегатообразования.

Завершает выпуск лекция А. В. Муравьев на тему «Роль газовых медиаторов (CO, NO и H₂S) в регуляции кровообращения: анализ участия микрореологии клеток крови». В лекции на основе анализа литературных данных показана важная роль всех трех газотрансммиттеров (ГТ) в регуляции сердца и сосудов. Материал лекции дополнен данными собственных исследований автора положительных эффектов ГТ на микрореологические свойства эритроцитов.

Мы надеемся, что материалы данного тематического номера будут интересны как экспериментаторам, так и практикующим врачам.

С уважением, член редакционной коллегии
журнала «Регионарное кровообращение и микроциркуляция»
доктор биологических наук, профессор А. В. Муравьев

УДК 612.062:612.1+616.005

DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-5-16

И. А. ТИХОМИРОВА¹, Е. П. ПЕТРОЧЕНКО¹,
А. С. ПЕТРОЧЕНКО²

Сероводород как сигнальная молекула в сердечно-сосудистой системе

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского», г. Ярославль, Россия

150000, Россия, г. Ярославль, ул. Республиканская, д. 108/1

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

г. Ярославль, Россия

150000, Россия, г. Ярославль, ул. Революционная, д. 5

E-mail: tikhom-irina@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 06.11.20; принята к печати 15.01.21

Резюме

Обсуждаются опубликованные данные о роли сероводорода в функционировании сердечно-сосудистой системы. Сероводород стал третьей газовой молекулой, отнесенной, наряду с NO и CO, к газомедиаторам – сигнальным молекулам, уникальной особенностью которых является их способность легко проникать через клеточную мембрану в силу их хорошей растворимости в липидах. Трансдукция сигнала с участием газомедиаторов существенно отличается от классических представлений – нет необходимости ни в специальных мембранных рецепторах, ни в транспортных системах, газомедиаторы реализуют свой эффект практически в зоне их синтеза, что делает такую регуляцию быстрой и точной. В сердечно-сосудистой системе сероводород продемонстрировал выраженное кардиопротекторное действие, особенно выраженное в условиях гипертензии и ишемии миокарда. Наряду с NO, сероводород является важнейшим регулятором сосудистого тонуса, при этом он оказывает влияние на свойства эндотелия и регулирует сократимость гладких миоцитов сосуда. Пр продемонстрированы роль H₂S в патогенезе артериальной гипертензии и терапевтический потенциал этого газомедиатора и его производных при ее лечении как на животных моделях, так и в клинических исследованиях. Опубликованы данные исследований, подтверждающие участие сероводорода в процессах ангиогенеза и в патогенезе атеросклероза. Для сердечно-сосудистой системы, основной функцией которой является кислородное снабжение органов и тканей, важной представляется способность этого газомедиатора влиять на систему крови и выступать в качестве сенсора кислорода. Сероводород оказывает влияние на функциональные свойства тромбоцитов, стабильность тромба и микрососудистый тромболизис, есть экспериментальные подтверждения эффекта H₂S на микроциркуляторные свойства эритроцитов и процесс эритрогенеза. И хотя механизмы влияния сероводорода пока недостаточно изучены, есть свидетельства того, что все газомедиаторы находятся в тесном взаимодействии и их совместное действие дает синергетический эффект.

Ключевые слова: газомедиаторы, сероводород, регуляторные механизмы, сердечно-сосудистая система

Для цитирования: Тихомирова И. А., Петроченко Е. П., Петроченко А. С. Сероводород как сигнальная молекула в сердечно-сосудистой системе. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2021;20(1):5–16. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-5-16.

UDC 612.062:612.1+616.005

DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-5-16

I. A. TIKHOMIROVA¹, E. P. PETROCHENKO¹,
A. S. PETROCHENKO²

Hydrogen sulfide as a signaling molecule in the cardiovascular system

¹ Yaroslavl State Pedagogical University named after K. D. Ushinsky, Yaroslavl, Russia

108/1, Respublikanskaya str., Yaroslavl, Russia, 150000

² Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia

5, Revolutsiyonnaya str., Yaroslavl, Russia, 150000

E-mail: tikhom-irina@yandex.ru

Received 06.11.20; accepted 15.01.21

Summary

The review discusses published data on the effect of hydrogen sulfide on the functioning of the cardiovascular system. Hydrogen sulfide has become the third gas molecule, along with NO and CO, which was classified as gasotransmitters – signaling molecules, a unique feature of which is their ability to easily penetrate the cell membrane due to their good solubility in lipids. Signal transduction with the participation of gasotransmitters significantly differs from classical concepts – there is no need for

either special membrane receptors or transport systems, gasotransmitters realize their effect practically in the zone of their biosynthesis, which makes such regulation fast and accurate. In the cardiovascular system, hydrogen sulfide has shown a pronounced cardioprotective effect, especially pronounced in conditions of hypertension and myocardial ischemia. Along with NO, hydrogen sulfide is the most important regulator of vascular tone, while it affects both the properties of the endothelium and regulates the contractility of vascular smooth muscle cells. The role of H₂S in the pathogenesis of arterial hypertension and the therapeutic potential of this gasotransmitter and its derivatives in arterial hypertension treatment both in animal models and in clinical studies have been demonstrated. Experimental data confirming the participation of hydrogen sulfide in the processes of angiogenesis and in the pathogenesis of atherosclerosis were published. For the cardiovascular system, the main function of which is the oxygen supply to organs and tissues, the ability of this gasotransmitter to influence the blood system and act as an oxygen sensor seems to be important. Hydrogen sulfide affects the functional properties of platelets, thrombus stability and microvascular thrombolysis; there is experimental evidence of the effect of H₂S on the microrheological properties of erythrocytes and the process of erythropoiesis. And although the mechanisms of the effect of hydrogen sulfide have not yet been sufficiently studied, there is evidence that all gasotransmitters are in close interaction and their joint action gives a synergistic effect.

Keywords: *gasotransmitters, hydrogen sulfide, regulatory mechanisms, cardiovascular system*

For citation: Tikhomirova I. A., Petrochenko E. P., Petrochenko A. S. Hydrogen sulfide as a signaling molecule in the cardiovascular system. *Regional blood circulation and microcirculation*. 2021;20(1):5–16. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-5-16.

Введение

То, что в организме млекопитающих синтезируется сероводород, было известно достаточно давно, однако его считали, скорее, метаболическим «мусором», токсическим отходом жизнедеятельности [1]. Исследования H₂S как сигнальной молекулы были начаты относительно недавно – в конце XX в., когда впервые была описана возможность синтеза сероводорода в тканях головного мозга и выявлена его способность регулировать функции клеток [2]. Позднее было показано, что одной из систем, где сероводород играет ключевую роль как сигнальная молекула, является сердечно-сосудистая система.

H₂S был отнесен к семейству физиологических сигнальных газовых молекул (газомедиаторов), наряду с CO и NO [1], как малая молекула, которая свободно проникает сквозь клеточную мембрану и непосредственно реализует свою биологическую функцию, взаимодействуя с клеточными компонентами [3]. Концепция газомедиаторов возникла в 2002 г. и положила начало новой области исследования клеточных сигнальных механизмов [1]. Особые свойства и разнообразие эффектов газов изменили традиционную концепцию внутриклеточной и межклеточной коммуникации [4]. В течение последующих лет и в настоящее время ученые пытаются выявить многообразие эффектов и физиологическую значимость газомедиаторов в тканях организма, что открывает новые перспективы для фармакологических исследований и создания препаратов, регулирующих метаболизм и концентрацию газов в тканях организма при различных патологических состояниях [5].

Газомедиаторы имеют ряд особенностей: они являются липидорастворимыми, выделяются из любого участка клетки, не запасаются в везикулах и не высвобождаются путем экзоцитоза. Кроме того, для них не существует рецепторов на клеточной мембране, они могут диффундировать внутрь клетки. Обычно мишени газов – внутриклеточные ферменты и ионные каналы [5]. Растворимость H₂S в липидах в 5 раз превосходит растворимость в воде, что обуславливает его хорошую проникающую способность через мембранные структуры клетки и не требует участия специальных ионтранспортных систем [6]. В клетках млекопитающих H₂S продуцируется как ферментатическим путем, так и без участия ферментов; второй

способ обеспечивает незначительную долю в общем количестве эндогенного H₂S. В настоящее время известно три основных фермента, которые участвуют в синтезе сероводорода: цистатионин-β-синтаза (CBS), цистатионин-γ-лиаза (CSE) и 3-меркаптопируват-сульфотрансфераза (3MST). При этом CBS осуществляет синтез сероводорода преимущественно в клетках нервной системы. В гладкомышечных клетках кровеносных сосудов, сокращение и расслабление которых обеспечивает изменение тонуса последних, синтез сероводорода осуществляет фермент CSE, а в эндотелиальных клетках, выстилающих изнутри просвет сосуда, – 3MST [7].

Грань между физиологическими и токсическими эффектами H₂S очень тонкая [5]. Уровень H₂S в тканях локально и кратковременно повышается только в ответ на специфическую стимуляцию, затем его концентрация быстро снижается, так как он расщепляется ферментами, связывается с белками или реагирует с другими соединениями [1].

Сероводород и функции сердца

Кардиопротекторный эффект

Экспериментальными исследованиями установлено, что в сердце содержатся незначительные количества CBS, но достаточно много CSE. Исходя из этого был сделан вывод о том, что CBS не играет основной роли в сердечно-сосудистой системе в физиологических условиях, и это позволило предположить потенциальную физиологическую функцию H₂S/CSE. Субстратами для CSE являются гомоцистеин и L-цистеин. Повышенный уровень гомоцистеина считается независимым фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний, тромботических, нейродегенеративных и ассоциированных с беременностью патологий. В этих условиях гипергомоцистеинемия способствует развитию эндотелиальной дисфункции, ухудшая эндотелийзависимую вазодилатацию [1].

Большое количество опубликованных данных свидетельствует о кардиопротекторном эффекте H₂S при инфаркте миокарда и гипоксии. Имеются данные о кардиопротекторной роли H₂S, выражающейся в уменьшении повреждений миокарда в условиях ишемии/реперфузии в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. При инфаркте нарушается кровоснабжение сердца из-за поражения коронарных артерий,

что сопровождается развитием некроза в миокарде. На модели инфаркта миокарда у крыс было показано, что H_2S уменьшает смертность и снижает размер очага некроза. По-видимому, сосудорасширяющее действие H_2S приводит к усилению коронарного кровотока при ишемических заболеваниях и снижает клеточные повреждения. Кроме того, имеются данные о том, что H_2S способствует стимуляции ангиогенеза – процесса образования новых кровеносных сосудов, усиливая миграцию эндотелиальных клеток, что также оказывает кардиопротекторный эффект [8].

Было показано, что применение экзогенного L-цистеина уменьшает размер инфаркта миокарда при ишемической болезни сердца (ИБС); считается, что этот защитный эффект L-цистеина обусловлен увеличением эндогенной продукции H_2S с участием CSE, поскольку ингибирование активности CSE пропаргил глицином (PPG) устраняет этот эффект L-цистеина [8]. Доказано, что H_2S активирует K_{ATP} -каналы в митохондриях и сарколемме кардиомиоцитов, что лежит в основе кардиопротекторного эффекта. Донор H_2S NaHS может способствовать вазодилатации коронарных артерий, увеличивая объем коронарного кровотока при ишемии, уменьшая клеточные повреждения.

Экзогенное введение H_2S и эндогенная повышенная экспрессия CSE с модуляцией H_2S продемонстрировали терапевтическую эффективность при сердечной недостаточности ишемического генеза [9]. Терапия с использованием H_2S была признана успешной на моделях ишемических поражений. При ишемии/реперфузии миокарда как с preconditionированием, так и с postconditionированием соединениями, высвобождающими свободный H_2S (NaHS, Na_2S и GYY4137), было продемонстрировано уменьшение очага инфаркта. Механизм такой защиты включает активацию антиоксидантной системы с вовлечением антиапоптотических и противовоспалительных сигнальных путей [10, 11].

Хронотропный и инотропный эффекты сероводорода

Сообщения о хронотропном эффекте H_2S достаточно противоречивы. В некоторых исследованиях был выявлен отрицательный хронотропный эффект H_2S , обусловленный ингибированием кардиомиоцитов синоатриального узла, этот эффект блокировался в присутствии глутатиона, что позволило предположить вовлеченность АТФ-зависимых K^+ -каналов в реализацию этого эффекта [12]. С другой стороны, было показано, что внутривенное введение H_2S не оказало никакого влияния на ЧСС у крыс [13]. Использование PPG – ингибитора эндогенной продукции H_2S – также никак не повлияло на функцию клеток пейсмекера у кроликов [8]. Возможно, что хронотропный эффект H_2S зависит от его концентрации. M. Kohno et al. [14] продемонстрировали снижение ЧСС (на 10–27 % от контроля) у крыс, подвергшихся воздействию 75 ppm H_2S в течение 60 мин; в другом исследовании, напротив, сообщается о повышении ЧСС у крыс при воздействии 100–200 ppm H_2S в течение 1 ч [15].

В условиях необратимого повреждения изолированного сердца крысы при ишемии-реперфузии H_2S

продемонстрировал отрицательный инотропный эффект и снизил центральное венозное давление в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, тем самым защищая сердце от повреждения [16]. Большинство исследователей склоняются к выводу о том, что открытие АТФ-зависимых K^+ -каналов в миокарде играет ключевую роль в реализации отрицательного инотропного эффекта H_2S , поскольку глутатион – классический блокатор таких каналов – ингибирует инотропный эффект H_2S на сердце. Это соответствует и отрицательному инотропному эффекту других активаторов АТФ-зависимых K^+ -каналов, которые вызывают гиперполяризацию клеточной мембраны [1]. В исследованиях на крысах H_2S оказал отрицательное инотропное влияние *in vivo* и *in vitro*, что, по предположению авторов, может происходить как за счет блокирования потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов, так и за счет ингибирования фермента аденилатциклазы, которая продуцирует циклический АМФ – важный вторичный посредник, регулирующий сократимость кардиомиоцитов [17].

Однако не во всех исследованиях зафиксирован отрицательный инотропный эффект H_2S . Так, например, NaHS (донор сероводорода) не оказал существенного влияния на сократительную способность изолированных вентрикулярных кардиомиоцитов крысы *in vitro* [18]. В этих изолированных кардиомиоцитах был зафиксирован отрицательный инотропный эффект для нитропруссид натрия (донора NO) и L-аргинина и положительный инотропный эффект для изопроterenолола (агониста β -адренорецепторов) [19]. Интересно, что и отрицательный эффект NO, и положительный эффект изопроterenолола были нивелированы NaHS. Физиологическое значение такой роли NaHS в противодействии как положительным, так и отрицательным инотропным влияниям на сердце пока не выяснено.

Регуляторная функция H_2S в сосудистой системе

Регуляция сосудистого тонуса и артериального давления

Сероводород и высвобождающие его доноры давно известны как вещества, способствующие расслаблению сосудов, облегчающие гипоксическую легочную гипертензию, уменьшающие повреждения при ишемии/реперфузии миокарда, снижающие адгезию лейкоцитов к сосудистой стенке, уменьшающие рестеноз сосудов и обладающие противовоспалительным действием [16].

Одним из способов доказательства физиологического значения эндогенного H_2S служит подавление его эндогенной продукции в определенном органе или в организме в целом с анализом изменений фенотипа. У мышей с генетической делецией CSE (цистатин- γ -лиазы) в значительной части (хотя и не полностью) была блокирована продукция H_2S в сердечно-сосудистой системе; у этих животных в возрасте 8 недель из-за недостатка эндогенного сероводорода формировалась артериальная гипертензия, которая могла быть предотвращена инъекцией экзогенного H_2S . Другим важным фактом, установленным в этом исследовании, было то, что развитие

гипертензии у нокаутированных по CSE мышей было обусловлено серьезным нарушением эндотелийзависимой вазодилатации мелких резистивных артерий. G. Yang et al. [20] показали, что сосудистый эндотелий генерирует H_2S с участием CSE: стимуляция холинергических мускариновых рецепторов эндотелия повышает внутриклеточное содержание Ca^{2+} , активируя Ca -зависимый кальмодулин, который, в свою очередь, запускает синтез H_2S через стимуляцию CSE. Сероводород действует как на эндотелиоциты, так и на гладкие миоциты, вызывая вазодилатацию. У мышей, нокаутированных по CSE, эта цепочка нарушается из-за недостатка CSE [21].

Осуществляя свое регуляторное действие в сосудах артериального русла, H_2S принимает активное участие в регуляции артериального давления [21]. Исследования на людях позволили установить, что в группе лиц с нормальными показателями артериального давления концентрация H_2S в плазме крови составляла 34 мкМ, тогда как у больных артериальной гипертензией его содержание было снижено до 20 мкМ. Назначение больным артериальной гипертензией ингаляций сероводорода способствовало снижению показателей артериального давления. При проведении исследований на крысах обнаружили, что внутривенное болюсное введение раствора сероводорода вызывало у них дозозависимое снижение артериального давления [22].

В условиях *in vitro* донор сероводорода гидросульфид натрия (NaHS), активно используемый в экспериментальной практике, также вызывал расслабление различных отделов артериального и венозного русла: грудной, брыжеечной, почечной артерии, аорты, воротной вены и т. д. Несмотря на существенную роль эндотелия в регуляции сосудистого тонуса, его удаление не оказывало существенного влияния на эффекты сероводорода в гладкомышечных клетках [22], что свидетельствует о прямом влиянии сероводорода на гладкомышечные клетки через присущие им регуляторные механизмы. Расслабляющее действие сероводорода на гладкомышечные клетки преимущественно связано с открытием АТФ-зависимых калиевых каналов [1]. Открытие этих каналов ведет к увеличению выхода ионов калия из клетки в межклеточное пространство. В то же время активация АТФ-зависимых калиевых каналов сопровождается инактивацией потенциалзависимых кальциевых каналов L-типа, обеспечивающих поступление ионов кальция в клетку. Высокая внутриклеточная концентрация Ca^{2+} является необходимым условием развития сократительного ответа со стороны мышечной клетки. Закрытие кальциевых каналов способствует снижению концентрации свободного внутриклеточного Ca^{2+} [1]. Эти процессы в совокупности запускают механизмы расслабления в гладкомышечных клетках, что, в конечном итоге, приводит к снижению тонуса кровеносных сосудов и артериального давления в целом [9].

Таким образом, H_2S является эндогенным газовым модулятором сократительной активности сосудов. В отличие от NO и CO, H_2S -индуцированная вазорелаксация не опосредуется участием цГМФ-сигнального

пути. В то же время, подобно NO и CO, H_2S способен ингибировать пролиферацию гладких миоцитов сосудов и ускорять апоптоз *in vitro* [23]. Этот эффект реализуется посредством активации MAP-киназы и каспазы-3. Поэтому H_2S – не только вазодилататор, но еще и важный регулятор клеточного роста, способный уменьшать структурное ремоделирование тканей сосудов, что может пролить свет на механизмы некоторых сосудистых патологий и стать основой разработки новых терапевтических подходов [3].

NO считают эндотелиальным расслабляющим фактором в многочисленных отделах сосудистого русла, однако во многих сосудах вазодилатационная активность лишь частично снижается в присутствии ингибиторов NOS и при нокауте eNOS; активность эндотелиального расслабляющего фактора, обусловленная действием NO, наиболее выражена в крупных сосудах, таких как аорта, в то время как в резистивных сосудах, непосредственно регулирующих давление крови, эффект NO не столь очевиден [24]. Считают, что H_2S является, наряду с NO, эндотелиальным фактором расслабления сосудов, вызывая гиперполяризацию клеточной мембраны за счет активации АТФ-зависимых K^+ -каналов [5].

Роль H_2S в патогенезе гипертензии была изучена у спонтанно гипертензивных крыс (SHR). Гипертензия у животных развивалась спонтанно, при этом были зафиксированы снижение продукции H_2S и экспрессии CSE в тканях аорты и уменьшение содержания H_2S в плазме крови. Введение крысам NaHS в течение 5 недель приостановило развитие гипертензии и частично обратило вспять вызванное гипертензией ремоделирование сосудов и накопление коллагена [25].

Частично вазодилатация при действии сероводорода происходит благодаря активации АТФ-зависимых калиевых каналов, через которые ионы калия выходят из клетки, а это влечет за собой гиперполяризацию мембраны. Вслед за этим инактивируются потенциалзависимые Ca -каналы, снижается внутриклеточная концентрация кальция, и сосуды расслабляются [26]; также было показано, что H_2S увеличивает амплитуду одиночных токов через АТФ-зависимые калиевые каналы. Однако эффект H_2S только частично блокировался глибенкламидом – ингибитором АТФ-зависимых калиевых каналов [26], что указывает на участие дополнительных механизмов действия.

Было установлено, что экзогенный H_2S демонстрирует бифазный эффект на сосудистый тонус: при высоких концентрациях NaHS ($>400 \mu M$) проявляет свойства вазодилататора, а при низких концентрациях отмечена вазоконстрикция, было высказано предположение, что это может быть обусловлено ингибированием eNOS. Однако позднее было показано, что такой бифазный эффект – результат высокого напряжения кислорода, поскольку в физиологическом диапазоне напряжения кислорода NaHS и при низких концентрациях приводит к расслаблению сосудов [27]. Однако этот факт позволяет высказать предположение о том, что ответственными за вазоконстрикцию в этих условиях могут быть продукты окисления H_2S [28].

Использование соединений, высвобождающих сероводород (NaHS и GYY4137), приводит к снижению давления крови на моделях гипертензии [29]. Было показано, что H_2S быстро окисляется следовыми количествами кислорода, и полисульфид калия может быть более эффективным вазодилататором, чем NaHS. Получены данные о том, что внутрибрюшинное введение тиосульфата (нового донора H_2S) не только снижает давление крови при артериальной гипертензии, но еще и защищает сердце от повреждений, вызванных повышенным давлением [30].

Сероводород как сенсор кислорода

Есть свидетельства, указывающие на важную регуляторную роль H_2S в условиях гипоксии, однако механизмы, посредством которых H_2S определяет недостаток кислорода и реагирует на него, во многом не ясны. При исследовании механического и электрического ответов изолированных кровеносных сосудов на гипоксию было высказано предположение, что H_2S играет роль сенсора кислорода и преобразователя сосудистого ответа на гипоксию, поскольку ингибирование синтеза H_2S блокирует ответ на гипоксию кровеносных сосудов позвоночных, и концентрация H_2S в сосудах регулируется балансом между продукцией эндогенного H_2S и его окислением доступным O_2 [31].

Факторы, индуцируемые гипоксией (HIF), являются ключевым регулятором уровня кислорода, так как в условиях гипоксии они активируют экспрессию генов-мишеней. В ряде недавних исследований было продемонстрировано, что H_2S , подобно NO и CO, играет важную роль в регуляции функций HIF-1 при гипоксии. HIF-1 – основной регулятор гипоксии в клетках млекопитающих, который активирует транскрипцию более чем 100 таргетных генов при недостатке кислорода [32]. HIF-1 вовлечен в опосредуемый H_2S ангиогенез при гипоксии [33].

Исследования последних лет показали, что экзогенный H_2S регулирует действие HIF различными способами. Активация каротидных телец – это чувствительный и быстрый ответ на гипоксию, быстро восстанавливающий общее снабжение кислородом. Обладая высокой чувствительностью и быстрой скоростью ответа на гипоксию, каротидные тельца играют уникальную роль в детекции уровня кислорода. Было доказано, что H_2S является возбуждающим медиатором при детекции гипоксии каротидными тельцами [34].

H_2S быстро превращается в полисульфиды при контакте с кислородом или перекисью водорода. Пока не ясно, вовлечены ли полисульфиды в опосредуемый H_2S ответ каротидных телец на гипоксию или в регулируемые H_2S функции HIF.

Ангиогенез

Способность эндотелиальных клеток к пролиферации и миграции в ответ на стимул является чрезвычайно важной в эмбриогенезе, ангиогенезе, при заживлении ран, ишемизации тканей и при различных воспалительных заболеваниях. Существуют

убедительные свидетельства того, что H_2S способствует эндотелиальной пролиферации и миграции.

Линия эндотелиальных клеток головного мозга (bEnd3) в *in vitro* исследовании обладала более высокой пролиферативной и миграционной активностью, а также ранозаживляющей способностью после обработки NaHS (донором H_2S) [35]. Эндогенная продукция сульфида также важна для роста и миграции эндотелиоцитов. Нокаут по CSE в эндотелиоцитах пупочной вены человека и аортальных эндотелиоцитах мыши привел к снижению скорости пролиферации, а увеличение экспрессии CSE – к ее повышению [28].

На модели ишемии задней конечности крыс было продемонстрировано, что 4-недельное введение NaHS значительно увеличило рост коллатеральных сосудов, повысило плотность капилляров и интенсифицировало периферический кровоток в ишемизированной конечности в сравнении с контролем [36].

Хотя целый ряд исследований представляет убедительные свидетельства регуляторной роли соединений серы в эндотелиальной пролиферации и миграции, многие ключевые вопросы пока остаются без ответа. Поскольку на сегодняшний день существуют определенные технические проблемы с методами точного измерения содержания H_2S и его метаболитов, не совсем ясно, относятся ли наблюдаемые регуляторные эффекты к действию свободного сероводорода, либо это «заслуга» его полисульфидных производных. Исследование клеточного ответа с использованием высвобождающих H_2S соединений, таких, например, как NaHS, не дает гарантии, что при этом фиксируется биологический эффект, вызванный свободным H_2S , особенно если речь идет о часах или днях после обработки, поскольку в этом случае пролиферативный и промиграционный эффекты доноров сероводорода могут быть обусловлены участием его окисленных метаболитов [36].

Продуцирующие H_2S ферменты тесно связаны с базовым клеточным метаболизмом, включая синтез аминокислот и окислительно-восстановительный баланс, что также может оказывать влияние на клеточную пролиферацию и миграцию, и это необходимо учитывать при обсуждении роли сероводорода как газотрансмиттера или генератора полисульфидов [28].

Атеросклероз

Атеросклероз – сложный процесс, включающий в себя, наряду с другими нарушениями, эндотелиальную дисфункцию и сосудистое воспаление. Взаимосвязь уровня H_2S и прогрессирования атеросклероза подтверждена рядом исследований [37].

В работах Yuan S. et al. [38, 39] была выявлена уникальная взаимосвязь между экспрессией CSE и характером потока крови. Было продемонстрировано, что свободное течение крови способствует снижению экспрессии CSE и продукции полисульфидов, в то время как в регионах сосудистой системы с нарушенным током крови в эндотелиальных клетках отмечена повышенная экспрессия CSE. Эти эксперименты демонстрируют, что CSE в проатерогенных условиях способствует опосредованному течением

сосудистому ремоделированию и снижает эндотелиальную активацию. Недостаток CSE также ограничивает обусловленную действием пристеночного напряжения сдвига провоспалительную сигнализацию, включающую экспрессию генов ICAM-1 и VCAM-1 и инфильтрацию моноцитов, опосредованную NF-κB [40].

Недавно проведенные исследования [41] подтвердили выявленные ранее особенности экспрессии CSE в участках сосудов с меньшей кривизной и в месте бифуркации артерий. На основании этого можно предположить, что нарушения сигнального пути CSE/полисульфиды может ускорить развитие эндотелиальной дисфункции и атеросклероза, что можно скорректировать CSE/полисульфидной терапией.

В ряде исследований указывается на значительную роль H_2S в патогенезе атеросклероза, в частности, в его формировании и уменьшении последствий ишемического ремоделирования сосудов и повреждения тканей при ишемии-реперфузии. Было показано, что экзогенный H_2S снижает экспрессию гена остеопонтина, тем самым уменьшая кальцификацию сосудов, которая обычно фиксируется не только при атеросклерозе, но и при целом ряде заболеваний, таких как гипертензия, диабет, хроническая почечная недостаточность, артериальный стеноз, и при старении [1].

Влияние сероводорода на систему крови

Гемостаз

Было установлено, что и CSE, и CBS активны в крови и секретируются эндотелиальными клетками [41]. Данные о действии H_2S на тромбоциты немногочисленны. В исследовании G. Zagli et al. [43] было показано, что H_2S может ингибировать агрегацию тромбоцитов, хотя использовавшиеся в этом эксперименте концентрации H_2S превышали физиологическую норму [42]. Другие исследователи установили, что высокие концентрации H_2S оказывают слабый ингибирующий эффект на агрегацию тромбоцитов человека и незначительное влияние на их адгезию.

В ряде экспериментальных работ было продемонстрировано, что H_2S проявляет антитромботический эффект, ингибируя различные стадии активации тромбоцитов (адгезию, секрецию и агрегацию) и процесса формирования тромба [44]. В исследованиях G. Zagli et al. [42] было показано, что NaHS дозозависимо уменьшает агрегацию тромбоцитов, вызванную различными агонистами – АДФ, U46619, коллагеном, адреналином, тромбином и арахидоновой кислотой. Более того, было установлено, что H_2S модифицирует адгезивные свойства коллагена и фибриногена, ухудшая адгезию тромбоцитов [45].

A. Morel et al. [45] продемонстрировали *in vitro*, что NaHS ингибирует генерацию O_2 в тромбоцитах, и самый выраженный ингибирующий эффект отмечен для тромбоцитов, активированных тромбином. Влияние H_2S на сложные процессы коагуляции и фибринолиза неоднозначно в силу плеiotропного характера его действия. Полученные *in vitro* результаты свидетельствуют об антикоагулянтной активности H_2S [45], поэтому было выдвинуто предположение о том,

что H_2S может быть перспективным соединением для предотвращения тромбоза в условиях патологии при высокой прокоагулянтной активности плазмы. Модификации различных протеинов системы гемостаза (включая фибриноген, плазминоген и тромбин) под действием H_2S могут быть связаны с выявленными в эксперименте изменениями процесса коагуляции и фибринолиза [45].

Механизмы, посредством которых H_2S может влиять на функциональные свойства тромбоцитов, пока не ясны. В своем исследовании G. Zagli et al. (2007) [42] установили, что выявленный ими ингибиторный эффект H_2S не зависит ни от синтеза NO, ни от активации аденилатциклазы или гуанилатциклазы или K^+_{ATP} -каналов. Было высказано предположение о возможной роли тиолдисульфидных реакций в реализации влияния на тромбоциты [46], и, поскольку H_2S содержит тиоловую группу, это может обеспечить альтернативный механизм действия на тромбоциты.

В недавних исследованиях было показано, что донор H_2S GYY4137 повышает сульфидгидратацию протеинов тромбоцитов, дозозависимо снижает экспрессию адгезионных молекул и уменьшает морфологические признаки активации тромбоцитов. У мышей GYY4137 также значительно увеличил время формирования веноулярных тромбов, исходя из чего авторами был сделан вывод об антитромботических свойствах H_2S и его способности к регуляции тромбогенеза путем влияния на процессы активации, адгезии и агрегации тромбоцитов [47]. В продолжении этих исследований по оценке влияния GYY4137 на стабильность тромбов и микрососудистый тромболизис было показано значительное ускорение артериального и веноулярного тромболизиса под действием GYY4137 в сравнении с контролем (DMSO), а также установлено, что GYY4137 уменьшает стабильность тромба, снижая тромбоцитарно-лейкоцитарную агрегацию, и способствует эндогенному тромболизису у мышей [48].

Эритропоэз

В экспериментах *in vitro* было продемонстрировано, что применение H_2S оказывает положительное влияние на продукцию эритропоэтина почками при гипоксии, но не при нормоксии. По всей видимости, H_2S оказывает значительное влияние на эритрогенез и продукцию эритропоэтина почками. Возможно, H_2S по-разному взаимодействует с HIF-1α и HIF-2α, регулируя экспрессию соответствующих генов разными способами.

В исследованиях J. Leigh et al. [49], выполненных на основании клинических данных и с использованием животных моделей, была продемонстрирована взаимосвязь между H_2S и сигнальными путями HIF в регуляции включения таргетных генов при гипоксии. Нокаутирование по одному из трех основных ферментов биосинтеза H_2S привело к значительному снижению содержания гемоглобина, EPO, CBS, и NFκB-p65 в условиях гипоксии в сравнении с мышами дикого типа. Экзогенное введение H_2S позволило вернуть эти показатели к норме. А в условиях нормоксии был

отмечен обратный эффект – и содержание гемоглобина, и активность множества HIF-регулируемых генов были повышены в сравнении с контролем. Клинические исследования продемонстрировали, что у пациентов с хронической почечной недостаточностью и анемией содержание тиосульфата в моче было значительно ниже, чем у пациентов с ХПН без анемии, что косвенно подтвердило роль H_2S в поддержании нормального числа эритроцитов [49].

Гемотрансфузия

Опубликованные данные о роли сероводорода при кровопотерях достаточно противоречивы. Есть экспериментальные подтверждения тому, что H_2S при массивных кровопотерях способен обратимо снижать метаболические потребности тканей в условиях недостаточного снабжения кислородом. В модельных опытах у крыс с контролируемой кровопотерей (60 % от общего объема крови) 24-часовая выживаемость составляла лишь 14–23 %. При аналогичных условиях эксперимента вдыхание газообразного H_2S или внутривенное введение $NaHS$ повышало выживаемость до 67–75 % [50]. И наоборот, в другом исследовании было продемонстрировано, что у крыс при геморрагическом шоке быстрее восстанавливались ЧСС и артериальное давление, повреждение тканей минимизировалось в присутствии PPG , блокирующего продукцию H_2S , тем самым указывая на негативную роль сероводорода в этом процессе [51].

Реологические свойства крови

Сведения о возможном влиянии газовых молекул на функциональные свойства эритроцитов (и в том числе на их микрореологические характеристики, определяющие клеточный вклад в вязкость цельной крови) весьма немногочисленны. И если оценка эффекта NO в той или иной степени нашла свое отражение в публикациях последнего времени [52, 53], то исследования влияния сероводорода на микрореологические свойства эритроцитов и текучие свойства крови были предприняты совсем недавно и отражены в единичных публикациях. В экспериментах *in vitro* А. В. Муравьев и др. [54] продемонстрировали дозозависимый эффект доноров NO и H_2S (нитропруссид натрия и $NaHS$) на микрореологические свойства разных возрастных фракций эритроцитов, было выявлено снижение агрегируемости эритроцитов в присутствии газомедиаторов, наиболее выраженное для «старых» клеток. В дальнейшем изучение возможных механизмов влияния сероводорода на агрегируемость и деформируемость эритроцитов позволило прийти к выводу о существовании цГМФ-независимого прямого действия газотрансмиттеров на вязкоэластичные свойства мембраны красных клеток крови [55] и взаимовлиянии NO и H_2S при их совместном действии [56]. При изучении эффекта *in vitro* экзогенного сероводорода на микрореологические характеристики эритроцитов в норме и при сахарном диабете II типа был продемонстрирован положительный эффект этого газомедиатора, более выраженный в норме [57].

Механизмы регуляторных воздействий сероводорода

Сигнальные пути, вовлеченные в реализацию эффекта H_2S

Регуляторная функция H_2S реализуется через различные молекулярные мишени, такие как разнообразные ионные каналы и сигнальные белки. Один из основных механизмов действия H_2S – модификация протеинов. H_2S является сильным восстановителем и может восстанавливать двойные дисульфидные связи. Другой механизм – это присоединение дополнительного атома серы к тиоловой группе [1]. Химическая модификация белков приводит к изменению их конформации и функциональной активности. В клетке мишенями действия H_2S могут быть ионные каналы, мембранные и внутриклеточные ферменты, различные протеины и т. д. [5].

Так же, как NO , H_2S с высокой аффинностью связывается с гемом, однако в физиологических условиях стимуляции циклической гуанилатциклазы не происходит [2], ингибиторы гуанилатциклазы не влияют на способность H_2S расслаблять кровеносные сосуды, поэтому действие H_2S не зависит от данного фермента [6, 9].

Газомедиаторы перевернули привычные концепции о межклеточных взаимодействиях. Например, газообразное вещество не может храниться в везикулярных структурах и поэтому должно вновь синтезироваться по мере потребности в нем. Из этого следует, что вместо регуляции экзоцитоза как основного способа доставки активного вещества объектом тонких регуляторных механизмов становятся ферменты его биосинтеза. Вместо связывания с мембранными рецепторами клеток газомедиаторы диффундируют внутрь близлежащих клеток для взаимодействия со своими мишенями.

Два газомедиатора (NO и H_2S) обладают высокой химической реакционной способностью. Поэтому при случайном проникновении в клетку они должны быть перехвачены и инактивированы такими соединениями, как глутатион, которые присутствуют в клетке в достаточных количествах. Обычно NO достигает своей мишени посредством связывания фермента его биосинтеза (той или иной формы NO -синтазы (NOS)) с белком-мишенью. Подобный регуляторный механизм, по всей видимости, существует и для H_2S .

Возможно, самой уникальной особенностью газомедиаторов можно считать молекулярные механизмы их сигнализации. Классическая молекула посредника (мессенджера) действует через амплифицирующий сигнал каскад. Например, гормоны или нейромедиаторы действуют на G-белки посредством активации сопряженных с ними рецепторов, изменяя свойства G-белков, которые, в свою очередь, влияют на ферменты, продуцирующие циклические нуклеотиды или инозитол 1,4,5-трифосфат (IP_3). Циклические нуклеотиды оказывают влияние на различные протеинкиназы, IP_3 способствует высвобождению внутриклеточного кальция, который, в свою очередь, взаимодействует с различными внутриклеточными белками. Пептиды и белки, которые действуют через тирозин-киназные рецепторы, реализуют свой эффект через определенную

достаточно длинную молекулярную цепочку. И напротив, газомедиаторы химически модифицируют внутриклеточные протеины, очень оперативно влияя на клеточный метаболизм [4].

Было показано, что H_2S реализует свои эффекты посредством механизмов, сходных с нитрозилированием, формируя ковалентные связи с SH-группой цистеинов, этот процесс был назван сульфидгидратацией. Сульфидгидратация гораздо более распространена, чем нитрозилирование. В то время как нитрозилируются обычно от 1 до 5 % большинства протеинов, 10–25 % эндогенной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, β -тубулина и актина в основном сульфидгидратируются. Сульфидгидратация может влиять на функции белков иначе, чем нитрозилирование. При нитрозилировании как бы прикрываются активные SH-группы цистеинов, что обычно ведет к инактивации белков, хотя иногда фиксируется и активирующий эффект. При сульфидгидратации, напротив, SH-группа превращается в SSH, которая химически более реакционно-способна и готова легче вступать во взаимодействие с клеточным окружением. Например, сульфидгидратация глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы повышает ее активность на 700 % [58].

Полисульфиды

В последнее время высказывается мнение, что представление о том, что исключительно молекула сероводорода как такового способна одна реализовывать все описываемые в литературе сигнальные и биологические эффекты, по всей видимости, можно считать слишком упрощенным [59]. Хотя H_2S – это коротко живущая молекула, многочисленные исследования демонстрируют ее пролонгированный эффект в организме млекопитающих. Поэтому была выдвинута гипотеза о физиологическом значении метаболитов сероводорода, таких как персульфиды, полисульфиды и другие активные формы серы (RSS). Кроме экзогенного образования неорганических полисульфидов в растворе $NaHS$, было зафиксировано также и существование эндогенных неорганических полисульфидов [38, 60].

Концепция газомедиаторов рассматривает конкретные свойства этих сигнальных молекул газов, в том числе их хорошую проницаемость через клеточные мембраны, взаимодействие с гемопroteинами и их способность к регуляции посредством включения определенных сигнальных механизмов. Однако эта концепция не учитывает тех фактов, что продукты метаболизма этих газов (например, продукты окисления) зачастую являются медиаторами многих биологических функций в большей степени, чем молекулы исходных газов сами по себе. Окисление H_2S в реальных биологических условиях – это неизбежный процесс, в результате которого образуются полисульфиды и персульфиды, которые проявляют такие же эффекты, как и H_2S [38].

В исследовании [37] было продемонстрировано, что, наряду с H_2S , пер- и полисульфиды в равной степени способны регулировать различные эндотелиальные функции. На различных моделях сердечно-сосудистых заболеваний с повреждением тканей

была зафиксирована кардиопротекторная роль сульфида и полисульфида [61].

Взаимодействие газомедиаторов

Известные на сегодняшний день газомедиаторы H_2S , NO и CO обладают сходными химическими и биологическими свойствами, общими молекулярными мишенями и сходными клеточными эффектами. Они дополняют друг друга в регуляции биологических функций. Например, на тканевом уровне все три газа способны вызывать вазодилатацию, на клеточном уровне все могут ингибировать окислительное фосфорилирование, H_2S и NO действуют на цитохромоксидазу. Они могут также конкурировать друг с другом, все они связываются с гемоглобином [1].

Эффекты газомедиаторов могут быть опосредованы их взаимодействием друг с другом, что получило подтверждение в последние годы. Взаимодействие осуществляется на уровне как регуляции ферментов синтеза, так и мишеней их действия. Сероводород, например, ингибирует активность ферментов, синтезирующих NO – эндотелиальный фактор расслабления стенок аорты и других крупных сосудов, а донор NO, нитропруссид натрия, усиливает экспрессию цистатионин- γ -лиазы и цистатионин- β -синтазы [7].

Если вазодилатационный эффект NO реализуется в аорте, то расслабление брыжеечных артерий, относящихся к резистивным сосудам и являющихся более значимыми для регулирования периферического давления крови, в основном связано с H_2S . Видимо, от типа сосудов и вида животного зависит, какой именно расслабляющий фактор будет работать. Кроме того, механизмы действия H_2S и NO в сосудах различны. Эффекты NO опосредуются через растворимую форму гуанилатциклазы и модуляцию K_{Ca} -каналов, а H_2S – через гиперполяризацию, которая обеспечивается активностью K_{ATP} -каналов. NO, CO и H_2S могут активировать K_{Ca} -каналы высокой проводимости посредством разных химических модификаций канального белка. NO модифицирует сульфгидрильные группы, CO – остатки гистидина, а H_2S восстанавливает дисульфидные связи [62].

Известен факт, что ингибирование любого из H_2S -продуцирующих энзимов (CSE, CBS или 3-MST) уменьшает фосфорилирование eNOS по Ser1177 в ответ на напряжение сдвига, что свидетельствует о фундаментальной роли метаболизма H_2S в активации эндотелия, вызванной сдвигом [63].

Данные о взаимовлиянии продукции и высвобождения H_2S и NO достаточно противоречивы. Наряду с данными, свидетельствующими, что H_2S стимулирует выработку NO эндотелием [10], в других исследованиях были высказаны суждения о том, что H_2S ингибирует активность eNOS и блокирует эффект SNP (нитропруссид натрия) [9]. Было высказано предположение о том, что H_2S способен модифицировать активность фосфодиэстераз, тем самым оказывая влияние на уровень циклических нуклеотидов [64]. Было показано, что NO обладает способностью повышать экспрессию и активность CSE и связываться с циркулирующей в крови CSE, а возможно,

и с CBS [9]. В то же время L-NAME может снижать содержание H_2S , уменьшая активацию и экспрессию CSE [13].

Кроме влияния на ферменты, было установлено, что NO и H_2S способны образовывать нитрозотиольные соединения, обладающие определенной физиологической ролью, S-нитрозосоединения, ингибировать синтез тромбоксана ThA_2 , непосредственно приводя к цГМФ-независимому ингибированию активации тромбоцитов [65]. Также H_2S может восстанавливать NO до нитроксила (HNO), который предположительно может независимо действовать на цГМФ и цАМФ, возможно, посредством активации SERCA (Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума); однако в настоящее время не представляется возможным измерить содержание HNO , а следовательно, и оценить его роль [18].

Повышенное содержание свободного сероводорода в плазме крови может быть компенсаторным ответом на эндотелиальную дисфункцию и дисрегуляцию биодоступности NO. Недавними исследованиями было показано, что H_2S может оказывать влияние на экспрессию и функциональную активность eNOS, способствуя восстановлению нитрит-аниона до NO, выступая в качестве альтернативного пути регуляции биодоступности NO [35].

NO может оказывать влияние на уровень H_2S в тканях сосудов посредством двух механизмов. Zhao et al. обнаружили, что NO повышает активность CSE в сосудистых тканях. Они инкубировали гомогенат тканей аорты с донором NO в течение 90 мин, что привело к значительному дозозависимому увеличению продукции H_2S . Возможно, NO повышает активность цГМФ-зависимой протеинкиназы, которая, в свою очередь, стимулирует CSE. Кроме того, NO может непосредственно воздействовать на белок CSE. Белок CSE млекопитающих состоит из 12 цистеинов, специфические остатки цистеина, которые могут взаимодействовать с NO, пока не установлены. Однако вполне возможно, что имеет место нитрозирование определенных свободных SH-групп CSE в присутствии NO [9].

Вторым механизмом NO-индуцированной продукции H_2S является регуляция экспрессии CSE. Инкубация культуры сосудистых гладкомышечных клеток с донором NO в течение 6 ч существенно повышает уровень экспрессии CSE [9]. Другими исследованиями также было показано, что донор NO S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин (SNAP) увеличивает экспрессию CSE, а другой донор NO (SNP) повышает активность CSE [13].

Взаимодействие H_2S и NO играет важную роль в кардиопротекции и регуляции сосудистого тонуса. H_2S , полисульфиды и их взаимодействие с NO опосредуют различные физиологические и патофизиологические процессы [66].

Еще меньше известно о взаимодействии CO и H_2S ; однако было показано, что CO способен связываться и с CSE, и с CBS, блокируя их активность, причем'affинность связывания CO с CBS выше, чем у NO [67]. В целом можно заключить, что существующие на сегодняшний день представления о взаимодей-

ствии газомедиаторов свидетельствуют о возможном синергетическом эффекте, когда комбинация газовых молекул в низкой концентрации обеспечивает больший суммарный эффект, чем сумма эффектов каждого из газов в отдельности [43].

Заключение

Прошло более двух десятилетий с тех пор, как была установлена регуляторная функция H_2S , и сейчас этот газ признан важнейшей сигнальной молекулой и ключевым регулятором биологических функций. Нарушения метаболизма H_2S вовлечены в патогенез гипертензии, атеросклероза, сердечной недостаточности, сахарного диабета, цирроза печени, нейродегенеративных заболеваний, эректильной дисфункции, бронхиальной астмы, воспаления, сепсиса и ряда других заболеваний. В сердечно-сосудистой системе этот газомедиатор активно участвует в регуляции работы сердца, сосудистого тонуса и обладает выраженным влиянием на систему крови. Несмотря на то, что эффекты сероводорода в сердечно-сосудистой системе еще недостаточно изучены и механизмы его воздействия тоже пока не совсем ясны, опубликованные данные позволяют заключить, что эта газовая молекула обладает определенным как диагностическим, так и терапевтическим потенциалом при лечении сердечно-сосудистых заболеваний.

Финансирование / Acknowledgments

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00143. / The reported study was funded by RFBR, project number 20-015-00143.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev.* 2012; (92):791–896. Doi: 10.1152/physrev.00017.2011.
2. Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.* 1996; (16):1066–1071. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-03-01066.1996.
3. Huang S, Li H, Ge J. A cardioprotective insight of the cystathionine γ -lyase/hydrogen sulfide pathway. *IJC Heart & Vasculture.* 2015;7(1):51–57. Doi: org/10.1016/j.ijcha.2015.01.010.
4. Mustafa AK, Gadalla MM, Snyder SH. Signaling by Gasotransmitters. *Sci. Signal.* 2009;2(68):1–8. Doi: 10.1126/scisignal.268re2.
5. Ситдикова Г. Ф., Яковлев А. В., Зефирова А. Л. Газомедиаторы: от токсических эффектов к регуляции клеточных функций и использованию в клинике // Бюлл. сибир. мед. – 2014. – Т. 13, № 6. – С. 185–200. [Sitdikova GF, Yakovlev AV, Zefirov AL. Gazomediatory: ot toksicheskikh efektov k regulyatsii kletochnykh funktsiy i ispol'zovaniyu v klinike. *Byulleten' sibirskoy meditsiny.* 2014;13(6):185–200. (In Russ.)].
6. Колесников С. И., Власов Б. Я., Колесникова Л. И. Сероводород как третья эссенциальная газовая молекула живых тканей // Вестн. РАМН. – 2015. – Т. 70, № 2. – С. 237–241. Doi: 10.15690/vramn.v70i2.1318). [Kolesn-

- ikov SI, Vlasov BY, Kolesnikova LI. Serovodorod kak tret'ya essentsial'naya gazovaya molekula zhivyykh tkaney. *Vestnik RAMN*. 2015;70(2):237–241. (In Russ.).
7. Shibuya N, Milkanai Y, Kimura Y, Nagahara N, Kimura H. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *J. Biochem. Adv. Access*. 2009;(146):623–626. Doi: 10.1093/jb/ myp111.
 8. Elsey DJ, Fowkes RC, Baxter GF. L-Cysteine stimulates hydrogen sulfide synthesis in myocardium associated with attenuation of ischemia-reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2010;(15):53–59. Doi: 10.1177/1074248409357743.
 9. Rushing AM, Donnarumma E, Polhemus DJ, Au KR, Victoria SE, Schumacher JD, Li Z, Jenkins JS, Lefer DJ, Goodchild TT. Effects of a novel hydrogen sulfide prodrug in a porcine model of acute limb ischemia. *J Vasc Surg*. 2019;(69):1924–1935. Doi: 10.1016/j.jvs.2018.08.172.
 10. Chatzianastasiou A, Bibli SI, Andreadou I, Efentakis P, Kaludercic N, Wood ME, Whiteman M, Di Lisa F, Daiber A, Manolopoulos VG, Szabo C, Papapetropoulos A. Cardioprotection by H₂S donors: Nitric oxide-dependent and independent mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther*. 2016;(358):431–440. Doi: 10.1124/jpet.116.235119.
 11. Karwi QG, Whiteman M, Wood ME, Torregrossa R, Baxter GF. Pharmacological postconditioning against myocardial infarction with a slow-releasing hydrogen sulfide donor, GYY4137. *Pharmacol Res*. 2016;(111):442–451. Doi: 10.1016/j.phrs.2016.06.028.
 12. Xu M, Wu YM, Li Q, Wang X, He RR. Electrophysiological effects of hydrogen sulfide on pacemaker cells in sinoatrial nodes of rabbits. 2008;(60):175–180. PMID: 18425303.
 13. Zhao W, Wang R. H₂S induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol*. 2002;(283):474–480. Doi: 10.1152/ajpheart.00013.2002.
 14. Kohno M, Tanaka E, Nakamura T, Shimojo N, Misa-wa S. Influence of short-term inhalation of hydrogen sulfide in rats. *Eisei Kagaku Jpn J Toxicol Environ Health*. 1991;(37):103–106.
 15. Higuchi Y. Behavioral studies on toxicity of hydrogen sulfide by means of conditioned avoidance responses in rats. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 1977;(73):307–319. Doi: 10.1254/fpj.73.307.
 16. Sivarajah A, Collino M, Yasin M, Benetti E, Gallicchio M, Mazzone E, Cuzzocrea S, Fantozzi R, Thiemermann C. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R. *Shock*. 2009;(31):267–274. Doi: 10.1097/SHK.0b013e318180ff89.
 17. Elsey DJ, Fowkes RC, Baxter GF. Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide (H₂S). *Cell Biochem Funct*. 2010;28(2):95–106. Doi: 10.1002/cbf.1618. PMID: 20104507.
 18. Yong QC, Hu LF, Wang S, Huang D, Bian JS. Hydrogen sulfide interacts with nitric oxide in the heart: possible involvement of nitroxyl. *Cardiovasc Res*. 2010;(88):482–491. Doi: 10.1093/cvr/cvq248.
 19. Yong QC, Pan TT, Hu LF, Bian JS. Negative regulation of beta-adrenergic function by hydrogen sulfide in the rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;(44):701–710. Doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.01.007.
 20. Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S, Snyder SH, Wang R. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*. 2008;322(5901):587–590. Doi: 10.1126/science.1162667.
 21. Skovgaard N, Gouliava A, Aalling M, Simonsen U. The Role of Endogenous H₂S in Cardiovascular Physiology. *Curr. Pharm. Biotechnol*. 2011;(12):1385–1393. Doi: 10.2174/138920111798280956.
 22. Lowicka E, Beltowski J. Hydrogen sulfide – the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacol. Reports*. 2007;(59):4–24. PMID: 17377202.
 23. Du J, Yan H, Cheung Y, Geng B, Jiang H, Chen X, Tang C. The possible role of hydrogen sulfide as a smooth muscle cell proliferation inhibitor in rat cultured cells. *Heart Vessels*. 2004;(19):75–80. Doi: 10.1007/s00380-003-0743-7.
 24. Brandes RP, Schmitz-Winnenthal FH, Félétou M, Gödecke A, Huang PL, Vanhoutte PM, Fleming I, Busse R. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;(97):9747–9752. Doi: 10.1073/pnas.97.17.9747.
 25. Zhao X, Zhang L, Zhang C, Zeng X, Yan H, Jin HF, Tang C, Du JB. Regulatory effect of hydrogen sulfide on vascular collagen content in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2008;(31):1619–1630. Doi: 10.1291/hypres.31.1619.
 26. Cheng Y, Ndisang JF, Tang G, Cao K, Wang R. Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;(287):H2316–H2323. Doi: 10.1152/ajpheart.00331.2004.
 27. Koenitzer JR, Isbell TS, Patel HD, Benavides GA, Dickinson DA, Patel RP, Darley-Usmar VM, Lancaster JR, Doeller JE, Kraus DW. Hydrogen sulfide mediates vasoactivity in an O₂-dependent manner. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;(292):H1953–H1960. Doi: 10.1152/ajpheart.01193.2006.
 28. Yuan S, Shen X, Kevil CG. Beyond a Gasotransmitter: Hydrogen Sulfide and Polysulfide in Cardiovascular Health and Immune Response Antioxid. *Redox Signal*. 2017;(27):634–653. Doi: 10.1089/ars.2017.7096.
 29. Possomato-Vieira JS, Goncalves-Rizzi VH, Graca TU, Nascimento RA, Dias-Junior CA. Sodium hydrosulfide prevents hypertension and increases in vascular endothelial growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase-1 in hypertensive pregnant rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2016;(389):1325–1332. Doi: 10.1007/s00210-016-1296-5.
 30. Snijder PM, Frenay AR, de Boer RA, Pasch A, Hillebrands JL, Leuvenink HG, van Goor H. Exogenous administration of thiosulfate, a donor of hydrogen sulfide, attenuates angiotensin II-induced hypertensive heart disease in rats. *Br J Pharmacol*. 2015;(172):1494–1504. Doi: 10.1111/bph.12825.
 31. Olson KR, Dombkowski RA, Russell MJ, Doellman MM, Head SK, Whitfield NL, Madden JA. Hydrogen sulfide as an oxygen sensor/transducer in vertebrate hypoxic vasoconstriction and hypoxic vasodilation. *J Exp Biol*. 2006;(209):4011–4023. Doi: 10.1242/jeb.02480.
 32. Semenza GL. Hypoxia. Cross talk between oxygen sensing and the cell cycle machinery, *The American Journal of Physiology – Cell Physiology*. 2011;301(3):C550–C552. Doi: 10.1152/ajpcell.00176.2011.
 33. Wu B, Teng H, Yang G, Wu L, Wang R. Hydrogen sulfide inhibits the translational expression of hypoxia-inducible factor-1α. *British Journal of Pharmacology*. 2012;167(7):1492–1505. Doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02113.x.
 34. Wu B, Teng H, Zhang L, Li H, Li J, Wang L, Li H. Interaction of Hydrogen Sulfide with Oxygen Sensing under Hypoxia. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;758678. Doi: 10.1155/2015/758678.
 35. Coletta C, Papapetropoulos A, Erdelyi K, Olah G, Modis K, Panopoulos P, Asimakopoulou A, Gero D, Sharina I, Martin E, Szabo C. Hydrogen sulfide and nitric oxide are

- mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;(109):9161–9166. Doi: 10.1073/pnas.1202916109.
36. Wang MJ, Cai WJ, Li N, Ding YJ, Chen Y, Zhu YC. The hydrogen sulfide donor NaHS promotes angiogenesis in a rat model of hind limb ischemia. *Antioxid Redox Signal*. 2010;(12): 1065–1077. Doi: 10.1089/ars.2009.2945.
37. Bolton SG, Cerda MM, Gilbert AK, Pluth MD. Effects of sulfane sulfur content in benzyl polysulfides on thiol-triggered H₂S release and cell proliferation. *Free Radic Biol Med*. 2019;(131):393–398. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.025.
38. Yuan S, Pardue S, Shen X, Alexander JS, Orr AW, Kevil CG. Hydrogen sulfide metabolism regulates endothelial solute barrier function. *Redox Biol*. 2016;(9):157–166. Doi: 10.1016/j.redox.2016.08.004.
39. Yuan S, Yurdagul AJr, Peretik JM, Alfaidi M, Al Yafeai Z, Pardue S, Kevil CG, Orr AW. Cystathionine γ -lyase modulates flow-dependent vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;(38):2126–2136. Doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311402.
40. Bibli SI, Hu J, Sigala F, Wittig I, Heidler J, Zukunft S, Tsilimigras DI, Randriamboavonjy V, Wittig J, Kojonazarov B, Schürmann C, Siragusa M, Siuda D, Luck B, Abdel Malik R, Filis KA, Zografos G, Chen C, Wen Wang D, Pfeilschifter J, Brandes RP, Szabo C, Papapetropoulos A, Fleming I. Cystathionine γ lyase sulfhydrates the RNA binding protein human antigen R to preserve endothelial cell function and delay atherogenesis. *Circulation*. 2019;(139):101–114. Doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034757.
41. Bearden SE, Beard RS, Jr, Pfau JC. Extracellular transsulfuration generates hydrogen sulfide from homocysteine and protects endothelium from redox stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299(5):H1568–H1576. Doi: 10.1152/ajpheart.00555.2010.
42. Zagli G, Patacchini R, Trevisani M, Abbate R, Cinotti S, Gensini GF, Masotti G, Geppetti P. Hydrogen sulfide inhibits human platelet aggregation. *Eur J Pharmacol*. 2007;559(1):65–68. Doi: 10.1016/j.ejphar.2006.12.011.
43. Truss NJ, Warner TD. Gasotransmitters and platelets. *Pharmacology & Therapeutics*. 2011;(132):196–203. Doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.07.001.
44. Olas B. Hydrogen sulfide in hemostasis: friend or foe? *Chem Biol Interact*. 2014;25(217):49–56. Doi: 10.1016/j.cbi.2014.04.006.
45. Morel A, Malinowska J, Olas B. Hydrogen sulfide changes adhesive properties of fibrinogen and collagen in vitro. *Platelets*. 2014;25(2):147–149. Doi: 10.3109/09537104.2012.737490.
46. Essex DW. The role of thiols and disulfides in platelet function. *Antioxid Redox Signal*. 2004;6(4):736–746. Doi: 10.1089/1523086041361622.
47. Grambow E, Mueller-Graf F, Delyagina E, Frank M, Kuhla A, Vollmar B. Effect of the hydrogen sulfide donor GYY4137 on platelet activation and microvascular thrombus formation in mice. *Platelets*. 2014;25(3):166–174. Doi: 10.3109/09537104.2013.786823.
48. Grambow E, Leppin C, Leppin K, Kundt G, Klar E, Frank M, Vollmar B. The effects of hydrogen sulfide on platelet-leukocyte aggregation and microvascular thrombolysis. *Platelets*. 2017;28(5):509–517. Doi: 10.1080/09537104.2016.1235693.
49. Leigh J, Saha MN, Mok A, Champai O, Wang R, Lobb I, Sener A. Hydrogen Sulfide Induced Erythropoietin Synthesis is Regulated by HIF Proteins. *J Urol*. 2016;196(1):251–260. Doi: 10.1016/j.juro.2016.01.113.
50. Morrison ML, Blackwood JE, Lockett SL, Iwata A, Winn RK, Roth MB. Surviving blood loss using hydrogen sulfide. *J Trauma*. 2008;(65):183–188. Doi: 10.1097/TA.0b013e3181507579.
51. Mok YYP, Shirhan M, Cheong YP, Wang ZJ, Bhatia M, Mochhala S, Moore PK. Role of hydrogen sulfide in haemorrhagic shock in the rat: protective effect of inhibitors of hydrogen sulfide biosynthesis. *Br J Pharmacol*. 2004;(143):881–889. Doi: 10.1038/sj.bjp.0706014.
52. Baskurt OK, Ulker P, Meiselman HJ. Nitric oxide, erythrocytes and exercise. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2011;49(1–4):175–81. Doi: 10.3233/CH-2011-1467.
53. Grau M, Pauly S, Ali J, Walpurgis K, Thevis M, Bloch W, Suhr F. RBC-NOS-dependent S-nitrosylation of cytoskeletal proteins improves RBC deformability. *PLoS One*. 2013;8(2):e56759. Doi: 10.1371/journal.pone.0056759.
54. Muravyov AV, Tikhomirova IA, Avdonin PV, Bulayeva SV, Malysheva YV, Kislov NV. Cellular models of erythrocytes for studying the effect of gasotransmitters on their microrheology. *Journal of Cellular Biotechnology*. 2019;(5):3–10. Doi: 10.3233/JCB-189009.
55. Муравьев А. В., Авдонин П. В., Тихомирова И. А. и др. Влияние газотрансмиттеров на мембранную эластичность и микрореологию эритроцитов // Биологические мембраны. – 2019. – Т. 36, № 4. – С. 281–289. Doi: 10.1134/S0233475519040091. [Murav'yev AV, Avdonin PV, Tikhomirova IA, Bulayeva SV, Malysheva YV. Vliyaniye gazotransmitterov na membrannuyu elastichnost' i mikroreologiyu eritrotsitov. *Biologicheskiye membrany*. 2019;36(4):281–289. (In Russ.)].
56. Muravyov AV, Antonova N, Tikhomirova IA. 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;33(2):34–40.
57. Тихомирова И. А., Кислов Н. В., Малышева Ю. В. и др. Влияние газотрансмиттера сероводорода на микрореологические свойства эритроцитов здоровых лиц и больных сахарным диабетом второго типа // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2020. – № 1 (81). – С. 21–26. [Murav'yev AV, Tikhomirova IA, Kislov NV, Malysheva YV, Zamyshlyayev AV. Vliyaniye gazotransmittera serovodорода na mikroreologicheskiye svoystva eritrotsitov zdorovykh lits i bol'nykh sakharnym diabetom vtorogo tipa. *Tromboz, gemostaz i reologiya*. 2020;1(81):21–26. (In Russ.)]. Doi: 10.25555/THR.2020.
58. Vandiver MS, Snyder SH. Hydrogen Sulfide: A gasotransmitter of clinical relevance. *J Mol Med (Berl)*. 2012;90(3):255–263. Doi: 10.1007/s00109-012-0873-4.
59. Kolluru GK, Shen X, Kevil CG. Reactive Sulfur Species: A New Redox Player in Cardiovascular Pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40(4):874–884. Doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314084.
60. King AL, Polhemus DJ, Bhushan S, Otsuka H, Kondo K, Nicholson CK, Bradley JM, Islam KN, Calvert JW, Tao YX, Dugas TR, Kelley EE, Elrod JW, Huang PL, Wang R, Lefer DJ. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;(111):3182–3187. Doi: 10.1073/pnas.1321871111.
61. Calvert JW, Elston M, Nicholson CK, Gundewar S, Jha S, Elrod JW, Ramachandran A, Lefer DJ. Genetic and pharmacologic hydrogen sulfide therapy attenuates ischemia-induced heart failure in mice. *Circulation*. 2010;(122):11–19. Doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.920991.
62. Ситдикова Г. Ф., Зефиоров А. Л. Газообразные посредники в нервной системе // Рос. физиолог. журн. им. И. М. Сеченова. – 2006. – Т. 97, № 7. – С. 872–882. [Sitdikova GF, Zefirov AL. Gazoobraznyye posredniki v nervnoy sisteme. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2006;97(7):872–878. (In Russ.)].

63. Huang B, Chen CT, Chen CS, Wang YM, Hsieh HJ, Wang DL. Laminar shear flow increases hydrogen sulfide and activates a nitric oxide producing signaling cascade in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;(464):1254–1259. Doi: 10.1016/j.bbrc.2015.07.115.

64. Bucci M, Papapetropoulos A, Vellecco V, Zhou Z, Pyriochou A, Roussos C, Roviezzo F, Brancalone V, Cirino G. Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(10):1998–2004. Doi: 10.1161/ATVBAHA.110.209783.

65. Whiteman M, Moore PK. Hydrogen sulfide and the vasculature: a novel vasculoprotective entity and regulator of nitric oxide bioavailability? *J Cell Mol Med*. 2009;13(3):488–507. Doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00645.x.

66. Kimura H. Signaling Molecules: Hydrogen Sulfide and Polysulfide. *Antioxidants & Redox signaling*. 2015;22(5). Doi: 10.1089/ars.2014.5869.

67. Yamamoto T, Takano N, Ishiwata K, Suematsu M. Carbon monoxide stimulates global protein methylation via its inhibitory action on cystathionine beta-synthase. *J Clin Biochem Nutr*. 2011;48(1):96–100. Doi: 10.3164/jcbrn.11-011FR.

Информация об авторах

Тихомирова Ирина Александровна – д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой медицины ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского», г. Ярославль, Россия, e-mail: tikhom-irina@yandex.ru.

Петроченко Елена Петровна – канд. биол. наук, доцент кафедры безопасности жизнедеятельности ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского», г. Ярославль, Россия, e-mail: epg.84@mail.ru.

Петроченко Александр Сергеевич – канд. мед. наук, доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского», г. Ярославль, Россия, e-mail: asp.80@mail.ru.

Author information

Tikhomirova Irina A. – Sc. D., Professor, Head of Medicine Department, Yaroslavl State Pedagogical University named after K. D. Ushinsky, Yaroslavl, Russia, e-mail: tikhom-irina@yandex.ru.

Petrochenko Elena P. – Ph. D., assistant professor at the Department of Life Safety of Yaroslavl State Pedagogical University named after K. D. Ushinsky, Yaroslavl, Russia, e-mail: epg.84@mail.ru.

Petrochenko Alexander S. – M. D., Ph. D., assistant professor at the Pharmacology Department of Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia, e-mail: asp.80@mail.ru.

УДК 616.1, 612.111.6

DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-17-24

И. М. КАДАНОВА, А. И. НЕЗНАНОВ, А. Е. ЛУГОВЦОВ,
Ю. И. ГУРФИНКЕЛЬ, А. А. ПИГУРЕНКО, Л. И. ДЯЧУК,
А. В. ПРИЕЗЖЕВ

Взаимосвязь параметров капиллярного кровотока, измеренных *in vivo*, и микрореологических параметров крови, измеренных *in vitro*, при артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», Москва, Россия
119991, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1
E-mail: kadanovairina@mail.ru

Статья поступила в редакцию 29.11.20; принята к печати 15.01.21

Резюме

Введение. При сердечно-сосудистых заболеваниях нарушается микроциркуляция крови, а также ее микрореологические свойства, которые характеризуются способностью эритроцитов к агрегации и деагрегации. Поэтому исследования взаимосвязи нарушения агрегации эритроцитов и микроциркуляции при патологиях представляют интерес как для развития теоретических представлений о токе крови, так и для клинической практики. **Цель** – провести анализ взаимосвязи параметров капиллярного кровотока, измеренных *in vivo*, и микрореологических параметров крови, измеренных *in vitro*, при артериальной гипертензии (АГ) и ишемической болезни сердца (ИБС). **Материалы и методы.** В работе были исследованы 3 группы людей: пациенты с АГ, пациенты с АГ+ИБС и здоровые доноры. Измерения характерного времени агрегации и индекса агрегации проводились *in vitro* методом лазерной агрегометрии. Анализ скорости капиллярного кровотока (СКК) и оценка наличия и отсутствия агрегатов эритроцитов в капиллярах ногтевого ложа испытуемых проводились *in vivo* с использованием цифровой капилляроскопии (ЦК). **Результаты.** Агрегация эритроцитов для групп пациентов с АГ и АГ+ИБС повышена по сравнению с контрольной группой. Так, характерное время агрегации статистически значимо уменьшается в среднем на $(38 \pm 13) \%$. Сопоставление результатов, полученных с использованием методов *in vitro* и *in vivo*, показало, что индекс агрегации для лиц с высокой СКК достоверно ниже, чем у лиц с низкой СКК. Тенденция состоит в увеличении количества агрегатов в капиллярах при снижении СКК. **Заключение.** У групп пациентов с АГ и АГ+ИБС агрегация эритроцитов повышена по сравнению с контрольной группой. Взаимосвязь между параметрами, измеренными *in vitro* и *in vivo*, проявляется для пациентов, разделенных на подгруппы в соответствии с параметрами, измеренными с помощью ЦК. Полученные результаты исследований позволяют сделать вывод о применимости используемых методов в клинической практике.

Ключевые слова: микроциркуляция, агрегация эритроцитов, лазерная агрегометрия, цифровая капилляроскопия, артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца

Для цитирования: Каданова И. М., Незнанов А. И., Луговцов А. Е., Гурфинкель Ю. И., Пигуренко А. А., Дячук Л. И., Приезжев А. В. Взаимосвязь параметров капиллярного кровотока, измеренных *in vivo*, и микрореологических параметров крови, измеренных *in vitro*, при артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2021;20(1):17–24. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-17-24.

UDC 616.1, 612.111.6

DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-17-24

I. M. KADANOVA, A. I. NEZNANOV, A. E. LUGOVTSOV,
Yu. I. GURFINKEL, A. A. FIGURENKO, L. I. DYACHUK,
A. V. PRIEZZHEV

Relationship between capillary blood flow parameters measured *in vivo* and microrheologic parameters of blood measured *in vitro* in arterial hypertension and coronary heart disease

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
1, Leninskie Gory, Moscow, Russia, 119991
E-mail: kadanovairina@mail.ru

Received 29.11.20; accepted 15.01.21

Summary

Introduction. Blood microcirculation and its microrheologic properties are impaired in cardiovascular diseases. Microrheologic properties are characterized by the red blood cells (RBC) ability to aggregate and disaggregate. Therefore, the correlation studies

between RBC aggregation and microcirculation disorders in pathologies are of interest for the development of theoretical concepts related to blood flow and for clinical practice. *Aim.* To analyze the correlation between capillary blood flow parameters measured *in vivo* and microrheologic blood parameters measured *in vitro* in patients suffering arterial hypertension (AH) and coronary heart disease (CHD). *Materials and methods.* We studied 3 groups of people: patients suffering AH, patients suffering AH+CHD and healthy donors. The characteristic aggregation time and aggregation index were measured *in vitro* by laser aggregometry. Analysis of capillary blood velocity (CBV) and assessment of the presence and absence of RBC aggregates in the nail bed capillaries were performed *in vivo* using vital digital capillaroscopy (VDC). *Results.* RBC aggregation for groups of patients suffering AH and AH+CHD was increased compared to the control group. Thus, in these patients groups, the characteristic aggregation time significantly decreases by an average of $(38 \pm 13) \%$. Comparison of the results obtained using *in vitro* and *in vivo* methods showed the aggregation index for individuals with high CBV was significantly lower than for individuals with low CBV. The tendency is that the number of aggregates in the capillaries increases with a decrease in CBV. *Conclusion.* RBC aggregation is increased in groups of patients suffering AH and AH+CHD compared to the control group. The correlation between parameters measured *in vitro* and *in vivo* is evident for patients divided into subgroups according to parameters measured using the VDC. The obtained results allow us to conclude that the used methods are applicable in clinical practice.

Keywords: microcirculation, red blood cells aggregation, laser aggregometry, digital capillaroscopy, arterial hypertension, coronary heart disease

For citation: Kadanova I. M., Neznanov A. I., Lugovtsov A. E., Gurfinkel Yu. I., Pigurenko A. A., Dyachuk L. I., Priezzhev A. V. Relationship between capillary blood flow parameters measured *in vivo* and microrheologic parameters of blood measured *in vitro* in arterial hypertension and coronary heart disease. *Regional blood circulation and microcirculation.* 2021;20(1):17–24. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-17-24.

Введение

Состояние кровеносных сосудов и микроциркуляции крови определяет структуру сердечно-сосудистой системы человека. Нарушения ее работы являются наиболее распространенными у людей, проживающих в развитых странах мира, и занимают 1-е место по числу летальных исходов [1]. При таких заболеваниях нарушается микроциркуляция крови, а также ее микроциркуляторные свойства, которые характеризуются способностями эритроцитов к обратимой спонтанной агрегации и вынужденной дезагрегации.

Анализ процесса агрегации эритроцитов в норме и при патологии позволяет выявить отклонения в скорости образования агрегатов эритроцитов, а также их размере и прочности [2, 3]. Так, патологическая агрегация эритроцитов выявлена при самых разных заболеваниях, примерами которых могут служить артериальная гипертензия, сахарный диабет, инсульт, инфаркт [4–8].

Последствия патологической агрегации эритроцитов проявляются в нарушениях на микроциркуляторном уровне, они не являются однозначными и во многом зависят от степени гемореологических нарушений [9]. В микрососудах при патологической агрегации эритроцитов можно наблюдать *in vivo* значительное замедление кровотока. При этом кровоток в микрососудах становится весьма неравномерным [10]. Таким образом, выраженная патологическая агрегация эритроцитов создает основу для развития микроциркуляторной патологии. Поэтому дальнейшие исследования взаимосвязи нарушения агрегации эритроцитов и микроциркуляции при патологиях представляют интерес как для развития теоретических представлений о токе крови на уровне микрососудов, так и для клинической практики.

Целью работы является анализ взаимосвязи параметров капиллярного кровотока, измеренных *in vivo*, и микроциркуляторных параметров крови, измеренных *in vitro*, при артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца.

Материалы и методы исследования

Метод лазерной агрегометрии. Измерения агрегационных параметров эритроцитов *in vitro* проводились

с помощью метода лазерной агрегометрии, основанного на диффузном рассеянии лазерного излучения кровью. В данной работе использовался лазерный агрегометр эритроцитов RheoScan AnD-300 (RheoMedTech, Корея) [11]. Принцип работы агрегометра основан на регистрации выходного сигнала, пропорционального интенсивности рассеянного вперед излучения на слое цельной крови при спонтанной агрегации.

Процесс измерения на одном образце крови состоял в следующем. В кювету с магнитным перемешивающим стержнем помещали 8 мкл цельной крови и устанавливали в прибор. Под действием вращающегося магнитного поля, которое создается внутри прибора, магнитный стержень в кювете начинал вращаться. В результате все агрегаты, образовавшиеся в резервуаре в результате процесса спонтанной агрегации, разрушались. Далее вращение стержня мгновенно останавливалось (момент времени $t=0$ на рис. 1), и в образце крови в кювете начинался процесс спонтанной агрегации. После остановки стержня происходит

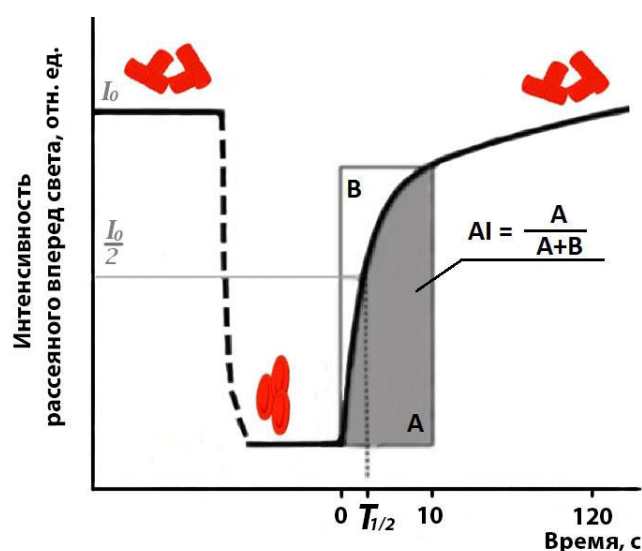


Рис. 1. Кинетика спонтанной агрегации эритроцитов, регистрируемая с помощью RheoScan: $T_{1/2}$ – характерное время образования агрегатов; AI – индекс агрегации

Fig. 1. Kinetics of spontaneous aggregation of red blood cells measured using RheoScan: $T_{1/2}$ – characteristic time of aggregates formation; AI – aggregation index

Таблица 1

Сравнение клинических данных пациентов

Table 1

Comparison of the clinical characteristics of patients

Параметр	Пациенты с АГ (1-я группа) (n=76)	Пациенты с АГ и ИБС (2-я группа) (n=53)
Число мужчин, n	36 (47,4 %)	39 (73,6 %)
Средний возраст (диапазон), лет	58,2 (24–83)	68,8 (51–92)
Индекс массы тела, кг/м ²	31±5	29±6
Число курящих, %	15 (20 %)	9 (17 %)
Систолическое давление, мм рт. ст.	144±21	139±29
Диастолическое давление, мм рт. ст.	87±13	84±13
Частота сердечных сокращений, уд./мин	72±13	72±8
Фракция выброса, %	61±5	55±8
Число пациентов, принимавших антиагреганты, n	23 (30,3 %)	41 (77,4 %)
Число пациентов, принимавших диуретики, n	43 (56,6 %)	24 (45,3 %)

монотонный рост сигнала вследствие увеличения размеров рассеивающих частиц при их спонтанной агрегации. Более подробное описание процедуры измерения на агрегометре можно найти в работе [12].

По полученной агрегационной кинетике (рис. 1) вычислялись следующие агрегационные параметры. Индекс агрегации (AI) – доля эритроцитов, проагрегировавших за первые 10 с процесса спонтанной агрегации. Данная величина рассчитывалась как отношение площади под кривой, соответствующей агрегационной кинетике, к суммарной площади под и над кривой за первые 10 с процесса спонтанной агрегации. Характерное время агрегации ($T_{1/2}$) – время, за которое интенсивность света, рассеянного вперед, достигает на агрегационной кинетике половинного значения интенсивности, соответствующей максимальной агрегации в образце.

Таким образом, чем выше параметр AI, тем больше доля проагрегировавших эритроцитов за первые 10 с процесса спонтанной агрегации. С увеличением характерного времени агрегации эритроциты агрегируют медленнее, соответственно, процесс агрегации замедляется.

Метод цифровой капилляроскопии (ЦК) использовался для изучения параметров кровотока *in vivo*. Стоит отметить, что *in vivo* измерения, при которых кровь течет по сосудам, отличаются от *in vitro* измерений, при которых кровь находится в искусственных кюветах. С помощью капилляроскопа Капилляроскан-1 («Новые энергетические технологии», Россия) производилась визуальная оценка капилляров ногтевого ложа. Капилляроскан-1 оборудован высокоскоростной CCD-камерой (1/3" датчик CCD, разрешение – 640×480 пикселей, частота кадров – 200 кадров в секунду в полнокадровом режиме), ТМ-6740GE (JAI, Япония). Для визуализации капилляров ногтевого ложа использовались два диапазона полного увеличения – ×125 и ×400. В результате эксперимента были получены следующие параметры: скорость капиллярного кровотока (СКК) и оценка наличия или отсутствия агрегатов крови в капиллярах.

Для определения СКК после записи видео программа стабилизирует динамические изображения капилляров и затем обрабатывает их в заданной области в автономном режиме. Программа определяет среднюю скорость эритроцитов вдоль оси капилляра в течение 5 с. СКК оценивается в 6 капиллярах, а затем результаты усредняются. Измерения СКК проводятся только в капиллярах первой линии, где капилляры расположены в пределах одного слоя. Таким образом, полученные значения СКК не зависят от движения крови в сосудах, лежащих выше и ниже исследуемого капилляра. Обычно в состоянии покоя у здоровых людей, не принимающих кофеин-содержащие вещества и напитки накануне исследования, средняя СКК колеблется в диапазоне от 800 до 1500 мкм/с. Более детально процедура измерения СКК описана в работе [13].

Оценка наличия (агрегаты = 1) или отсутствия (агрегаты = 0) агрегатов эритроцитов в капиллярах проводилась на основе визуальной обработки изображений и видеозаписей ногтевого ложа. Появление агрегатов в большинстве случаев сопровождалось замедлением скорости капиллярного кровотока.

Исследуемые группы пациентов. В исследование были включены 76 пациентов с артериальной гипертензией (АГ) (от 24 до 83 лет; средний возраст – 58,2 года) и 53 пациента с АГ и ишемической болезнью сердца (ИБС) (от 51 до 92 лет; средний возраст – 68,8 года). Сравнение клинических данных пациентов с АГ и пациентов с АГ и ИБС приведено в табл. 1.

У всех пациентов проведено неинвазивное исследование параметров микроциркуляции в тканях ногтевого ложа методом цифровой капилляроскопии (ЦК), а также натошак осуществлялся забор венозной крови для измерения ее агрегационных свойств методом лазерной агрегометрии (ЛА). Дополнительно было проведено исследование агрегационных свойств крови методом ЛА у 22 здоровых добровольцев (средний возраст – 22,5 года), некурящих и не принимающих каких-либо медицинских препаратов. Процедура исследования была одобрена

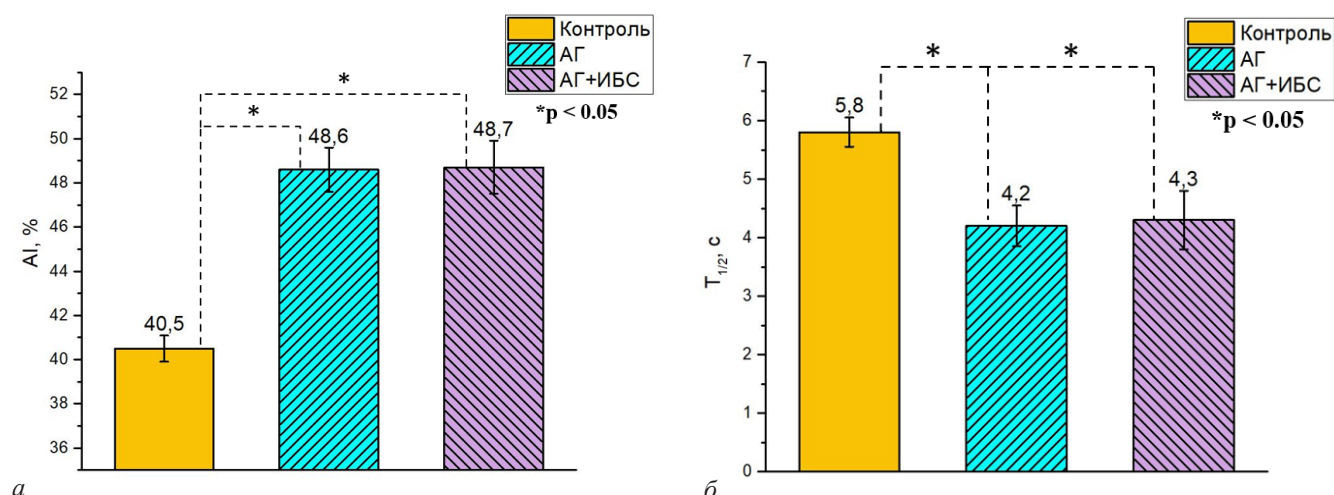


Рис. 2. Индекс агрегации AI (а) и характерное время агрегации $T_{1/2}$ (б), измеренные *in vitro* методом ЛА для контрольной группы и групп пациентов с АГ и АГ+ИБС

Fig. 2. Aggregation index AI (a) and characteristic aggregation time $T_{1/2}$ (b), measured *in vitro* by LA method for the control group and groups of patients suffering AH and AH+CHD

локальным этическим комитетом Медицинского научно-образовательного центра МГУ им М. В. Ломоносова. Пациенты и здоровые добровольцы были проинформированы о цели исследования, подписав информированное согласие на участие в нем.

Процедура измерений и подготовки образцов крови к измерениям. При проведении исследований учитывались последние рекомендации для гемореологических лабораторий, разработанные международной экспертной группой, созданной для стандартизации гемореологических методов [14]. Измерения методом ЛА проводились при температуре 37°C в течение первых 3 ч после забора крови из локтевой вены пациентов или здоровых доноров натошак. При этом все образцы стабилизировались антикоагулянт ЭДТА. Измерения исследуемых параметров проводились по 5 раз для каждого образца. Результаты усреднялись по отдельному образцу, а затем по соответствующей исследуемой группе в целом.

Измерения микрососудов методом ЦК проводились у пациентов между 9 и 11 часами утра в комнате с регулируемой температурой (температура поддерживалась между 22 и $23,5^{\circ}\text{C}$). Температура кожи измерялась в дорсальной области средней фаланги исследуемого пальца левой руки методом медицинской прецизионной термометрии; средняя температура кожи составляла $33,2 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$. Испытуемый находился в сидячем положении, а левая рука располагалась на уровне сердца. Все участники должны были воздержаться от курения и кофеиносодержащих напитков за 1 день до измерений. СКК измерялась в эпонихии IV или III пальца левой руки.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования представлены в виде диаграмм (рис. 2–4). На них указаны средние значения измеряемых параметров, стандартное отклонение, а также статистическая значимость, рассчитанная с помощью критерия Стьюдента.

Для анализа агрегации при АГ и ИБС методом ЛА были исследованы микрореологические свойства крови у здоровых доноров и пациентов с данными заболеваниями. Число измеренных образцов приведено в табл. 2.

Диаграмма на рис. 2, а демонстрирует, что индекс агрегации AI был значительно увеличен на $(20 \pm 4)\%$ у больных АГ (1-я группа) и у больных АГ и ИБС (2-я группа). Характерное время агрегации (рис. 2, б) также статистически значимо различается: по сравнению с контрольной группой людей $T_{1/2}$ уменьшено в обеих группах в среднем на $(38 \pm 13)\%$. Таким образом, можно сделать вывод об усиленной агрегации эритроцитов для пациентов с АГ и ИБС по сравнению с контрольной группой.

Для сравнения методов *in vitro* и *in vivo*, а также оценки взаимосвязи результатов, получаемых этими методами, были произведены измерения микрореологических параметров для исследуемых групп пациентов с АГ и пациентов с АГ, осложненной ИБС. Данные группы были разбиты на подгруппы в зависимости от результатов измерения капиллярного кровотока ногтевого ложа с помощью ЦК: а) по значению скорости капиллярного кровотока – меньше и больше 800 мкм/с ; б) по наличию (агрегаты=1) и отсутствию (агрегаты=0) агрегатов в капиллярах. Число

Таблица 2

Число измеренных образцов в каждой группе

Table 2

Number of measured samples in each group

Число здоровых доноров	Число пациентов с АГ	Число пациентов с АГ и ИБС
22	76	53

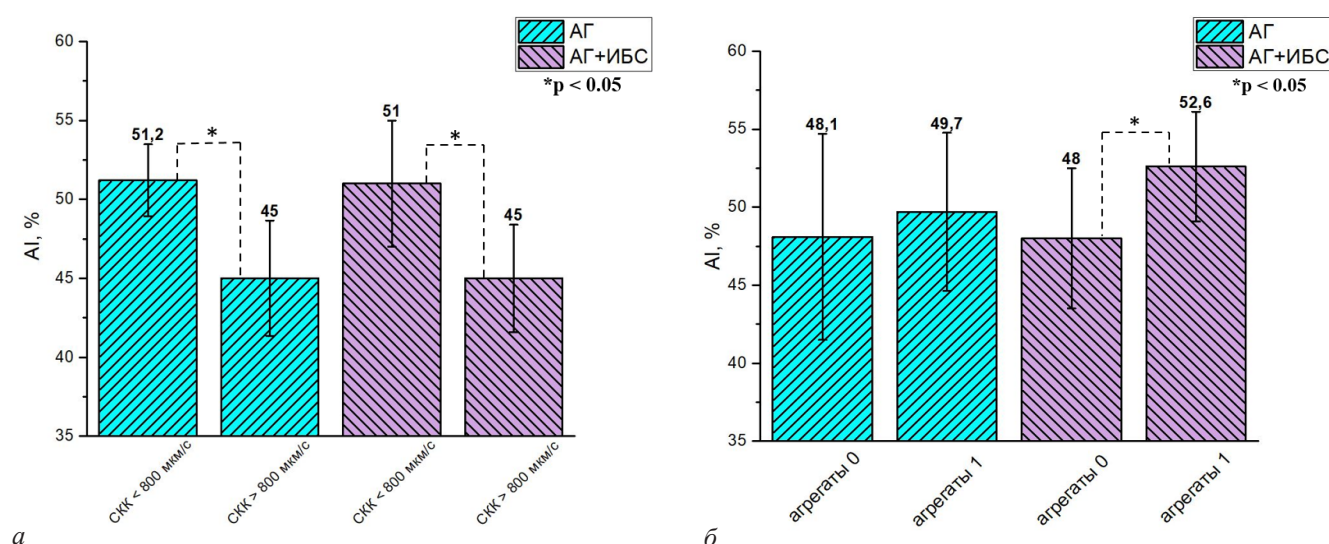


Рис. 3. Индекс агрегации AI, измеренный *in vitro* методом ЛА для групп пациентов с АГ и с АГ+ИБС в зависимости от скорости капиллярного кровотока (а), а также наличия или отсутствия агрегатов в капиллярах (б), полученных с помощью метода ЦК *in vivo*
 Fig. 3. Aggregation index AI measured *in vitro* by LA method for groups of patients suffering AH and AH + CHD, depending on the rate of capillary blood velocity (a) and the presence or absence of aggregates in the capillaries (b) detected *in vivo* by the VDC method

пациентов, принимавших участие в эксперименте, в каждой подгруппе приведено в табл. 3.

Результаты исследуемых групп, разделенных по указанным подгруппам, показаны на диаграммах (рис. 3–4).

Индекс агрегации для лиц с высокой СКК достоверно ниже, чем у лиц с низкой СКК: у пациентов с АГ – на $14 \pm 5\%$, а у группы с АГ и ИБС – на $13 \pm 5\%$ (рис. 3, а). Разделение пациентов по наличию и отсутствию агрегатов в капиллярах не выявило достоверных отличий при АГ. Однако для больных АГ и ИБС такое разделение продемонстрировало статистически значимые различия по показателю AI $10 \pm 5\%$ (рис. 3, б). Таким образом, тенденция состоит в том, что большее число агрегатов в капиллярах сопровождается пониженной СКК, определяемой с помощью ЦК.

Достоверные различия по характерному времени агрегации были обнаружены у пациентов с АГ и с АГ и ИБС при разбиении групп по скорости капиллярного кровотока. У 1-й группы параметр агрегации $T_{1/2}$ при СКК выше 800 мкм/с увеличен на $39 \pm 8\%$, а у 2-й группы данный параметр увеличен на $50 \pm 8\%$ при СКК выше 800 мкм/с (рис. 4, а). Разделение пациентов по наличию и отсутствию агрегатов для лиц с АГ не выявило статистической значимости, в то время как для больных АГ и ИБС среднее время агрегации

при наличии агрегатов существенно уменьшается на $38 \pm 13\%$ (рис. 4, б). Эти результаты подтверждают наличие повышенной скорости образования агрегатов при пониженной СКК.

Проведенные исследования показывают, что микрореологические параметры в капиллярном русле, полученные методом цифровой капилляроскопии *in vivo*, и агрегационные свойства эритроцитов, полученные методом лазерной агрегометрии *in vitro*, имеют высокую долю статистически значимых различий у пациентов с АГ и АГ, осложненной ИБС. Так, наблюдается согласованное увеличение индекса агрегации при снижении СКК у пациентов с ССЗ. Механизмы изменения параметров, отвечающих за микроциркуляцию крови в капиллярах ногтевого ложа, могут быть следующие. Как было показано нами [13, 15, 16] и другими авторами [17, 18], в патологических случаях агрегация эритроцитов усиливается, что сказывается на изменении параметров агрегации эритроцитов, измеряемых *in vitro*: уменьшается характерное время образования агрегатов и увеличивается число проагрегировавших эритроцитов (индекс агрегации). Все это приводит к увеличению вязкости крови и, как следствие, к увеличению гидродинамического сопротивления течению крови [19]. Данный факт приводит к уменьшению скорости капиллярного кровотока и увеличению числа агрегатов, регистрируемых *in vivo*

Таблица 3

Число измеренных образцов в каждой подгруппе

Table 3

Number of measured samples in each subgroup

Параметры капилляроскопии	Число пациентов с АГ	Число пациентов с АГ и ИБС
Агрегатов нет (0)	53	38
Агрегаты есть (1)	23	15
СКК < 800 мкм/с	43	34
СКК > 800 мкм/с	33	19

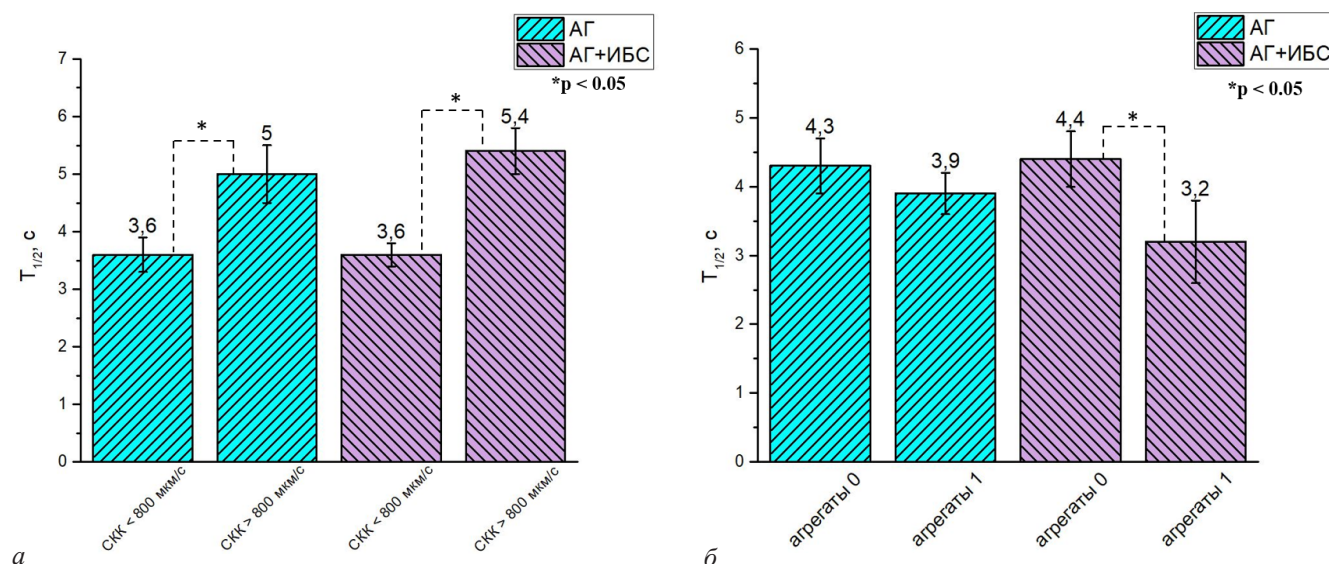


Рис. 4. Характерное время образования агрегатов $T_{1/2}$, измеренное *in vitro* методом ЛА для групп пациентов с АГ и с АГ+ИБС в зависимости от скорости капиллярного кровотока (а), а также наличия или отсутствия агрегатов в капиллярах (б), выявленных методом ЦК *in vivo*

Fig. 4. Characteristic time of aggregates formation $T_{1/2}$ measured *in vitro* by the LA method for groups of patients suffering AH and AH + CHD depending on the capillary blood velocity (a) and the presence or absence of aggregates in the capillaries (b) detected *in vivo* by the VDC method

с помощью ЦК [20]. Таким образом, наблюдаемые нами характерные изменения в значении параметров, полученных *in vivo* и *in vitro*, связаны между собой, а именно: патологические изменения способности одиночных эритроцитов агрегировать приводят к изменению параметров капиллярного кровотока.

Полученные статистически значимые результаты исследований микрореологических свойств крови позволяют сделать вывод о применимости используемых методов в клинической практике, в частности, при лечении больных артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца.

Наши предыдущие результаты исследований с использованием методов *in vitro* на меньшем числе испытуемых, выполненные в работах [16, 21], подтверждают гипотезу об усилении агрегации эритроцитов и нарушении кровотока у пациентов с АГ по сравнению с нормой. Также в нашей работе [15] была исследована взаимосвязь результатов, полученных с использованием методов измерений *in vitro* и *in vivo*, у групп пациентов с артериальной гипертензией и сахарным диабетом II типа. В настоящей работе результаты исследуемых групп пациентов с артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца не противоречат предыдущим результатам и также подтверждают согласованность методов *in vitro* и *in vivo*. Новизна представленной работы заключается в комплексном анализе *in vitro* и *in vivo* результатов измерений на пациентах с артериальной гипертензией и артериальной гипертензией, осложненной ишемической болезнью сердца.

Полученные в данной работе результаты согласуются с другими работами, изучающими агрегацию эритроцитов при артериальной гипертензии и сопутствующих осложнениях альтернативными методами. В работе [22] с помощью камеры Горяева было показано превышение параметров агрегации на 64 % по сравнению с нормой. В статьях [23, 24] утверж-

дается, что артериальная гипертензия в большинстве случаев сопровождается повышенным содержанием фибриногена и усиленной агрегацией эритроцитов. Однако использованные в наших исследованиях оптические методы обладают рядом преимуществ по сравнению с другими. К таким преимуществам можно отнести быстроту проведения измерений и их универсальность. К тому же наши результаты получены на достаточно большой выборке, всего в эксперименте был исследован 151 образец крови уникальных доноров, а большинство полученных результатов имеют высокий уровень статистической значимости.

Стоит отметить, что реология крови во многом зависит от агрегационного состояния компонентов крови, в частности, тромбоцитов и эритроцитов. Данная работа посвящена характеристике агрегационных свойств последних. Известно, что активация и агрегация тромбоцитов влияют на реологию крови за счет повышения вязкости крови и снижения ее текучести. Однако этот эффект находится вне фокуса данной работы. Также в данной работе не учитывается влияние возраста на агрегационные параметры клеток. Так, средний возраст пациентов отличается от среднего возраста добровольцев контрольной группы.

Заключение

В данной работе была проведена серия измерений *in vitro* параметров агрегации эритроцитов с образцами крови, полученными от здоровых добровольцев, а также от пациентов, страдающих артериальной гипертензией и ишемической болезнью сердца. Индекс агрегации и характерное время образования агрегатов измерялись методом лазерной агрегометрии в образцах цельной крови. Кроме того, с помощью цифровой капилляроскопии были проведены измерения *in vivo* скорости капиллярного кровотока, а также получена оценка наличия или отсутствия агрегатов эритроцитов в кровотоке.

Взаимосвязь между параметрами, измеренными *in vitro* и *in vivo*, проявляется для пациентов, разделенных на подгруппы в соответствии с параметрами, измеренными с помощью цифрового капилляроскопа. В частности, наличие агрегатов в капиллярах при исследуемых заболеваниях коррелирует с ухудшением агрегационных параметров клеток в образцах крови.

Наши результаты также наглядно демонстрируют возможность использования лазерной агрегометрии и цифровой капилляроскопии для оценки изменений микрореологических и, следовательно, микроциркуляторных параметров. Изменения параметров агрегации эритроцитов, измеренных *in vitro* и *in vivo*, могут быть использованы для оценки изменений жизненно важных параметров капиллярного кровотока в организме человека.

Финансирование / Acknowledgments

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-45-08004. / This work is supported by Russian Science Foundation (Grant № 20-45-08004).

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Литература / References

1. Ribera-Casado JM, Ageing and the cardiovascular system. *Z Gerontol Geriatr.* 1999;(32):412–419. Doi: 10.1007/s003910050138.
2. Baskurt OK, Meiselman HJ. Blood rheology and hemodynamics. *Semin Thromb Hemost.* 2003;29(5):435–450. Doi: 10.1055/s-2003-44551.
3. Schmid-Schonbein H, Rieger H, Gallasch G, Schachner H. Pathological red cell aggregation (clump aggregation). *Molecular and electrochemical factors. Bibl Anat.* 1977;(16 Pt 2):484–489.
4. Ионова В. Г., Суслина З. А. Реологические свойства крови при ишемических нарушениях мозгового кровообращения // *Невролог. журн.* – 2002. – № 7. – С. 4–10. [Ionova VG, Suslina ZA. Rheological properties of blood in ischemic disorders of cerebral circulation. *Neurological J.* 2002;3(7):4–10. (In Russ.)].
5. Фирсов Н. Н., Джанашия П. Х. Введение в экспериментальную и клиническую гемореологию. М.: ГОУ ВПО РГМУ, 2004. [Firsov NN, Dzhanashiya PKH. *Introduction to experimental and clinical rheology.* Moscow, Izdatel'stvo RGMU, 2004. (In Russ.)].
6. Kwaan HC, Bonga A. The hyperviscosity syndromes. *Semin. Thromb. Hemost.* 1999;25(2):199–208. Doi: 10.1055/s-2007-994921.
7. Stoltz JF, Stoltz JF, Donner M. Erythrocyte aggregation: experimental approaches and clinical implications. *Int Angiol.* 1987;6(2):193–201.
8. Zannad F, Stoltz JF. Blood rheology in arterial hypertension. *J. Hypertens. Suppl.* 1992;10(5):69–78.
9. Соколова И. А. Агрегация эритроцитов. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2010. – № 4. – С. 4–26. [Sokolova IA. Erythrocyte aggregation. *Regional blood circulation and microcirculation.* 2010;9(4):4–26. (In Russ.)]. Doi: 10.24884/1682-6655-2010-9-4-4-26.
10. Knisely MH, Bloch EH. Microscopic observation of intravascular agglutination of red cells and consequent sludging of the blood in human diseases. *Anat. Rec.* 1942;82(3):426.
11. Shin S, Yang Y, Suh JS. Measurement of erythrocyte aggregation in a microchip-based stirring system by light transmission. *Clinical Hemorheology and Microcirculation.* 2009;41(3):197–207. Doi: 10.3233/CH-2009-1172.
12. Семенов А. Н., Луговцов А. Е., Ли К. и др. Использование методов диффузного рассеяния света и оптического захвата для исследования реологических свойств крови: агрегация эритроцитов при сахарном диабете // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер.: Физика.* – 2017. – № 2. – С. 85–97. [Semenov AN, Lugovtsov AE, Li K, Fabrichnova AA, Kovalev YuA, Priezzhev AV. Applying methods of diffuse light scattering and optical trapping for assessing blood rheological parameters: erythrocytes aggregation in diabetes mellitus. *Izvestiya Saratovskogo university. Novaya seriya. Seriya: Fizika [Proceedings of the Saratov University. New Series. Series Physics].* 2017;17 (2):85–97. (In Russ.)]. Doi: 10.18500/1817-3020-2017-17-2-85-97.
13. Gurfinkel YuI, Priezzhev AV, Sasonko ML, Kuznetsov MI. Importance of image processing in digital optical capillaroscopy for early diagnostics of arterial hypertension. *BioPhotonics, International Conference Proceedings.* 2015;20(22):1–4. Doi: 10.1109/BioPhotonics.2015.7304025.
14. Baskurt OK, Boynard M, Cokelet GC, Connes P, Cooke BM, Forconi S, Liao F, Hardeman M, Jung F, Meiselman H. New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *International Expert Panel for Standardization of Hemorheological Methods.* 2009;42(2):75–97. Doi: 10.3233/CH-2009-1202.
15. Масляницкая А. И., Каданова И. М., Незнанов А. И. и др. Микрореологические свойства крови и капиллярный кровоток при артериальной гипертензии и сахарном диабете второго типа: исследование оптическими методами *in vitro* и *in vivo*. Комплекс. проблемы сердечно-сосуд. заболеваний. – 2020. – № 2. – С. 53–63. [Maslianitsyna AI, Kadanova IM, Neznanov AI, Ermolinskiy PB, Gurfinkel YuI, Pigurenko AA, Dyachuk LI, Lugovtsov AE, Priezzhev AV. Microreologic properties of blood and capillary blood flow in case of arterial hypertension and type 2 diabetes mellitus: *in vitro* and *in vivo* optical assessment. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2020;9(2):53–63. (In Russ.)]. Doi: 10.17802/2306-1278-2020-9-2-53-63.
16. Ermolinskiy P, Lugovtsov A, Maslyanitsina A, Semenov A, Priezzhev A, Dyachuk L. In vitro assessment of microrheological properties of erythrocytes in norm and pathology with optical methods. *Series on Biomechanics.* 2018;32(3):20–25.
17. Baskurt O, Meiselman H. Erythrocyte aggregation: basic aspects and clinical importance. *Clinical Hemorheology and Microcirculation.* 2013;53(1–2):23–37.
18. Медведев И. Н., Скорятин И. А., Завалишина С. Ю. Сосудистый контроль над агрегацией форменных элементов крови у больных артериальной гипертензией с дислипидемией // *Кардиоваскуляр. терапия и профилактика.* – 2016. – 1. – С. 4–9. [Medvedev IN, Skorjatina IA, Zavalishina SY. Vascular control over blood cells aggregation in patients with arterial hypertension with dyslipidemia. *Cardiovascular Therapy and Prevention.* 2016;15(1):4–9. (In Russ.)]. Doi: 10.15829/1728-8800-2016-1-4-9.
19. Baskurt O, Meiselman H. Hemodynamic effects of red blood cell aggregation. *Indian Journal of Experimental Biology.* 2007;45:25–31.
20. Kim S, Popel AS, Intaglietta M, Johnson PC. Aggregate formation of erythrocytes in postcapillary venules. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2005;(288):584–590.
21. Ermolinskiy PB, Lugovtsov AE, Maslyanitsina AI, Semenov AN, Dyachuk LI, Priezzhev AV. 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 & Eng.* 2018;4(3):1–8. Doi: 10.18287/JBPE18.04.030303.

22. Медведев И. Н., Скорятин И. А., Завалишина С. Ю. Сосудистый контроль над агрегацией форменных элементов крови у больных артериальной гипертензией с дислипидемией // Кардиоваскуляр. терапия и профилактика. – 2016. — № 1. – С. 4–9. [Medvedev IN, Skorjatina IA, Zavalishina SYu. Vascular control over blood cells aggregation in patients with arterial hypertension with dyslipidemia. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2016;15(1):4–9. (In Russ.)]. Doi: 10.15829/1728-8800-2016-1-4-9.

23. Bogar L. Hemorheology and hypertension: not «chicken or egg» but two chickens from similar eggs. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2002;26(2):81–83.

24. Guedes AF, Carvalho FA, Moreira C, Nogueira JB, Santos NC. Essential arterial hypertension patients present higher cell adhesion forces, contributing for fibrinogen-dependent cardiovascular risk. *Nanoscale*. 2017;9(39):14897–14906. Doi: 10.1039/c7nr03891g.

Информация об авторах

Каданова Ирина Михайловна – студентка I курса магистратуры Физического факультета, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия, e-mail: kadanovairina@mail.ru.

Незнанов Антон Игоревич – студент I курса магистратуры Физического факультета, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия, e-mail: neznanov.ai@mail.ru.

Луговцов Андрей Егорович – канд. физ.-мат. наук, старший научный сотрудник Международного учебно-научного лазерного центра и физического факультета, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия, e-mail: anlug1@gmail.com.

Гурфинкель Юрий Ильич – д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией микроциркуляции крови отдела внутренних болезней Медицинского научно-образовательного центра, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия, e-mail: yugurf@yandex.ru.

Пигуренко Александра Алексеевна – студентка I курса магистратуры Факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия, e-mail: pigurenko-alexandra-101-16-17@yandex.ru.

ва, Москва, Россия, e-mail: pigurenko-alexandra-101-16-17@yandex.ru.

Дячук Лариса Ивановна – канд. мед. наук, зав. кардиологическим отделением Медицинского научно-образовательного центра, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия, e-mail: cardio-heart@yandex.ru.

Приезжев Александр Васильевич – канд. физ.-мат. наук, доцент, руководитель лаборатории биомедицинской фотоники физического факультета, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия, e-mail: avp2@mail.ru.

Information about authors

Kadanova Irina M. – a 1-year master of the Physics Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, e-mail: kadanovairina@mail.ru.

Neznanov Anton I. – a 1-year master of the Physics Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, e-mail: neznanov.ai@mail.ru.

Lugovtsov Andrei E. – PhD, senior researcher at the International Educational and Scientific Laser Center and the Physics Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, e-mail: anlug1@gmail.com.

Gurfinkel Yuri I. – PhD, leading researcher, Head of the Blood Microcirculation Laboratory, Department of Internal Diseases of the Medical Research and Educational Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, e-mail: yugurf@yandex.ru.

Pigurenko Alexandra A. – a 1-year master of the Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, e-mail: pigurenko-alexandra-101-16-17@yandex.ru.

Dyachuk Larisa I. – PhD, Head of the Cardiology Department at the Medical Research and Educational Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, e-mail: cardio-heart@yandex.ru.

Priezzhev Alexander V. – PhD, Associate Professor, Head of the Biomedical Photonics Laboratory at the International Educational and Scientific Laser Center and the Physics Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, e-mail: avp2@mail.ru.

UDC 612.1;591.11;577.353
DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-25-33

N. M. ANTONOVA¹, V. K. PASKOVA¹, I. V. VELCHEVA²

Blood rheological and electrical properties and relationships with the microvascular tone regulation in patients with diabetes mellitus type 2

¹ Dept. of Biomechanics, Institute of Mechanics, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

² Clinic of Nervous Diseases, Uni Hospital, Panagyurishte, Bulgaria

E-mail: antonova@imbm.bas.bg

Received 25.11.20; accepted 22.01.21

Summary

Aim. The study aims to evaluate impairment of the rheological and electrical properties of blood, plasma viscosity and blood conductivity in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) in comparison with the data of the control group of healthy individuals. It also aims to investigate the changes of the skin blood flow responses to cold stress in T2DM patients through wavelet analysis of the peripheral skin temperature pulsations and to estimate their relationships with the blood viscosity and blood conductivity parameters, obtained from the simulation of experimental data with mathematical equations. **Materials and methods.** The whole blood viscosity was measured by Contraves LS30 viscometer (Switzerland) at a steady flow in 9 healthy individuals and in 13 patients with type 2 diabetes mellitus. Time variation of whole blood conductivity σ under transient flow at rectangular and trapezium shaped Couette viscometric flow and under electric field of 2 kHz was determined. The amplitudes of the skin temperature pulsations (ASTP) were monitored by «Microtest» device («FM-Diagnostics», Russia). To analyze the temperature fluctuations, wavelet transformation analysis of the low amplitude oscillations of skin temperature in accordance with myogenic (0.05–0.14 Hz), neurogenic (0.02–0.05 Hz), and endothelial (0.0095–0.02 Hz) control mechanisms of the vascular tone (WAST method) was applied. **Results.** Blood viscosity was increased in the T2DM patients' group, while blood conductivity decreased in comparison to controls. Two sigmoidal equations were applied to describe the kinetics of blood conductivity. Both models include conductivity indices ($\sigma_1, \sigma_2, \sigma_3$) and time indices too. The Pearson correlations between these parameters and the ASTP in the frequency ranges, corresponding to the myogenic, neurogenic and endothelial mechanisms of the microcirculation tone regulation were analyzed. The correlation analysis revealed good ASTP–($\sigma_1, \sigma_2, \sigma_3$) relationships in the neurogenic range 3 minutes after the cold test, while the ASTP–($\sigma_1, \sigma_2, \sigma_3$) correlation in the myogenic frequency range before the cold test was negative ($r < -0.8, p < 0.5$). **Conclusion.** The results complement the studies of the microvascular regulatory mechanisms and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus, as well as their relationships with the rheological and electrical properties of blood.

Keywords: diabetes mellitus type 2, skin temperature pulsations, contralateral cold test, microvascular tone regulation, blood and plasma viscosity, blood conductivity, mathematical equations

For citation: Antonova N. M., Paskova V. K., Velcheva I. V. Blood rheological and electrical properties and relationships with the microvascular tone regulation in patients with diabetes mellitus type 2. *Regional blood circulation and microcirculation*. 2021;20(1):25–33. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-25-33.

УДК 612.1;591.11;577.353
DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-25-33

Н. М. АНТОНОВА¹, В. К. ПАСКОВА¹, И. В. ВЕЛЬЧЕВА²

Реологические и электрические свойства крови и взаимосвязь с регуляцией тонуса микрососудов у пациентов с сахарным диабетом II типа

¹ Деп. биомеханики, Институт механики Болгарской академии наук, София, Болгария

² Клиника нервных болезней, Уни госпиталь, Панагюриште, Болгария

E-mail: antonova@imbm.bas.bg

Статья поступила в редакцию 25.11.20; принята к печати 22.01.21

Резюме

Цель – исследование направлено на оценку нарушения реологических и электрических свойств крови, вязкости плазмы и проводимости крови у пациентов с сахарным диабетом II типа (СД2) в сравнении с данными контрольной группы здоровых лиц. При этом также проводили изучение, на основе вейвлет-анализа пульсаций температуры кожи, реакций кожного кровотока на холодовую нагрузку у пациентов с СД2. Выполняли оценку взаимосвязи указанных выше параметров с показателями вязкости и проводимости крови, полученными в результате моделирования экспериментальных данных математическими уравнениями. **Материалы и методы.** Вязкость цельной крови измеряли вискозиметром Contraves LS30 (Швейцария) у 9 здоровых лиц и у 13 пациентов с СД2. Определяли изменение во

времени электрической проводимости цельной крови σ при нестационарном течении в прямоугольном и трапециевидном вискозиметрическом потоке Куэтта, при электрическом поле 2 кГц. Амплитуды пульсаций температуры кожи (АСТК) регистрировали прибором «Микротест» («ФМ-Диагностика», Россия). Был использован метод вейвлет-анализа низкоамплитудных колебаний температуры кожи в соответствии с миогенным (0,05–0,14 Гц), нейрогенным (0,02–0,05 Гц) и эндотелиальным (0,0095–0,02 Гц) механизмами контроля тонуса сосудов (WAST-метод). *Результаты.* Вязкость крови увеличилась в группе пациентов с СД2, тогда как ее электрическая проводимость снизилась по сравнению с контролем. Для описания кинетики проводимости крови применяли два сигмоидальных уравнения. Обе модели включают индексы проводимости ($\sigma_1, \sigma_2, \sigma_3$), а также временные индексы. Проанализированы корреляции Пирсона между этими параметрами и АСТР в частотных диапазонах, соответствующих миогенным, нейрогенным и эндотелиальным механизмам регуляции тонуса микроциркуляции. Корреляционный анализ выявил хорошие отношения АСТР – ($\sigma_1, \sigma_2, \sigma_3$) в нейрогенном диапазоне через 3 мин после холодового теста, в то время как корреляция АСТР – ($\sigma_1, \sigma_2, \sigma_3$) в миогенном частотном диапазоне до холодового теста была отрицательной ($r < -0,8$, $p < 0,05$). *Заключение.* Результаты дополняют исследования механизмов регуляции микрососудов и эндотелиальной дисфункции у пациентов с сахарным диабетом II типа, а также их взаимосвязи с реологическими и электрическими свойствами крови.

Ключевые слова: сахарный диабет II типа, пульсации температуры кожи, контрлатеральная холодовая проба, регуляция тонуса микрососудов, вязкость крови и плазмы, проводимость крови, математические уравнения

Для цитирования: Антонова Н. М., Паскова В. К., Вельчева И. В. Реологические и электрические свойства крови и взаимосвязь с регуляцией тонуса микрососудов у пациентов с сахарным диабетом II типа. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2021;20(1):25–33. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-25-33.

Introduction

The blood rheological properties have important role in ensuring blood circulation, along with neurogenic and humoral regulation, and properties of the vascular wall. In our previous studies we found that in the patients with diabetes mellitus type 2 (T2DM) the impairment of the cutaneous microvascular blood flow hemodynamic responses and the temperature oscillations were associated with increase of the blood viscosity values [1, 2].

Along with other optical methods a laser Doppler flowmetry is used to investigate the microcirculation [3]. This method provides useful information about the local skin factors of the microcirculatory regulation [4]. It was proved that the myogenic oscillation frequency spectrum of the vascular wall tone is 0.05–0.14 Hz, the neurogenic activity is in the range of 0.02 to 0.05 Hz and the vascular endothelial function is determined in the spectrum of 0.0095–0.02 Hz. Changes of the vascular tone influence the blood flow and cause the appearance of low-amplitude fluctuations in the temperature on the skin surface [5, 6]. A statistically significant correlation between the variations in the skin temperature and the blood flow changes recorded by Doppler flowmetry has been established [7, 8]. This allows the use of wavelet analysis of temperature variations on the skin surface for analysis of the dynamics of the vascular tone in the frequency bands resulting for myogenic and neurogenic activity, as well as for functioning of the endothelium [6, 9, 10].

In our previous studies the oscillations in the skin temperature after cold test in patients with T2DM, the blood rheological properties and the relationship with disturbances of the microvascular tone regulation were analyzed [9, 10].

It was found that the electrical properties of the flowing blood depend on the flow conditions and the modes (regimes) of the applied shear rates. The reason is the erythrocyte orientation and deformation under flow, erythrocytes' slightly electronegative charge, the hematocrit and the different shear rates [11]. It was also shown that the blood conductivity is a very sensitive tool and that the RBCs aggregation-disaggregation processes can be characterized by measuring the electrical conductivity

of blood under conditions of non-steady viscometric flow [12].

The present study aims through novel approaches, methods and tools to study impairments of the rheological and electrical properties of the blood and plasma viscosity and blood conductivity under different flow conditions and modes of steady and unsteady flow in a group of patients with T2DM and in a control group of healthy subjects. Another aim is to analyze the peripheral vasomotor reactivity and vascular endothelial function in these patients using the wavelet analysis of skin temperature oscillations (WAST) method. The last aim is to analyze the data obtained using mathematical models and to seek correlations, characterizing the relationships between the blood rheological parameters and the micromechanical properties of the blood cells as well as the parameters of microvascular tone regulation in T2DM patients.

Materials and methods

Subjects

The study included 13 patients (9 women and 4 males, mean age 66.92 ± 11.10 years) with T2DM with mean duration of the disease 12.33 ± 5.3 years and 9 healthy controls (8 women and 1 male, mean age 52.3 ± 9.4 years). The diagnosis of T2DM was based on clinical examination and estimation of blood glucose, insulin and HbA1C. The clinical examinations of the patients were performed in the University Hospital of Neurology and Psychiatry «St. Naum», Medical University in Sofia, Bulgaria. Blood samples were collected in Li heparin tubes and rheological measurements were completed within 3 hours after the blood sample withdrawal. Both groups gave voluntary informed consent to participate in the study.

Biochemical and hematological examinations. The examined hemorheological blood constituents were: hematocrit (Ht), fibrinogen (FIB), erythrocytes (Erythr), platelets (Plt), mean cell volume (MCV). The relationship between the dynamic viscosity and Ht, Fib, Erythr and MCV were evaluated using the correlation coefficient r . The mean hematocrit values of the studied groups were: Ht (T2DM) = 38.9 ± 5.04 %; Ht (controls) = 42.7 ± 1.82 %

Methods

Statistical analyses were performed using the scientific graphing and data analysis software packages SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., 2008) и Origin 6.1 (OriginLab Corporation, 2009). The data were presented as mean±standard deviation (SD). According to normality of the data distribution (Shapiro – Wilk's W test) the significance of inter-group differences was evaluated by using the Student's t-test and Mann – Whitney U test. Pearson correlation coefficient was used to evaluate the relationship between the whole blood conductivity, the hemorheological and the microrheological parameters and the parameters obtained for the amplitudes of the skin temperature pulsations (ASTP). A p value less than 0.05 was considered as statistically significant.

Rheological and electrorheological measurements. A rotational viscometer Contraves LS30 (Switzerland) with MS 1/1 standard measurement system and the concurrent measuring system MS 1/1 was used to investigate the rheological and electrical properties of blood simultaneously [11]. Whole blood viscosity (WBV) was examined under conditions of a steady blood flow at 12 shear rates from 0.0237 s⁻¹ to 94.5 s⁻¹ at 37 °C.

A method based on dielectric properties of dispersed systems in Couette viscometric blood flow was applied to investigate the kinetics of RBC aggregation and the formation and break-up of the aggregates. Time variation of whole blood conductivity σ and shear stresses under transient flow at rectangular and trapezium shaped Couette viscometric flow were investigated under electric field of 2 kHz. To investigate aggregation process in stasis and under flow conditions after subjected to shearing for 30 seconds to disperse all aggregates, RBC suspension was stopped or decreased to allow RBCs aggregation. Immediately after beginning and complete stoppage of shearing kinetics of conductivity and torque signals were recorded. If the higher shear rates had no further effect on σ values measured during shearing, the applied shear rate was sufficiently high for complete dispersion of the aggregates [11, 12].

Equations. The obtained experimental data on the kinetics of the whole blood conductivity in both studied groups of T2DM patients and of controls were described by the following equations, derived in our previous studies [11] and used for estimation of RBC aggregation-disaggregation process at loading (1) and at relaxation (2).

$$\sigma = \frac{(\sigma_1 - \sigma_2)}{1 + (t/t_0)^p} + \sigma_2, \quad (1)$$

where σ_1 is the initial value of the blood conductivity; σ_2 is the final value of the blood conductivity; p is power and t_0 is the center of the curve.

$$\sigma = \sigma_3 + \frac{(\sigma_2 - \sigma_3)f}{1 + 10^{t-\log t_{01}}} + \frac{(\sigma_2 - \sigma_3)(1-f)}{1 + 10^{t-\log t_{02}}}, \quad (2)$$

where σ_2 is the initial asymptotic value of the blood conductivity; σ_3 is the final asymptotic value of the blood conductivity; 0<f<1 is a fraction and t_{01} and t_{02} are first and second curve centers.

Based on the blood viscosity experimental data the index of erythrocyte aggregation (IAE) index, characterizing the erythrocyte aggregation and T_k index, characterizing erythrocyte deformability were calculated. The IAE is determined as the relation of whole blood viscosity at 11,02 s⁻¹ to whole blood viscosity at 94,5 s⁻¹ [13].

$$IAE = \frac{\eta_{11,02}}{\eta_{94,5}}. \quad (3)$$

T_k index characterizes the erythrocyte deformability [14]. It is determined by the relation:

$$T_k = \frac{\eta_r^{0.4} - 1}{\eta_r^{0.4} \cdot Ht}, \quad (4)$$

where η_r is the relative viscosity; $\eta_r = \eta_{bl} / \eta_{pr}$ η_{bl} is the apparent dynamic blood viscosity at shear rate 94.5 s⁻¹ and η_{pr} is plasma viscosity at the same shear rate, Ht, % is the hematocrit [14].

Skin temperature oscillations recording. Recording of the skin temperature on the volar surface of the distal phalange of the 2nd finger under basal conditions 10 min, during a 3 min immersion of the contralateral hand in ice water and 10 min thereafter by means of platinum thermistor sensor is performed.

The amplitudes of the skin temperature pulsations (ASTP) were monitored by «Microtest» device («FM-diagnostics», Russia) providing the actual resolution of temperature is 0.002 °C. The operating principles of the «Microtest» device are based on the recording the low-amplitude fluctuations of the skin temperature caused by change of the microvascular tone in the skin with a high temperature resolution. To analyze the temperature fluctuations innovative wavelet-analysis algorithms were used with Wavelet transformation analysis of the low amplitude oscillations of the skin temperature in accordance with myogenic (0.05–0.14 Hz), neurogenic (0.02–0.05 Hz), and endothelial (0.0095–0.02 Hz) control mechanisms of the vascular tone [6, 8, 15].

Contralateral cold test. The patients were in supine position during the contralateral cold test. The measurements were conducted at room temperature 22.5±0.5 °C. The skin temperature was recorded on the palm surface of the index distal phalanx of the right hand. The thermal sensor has low-conductive enclosure to prevent the influence of ambient air flows. Another sensor controls the room temperature.

During the cold test, the left hand was immersed into ice-water mixture at 0 °C for 3 min. Skin temperature was continuously measured for 10 min before the test, 3 min during the test and 10 min after the cooling. The temperature recording started after the establishment of a stationary thermal regime, approximately 5–10 min after the sensor attachment. The minimal initial skin temperature to find reliable response to cold test was 30°C [1, 2, 6, 8, 15].

Results

A comparison of the mean whole blood viscosity values (WBV) of the diabetic patients with the mean WBV of the control group and their standard deviations within the wide range of shear rates is shown in Table 1.

Table 1

Mean values and standard deviations of whole blood viscosity (WBV) at different shear rates in the group of patients with diabetes mellitus type 2 (n=13) and in healthy subjects (n=9) [15]

Shear rate [s ⁻¹]	η_{diabetes} [mPa.s], mean $\pm$ SD	η_{controls} [mPa.s], mean $\pm$ SD
0.0237	65.73 $\pm$ 15.18	58.56 $\pm$ 4.59
0.0596	50.92 $\pm$ 12.09	40.03 $\pm$ 4.29
0.1102	47.28 $\pm$ 13.58**	29.86 $\pm$ 3.41
0.277	38.63 $\pm$ 11.42**	22.81 $\pm$ 3.33
0.512	32.49 $\pm$ 11.19*	21.46 $\pm$ 3.21
1.285	22.18 $\pm$ 6.95**	13.78 $\pm$ 2.96
2.37	18.84 $\pm$ 5.52	13.38 $\pm$ 2.74
5.96	12.94 $\pm$ 3.21	9.95 $\pm$ 1.75
11.02	8.28 $\pm$ 2.80	7.99 $\pm$ 0.97
20.40	8.00 $\pm$ 1.66*	6.72 $\pm$ 0.7
51.20	6.14 $\pm$ 1.10	5.38 $\pm$ 0.55
94.5	5.37 $\pm$ 0.87*	4.63 $\pm$ 0.44

* – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ significance in comparison to controls.

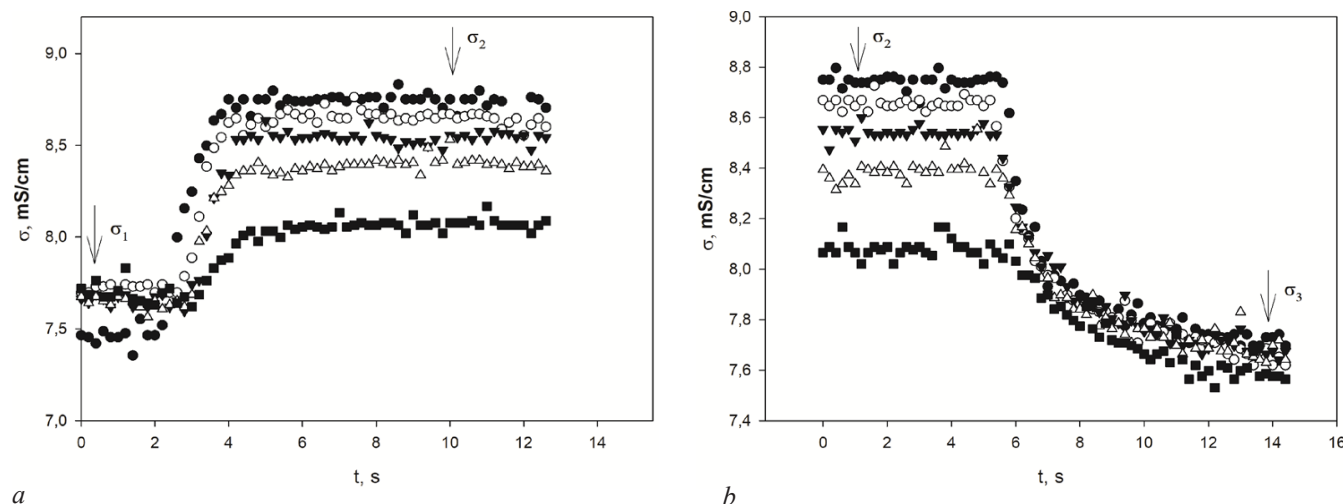


Fig. 1. Experimental data for blood conductivity in a patient obtained by rectangular regimes of the shear rates from 0 s⁻¹ to 94.5 s⁻¹, 37.6 s⁻¹, 20.4 s⁻¹, 11.02 s⁻¹, 3.23 s⁻¹ (a) and back (b) of whole blood, H=40.1 %, T=37 °C [15]

An increase in the mean values of WBV in the group of T2DM patients was observed [15, 16]. Statistically significant differences were found between the T2DM and the control groups at the shear rates of 0.1102 s⁻¹ ($p < 0.01$), 0.277 s⁻¹ ($p < 0.01$), 0.512 s⁻¹ ($p < 0.05$), 1.285 s⁻¹ ($p < 0.01$), 20.4 s⁻¹ ($p < 0.05$) and 94.5 s⁻¹ ($p < 0.05$), shown in Table 1. It was observed that the plasma viscosity was also increased in the patients' group as compared to the controls. Statistically significant differences for the plasma viscosity were observed at shear rates – 5.96 s⁻¹, 51.20 s⁻¹ and 94.5 s⁻¹ ($p < 0.05$) [15].

Typical experimental dependences of whole blood conductivity at loading are shown on Fig. 1, a. Starting from zero, the shear rates are increased up to 3.23–94.5 s⁻¹ and the experimental data of the kinetics of blood conductivity at loading (Fig. 1, a) are recorded. These records are approximated by equation (1) and the mean values of its parameters, determined from the experimental data are presented in Fig 3. The results show that the mean values of the parameters of whole blood

conductivity (σ_1 , σ_2), obtained from eq. (1) at loading from zero up to five different shear rates in the group of T2DM patients are lower than in the control group of healthy subjects (Fig. 3).

The experimental data for blood conductivity – time dependences at relaxation, starting from five different shear rates within the range 94.5–3.23 s⁻¹ and then back to zero (Fig. 1, b) are recorded. These data are simulated by the equation (2) and the mean values of its parameters are presented in Fig 4. The results show that the mean values of the parameters of whole blood conductivity (σ_2 , σ_3), obtained from eq. (2) at relaxation from five different shear rates to zero in the group of T2DM patients (n=13) are also lower than in the control group of healthy subjects (n=9).

The amplitudes of the skin temperature pulsations (ASTP) were monitored by «Microtest» device («FM-Diagnostics», Russia). To analyze the temperature fluctuations wavelet transformation analysis of the low amplitude oscillations of skin temperature in accordance

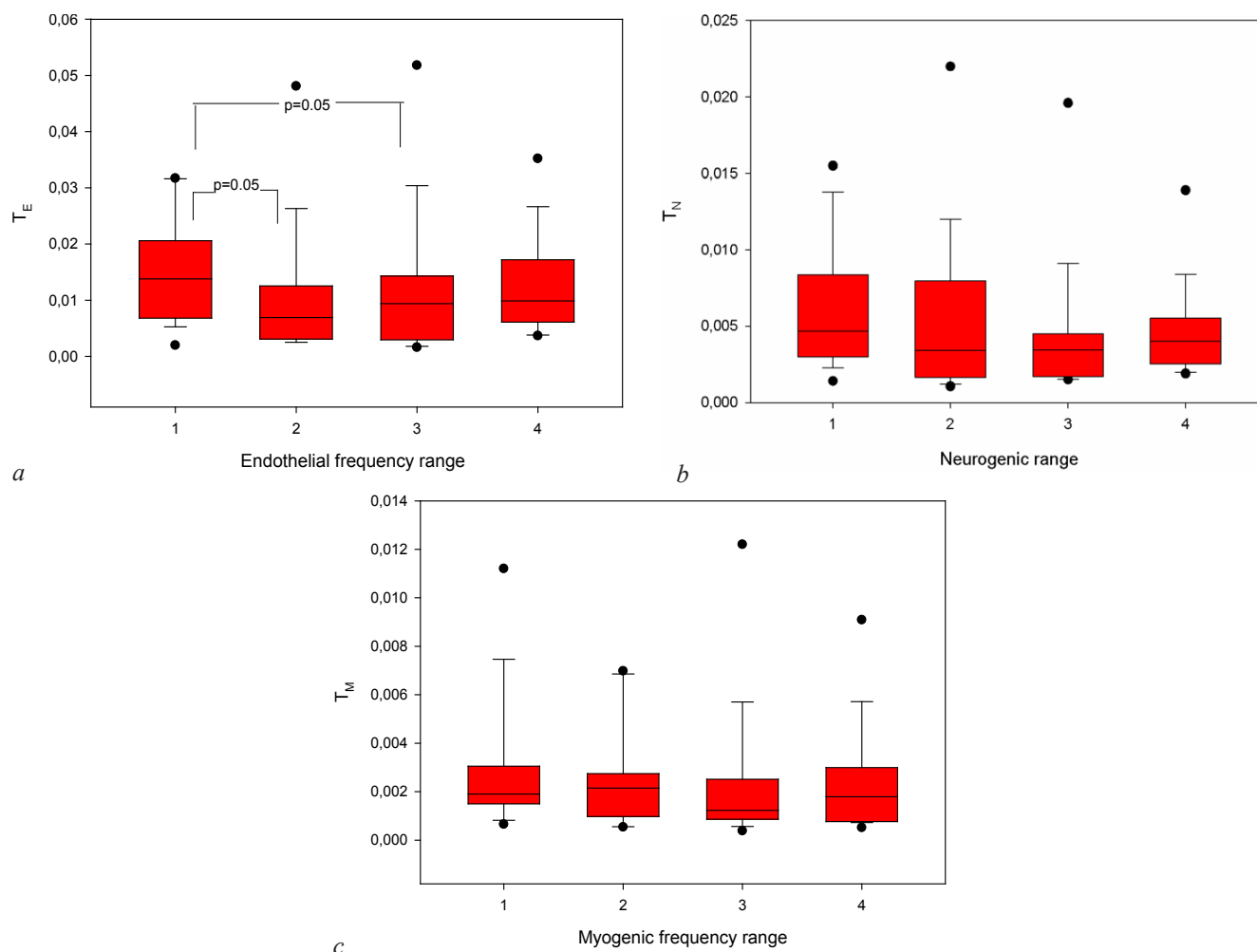


Fig. 2. Box-plot diagrams of the amplitudes of the skin temperature pulsations (ASTP) in the T2DM patients' group: *a* – in the endothelial (T_E), *b* – neurogenic (T_N), *c* – myogenic frequency ranges (T_M)

with myogenic (0.05–0.14 Hz), neurogenic (0.02–0.05 Hz), and endothelial (0.0095 – 0.02 Hz) control mechanisms of the vascular tone (WAST method) was applied. The distribution of the obtained values of the root mean square (RMS) of the amplitudes of the skin temperature pulsations (ASTP) in the T2DM patients' group are shown as box-plot diagrams (Vertical Boxplot) on Fig. 2: (*a*) in the endothelial (T_E), (*b*) – neurogenic (T_N) and (*c*) – myogenic frequency ranges (T_M). The median of the sample (straight black line), the confidence interval (25–75 %) and the obtained minimum and maximum value (errors) are shown on the figure. Statistically significant differences ($p < 0.05$) were found only in the endothelial frequency range (T_E): before the cold test, during the cold test and 3 minutes after it ($p < 0.05$) in the T2DM group (Fig. 2, *a*).

The results from the linear correlation analysis (the Pearson correlation coefficient) between the parameters of whole blood conductivity (σ_1 , σ_2), derived from eq. (1) at loading and ASTP are shown in Table 2. Linear positive correlation is found between σ_1 (mS/cm) and σ_2 (mS/cm) at high shear rates (37,6 s⁻¹ and 94,5 s⁻¹) and ASTP in the neurogenic frequency range, 3 minutes after the cold test – N3 ($r \approx 0,6$). Linear negative correlation is found between the σ_1 (mS/cm) and σ_2 (mS/cm) at high shear rates too (37,6 s⁻¹ and 94,5 s⁻¹) and ASTP in the myogenic frequency range, before the

cold test – M1 ($r \approx -0,6$). Significant linear negative correlation was found between σ_2 (mS/cm) and calculated from the viscosity IAE index at loading from 0÷3,23 s⁻¹ ($r = -0,999$, $p = 0,0206$). The correlation analysis revealed significant $\sigma_1 - T_k$ and $\sigma_2 - T_k$ ($r \approx -0,8$, $p < 0.05$) correlation at high shear rates (Tabl. 2).

The conductivity parameters – the initial value of blood conductivity, the final value of the blood conductivity and the asymptotic final value of the blood conductivity (σ_1 , σ_2 , σ_3), derived from both equations (1) and (2) revealed high negative linear correlation with sodium at high shear rates 37,6 s⁻¹ and 94,5 s⁻¹, for both types of experiments evaluating the kinetics of whole blood conductivity at loading ($r \approx -0,79 \div -0,83$, $p < 0.05$) and at relaxation ($r \approx -0,79 \div -0,86$, $p < 0.05$) (Tabl. 2; 3). Sodium usually forms ionic compounds involving the Na⁺ cation. As a result, the total charge of blood, consisting of slightly electronegative erythrocytes in blood plasma decreased. This could explain the negative linear correlation of the parameters of the specific conductivity (σ_1 , σ_2 , σ_3) with sodium at high shear rates, when the erythrocytes are oriented along the current lines. The conductivity parameters (σ_1 , σ_2 , σ_3) revealed strong linear correlations with each other (Tabl. 2; 3).

The results from the linear correlation analysis (the Pearson correlation coefficient) between the parameters of whole blood conductivity (σ_2 , σ_3), derived

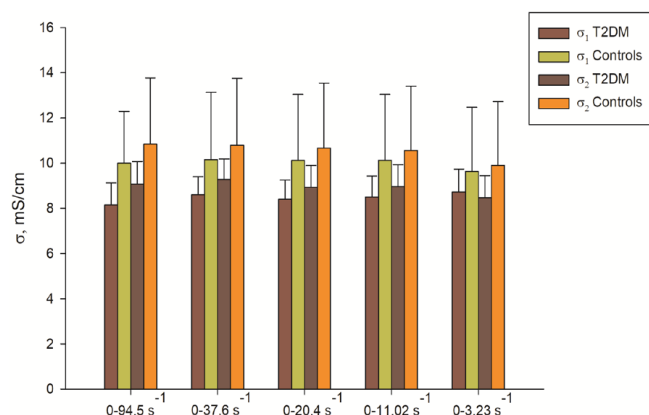


Fig. 3. Mean values and standard deviations of the parameters of the whole blood conductivity (σ_1 , σ_2), obtained from eq. (1) at loading from zero up to different shear rates in the group of T2DM (n=13) and in healthy subjects (n=9)

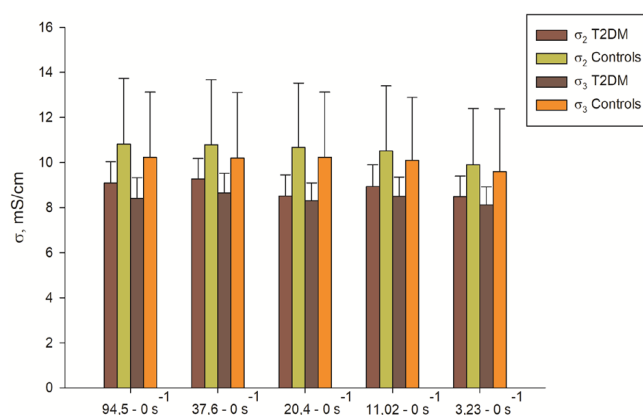


Fig. 4. Mean values and standard deviations of the parameters of whole blood conductivity (σ_2 , σ_3), obtained from eq. (2) at relaxation from different shear rates to zero in the group of T2DM patients (n=13) and in healthy subjects (n=9)

Table 2

Pearson correlation coefficients obtained from the linear correlation analysis between the parameters of whole blood conductivity (σ_1 , σ_2), calculated from eq. (1) at loading and the amplitudes of the skin temperature pulsations (ASTP) in the myogenic (M1, before the cold test) and the neurogenic (N3, 3 minutes after the cold test) frequency ranges and microrheological parameters (IAE, Tk) and sodium (Na) in the group of patients with T2DM

		σ_2 (mS/cm)	σ_3 (mS/cm) (at relaxation)	N3	M1	Na, mmol/l	Tk	IAE
Shear rate 0÷94,5 s ⁻¹	σ_1 (mS/cm)	r=0,992*** (17)	r=0,996*** (17)		r=-0,591* (13)	r=-0,833* (8)		
	σ_2 (mS/cm)		r=0,998*** (17)	r=0,554* (13)		r=-0,862** (8)		
Shear rate 0÷37,6 s ⁻¹	σ_1 (mS/cm)	r=0,998*** (15)	r=1*** (15)	r=0,614* (12)	r=-0,654* (12)	r=-0,793* (8)	r=-0,627* (13)	
	σ_2 (mS/cm)		r=0,998*** (15)	r=0,619* (12)	r=-0,672* (12)	r=-0,792* (8)	r=-0,626* (13)	
Shear rate 0÷20,4 s ⁻¹	σ_1 (mS/cm)	r=0,996*** (17)	r=0,656*** (15)				r=-0,690* (12)	
	σ_2 (mS/cm)		r=0,676*** (15)				r=-0,689* (12)	
Shear rate 0÷11,02 s ⁻¹	σ_1 (mS/cm)	r=0,997*** (13)	r=0,997*** (10)	r=0,679* (10)				r=0,860** (9)
	σ_2 (mS/cm)		r=0,994*** (9)					
Shear rate 0÷3,23 s ⁻¹	σ_1 (mS/cm)	r=0,996* (3)	r=1*** (4)					r=-0,957* (3)
	σ_2 (mS/cm)		r=0,997* (3)					r=-0,999* (3)

* - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001 - significance differences.

from eq. (2) at relaxation and the amplitudes of the skin temperature pulsations ASTP are shown in Table 4. Moderate linear positive correlation is found between σ_2 (mS/cm) and σ_3 (mS/cm) at high shear rates (37,6 s⁻¹ and 94,5 s⁻¹) and ASTP in the neurogenic frequency range, 3 minutes after the cold test - N3 ($r \approx 0,6$, $p < 0,05$). Linear negative correlation is found between the σ_2 (mS/cm) and σ_3 (mS/cm) at high shear rates (37,6 s⁻¹ and 94,5 s⁻¹) and ASTP in the myogenic frequency range, before the cold test - M1 ($r \approx -0,6$). Significant linear negative correlation was found between σ_3 (mS/cm) and calculated from the viscosity IAE index at loading from 0÷3,23 s⁻¹ ($r = -0,999$, $p = 0,02$) which means that at low shear rates

with increasing of conductivity the erythrocyte aggregation is decreased. The correlation analysis revealed significant σ_1 -Tk and σ_2 -Tk ($r \approx -0,8$) correlations at high shear rates (Tabl. 3). Moderate linear negative correlation was observed σ_3 -Plt ($r \approx -0,6$) at 20,4 s⁻¹ and high ($r \approx -0,89$) at 94,5 s⁻¹.

Moderate negative linear correlations ($r = -0,4$, $r = -0,5$, $r = -0,6$) between the amplitudes of the skin temperature pulsations ASTP and the dynamic whole blood viscosity (η) at a shear rate of 94,5 s⁻¹ in the endothelial frequency range during the cold test (T_{E2}), 3 min after (T_{E3}) and 10 min after it (T_{E4}) for the group of patients with T2DM were found (Tabl. 4).

Table 3

Pearson correlation coefficients obtained from the linear correlation analysis between the parameters of whole blood conductivity (σ_2, σ_3), obtained from eq. (2) at relaxation from five different shear rates to zero shear rate and the amplitudes of the skin temperature pulsations (ASTP) and some microrheological parameters as IAE and Tk and platelets (Plt) in the patients with T2DM

		σ_3 (mS/cm)	N3	M1	Na, mmol/l	Tk	IAE	Plt ·10 ⁹ /l
Shear rate 94,5±0 s ⁻¹	σ_2 (mS/cm)	r=0,998*** (17)	r=0,554* (13)		r=-0,859** (8)			
	σ_3 (mS/cm)		r=0,556* (13)	r= -0,553* (13)	r=-0,857** (8)			
Shear rate 37,6±0 s ⁻¹	σ_2 (mS/cm)	r=0,998*** (15)	r=0, 614* (12)	r= -0,654* (12)	r=-0,793* (8)	r=- 0,627* (13)		
	σ_3 (mS/cm)		r=0, 619* (12)	r= -0,672* (12)	r=-0,792* (8)	r=- 0,626* (13)		
Shear rate 20,4±0 s ⁻¹	σ_2 (mS/cm)	r=0,997*** (15)						
	σ_3 (mS/cm)							r=-0,658* (11)
Shear rate 11,02±0 s ⁻¹	σ_2 (mS/cm)	r=0,992*** (10)						
Shear rate 3,23±0 s ⁻¹	σ_2 (mS/cm)	r=0,996*** (8)					r=-0,850* (6)	
	σ_3 (mS/cm)				r=-1,000* (3)			r=-0,892* (6)

* – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001 – significance differences.

Table 4

Pearson correlation coefficients obtained from the linear correlation analysis between the dynamic whole blood viscosity (η) at a shear rate of 94.5 s⁻¹ and the amplitudes of the skin temperature pulsations (ASTP) in the endothelial frequency range during the cold test (TE2), 3 min after (TE3) and 10min after it (TE4) for the group of patients with T2DM

η , mPa.s	TE2	TE3	TE4
$\dot{\gamma}=94.5$ s ⁻¹	r=-0.560**	r=-0.669**	r=-0.438*

* – p<0,05; ** – p<0,01 – significance in comparison to controls.

Discussion

Using novel approaches, methods and tools, impairments of the rheological and electrical properties of the blood (plasma and blood viscosity, blood conductivity) under different flow conditions and modes of steady and unsteady flow in the group of patients with diabetes mellitus type 2 (T2DM) have been determined. Peripheral vasomotor reactivity and vascular endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus using WAST method were analyzed too. Correlations, characterizing the relationships between the blood rheological and conductivity parameters, obtained from approximation of experimental data and the micromechanical properties of the blood cells as well as the parameters of microvascular tone regulation in T2DM patients have been searched.

The methodology for diagnosing the peripheral microcirculation based on the wavelet analysis of data from the contact thermometry (WAST) method was used to estimate disturbances of the mechanisms of regulation of the vascular tone in patients with type 2 diabetes mellitus. We used the contralateral cold test, as one of the pathogenetical tests to assess microvascular function

[17]. Dysregulation of microvascular tone in patients with type 2 diabetes mellitus is accompanied by disturbances of the rheological and electrical characteristics of blood, which presumably is a complex manifestation of endothelial dysfunction.

Two sigmoidal equations were applied to describe the kinetics of blood conductivity. Both models include conductivity parameters ($\sigma_1, \sigma_2, \sigma_3$) – σ_1, σ_2 are the initial asymptotic value of the blood conductivity; σ_3 is the final asymptotic value of the blood conductivity and time indices too. The Pearson correlations between these parameters and the ASTP in the frequency ranges, corresponding to the myogenic, neurogenic, and endothelial mechanisms of the microcirculation tone regulation were analyzed. The correlation analysis revealed good ASTP – ($\sigma_1, \sigma_2, \sigma_3$) relationships in the neurogenic range 3 minutes after the cold test, while the ASTP – ($\sigma_1, \sigma_2, \sigma_3$) correlation in the myogenic frequency range before the cold test was negative ($r < -0.8, p < 0.5$).

Several authors have studied the electrical properties of blood and blood cells in patients with type 2 diabetes mellitus. Using a new method based on the dielectric

properties of disperse systems and blood admittance measurements abnormal erythrocyte aggregability was determined in diabetic patients [18]. The authors found a significantly higher sensitivity of the method to detect enhanced RBC aggregation than techniques based on the phenomenon of light scattering, microscopic observations, and others. Zilberman–Kravits et al. also found in [18] that aggregability is increased in type 1 DM and even more markedly in type 2 diabetic patients. The enhanced RBC aggregation in type 1 diabetes was significantly correlated with the levels of HbA1C, cholesterol and triglycerides. However, no correlation between metabolic control and RBC aggregability was found in T2DM.

Rheological and electrical behavior of blood in patients with diabetes mellitus type 2 is studied by O. Desouky [19]. The obtained results show that there is an increase in rheological properties (viscosity and yield stress) and electrical properties (dielectric constant, dielectric loss, relaxation time and AC conductivity) of diabetic erythrocytes compared to healthy individuals. The authors suggest that rheological disorders of diabetic erythrocytes (increased aggregation and decreased deformability) will cause microvascular complications of diabetes [19].

The feasibility of differential diagnosis of the degrees of rheological disturbances in patients with T2DM by dielectrophoresis of erythrocytes has been investigated by Kruchinina et al. [20]. By applying this method, the authors found different changes of several rheological parameters of the erythrocytes, their combined interpretation showing high sensitivity and specificity for diagnosis of rheological disturbances in T2DM. They emphasize that the study of more than 20 parameters of erythrocytes like decrease in deformation amplitude, dipole moment, polarizability and membrane capacity and increase in conductivity, viscosity, rigidity, hemolysis, and formation of aggregates, allows assessment of local and systemic microcirculation. Our findings for increased whole blood viscosity at high shear rates in T2DM patients are in accordance with the results of Kruchinina et al. for raised internal viscosity and summarized rigidity of RBCs.

Conclusion

Impairments of the rheological and electrical properties of the blood (plasma and blood viscosity, blood conductivity) under different flow conditions and modes of steady and unsteady flow in a group of patients with diabetes mellitus type 2 (T2DM) and in a control group of healthy subjects were found. The changes of the skin blood flow responses to cold stress in T2DM patients through wavelet analysis of the peripheral skin temperature pulsations were found and their relationship with the blood viscosity and blood conductivity parameters were estimated.

The simulation results and their comparison with the experimental data obtained in the study will allow us to search specific parametric models, which can reliably describe the main distinguishing features of the micromechanics of blood cells, its rheology, the microcirculation impairments in patients with diabetes mellitus type 2 (T2DM). They could be used in the study of microvascular and hemorheological complications in patients with

various forms of pathology. These methods are based on the high sensitivity of the measured characteristics and the ability to detect pathological deviations.

The combination of these tests with an easy-to-perform technique (WAST method), could be successfully applied in the routine clinical practice to detect vascular complications in the patients with T2DM. The data from the results obtained are of interest and indicative of disorders associated with vasodilation and vasoconstriction of the peripheral vessels due to the endothelial dysfunctions.

Acknowledgements

The study has been supported by the project № КП-06-H27/13 from 2018: «Development of 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», funded by the Bulgarian National Science Fund.

The work has been supported also by the National Program «Young Scientists and Postdoctoral Students» of the Ministry of Education and Science, Project: «Development of non-invasive methodology and tools for assessment of regulatory mechanisms in patients with metabolic syndrome».

The authors also thank Acad. S. Podtaev from the Institute of Continuous Media Mechanics at UB of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia for providing the devices «Microtest», for the training for work and examining patients, for conducting research results, as well as for the instruction for working with various program options.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Velcheva I, Stoyneva Z, Antonova N, Damianov P, Kostova V, Dimitrova V. Skin hemodynamics and temperature oscillations in diabetic patients. Relation to blood rheology. *J. Clin. Hemorheology and Microcirculation*. 2013;167. Doi: 10.3233/CH-131750.
2. Velcheva I, Damianov P, Mantarova S, Antonova N. Cold pressor test: Effects on cardiac autonomic control and cerebral hemodynamic response in patients with diabetes mellitus type 2. *Series on Biomechanics*, 2012;27(1–2):64–69. ISSN:1313-2458.
3. Allen J, Howell K. Microvascular imaging: techniques and opportunities for clinical physiological measurements. *Physiol Meas*. 2014;(35):91–141. Doi: 10.1088/0967-3334/35/7/R91.
4. Kvandal P, Landsverk A, Bernjak A, Stefanovska A, Kvernmo D, Kirkeboen A. Low-frequency oscillations of the laser Doppler perfusion signal in human skin. *Microvasc Res*. 2006;72(3):120–127. Doi: 10.1016/j.mvr.2006.05.006.
5. Shusterman V, Anderson P, Barnea O. Spontaneous skin temperature oscillations in normal human subjects. *Am J Physiol*. 1997;(273):1173–1181.
6. Podtaev S, Morozov M, Frick P. Wavelet-based correlations of skin temperature and blood flow oscillations. *Cardiovasc Eng*. 2008;8(3):185–189. Doi: 10.1007/s10558-008-9055-y.
7. Isii Y, Matsukawa K, Tsuchimochi H, Nakamoto T. Ice-water hand immersion causes a reflex decrease in skin temperature in the contralateral hand, *J Physiol Sci*. 2007;57(4):241–248. Doi: 10.2170/physiolsci.RP007707.

8. Smirnova E, Podtaev S, Mizeva I, Loran E. Assessment of endothelial dysfunction in patients with impaired glucose tolerance during a cold pressor test. *Diab Vasc Dis Res.* 2013; 10(6):489–497. Doi: 10.1177/1479164113494881
9. Kostova V, Antonova N, Chaushev N, Velcheva I, Ivanov I. Oscillations in skin temperature after cold test in patients with type 2 diabetes mellitus and rheological properties of the blood, *J Series on Biomechanics.* 2015;29(1):11–16.
10. Antonova N, Tsiberkin K, Podtaev S, Paskova V, Velcheva I, Chaushev N. Comparative study between microvascular tone regulation and rheological properties of blood in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clinical Hemorheology and Microcirculation.* 2016;64(4):837–844. Doi: 10.3233/CH-168000,837-844.
11. Antonova N, Riha P, Ivanov I. Time dependent variation of human blood conductivity as a method for an estimation of RBC aggregation. *Clinical Hemorheology and Microcirculation.* 2008;(39):69–78.
12. Kaliviotis E, Ivanov I, Antonova N, Yianneskis M. Erythrocyte aggregation at non-steady flow conditions: A comparison of characteristics measured with electrorheology and image analysis. *Clinical Hemorheology and Microcirculation.* 2010;44(1):43–54. Doi: 10.3233/CH-2009-1251.
13. Ройтман Е., Фирсов Н., Дементьева М. и др. Термины, понятия и подходы к исследованиям реологии крови в клинике. Тромбоз, гемостаз и реология. – 2000. – Т. 3, № 3. – С. 5–12. [Roitman E, Firsov N, Dementyeva M, Samsonova N, Plyushch M, Vorobieva N. Terms, concepts and approaches to the study of blood rheology in the clinic. *Thrombosis, Hemostasis and Rheology.* 2000;3(3):5–12. (In Russ.)]
14. Dintenfass L. Red cell rigidity, «Тк» and filtration. *Clinical Hemorheology.* 1985;(5):241–244.
15. Paskova V, Antonova N, Ivanov I, Velcheva I, Chaushev N. Rheological and electrical behaviour of blood in patients with diabetes mellitus type 2. *Series on Biomechanics.* 2019;33(1):51–58.
16. Antonova N. Methods in hemorheology and their clinical applications. *Clinical Hemorheology and Microcirculation.* 2016;(64):509–515. Doi: 10.3233/CH-168001.
17. Frick P, Grossmann A, Tchamitchian P. Wavelet analysis of signals with gaps, *J Math Phys.* 1998;(39):4091–4107. Doi: 10.1063/1.532485.
18. Zilberman-Kravits D, Harman-Boehm I, Shuster T, Meyerstein N. Increased red cell aggregation is correlated with HbA1C and lipid levels in type 1 but not type 2 diabetes. *Clinical Hemorheology and Microcirculation.* 2006; 35(4):463–471.
19. Desouky O. Rheological and electrical behavior of diabetes mellitus, *Romanian J. Biophys.* 2009;19(4):239–250.
20. Kruchinina MV, Gromov AA, Generalov VM, Kruchinin VN. Possible differential diagnosis of the degrees of rheological disturbances in patients with type 2 diabetes mellitus by dielectrophoresis of erythrocytes, *J. Pers. Med.* 2020;(10):60. Doi: 10.3390/jpm10030060.

Information about authors

Nadya Mladenova Antonova – PhD, Professor, Department of Biomechanics, Institute of Mechanics, BAS, Sofia, Bulgaria, e-mail: antonova@imbm.bas.bg, ORCID: 0000-0003-1707-0235.

Vasilka Krumova Paskova – PhD, Assistant, Department of Biomechanics, Institute of Mechanics, BAS, Sofia, Bulgaria, ORCID: 0000-0003-1398-5614.

Irena Vassileva Velcheva – Ph. D., Associate Professor, Clinic of nervous diseases, Uni Hospital Panagyurishte, Bulgaria, e-mail: velchevairena@gmail.com, ORCID: 0000-0003-1464-7385.

Информация об авторах

Антонова Надя Младенова – доктор (кандидат технических наук), профессор кафедры биомеханики, Институт механики БАН, София, Болгария, e-mail: antonova@imbm.bas.bg, ORCID: 0000-0003-1707-0235.

Паскова Василка Крумова – доктор по биомеханике (кандидат наук по биомеханике), ассистент кафедры биомеханики, Институт механики БАН, София, Болгария, ORCID: 0000-0003-1398-5614.

Велчева Ирена Василева – доктор (кандидат медицинских наук), доцент, клиника нервных заболеваний, Уни Хоспитал, Панагюриште, Болгария, e-mail: velchevairena@gmail.com, ORCID: 0000-0003-1464-7385.

УДК 612.112 /576.54/57.053.4

DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-34-41

М. Ю. СКОРКИНА, Т. С. ШЕВЧЕНКО, Н. И. ЖЕРНАКОВА

Микромеханические свойства и функциональная активность гранулоцитов при моделировании экзогенной нагрузки с АТФ *in vitro*

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства образования

Российской Федерации, г. Белгород, Россия

Россия, г. Белгород, ул. Победы, д. 85

E-mail: skorkina@bsu.edu.ru

Статья поступила в редакцию 02.12.20; принята к печати 22.01.21

Резюме

Микромеханические свойства лейкоцитов вносят определенный вклад в скорость кровотока в микроциркуляторном русле, при этом сами изменяются под действием сложной сети пуринергических сигналов. Цель работы – изучить микромеханические свойства и функциональную активность гранулоцитов в норме и у больных острым лимфобластным лейкозом при моделировании экзогенной нагрузки с АТФ в опытах *in vitro*. *Материалы и методы.* Выделяли лейкоциты из крови больных острым лимфобластным лейкозом и здоровых людей. Каждую пробу делили на опытную и контрольную. В опытных пробах моделировали нагрузку с АТФ *in vitro*, лейкоциты контрольных проб инкубировали в культуральной среде без добавления АТФ. Модуль Юнга и силу адгезии измеряли на атомно-силовом микроскопе в режиме силовой спектроскопии. Потенциал поверхности клеток измеряли на атомно-силовом микроскопе в режиме моды Кельвина. Для оценки функциональной активности гранулоцитов использовали гипоосмотические тесты *in vitro* и определение миграционной активности. *Результаты.* В тестах с экзогенной АТФ, как в пробах здоровых людей, так и больных острым лимфобластным лейкозом, установлено снижение жесткости и потенциала поверхности плазмалеммы, усиление адгезивных свойств лейкоцитов и миграционной активности. При этом ответы гранулоцитов на осмотическую нагрузку различались: так, в группе здоровых людей нагрузка с АТФ вызывала сжатие клетки и снижение использования мембранного резерва клеткой в гипотонической среде, а у пациентов больных ОЛЛ – увеличение объема и более интенсивное использование мембранного резерва в регуляции объема. *Заключение.* Выявленные эффекты указывают на ведущую роль молекулы АТФ в механизмах сигнальной трансдукции между клетками крови в микроциркуляторном русле. Установленное в исследовании увеличение адгезивных свойств клеточной поверхности гранулоцитов, параллельно с усилением их миграционной активности под влиянием молекулы АТФ, может способствовать развитию воспаления в сосудистой стенке.

Ключевые слова: гранулоциты, модуль Юнга, адгезия, потенциал поверхности, мембранный потенциал, мембранный резерв, миграция

Для цитирования: Скоркина М. Ю., Шевченко Т. С., Жернакова Н. И. Микромеханические свойства и функциональная активность гранулоцитов при моделировании экзогенной нагрузки с АТФ *in vitro*. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2021;20(1):34–41. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-34-41.

UDC 612.112 /576.54/57.053.4

DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-34-41

М. Yu. SKORKINA, T. S. SHEVCHENKO, N. I. ZHERNAKOVA

Micromechanical properties and functional activity of granulocytes when simulating exogenous loading with ATP *in vitro*

Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

Russia, Belgorod, Pobedy str., 85

E-mail: skorkina@bsu.edu.ru

Received 02.12.20; accepted 22.01.21

Summary

The micromechanical properties of leukocytes make a certain contribution to the blood flow velocity in the microcirculatory bed, while the micromechanical properties themselves change under the influence of a complex network of purinergic signals. The aim of the work was to study the micromechanical properties and functional activity of granulocytes in normal conditions and in patients with acute lymphoblastic leukemia when simulating exogenous loading with ATP *in vitro*. *Materials and methods.* Leukocytes were isolated from the blood of patients with acute lymphoblastic leukemia and healthy people. Each sample was divided into a test sample and a control sample. In the test samples, the loading with ATP *in vitro* was simulated. Leukocytes of the control samples were incubated in the culture medium without the addition of ATP. Young's modulus and adhesion force were measured using an atomic force microscope in the force spectroscopy mode. The cell surface potential was measured in an atomic force microscope in the Kelvin mode. To assess the functional activity of granulocytes, hypoosmotic tests *in vitro* and determination of migration activity were used. *Results.* In tests with exogenous ATP, both in samples from healthy people and from patients with acute lymphoblastic leukemia, a decrease in the rigidity and potential of the plasma membrane surface, an increase in the adhesive

properties of leukocytes and migration activity were found. At the same time, the responses of granulocytes to the osmotic loading were different: for example, in the group of healthy people, the loading with ATP caused cell contraction and a decrease in the use of the membrane reserve by the cell in a hypotonic environment, and in patients with acute lymphoblastic leukemia, it caused an increase in the volume and more intensive use of the membrane reserve in volume regulation. *Conclusion.* The revealed effects indicate the leading role of the ATP molecule in the signal transduction mechanisms between blood cells in the microvasculature. The increase in the adhesive properties of the cell surface of granulocytes revealed in the study, in parallel with the increase in their migration activity under the influence of the ATP molecule, can contribute to the development of inflammation in the vessel wall.

Keywords: *granulocytes, Young's modulus, adhesion, surface potential, membrane potential, membrane reserve, migration*

For citation: Skorkina M. Yu., Shevchenko T. S., Zhernakova N. I. Micromechanical properties and functional activity of granulocytes when simulating exogenous loading with ATP *in vitro*. *Regional blood circulation and microcirculation*. 2021;20(1):34–41. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-34-41.

Введение

В микроциркуляторном русле гранулоциты являются непосредственными участниками межклеточных взаимодействий. Физиологическая активность гранулоцитов в большинстве случаев зависит от свойств плазмалеммы и компетентности их рецепторного аппарата, который реагирует на сложную сигнальную сеть, включающую комбинированное воздействие пуринаргических сигналов [1]. Микромеханические свойства лейкоцитов вносят определенный вклад в скорость кровотока в микроциркуляторном русле, при этом изменяются под влиянием регуляторных ауто- и паракринных сигналов [2]. Доказано, что увеличение в перфузате скорости потока является существенным механическим стимулом для высвобождения АТФ из эритроцитов во время ишемии [3], механического стресса, воздействия β -адренергических агонистов, аналогов простаглиннов, при ацидозе или набухании клетки [4]. В этой связи одной из фундаментальных задач является изучение функциональных свойств плазмалеммы гранулоцитов в условиях активации элементов внутриклеточных и внеклеточных пуринаргических сигнальных путей в норме и при развитии злокачественных процессов в системе крови, поскольку молекулы АТФ выступают ключевыми мессенджерами в межклеточной коммуникации между опухолевыми и здоровыми клетками. Известно, что рост злокачественных опухолей сопровождается выраженной воспалительной реакцией, формированием диффузных некротических очагов в результате накопления АТФ во внеклеточной среде [5].

Цель работы – изучить микромеханические свойства (жесткость, адгезию, потенциал поверхности) и функциональную активность гранулоцитов (миграционную активность и осморегуляторные реакции) в норме и у больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) при моделировании экзогенной нагрузки с АТФ в опытах *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Экспериментальная часть работы выполнена на венозной крови пациентов больных ОЛЛ, проходивших обследование и лечение в гематологическом отделении Белгородской областной клинической больницы им. Святителя Иоасафа. Было сформировано две группы проб: в первую отбирали кровь больных ОЛЛ ($n=10$) на стадии первичной постановки диагноза до лечения. Возраст пациентов – 20–46 лет, в периферической крови присутствовали бластные формы лимфоидного ростка кроветворения $86,3 \pm 0,8$ %. Вторая группа проб – кровь здоровых пациентов ($n=30$) в возрасте 20–45 лет, проходивших диспансеризацию.

Кровь получали методом венепункции при непосредственном участии специализированного медперсонала больницы. Образцы крови собирали в вакуумные пробирки Vacuette K3E (*Greiner Bio-One*, Австрия), с сухим напылением ЭДТА K_3 в концентрации 2,0 мг на 1 мл крови.

Цельную кровь центрифугировали при 1500 об./мин в течение 15 мин, отбирали кольцо лейкоцитов и ресуспендировали клетки в культуральной среде RPMI 1640 («ПанЭко», Россия). Каждую пробу лейкоцитарной суспензии делили на две части – контрольную и опытную (10^6 кл/мл).

В опытных пробах крови пациентов больных ОЛЛ моделировали нагрузку с АТФ *in vitro*, добавляя к клеточной суспензии 100,0 μ M аденозин-5-трифосфата динатриевую соль тригидрата (АТФ- $Na_2 \times 3H_2O$) (Sigma, США) к клеточной суспензии, в группе здоровых людей – 10,0 μ M аденозин-5-трифосфата динатриевую соль тригидрата (АТФ- $Na_2 \times 3H_2O$) (Sigma, США). Выбор концентраций АТФ основан на данных литературы [6], согласно которым, при развитии опухолей концентрация АТФ во внеклеточной среде находится в микромолярном диапазоне, тогда как в здоровых тканях не превышает субмикромолярные количества.

Контрольные пробы, в группах как пациентов, больных ОЛЛ, так и здоровых, включали в себя лейкоцитарную суспензию в среде RPMI 1640 без добавления препарата. Инкубацию всех проб проводили в течение 15 мин при 37 °C.

При изучении функциональных свойств плазмалеммы использовали метод атомно-силовой микроскопии. Модуль Юнга, характеризующий жесткость клеточной поверхности, рассчитывали исходя из силовых кривых подвода и отвода. Силовые кривые получали на атомно-силовом микроскопе (АСМ) «ИНТЕГРА ВИТА» (конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа Olympus IX-71) в режиме силовой спектроскопии. Для сканирования конструировали модифицированные АСМ-зонды, приготовленные на основе типлесса и полимерных микросфер (с радиусом закругления 5 μ m). Силу взаимодействия между биосенсорным чипом и клеточной поверхностью рассчитывали согласно алгоритму, изложенному в работе [7]. Из каждой пробы сканировали по 20 клеток.

Потенциал клеточной поверхности измеряли на АСМ в режиме зонда Кельвина. Лейкоцитарную суспензию отмывали изотоническим раствором хлорида натрия («ПанЭко», Россия) в течение 5 мин, затем фиксировали 0,25 %-м раствором глутарового альдегида (MERCK, Германия) в течение 20 мин, дважды отмывали изотоническим раствором хлорида

Таблица 1

Функциональные свойства гранулоцитов под влиянием экзогенной нагрузки с АТФ *in vitro*

Table 1

Functional properties of granulocytes under the influence of exogenous loading with ATP *in vitro*

Измеряемый показатель	Группа больных ОЛЛ		Группа сравнения, здоровые люди	
	контроль (интактные пробы)	опыт (нагрузка с АТФ)	контроль (интактные пробы)	опыт (нагрузка с АТФ)
Модуль Юнга, μPa	1,846 $\pm$ 0,024	0,246 $\pm$ 0,001*	4,549 $\pm$ 0,042	2,971 $\pm$ 0,031*
Потенциал поверхности, mV	-15,60 $\pm$ 0,68	-26,43 $\pm$ 1,10*	-30,98 $\pm$ 2,58	-45,87 $\pm$ 1,44*
Сила межклеточной адгезии, nN	48,8 $\pm$ 2,1	99,5 $\pm$ 4,2**	30,7 $\pm$ 0,5	54,2 $\pm$ 0,7**
Миграционная активность гранулоцитов, %	25,12 $\pm$ 0,9	33,3 $\pm$ 4,2*	10,4 $\pm$ 0,2	41,3 $\pm$ 0,8*

Примечание: * – статистически значимые различия между показателями контрольной и опытной проб по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$); ** – статистически значимые различия между показателями по U-критерию Манна – Уитни ($p < 0,05$).

натрия по 5 мин и готовили препараты на обезжиренной металлической подложке. Сканирование выполняли кантилеверами с токопроводящим титановым покрытием серии NSG03/TiN (*Nanoworld*, США). Из каждой пробы сканировали по 20 гранулоцитов. Полученные сканы обрабатывали с помощью инструмента «Point Instruments» в программе «Nova» (*NT-MDT*, Россия), измеряя потенциал в 10 участках поверхности каждой клетки.

Силу межклеточной адгезии измеряли на АСМ в режиме силовой спектроскопии. Во время сканирования конструировали биосенсорный чип на основе нативного эритроцита и типлесса CSG11 (США) согласно способу, изложенному в работе [8]. Силу межклеточной адгезии измеряли между эритроцитом и гранулоцитом, регистрируя силовые кривые с поверхности 20 клеток. Полученные силовые кривые обрабатывали с использованием программного обеспечения «Nova» (*NT-MDT*, Россия).

Для оценки функциональной активности гранулоцитов использовали гипоосмотические тесты *in vitro* и определение миграционной активности. При выполнении гипоосмотической нагрузки суспензию лейкоцитов, как в опытных, так и в контрольных группах, делили на 2 части (по 0,5 мл). К первой части добавляли 0,5 мл аутологичной плазмы, ко второй – 0,5 мл гипотонического раствора хлорида натрия (0,45 %). В стерильные чашки Петри со стеклянным дном (*Eppendorf*, Германия) вносили 0,1 мл клеточной суспензии из соответствующей опытной и контрольной пробы. Полученные суспензионные препараты микроскопировали, регистрируя изображения нативной суспензии лейкоцитов, с интервалом каждые 30 с на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Nikon (*TokyoByoke*, Япония, 2011). Длительность гипоосмотической нагрузки составила 5 мин. На полученных изображениях измеряли диаметр 50 клеток из каждой пробы, используя программное обеспечение Nis-Elements Documentation (ver. 2.32 TokyoByoke, Япония). На основе промеров диаметров рассчитывали объем клетки и мембранный резерв, заложенный в складчатости плазмалеммы и используемый клетками в регуляции объема клеток при гипоосмотической нагрузке, согласно формуле:

$$MP = \frac{S_r - S_n}{V_n},$$

где MP – мембранный резерв клетки, мкм^{-1} ; S_r – площадь поверхности клетки в гипотонической среде, мкм^2 ; S_n – площадь поверхности клетки в аутологичной плазме, мкм^2 ; V_n – объем клетки в аутологичной плазме, мкм^3 .

Для оценки миграционной активности лейкоцитов в работе применен прямой капиллярный тест под агарозой. С предварительной оценкой жизнеспособности клеток не менее 95 %. Жизнеспособность клеток определяли с помощью счетчика и анализатора жизнеспособности клеток Countress II Automated Cell Counter (*Thermo, Life Technologies*, США, 2019 г.), добавляя к 1 мкл клеточной суспензии 5 мкл 0,4 %-го раствора трипанового синего (*Invitrogen*, США). Подсчет мигрировавших клеток в 1 мкл среды проводили в 25 больших квадратах сетки счетной камеры Горяева под большим увеличением (окуляр $\times 20$, объектив $\times 40$).

Результаты экспериментальных исследований обрабатывали методами вариационной статистики. Достоверность различий между контрольными и опытными пробами в случае нормального распределения признака определяли с использованием t-критерия Стьюдента при $p < 0,05$, для непараметрических данных применяли U-критерий Манна – Уитни при $p < 0,05$. Данные представляли в виде средних значений (M) и их средних статистических ошибок (m).

Результаты исследования и их обсуждение

В группе пациентов больных ОЛЛ под влиянием экзогенной нагрузки с АТФ установлено снижение модуля Юнга и потенциала поверхности соответственно на 86,7 и 40,9 % ($p < 0,05$) по сравнению с интактными пробами (табл. 1).

Под влиянием АТФ в группе больных ОЛЛ увеличилась сила адгезии в системе «эритроцит – гранулоцит» и миграционная активность гранулоцитов соответственно на 50,9 и 24,5 % ($p < 0,05$) по сравнению с интактными пробами.

В группе сравнения у здоровых доноров наблюдали аналогичные реакции гранулоцитов на экзогенную

Таблица 2

Объем гранулоцитов и мембранный резерв, задействованный ими в тестах с гипосмотической нагрузкой *in vitro* (в группе пациентов больных ОЛЛ)

Table 2

Granulocytes volume and membrane reserve used in tests with hypoosmotic loading *in vitro* (in the group of patients with ALL)

Время инкубации, с	Контроль		Нагрузка с АТФ	
	$V_{\text{гипо}}, \text{мкм}^3$	MR, %	$V_{\text{гипо}}, \text{мкм}^3$	MR, %
0	547,2±30,8	25,7±2,0	563,0±40,1	30,2±1,2
30	524,1±29,0	17,3±3,6*	578,1±30,8	36,4±8,9
60	524,4±30,4	23,3±1,4	631,2±43,9	50,2±1,7*
90	491,3±18,6	12,8±2,05*	627,2±30,4	59,5±2,2*
120	488,9±15,5	19,1±3,9	647,8±41,9	51,8±1,2*
150	487,2±25,8	21,6±1,2	675,4±50,0	51,8±1,2*
180	485,1±23,5	17,2±3,9*	705,4±50,0*	33,2±7,3
210	563,6±32,6	28,2±0,4	769,7±44,7*	65,9±1,2*
240	609,2±31,7	45,9±1,5*	679,8±54,9	51,8±1,4*
270	527,9±30,3	33,4±5,9*	766,5±31,2*	57,9±1,5*
300	523,5±35,5	22,7±1,0	735,5±47,7*	71,5±1,9*

Примечание: * – статистически значимые различия между показателями в начале инкубации (0 с) и последующими временными интервалами по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$); $V_{\text{гипо}}$ – объем клетки в гипотонической среде; MR – мембранный резерв клетки.

нагрузку с АТФ. Так, согласно данным табл. 1, в опытных пробах модуль Юнга снижен на 53,2 %, при этом миграционная активность клеток увеличилась на 74,8 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Заряд клеточной поверхности стал более отрицательным – потенциал поверхности снижен на 32,5 % ($p < 0,05$), а сила адгезии между эритроцитом и гранулоцитом увеличилась на 43,3 % по сравнению с контролем.

В группе больных ОЛЛ под влиянием нагрузки с АТФ установлено более интенсивное использование мембранного резерва в осморегуляторных реакциях (табл. 2).

Согласно данным табл. 2, под влиянием АТФ объем гранулоцитов в гипотонической среде увеличивался в течение 210 с инкубации, затем наблюдали 30-секундную фазу уменьшения объема с 201-й по 240-ю с и далее до конца инкубации (к 300-й с) объем клетки вновь возрастал на 23,4 % ($p < 0,05$) по сравнению с началом инкубации (0 с). На 60-й с инкубации отмечали достоверное увеличение величины мембранного резерва на 39,8 % ($p < 0,05$), задействованного гранулоцитами в регуляции их объема, по сравнению с началом инкубации. На 180-й с величина мембранного резерва клетки возвращалась практически к исходным значениям до инкубации, а затем, начиная с 210-й с и до конца инкубации, возрастала. На 300-й с мембранный резерв, используемый гранулоцитами, увеличился на 57,8 % ($p < 0,05$) по сравнению с началом инкубации.

В контроле у больных ОЛЛ не выявили достоверных изменений объема гранулоцитов в гипотонической среде (табл. 2). Установлены периоды снижения использования мембранного резерва клеткой, так на 30-й, 90-й и 180-й с величина мембранного резерва снижена соответственно на 48,5, 50 и 49,4 % ($p < 0,05$)

по сравнению с началом инкубации. С 210-й и по 270-ю с величина мембранного резерва увеличилась, максимальный прирост зафиксирован на 270-й с на 23 % ($p < 0,05$) по сравнению с началом инкубации. К 300-й с объем клетки и величина мембранного резерва достоверно не отличались от исходных значений (0 с).

В группе здоровых людей под влиянием АТФ в гипотонической среде была установлена фаза регуляторного сокращения объема в первые 60 с инкубации, затем клетка восстанавливала свой объем к 90-й с до значений, характерных до инкубации (табл. 3). В интервале 120–150 с инкубации регистрировали фазу регуляторного сокращения объема клетки, которая сменялась коротким 30-секундным периодом регуляторного увеличения объема к 180 с. В интервале 210–240 с был установлен 30-секундный период уменьшения объема, который длился до конца инкубации. К 300-й с объем клетки снижен и не восстановился до исходных значений.

В контрольной группе проб в гипотонической среде в первые 30 с инкубации объем гранулоцитов увеличился, затем сменился длительной фазой регуляторного сокращения объема в период с 90-ю по 300-ю с инкубации. Под влиянием внеклеточной АТФ использование мембранных структур в регуляции клеточного объема было снижено на протяжении всего времени инкубации по сравнению с начальной точкой (0 с). Достоверное снижение величины мембранного резерва установлены на 90-й и 120-й с соответственно на 39,1 и 53,4 % ($p < 0,05$) по сравнению с началом инкубации (см. табл. 2).

Полученные в работе данные указывают на ведущую регуляторную роль молекулы АТФ в изменении микромеханических и функциональных

Таблица 3

Объем гранулоцитов и мембранный резерв, задействованный ими в тестах с гипотонической нагрузкой *in vitro* (в группе здоровых людей)

Table 3

Granulocytes volume and membrane reserve used in tests with hypoosmotic loading *in vitro* (in the group of healthy people)

Время инкубации, с	Контроль		Нагрузка с АТФ	
	$V_{\text{гипо}}, \text{мкм}^3$	MR, %	$V_{\text{гипо}}, \text{мкм}^3$	MR, %
0	652,4±12,4	54,6±4,0	752,7±15,9	50,0±4,7
30	669,9±13,6*	58,2±4,3	751,7±18,3	41,1±5,1
60	642,7±12,2*	44,0±3,8	722,8±15,9*	39,9±4,0
90	636,5±12,9*	39,1±3,0*	752,7±18,1	39,2±3,7
120	613,2±11,3*	35,6±2,9*	729,4±16,7*	40,3±3,9
150	626,8±12,3*	48,9±3,4	728,4±15,3*	37,7±3,5*
180	623,8±12,6*	46,2±3,7	740,2±17,8*	39,8±3,7
210	627,4±13,4*	53,5±4,2	714,1±16,2*	37,1±4,1*
240	623,5±11,2*	46,1±3,5	703,1±14,2*	32,9±3,1*
270	622,4±12,3*	51,8±3,8	746,9±15,5	41,5±3,3
300	614,9±12,6*	47,8±3,6	719,8±15,7*	46,7±4,1

Примечание: * – статистически значимые различия между показателями в начале инкубации (0 с) и последующими временными интервалами по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$). $V_{\text{гипо}}$ – объем клетки в гипотонической среде, MR – мембранный резерв клетки.

свойств гранулоцитов, как в норме, так и у больных ОЛЛ. Внеклеточный АТФ является мощным хемотаксическим стимулом для нейтрофилов, которые участвуют в реализации воспалительных реакций в организме [9]. В группах здоровых людей и больных ОЛЛ установлена высокая степень корреляции между параметрами модуля Юнга и миграционной активностью клетки ($r=1$), а также между потенциалом поверхности и силой межклеточной адгезии ($r=1$), что указывает на тесную взаимосвязь между свойствами плазмалеммы и функциональной активностью клетки. Чем ниже значения модуля Юнга, а значит, жесткость поверхности, тем выше миграционная активность клеток, при этом отрицательный заряд к поверхности гранулоцитов играет определенную роль в увеличении силы межклеточной адгезии между эритроцитом и гранулоцитом.

Учитывая, что микрореологические свойства клетки контролируются цитоскелетом [10], установленное в эксперименте снижение жесткости клеточной поверхности гранулоцитов в условиях экзогенной нагрузки с АТФ, как в норме, так и у больных ОЛЛ, указывает на реализацию сигнального каскада с участием ионов Ca^{2+} . Согласно данным литературы, активация P2-рецепторов на клеточной поверхности индуцируют увеличение внутриклеточного Ca^{2+} в нейтрофилах человека [11] и способствует разборке полимеризованного актина [12], что приводит к снижению концентрации актинсшивающих белков [13]. С точки зрения микроциркуляции, снижение жесткости поверхности гранулоцитов будет способствовать усилению миграционной активности клетки, так как им легче деформироваться в мелких сосудах.

В выполненном исследовании доказано непосредственное влияние внеклеточной АТФ на усиление

миграционной активности гранулоцитов в обеих исследованных группах. Полученные данные согласуются с рядом данных, в которых доказана регулирующая функция внеклеточной АТФ, посредством влияния ее на P2X7-рецептор, который изменяет активность селектина и миграцию нейтрофилов [14]. При этом некоторые работы указывают на активацию P2Y2-рецептора, усиливающего хемотаксис нейтрофилов посредством передачи сигнала на mTOR-сигнальный путь на переднем крае клетки [15].

Влияние АТФ на осморегуляторные реакции проявлялось по-разному. Так, в норме у здоровых людей под влиянием АТФ в гипотонической среде наблюдали фазу регуляторного снижения объема. Вероятно, сжатие клетки и уменьшение ее объема связано с увеличением оттока K^+ и Cl^- . В литературе представлены данные, согласно которым, в нейтрофилах повышение Ca^{2+} увеличивает активность Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов и Cl^- -каналов, что приводит к сжатию клетки и развитию фазы регуляторного снижения объема [16].

У гранулоцитов пациентов больных ОЛЛ под влиянием АТФ в гипотонической среде регистрировали длительную фазу регуляторного увеличения объема и более интенсивное использование мембранного резерва в реакциях осморегуляции. Наблюдаемый эффект мы связываем с работой TRPV4-катионного канала. TRPV4-канал функционирует как мульти-модальный датчик и может быть активирован кальмодулином и ионами Ca^{2+} [17]. Кроме того, TRPV4 задействован в миграции иммунных клеток [18]. При анализе миграционной активности гранулоцитов интактных проб (контроль) между группами здоровых и больных ОЛЛ видно что миграционная активность гранулоцитов больных ОЛЛ повышена почти в 2 раза.

Можно полагать, что, контактируя с опухолевыми лимфоцитами в гранулоцитах, могут быть активированы программы экспрессии промиграционных генов [19], в связи с чем у них изначально до воздействия нагрузки с АТФ миграционная активность повышена.

Заключение

Таким образом, при стимуляции пуринергического сигнального пути (*in vitro*) в смоделированном нагрузочном тесте с экзогенной АТФ, как в пробах здоровых людей, так и больных ОЛЛ, установлено снижение жесткости и потенциала поверхности плазмалеммы, усиление адгезивных свойств и миграционной активности гранулоцитов. При этом ответы гранулоцитов на осмотическую нагрузку различались: так, в группе здоровых людей нагрузка с АТФ вызывала сжатие клетки и снижение использования мембранного резерва клеткой в гипотонической среде, а у пациентов, больных ОЛЛ, – увеличение объема и более интенсивное использование мембранного резерва в регуляции объема. Выявленные эффекты указывают на ведущую роль молекулы АТФ в механизмах сигнальной трансдукции между клетками крови в микроциркуляторном русле. Установленное в исследовании увеличение адгезивных свойств клеточной поверхности гранулоцитов, параллельно с усилением их миграционной активности под влиянием молекулы АТФ, может способствовать развитию воспаления в сосудистой стенке.

Финансирование / Acknowledgements

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-015-00032/20. / The reported study was funded by the Russian Foundation of Basic Research (RFBR) according to the research project № 18-015-00032/20.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Соответствие нормам этики / Compliance with ethical principles

Работа выполнена с соблюдением требований Хельсинской декларации, получено предварительное информированное согласие участников исследования в соответствии с рекомендациями, изложенными в Декларации по этическим принципам медицинских исследований, в которых участвуют люди, принятая 52 Генеральной Ассамблеей Всемирной Медицинской Ассоциации, Эдинбург, Шотландия, октябрь, 2000 г. (в редакции 2013 г.). / The study was carried out in compliance with the requirements of Declaration of Helsinki, the preliminary informed consent of the study participants was obtained in accordance with the guidelines set out in the Declaration on Ethical Principles for Medical Research in which people participate, as adopted by the 52nd WMA General Assembly, Edinburg, October 2000 (as amended in 2013).

Литература / References

1. Burnstock G, Boeynaems JM. Purinergic signaling and immune cells. *Purinergic Sign.* 2014;(10):529–564. Doi: 10.1007/s11302-014-9427-2.
2. Erlinge P, Burnstock G. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Sign.* 2008;(4):1–20. Doi: 10/1007/s11302-007-9092-9.
3. Sprague RS, Stephenson AH, Ellsworth ML. Impaired release of ATP from red blood cells of human with primary pulmonary hypertension. *Exp Biol and Med.* 2001;226(5):434–439. Doi: 10.1177/153537020122600507.
4. Leal Denis MF, Incicco JJ, Espelt MV, Verstraeten SV, Pignataro OP, Lazarowski ER, Schwarzbaum PJ. Kinetics of extracellular ATP in mastoparan 7-activated human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(10):4692–4707. Doi: 10/1016/j.bbagen.2013.05.033.
5. Di Virgilio F. Purines, purinergic receptors, and cancer. *Cancer Res.* 2012;72(21):1–7. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1600.
6. Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, Di Virgilio F. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: *in vivo* imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS ONE* 2008;3(7):2599. Doi: 10/1371/journal.pone.0002599.
7. Использование наномеханического сенсора для изучения морфофункциональных свойств лимфоцитов здоровых доноров и больных хроническим лимфобластным лейкозом / М. Ю. Скоркина, М. З. Федорова, А. В. Муравьев, Е. А. Сладкова // Клет. техн. в биол. и мед. – 2012. – № 3. – С. 172–175. [Skorkina MYu, Fedorova MZ, Muravyov AV, Sladkova EA. Using a nanomechanical sensor to study the morphofunctional properties of lymphocytes from healthy donors and patients with chronic lymphoblastic leukemia. *Cell technol. in biol. and med.* 2012;(3):172–175. (In Russ.)].
8. Скоркина М. Ю., Шамрай Е. А., Сладкова Е. А. Измерение сил адгезии в системе «клетка-клетка» на основе технологий атомно-силовой микроскопии // Клет. техн. в биол. и мед. – 2017. – № 4. – С. 213–215. [Skorkina MYu, Shamray EA, Sladkova EA. Measurement of adhesion forces in the «cell-cell» system based on atomic force microscopy technology. *Cell technol. in biol. and med.* 2017;(4):213–215. (In Russ.)].
9. Trautmann A. Extracellular ATP in the immune system: more than just a “danger signal” *Sci. Signal* 2009;2(56):6. Doi: 10.1126/scisignal.256pe6.
10. Verdier C, Couzon C, Duperray A, Singh P. Modeling cell interactions under flow. *J. of Mathematical Biology.* 2009;(58):235–259. Doi: 10.1007/s00285-008-0164-4.
11. Chen Yu, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi, Zinjenagel A, Nizet V, Insel PA, Junger WG. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science.* 2006;314(5806):1792–1795. Doi: 10.1126/science.1132559.
12. Goldman N, Chandler-Militello D, Langevin H, Nedergaard M, Takano T. Purine receptor mediated actin cytoskeleton remodeling of human fibroblasts. *Cell Calcium* 2013;53(4):297–301. Doi: 10.1016/j.ceca.2013.01.004.
13. Yap B, Kamm RD. Cytoskeletal remodeling and cellular activation during reformation of neutrophils into narrow channels. *J. Appl. Physiol.* 2005;99(6):2323–2330. Doi: 10.1152/jappphysiol.00503.2005.
14. Ley K, Laudanna C, Cynulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 2007;(7):678–689. Doi: 10.1038/nri2156.
15. Bao Y, Ledderose C, Graf AF, Brix B, Birsak T, Lee A, Zang J, Junger WG. mTOR and differential activation of mitochondria orchestrate neutrophil chemotaxis. *J. cell Biol.* 2015;210(7):1153–1164. Doi: 10/1083/jcb.201503066.

16. Hoffman EK, Lambert LH, Pedersen SF. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol. Rev.* 2009; 89(1):193–277. Doi: 10/1152/physrev.00037.2007.

17. Vrenken KS, Jalink K, van Leeuwen FN, Middelbeek J. Beyond ion-conduction: Channel-dependent and –independent roles of TRP channels during development and tissue homeostasis. *Biochem. and Biophys. Acta.* 2016;1863(6):1436–1446. Doi: 10/1016/j.bbamcr.2015.11.008.

18. Scheraga RG, Abraham S, Niese KA, Southern BD, Grove LM, Hite RD, McDonald C, Hamilton TA, Olman MA. TRPV4 mechanosensitive ion channel regulates lipopolysaccharide-stimulated macrophage phagocytosis. *J. Immunol.* 2016;196(1):428–436. Doi: 10.4049/jimmunol.1501688.

19. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science.* 2011;331(6024):1559–1564. Doi: 10.1126/science.1203543.

Информация об авторах

Скоркина Марина Юрьевна – д-р биол. наук, доцент, зав. кафедрой биохимии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Минобрнауки России, г. Белгород, Россия, e-mail: skorkina@bsu.edu.ru.

Шевченко Татьяна Сергеевна – канд. биол. наук, доцент, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Минобрнауки России, г. Белгород, Россия, e-mail: ts_shevchenko@bsu.edu.ru.

Жернакова Нина Ивановна – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой семейной медицины, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Минобрнауки России, г. Белгород, Россия, e-mail: zhernakova@bsu.edu.ru.

Information about authors:

Skorkina Marina Yu. – Doctor of Biological science, docent, Head of Department of Biochemistry, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, e-mail: skorkina@bsu.edu.ru.

Shevchenko Tatyana S. – Candidate of Biological science, Docent of Department of Biochemistry, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, e-mail: ts_shevchenko@bsu.edu.ru.

Zhernakova Nina I. – Doctor of Medical science, Professor, Head of Department of Family Medicine, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia, e-mail: zhernakova@bsu.edu.ru.

В. Н. ВАВИЛОВ¹, А. Ю. ЗАРИЦКИЙ⁴, Д. Г. ПОЛЫНЦЕВ³,
П. С. КУРЬЯНОВ², А. Н. КРУТИКОВ⁴, Е. А. ЗЕНКОВА³,
Ф. З. ШИРИТОВА¹

Эффективность мезенхимных стромальных клеток при лечении больных с критической ишемией нижних конечностей

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8

² Городская больница № 14, Санкт-Петербург, Россия
198099, Россия, Санкт-Петербург, ул. Косинова, д. 19/9

³ ООО «Транс-Технологии», Банк стволовых клеток, Санкт-Петербург, Россия
Россия, Санкт-Петербург, Железнодорожный пр., д. 40

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр
имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия
197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2
E-mail: vnvavilov@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 12.11.20; принята к печати 29.01.21

Резюме

Актуальность исследования определяется тем, что на клеточную терапию у пациентов с хронической ишемией нижних конечностей возлагают надежды как на метод восстановления кровообращения в пораженной конечности у пациентов, которым невозможно выполнить хирургическое или эндоваскулярное вмешательство. *Цель* – исследовать эффективность аллогенных мезенхимных стромальных клеток костного мозга (МСК) для лечения критической ишемии нижних конечностей (рандомизированное плацебоконтролируемое исследование). *Материалы и методы.* В исследование были включены 34 пациента с критической ишемией нижних конечностей (4 ст. по Покровскому). Группа МСК – 18 человек, в группе плацебо – 16. Группы были сопоставимы по возрасту, длительности заболевания, коморбидной патологии. Аллогенные МСК (фенотип CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD45⁻, CD34⁻, CD14⁻) вводили в задние мышцы голени. Оценивали клиническую симптоматику, лодыжечное давление, транскутанное напряжение кислорода (tcpO₂), дистанцию безболевого ходьбы (ДБХ). Наблюдение за пациентами продолжалось 12–36 месяцев. По клиническому течению в каждой группе выделяли пациентов в подгруппы «эффект (+)» или «эффект (–)». У 2 пациентов отмечался «неопределенный клинический результат». При анализе результатов этих пациентов относили в ту или иную подгруппу. *Результаты.* В группах МСК и плацебо клинический результат, оцениваемый как «эффект (+)» или «эффект (–)», не различался – ОШ 1,5 (ДИ 0,34–6,7). При разных вариантах формирования групп с отнесением пациентов с «неопределенным клиническим результатом» в ту или иную подгруппу итоговые результаты также не различались. По данным инструментальных методов исследования (ДБХ, tcpO₂, лодыжечное давление, ангиография), в группах МСК и плацебо различий не было. *Заключение.* При разных вариантах анализа и формирования групп не получено убедительных данных, что аллогенные МСК могут быть эффективны для лечения критической ишемии нижних конечностей.

Ключевые слова: критическая ишемия конечности, аллогенные мезенхимные стромальные клетки, клеточная терапия

Для цитирования: Вавилов В. Н., Зарицкий А. Ю., Полынцев Д. Г., Курьянов П. С., Крутиков А. Н., Зенкова Е. А., Ширитова Ф. З. Эффективность мезенхимных стромальных клеток при лечении больных с критической ишемией нижних конечностей. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2021;20(1):41–49. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-41-49.

V. N. VAVILOV¹, A. Yu. ZARITSKEY⁴, D. G. POLYNTSEV³,
P. S. KURIANOV², A. N. KRUTIKOV⁴, H. A. ZENKOVA³,
F. Z. SHIRITOVA¹

Efficiency of mesenchymal stromal cells (MSCs) in the treatment of patients with critical limb-threatening ischemia

¹ Pavlov University, Saint Petersburg, Russia

6-8, L'va Tolstogo street, Saint Petersburg, Russia, 197022

² Saint Petersburg State hospital № 14, Saint Petersburg, Russia

19/9, Kosinova str., Saint Petersburg, Russia, 198099

³ Stem cells bank «Trans-Tachnologies», Saint Petersburg, Russia

40, Geleznodorozhny pr., Saint Petersburg, Russia

⁴ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

2, Akkuratova str., Saint Petersburg, Russia, 197341

E-mail: vnvavilov@yandex.ru

Received 12.11.20; accepted 29.01.21

Summary

Relevance. The relevance of the study is determined by the fact that hopes are placed in the cell therapy for patients with critical limb-threatening (CLI) ischemia as a method of the restoration of blood circulation in the affected limb in patients who cannot undergo surgical or endovascular intervention. **Aim.** To evaluate the efficiency of allogeneic MSCs for the treatment of critical lower limb ischemia (randomized placebo-controlled study). **Materials and methods.** The study included 34 patients with critical lower limb ischemia (grade 4 according to Pokrovsky). There were 18 patients in the MSC group, and 16 patients in the placebo group. The groups were comparable concerning age, disease duration, and comorbidities. Allogeneic MSCs (phenotype CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD45⁻, CD34⁻, CD14⁻) were injected into the posterior calf muscles. Clinical outcome, ankle pressure, transcutaneous oxygen tension (tcpO₂), and pain-free walking distance (PFWD) were evaluated. The patients were followed-up for 12–36 months. According to the clinical outcome in each group, the patients were divided into subgroups with «effect (+)» or «effect (–)». In 2 patients, there was an «uncertain clinical outcome». When analyzing the results, these patients were assigned to one or another subgroup. **Results.** In the MSC and placebo groups, the clinical outcome assessed as «effect (+)» or «effect (–)» did not differ (OR 1.5; 95 % CI 0.34–6.7). With different variants of group formation and with the assignment of patients with an «uncertain clinical outcome» to a one or another subgroup, the final results neither differed. According to instrumental research methods (PFWD, tcpO₂, ankle pressure, angiography), there were no differences in the MSC and placebo groups. **Conclusion.** With different variants of analysis and group formation, no convincing evidence that allogeneic MSCs can be effective for the treatment of critical lower limb ischemia have been obtained.

Keywords: critical limb ischemia, allogeneic mesenchymal stromal cells, cell therapy

For citation: Vavilov V. N., Zaritskey A. Yu., Polyntsev D. G., Kurianov P. S., Krutikov A. N., Zenkova H. A., Shiritova F. Z. Efficiency of mesenchymal stromal cells (MSCs) in the treatment of patients with critical limb-threatening ischemia. *Regional blood circulation and microcirculation*. 2021;20(1):41–49. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-41-49.

Введение

Использованию клеточной терапии для лечения больных, страдающих критической ишемией нижних конечностей (КИНК), посвящено большое число работ. С первых публикаций в 2002 г. [1] сейчас их насчитывается несколько сотен (включая описание отдельных клинических наблюдений). Если в первые 5–10 лет преобладали положительные отзывы и впечатления от обсуждаемого метода, то в последующие годы результаты клеточной терапии выглядели менее оптимистично. В большинстве исследований отмечали большую скорость заживления язв, уменьшение болей покоя, увеличение транскутанного напряжения кислорода. Однако по таким критическим показателям, как частота ампутаций (безампутационный интервал, безампутационная выживаемость), разницы в группах клеточной терапии и контрольной получено не было [2, 3].

В ранних исследованиях использовали преимущественно аутологичные моноклеарные клетки костного мозга и отсутствие значимого результата клеточной терапии связывали с их низкой секретор-

ной активностью, особенно у пациентов с сахарным диабетом, составляющих более половины реkrутируемых пациентов [4, 5].

Определенные надежды возлагали на использование других популяций клеток, в частности, мезенхимных стромальных клеток костного мозга (МСК) (Международное общество по клеточной и генной терапии (ISCT – International Society for Cell & Gene Therapy) рекомендует использовать не термин «мезенхимные стволовые клетки», а термин «мезенхимные стромальные клетки», добавляя их источник получения, при этом сохраняется акроним «МСК» [6]. Обоснованием таких надежд было то, что секретом МСК составляет около 40 биологически активных факторов, влияющих на репаративные, иммунные процессы в организме, в том числе и на ангио/артериогенез [7, 8]. Однако и при использовании МСК в лечении КИНК получены противоречивые результаты – как положительные [9–11], так и отсутствие эффекта по частоте ампутаций [12].

Кроме того, при анализе публикаций отмечается, что подавляющее большинство исследований по

Таблица 1

Характеристика включенных в исследование пациентов

Table 1

Baseline characteristics of the patients included in the study

Показатель	Гр. плацебо (n=16)	Гр. МСК (n=18)	p
Мужчины/женщины	1/15	3/15	ОШ 0,33 (ДИ 0,03–3,6)
Длительность КИК 1–6 месяцев	12	14	ОШ 0,86 (ДИ 0,2–4,2)
Длительность КИК 7–12 месяцев	3*	3*	ОШ 1,13 (ДИ 0,2–6,5)
Трофические изменения на стопе	6	9	ОШ 0,6 (ДИ 0,15–2,4)
ЛПИ	0,32±0,16	0,28±0,12	p=0,18
tсрО ₂ , мм рт. ст.	11,8±8,6	11,3±11,5	p=0,34
Дистанция безболевого ходьбы (ДБХ), м	35±13	57±22	p=0,08
ГБ	11	13	ОШ 0,85 (ДИ 0,2–3,7)
ИБС	8	10	ОШ 0,8 (ДИ 0,2–3,1)
ИБГМ	6	5	ОШ 1,44 (ДИ 0,3–6,2)

* – у 2 пациентов (по 1 в каждой группе) длительность КИК не удалось установить.

клеточной терапии при КИНК обладают «низким качеством доказательств» [13].

Нами в 2006–2010 гг. проведена работа, в которой были использованы аутологичные МСК при лечении больных, страдающих КИНК. В работе были получены положительные результаты клеточной терапии [14]. Однако исследование было не рандомизированным и не плацебоконтролируемым, что снижало степень доказательности. Учитывая это и противоречивость данных об эффективности МСК при КИНК, мы провели рандомизированное, плацебоконтролируемое исследование, результаты которого представлены в настоящей публикации.

Цель – оценка клинической эффективности использования аллогенных МСК костного мозга для лечения критической ишемии нижних конечностей.

Дизайн исследования: двойное слепое рандомизированное плацебоконтролируемое исследование. Рандомизация проводилась в Банке стволовых клеток ООО «Транс-Технологии» (лицензия № ЛО-78-01-009099 от 21.08.2018 г., выдана Комитетом по здравоохранению Санкт-Петербурга) методом генерации случайных чисел.

«Ослепление» в исследовании: в клинику материал для введения пациенту (МСК или плацебо) поступал из Банка стволовых клеток ООО «Транс-Технологии», врач и пациент не были информированы о составе вводимого материала.

Исследование было разрешено Этическим комитетом Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова (протокол № 185 от 30 мая 2016 г.), протокол исследования утвержден Ученым советом ПСПбГМУ им. И. П. Павлова. Больные были осведомлены о сути исследования и давали информированное согласие на участие в нем.

Материалы и методы исследования

В исследование включены 34 больных (30 мужчин, 4 женщины) в возрасте от 36 до 79 лет, страдавших КИНК (4 ст. по Покровскому, Rutherford III–IV). Все

пациенты жаловались на боли в покое, интенсивную перемежающуюся хромоту 15–20 м, у 15 человек имелись трофические изменения на стопе. Длительность заболевания колебалась от 1 до 20 лет, 24 перенесли открытые операции или эндоваскулярные вмешательства на сосудах конечности, 3 пациента – поясничную симпатэктомию, 7 пациентов ранее не оперированы.

У большинства больных, перенесших реконструктивную операцию, наступил тромбоз в зоне реконструкции (этих больных повторно не оперировали из-за отсутствия технических возможностей такого вмешательства или из-за отказа от него). Причины поражения сосудов нижних конечностей у 32 – атеросклероз, у 2 – аортоартериит.

Критериями невключения в исследование были наличие клинически значимой сопутствующей патологии (сахарный диабет, перенесенный инфаркт миокарда или ОНМК менее 1 года, почечная недостаточность, онкологическое заболевание анамнезе и др.), невозможность выполнения в полном объеме протокола исследования, аллергия к любому компоненту препаратов, используемых при трансплантации клеток или при инструментальных исследованиях.

Все больные обследованы физикально, выполнена ангиография конечностей, определен уровень лодыжечного давления, лодыжечно-плечевой индекс (ЛПИ), транскутанное напряжение кислорода голени и стоп на страдающей и «здоровой» ноге. По данным ангиографии, уровень поражения артерий конечности – ниже паховой связки.

В группе плацебо было 16 пациентов/конечностей, в группе МСК – 18 пациентов/конечностей.

Характеристика пациентов обеих групп приведена в табл. 1.

В качестве лечебного материала использованы аллогенные МСК, полученные у молодых здоровых доноров костного мозга. Получение, хранение, культивирование МСК проводили в Банке стволовых клеток ООО «ТрансТехнологии».

Фенотип МСК: CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD45⁻, CD34⁻, CD14⁻.

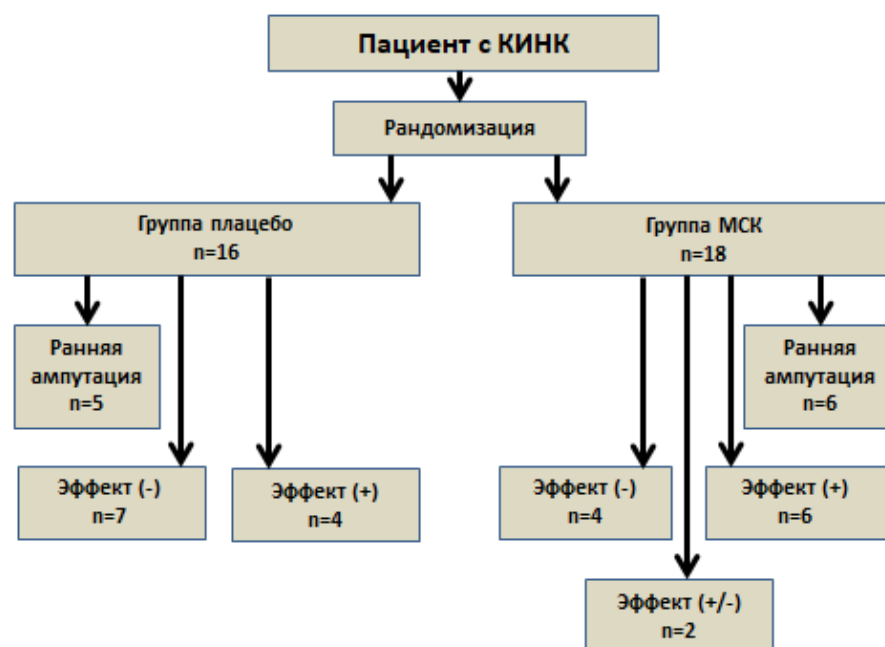


Рис. 1. Распределение групп исследованных пациентов

Fig. 1. Distribution of groups of the studied patients

В качестве плацебо использовали фосфатно-солевой буфер с добавлением жировой эмульсии для парентерального питания, чтобы по физическим свойствам (вязкость и цвет) плацебо-раствор был похож на раствор с клетками.

Полученный материал вводили в мышцы голени под местной анестезией S. Novokaini 0,5 % в 34 точки по задней поверхности голени, по 17 точек на одной и другой ее стороне. В каждую точку вводили по 1,5 мл материала (по 1,5 млн клеток – у пациентов опытной группы или раствора плацебо – у пациентов контрольной группы).

До введения МСК/плацебо и в течение последующего времени все пациенты получали дезагрегантную терапию, препараты, улучшающие реологию крови, и средства, нормализующие тканевой метаболизм (Трентал, Сулодексид, Актовегин).

Контрольные визиты – каждые 3 месяца после введения МСК/плацебо.

Оценивали клиническую симптоматику, лодыжечное давление/ЛПИ, транскутанное напряжение кислорода (tcpO_2) в коже дистальных отделов нижних конечностей. Некоторым больным проведена повторная ангиография сосудов конечностей.

Максимальный срок наблюдения за больными – до 2,5 года. Большое внимание уделяли клинической оценке эффективности проводимого лечения: сохранению или нарастанию, уменьшению или исчезновению болей в покое, увеличению или уменьшению, постепенному исчезновению трофических изменений на стопе, изменению дистанции безболевого ходьбы. Регистрировали сохранение или потерю конечности.

По клиническому течению ишемии нижних конечностей выделено 2 варианта: отсутствие лечебного эффекта и положительный лечебный эффект.

К *первому* (отсутствие лечебного эффекта – «эффект (-)») отнесены больные, у которых после введения

МСК/плацебо ишемия конечности прогрессировала или признаки ее уменьшения отсутствовали. При этом у части пациентов боли становились интенсивнее, нарастали трофические изменения, и конечность приходилось ампутировать. При анализе результатов выделены больные, которым ампутацию конечности выполняли в течение первых 3 месяцев от момента инъекций. У других больных с отрицательным клиническим эффектом тяжесть ишемии долгое время (не менее 10–12 месяцев) оставалось приблизительно на одном уровне с исходной. У части этих пациентов, с длительным отсутствием лечебного эффекта, исходом была ампутация конечности или попытка, иногда успешная, реваскуляризирующего вмешательства.

Ко *второму* (положительный лечебный эффект – «эффект (+)») отнесены больные, у которых после инъекции МСК постепенно уменьшалась, а затем исчезала критическая ишемия конечности. У них уменьшалась интенсивность болей в покое, а затем они проходили вовсе, переставали беспокоить ночные боли, постепенно увеличивалась ДБХ, улучшалась трофика тканей стопы, заживали трофические язвы или раны на месте ампутированных пальцев стопы и т. п. У всех этих больных сохранены пораженные нижние конечности.

Кроме традиционного представления результатов суммарно по группам, итоги лечения сравнивали также после исключения из обеих групп больных, перенесших ампутацию конечности в первые 3 месяца после введения МСК/плацебо. Помимо этого, рассматривали ситуацию, при которой пациентов с неопределенными клиническими результатами воздействия относили к положительным или отрицательным исходам.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы «Excel» и online-калькулятора (<https://medstatistic.ru/calculators/calccodds.html>). Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Таблица 2

Клинические результаты исследования (общие данные)

Table 2

Clinical outcome of the studied patients (general data)

	Плацебо (n=16)	МСК (n=18)	ОШ (ДИ)
Вариант 1 формирования подгрупп (2 пациента с неопределенным клиническим результатом из группы МСК отнесены в подгруппу с отрицательным исходом)			
Эффект (-), n (%)	12 (75 %)	12 (66 %)	ОШ 1,5 (ДИ 0,34–6,7)
Эффект (+), n (%)	4 (25 %)	6 (34 %)	
Вариант 2 формирования подгрупп (2 пациента с неопределенным клиническим результатом из группы МСК отнесены в подгруппу с положительным исходом)			
Эффект (-), n (%)	12 (75 %)	10 (66 %)	ОШ 2,4 (ДИ 0,56–10,4)
Эффект (+), n (%)	4 (25 %)	8 (34 %)	

Примечание: здесь и далее ОШ – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал.

Таблица 3

Клинические результаты исследования (исключены пациенты, которым выполнены ранние ампутации конечности)

Table 3

Clinical outcome of the studied patients (excluded patients with early amputations)

	Плацебо, n=11 (16-5)	МСК, n=12 (18-6)	ОШ (ДИ)
Вариант 1 формирования подгрупп (2 пациента с неопределенным клиническим результатом отнесены в подгруппу с отрицательным исходом)			
Эффект (-)	7 (64%)	6 (50%)	ОШ 1,75 (ДИ 0,33-9,3)
Эффект (+)	4 (36%)	6 (50%)	
Вариант 2 формирования подгрупп (2 пациента с неопределенным клиническим результатом отнесены в подгруппу с положительным исходом)			
Эффект (-)	7 (64%)	4 (34%)	ОШ 3,5 (ДИ 0,63-19,5)
Эффект (+)	4 (36%)	8 (66%)	

Результаты исследования и их обсуждение

Прежде всего, необходимо указать, что ни у одного больного после введения МСК в мышцы голени не было негативных общих и местных проявлений, т. е. введение аллогенных МСК в данной ограниченной выборке было безопасным.

Ранние ампутации (до 3 месяцев после введения материала): в группе плацебо ампутировано 5 конечностей, в группе МСК – 6.

В группе плацебо в сроки от 12 месяцев до 2,5 года после проведения процедуры постепенное улучшение состояния конечности и ее сохранение имели место у 4 человек. У 12 зафиксирован отрицательный результат. Из них у 5 из-за быстрого прогрессирования ишемии в течение первых 3 месяцев после введения материала проведены ампутации конечностей. У 7 человек сохранялись боли в покое и трофические изменения (если имелись исходно), также не было динамики ДБХ. В дальнейшем у них выполнена либо ампутация конечности, либо попытка реваскуляризации, иногда успешная.

В группе МСК в сроки от 12 месяцев до 2,5 года улучшение состояния конечности, и ее сохранение отмечено в 6 наблюдениях, в 12 – отрицательный

результат. Из них у 6 из-за быстрого прогрессирования ишемии в течение первых 3 месяцев после введения МСК выполнена ампутация конечности. У остальных 6 через 10–20 месяцев после введения МСК проведены либо поздние ампутации (2 больных) либо попытки реваскуляризации конечности (3 пациента), 1 больная продолжает лечиться консервативно. У этой пациентки уже около 2 лет сохраняются боли в покое, интенсивная перемежающаяся хромота, не увеличиваются трофические изменения на пальцах стопы.

У 2 пациентов из группы МСК отмечен «неопределенный клинический эффект». В 1 наблюдении у мужчины 65 лет, страдавшего КИНК (при ангиографии – окклюзия поверхностной бедренной артерии в сочетании с сегментарным поражением артерий голени), после введения клеточного материала наблюдали положительный клинический эффект: исчезновение болей в покое, ДБХ достигла 200 м, наступило заживление трофической язвы стопы. Но через 1 год 3 месяца после введения МСК у пациента возникло тяжелое ОНМК, сопровождавшееся резким ухудшением кровообращения в «леченой» конечности, что потребовало ее ампутации. У другой 55-летней

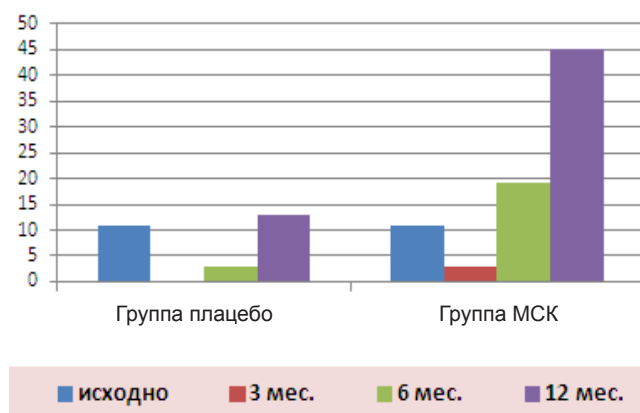


Рис. 2. Динамика транскутанного напряжения кислорода
Fig. 2. Transcutaneous oxygen pressure during the follow-up period

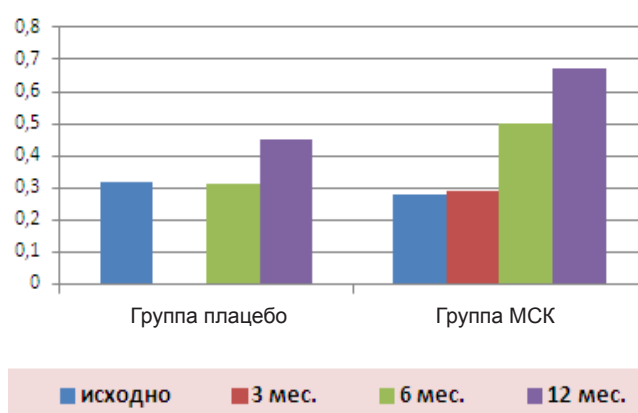


Рис. 3. Динамика лодыжечно-плечевого индекса
Fig. 3. Ankle-brachial index during the follow-up period

больной, страдающей атеросклерозом в комбинации с артериитом, в связи с КИНК правой ноги на фоне уже стентированной ранее подвздошной артерии, после введения МСК, отмечен положительный клинический эффект. Через 8 месяцев от начала лечения, из-за обострения ревматоидного артрита начала получать цитостатики, что спровоцировало тромбоз стента в правой подвздошной артерии и острую ишемию правой конечности. Острые артериальные тромбозы при введении цитостатиков описаны в литературе [15, 16]. Через 2 месяца после этого пациентке выполнено перекрестное подвздошно-бедренное шунтирование слева направо.

Клинические результаты лечения пациентов с КИНК приведены в табл. 2 (общие данные), в табл. 3 исключены пациенты, которым выполнены ранние ампутации конечности.

При общепринятом варианте формирования подгрупп (табл. 2, вариант 1) достоверной разницы по интегральному клиническому эффекту МСК получено не было.

При исключении из групп плацебо и МСК пациентов, которым выполнены ранние ампутации конечности, также достоверной разницы в клиническом эффекте получено не было.

При отнесении пациентов с «неопределенным клиническим результатом» в подгруппу «эффект (+)» отмечается тенденция к положительному клиническому эффекту в группе МСК (отношение шансов – 2,4 и 3,5), однако достоверных различий между группами также не получено (малое число наблюдений).

Данные инструментальных исследований приведены на рис. 2–4.

Различия исходных параметров и через 1 год наблюдения недостоверны, однако отмечается тенденция к увеличению ЛПИ и tcPO_2 в группе МСК.

Различий по ДБХ в группах не было.

При повторных ангиографических исследованиях у пациентов не выявлено увеличения коллатеральной сосудистой сети.

Прежде чем последовательно обсудить результаты исследования, необходимо остановиться на том, почему столь большое внимание было уделено клинической стороне исследования. Связано это с тем, что клинические особенности развития критической

ишемии у обсуждаемых больных есть фактически интегральный показатель течения дел (нарастание/исчезновение болей в покое, изменение в ту или иную сторону ДБХ, состояние трофических изменений, сохранение или вынужденная ампутация конечности), позволяющий наиболее убедительно оценить эффективность проводимой терапии и имеющий в этом отношении решающее значение [17].

Кроме того, в предыдущем нашем исследовании [14] было показано, что эффект клеточной терапии с использованием аутологичных МСК начинал проявляться, прежде всего, клинически (снижалась интенсивность болей в ноге, пациенты реже опускали ее в ночное время, несколько увеличивалась ДБХ, ярче становились грануляции в зоне трофических изменений и т. д.). Постепенно признаки улучшения становились более очевидными и устойчивыми. Никогда этому не предшествовали убедительно зафиксированные рост лодыжечного давления и повышение tcPO_2 в тканях. Последнее обнаруживали только на фоне очевидного, может быть и умеренного, но клинического улучшения. Эти первые признаки эффективности проводимого с помощью МСК лечения возникали не ранее, чем через 3 месяца от момента введения клеток в мышцу.

Следует отметить, что в эти же первые 3 месяца у другой части больных наблюдали, напротив, клиническое прогрессирование ишемии конечности, включая нарастание трофических изменений, если таковые имелись, что и вело к необходимости ампутации. Описанное имело место и в настоящем исследовании. Это позволяет считать, что агрессивное течение ишемии, которое ведет к ранней ампутации конечности, связано, скорее всего, с тем, что предпринятое лечение было начато поздно и механизмы компенсации кровообращения не успевали включиться или их реализация была уже невозможна – возникшие ишемические изменения носили необратимый характер. Это и стало причиной того, что при сравнении результатов воздействия плацебо или МСК проводили анализ эффективности исследуемого метода лечения как в общих группах больных (плацебо – 16 и МСК – 18), так и после исключения пациентов с ранними ампутациями. Близкая частота ранних ампутаций в обеих группах (плацебо – 5 (31 %), МСК – 6

(33 %) свидетельствует об их сопоставимости. Они были сопоставимы также по частоте сопутствующих заболеваний, длительности КИНК и частоте трофических изменений конечности.

Выделение больных «с неопределенным клиническим эффектом» отражает реальную клиническую практику и позволяет рассмотреть ситуацию всесторонне. Вариант сравнения исходов воздействия плацебо и МСК, в случае, когда 2 пациента с «неопределенным клиническим эффектом» отнесены к успешным или отрицательным, нам кажется, заслуживает внимания, так как делает анализ более точным.

Несколько подходов при формировании подгрупп и, соответственно, вариантов представления результатов не привели к обнаружению достоверной разницы между плацебо и МСК. Возможно, это объясняется малым числом наблюдений в подгруппах после исключения пациентов с ранними ампутациями.

Инструментальные показатели исходно и при динамическом наблюдении отличались большим разбросом значений, что также не позволяет получить достоверную разницу в исследуемых группах.

Полученные данные согласуются с данными других исследований, в большей части которых отмечали тенденцию к снижению частоты ампутаций конечности, однако в метаанализах подчеркивается большой разброс результатов и низкое качество доказательств [18].

Этому даются разные объяснения: ссылаются на большую разнородность больных, неадекватность их отбора, влияние на результат наличия или отсутствия у больных сахарного диабета, неполное соответствие контрольной и леченой групп по характеру и объему поражения сосудов, длительности предшествующей ишемии, виду проводимого до начала клеточного лечения и т. д.

Каждый метаанализ заканчивается рекомендацией еще и еще раз исследовать эффективность клеточной терапии при лечении КИНК [13]. И в этой связи следует остановиться на механизмах, объясняющих положительное влияние МСК при лечении обсуждаемых больных.

Надо отметить, что точка зрения на эти механизмы, судя по данным литературы, не меняется на протяжении последних 25–30 лет. Согласно данным, полученным в исследованиях на животных, МСК, попадая с мягкие ткани конечности, погибают в течение нескольких недель в результате апоптоза [19, 20].

Но за это время введенные клетки выделяют цитокины («паракринная гипотеза» эффектов клеточной терапии), которые могут стимулировать разрастание капилляров (ангиогенез) и/или артериогенез – увеличение диаметра уже имеющихся коллатералей [21]. Это приводит, в конце концов, к увеличению количества крови, притекающей к ишемизированным тканям, и регионального давления крови до уровня, при котором тканевой обмен может быть вполне адекватным. Следует отметить, что только увеличение числа капилляров (ангиогенез без артериогенеза) не может улучшить кровообращение в страдающих от ишемии тканях [22].

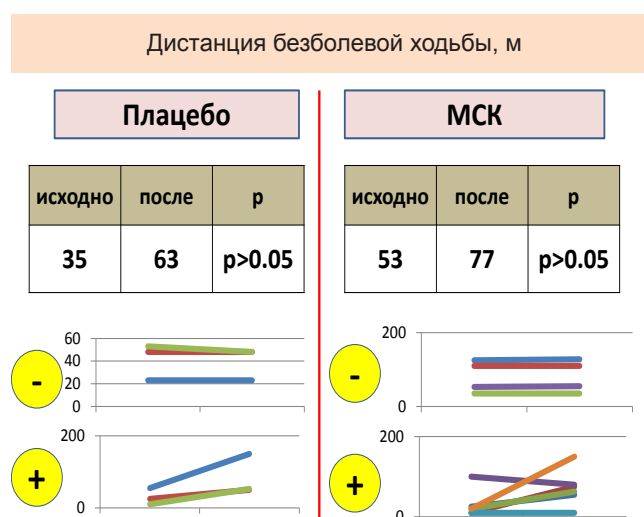


Рис. 4. Динамика дистанции безболевого ходьбы

Fig. 4. Pain-free walking distance during the follow-up period

Дело в том, что в ситуации критической ишемии всегда имеет место очень малое, на грани допустимого, количество поступающей к ткани крови. Если предположить, что МСК увеличит число капилляров, то невозможно представить, что это приведет к увеличению объема поступающей крови, ибо перфузионное давление, под которым поступает кровь к тканям, при этом не увеличивается, а региональное периферическое давление при ишемии, тем более критической, как известно, низкое и далее снижаться не может. Остается, таким образом, наиболее реальное положение о том, что, в первую очередь, эффективность обсуждаемого лечения в случае успеха определяется артериогенезом или увеличением числа обходных путей. Зарегистрировать артериогенез в этом случае в клинике является довольно трудной задачей. Ряд авторов видели и демонстрировали увеличение диаметра малых артериальных сосудов, другие это не отмечали [23, 24].

В тех наблюдениях, где ангиография выполнялась до и после введения МСК, мы ни разу не выявили какой-либо динамики со стороны сосудистого русла. Правда, считается, что для точного суждения об этом необходимо специально поставленное исследование. Но, так или иначе, другого объяснения эффекта от введения МСК у обсуждаемых больных, кроме артериогенеза, едва ли можно предположить.

Как же в свете уже представленного можно объяснить сегодня результаты лечения КИНК с использованием МСК? Кажется, правильнее всего обратить внимание на особенности течения тяжелой ишемии нижних конечностей, известные из ежедневной практики. В частности, при агрессивном течении ишемии исходом является непременно ампутация конечности, как правило, не позже, чем в первые 3 месяца (естественно, это наблюдения, где оперативное лечение в силу разных причин невозможно или оно было безуспешным). Кроме того, среди больных с КИНК есть относительно небольшая часть пациентов, у которых долго, иногда годами, проводя только консервативное лечение, удастся не только сохранить конечность, но и добиться, в конце концов, исчезновения

боли в покое, заживления трофических изменений, увеличение ДБХ. У этих больных, по-видимому, заболевание следует рассматривать как пролонгированный вариант КИНК. На это обращает внимание группа авторов из Нидерландов [25]. Об этом фактически говорят результаты большинства рандомизированных слепых исследований по использованию клеточной терапии при лечении КИНК: в группах плацебо почти всегда есть то или иное число пациентов, у которых конечный результат – сохранение конечности – не хуже, чем в группе клеточной терапии. По-видимому, из-за этих двух вариантов течения ишемии конечности у пациентов получить достоверные различия чаще всего и не удастся.

По-видимому, клеточная терапия с использованием МСК (использование моноклеаров костного мозга или периферической крови менее оправдано), способствуя ангиогенезу, может быть эффективна только у больных, где тяжелая ишемия протекает относительно медленно. Причины, по которым ишемия течет агрессивно или сравнительно пролонгировано, пока не ясны.

Перспективы. В Международных рекомендациях 2019 г. по лечению пациентов с критической ишемией конечностей [26] указано, что до настоящего времени не получены убедительные доказательства положительного влияния клеточной терапии на течение КИНК, и такой вид терапии может проводиться только в рамках научного исследования.

При дальнейшем исследовании эффективности МСК и других популяций клеток у обсуждаемых больных, по-видимому, целесообразны повторные введения клеточного материала, а также комплексность воздействия при консервативном лечении КИНК, включающем в себя, кроме фармакотерапии, также лечебные процедуры, способствующие ангиогенезу, – контролируемую физическую нагрузку (вызывает рабочую гиперемию) и периодическую пневматическую компрессию (вызывает реактивную гиперемию). Необходим тщательный анализ клинико-инструментальных данных с целью выделения пациентов, у которых клеточная терапия может быть эффективной (респондеры vs нереспондеры), соответственно, при проведении исследований более строгое выделение групп пациентов и модификация критериев включения.

Выводы

1. При введении аллогенных МСК в исследуемой группе пациентов не было побочных реакций: по-видимому, их использование безопасно.

2. Не получено достоверных доказательств эффективности МСК для лечения пациентов с КИНК.

3. Среди больных с КИНК следует выделить группу пациентов, у которых выраженность ишемии существенно не прогрессирует в течение 1–2 лет.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Литература / References

1. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360(9331):427–435. Doi: 10.1016/S0140-6736(02)09670-8.
2. Abdul Wahid SF, Ismail NA, Wan Jamaludin WF, Muhammad NA, Abdul Hamid MKA, Harunarashid H, Lai NM. Autologous cells derived from different sources and administered using different regimens for 'no-option' critical lower limb ischaemia patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;8(8):CD010747. Doi: 10.1002/14651858.CD010747.pub2.
3. Peeters Weem SM, Teraa M, de Borst GJ, Verhaar MC, Moll FL. Bone Marrow derived Cell Therapy in Critical Limb Ischemia: A Meta-analysis of Randomized Placebo Controlled Trials. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2015;50(6):775–783. Doi: 10.1016/j.ejvs.2015.08.018.
4. Heeschen C, Lehmann R, Honold J, et al. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation*. 2004;109(13):1615–1622. Doi: 10.1161/01.CIR.0000124476.32871.E3.
5. Spinetti G, Cordella D, Fortunato O et al. Global remodeling of the vascular stem cell niche in bone marrow of diabetic patients: implication of the microRNA-155/FOXO3a signaling pathway. *Circ Res*. 2013;112(3):510–522. Doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300598.
6. Viswanathan S, Shi Y, Galipeau J et al. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy*. 2019;21(10):1019–1024.
7. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006;98(5):1076–1084. Doi: 10.1002/jcb.20886.
8. Caseiro AR, Santos Pedrosa S, Ivanova G et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cells metabolomic and bioactive factors profiles: A comparative analysis on the umbilical cord and dental pulp derived Stem/Stromal Cells secretome. *PLoS One*. 2019;14(11):e0221378. Doi: 10.1371/journal.pone.0221378.
9. Powell RJ, Comerota AJ, Berceli SA et al. Interim analysis results from the RESTORE-CLI, a randomized, double-blind multicenter phase II trial comparing expanded autologous bone marrow-derived tissue repair cells and placebo in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg*. 2011;54(4):1032–1041. Doi: 10.1016/j.jvs.2011.04.006.
10. Lu D, Jiang Y, Deng W, et al. Long-Term Outcomes of BMMSC Compared with BMMNC for Treatment of Critical Limb Ischemia and Foot Ulcer in Patients with Diabetes. *Cell Transplant*. 2019;28(5):645–652. Doi: 10.1177/0963689719835177.
11. Gupta PK, Krishna M, Chullikana A et al. Administration of Adult Human Bone Marrow-Derived, Cultured, Pooled, Allogeneic Mesenchymal Stromal Cells in Critical Limb Ischemia Due to Buerger's Disease: Phase II Study Report Suggests Clinical Efficacy. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(3):689–699. Doi: 10.5966/sctm.2016-0237.
12. Gupta PK, Chullikana A, Parakh R et al. A double blind randomized placebo controlled phase I/II study assessing the safety and efficacy of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stem cell in critical limb ischemia. *J Transl Med*. 2013;(11):143. Published 2013 Jun 10. Doi: 10.1186/1479-5876-11-143.
13. Gao W, Chen D, Liu G, Ran X. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):140. Doi: 10.1186/s13287-019-1254-5.

14. Седов В. М., Вавилов В. Н., Зарицкий А. Ю. и др. Эффективность клеточной терапии у больных с критической ишемией нижних конечностей // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2011. – Т. 10, № 2. – С. 45–52. [Sedov VM, Vavilov VN, Zaritskiy AY et al. *Effektivnost' kletочноj terapii u bol'nyh s kriticheskoj ishemiej nizhnih konechnostej. Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrocirkulyaciya.* 2011;10(2):45–52. (In Russ.)].
15. Molloy RG, Welch GC, Drury JK, Abel BJ. Arterial thrombosis after chemotherapy with cisplatin, vinblastine and methotrexate. *Br J Clin Pract.* 1995;49(1):50–51.
16. Türk SM, Cansu DÜ, Teke HÜ, et al. Can we predict thrombotic tendency in rheumatoid arthritis? A thromboelastographic analysis (with ROTEM). *Clin Rheumatol.* 2018;37(9):2341–2349. Doi: 10.1007/s10067-018-4134-y.
17. Лебедев С. В., Карасев А. В., Кунгурцев В. В. и др. Клеточная терапия критической ишемии нижних конечностей (проблемы и перспективы) // Вест. Росс. академ. медиц. наук. – 2013. – Т. 68, № 3. – С. 33–44. [Lebedev SV, Karasev AV, Kungurcev VV et al. *Kletочnaya terapiya kriticheskoj ishemii nizhnih konechnostej (problemy i perspektivy).* Vest. Ross. akadem. medic. nauk. 2013;68(3):33–44. (In Russ.)].
18. Abdul Wahid SF, Ismail NA, Wan Jamaludin WF, Muhammad NA, Abdul Hamid MKA, Harunarashid H, Lai NM. Autologous cells derived from different sources and administered using different regimens for 'no-option' critical lower limb ischaemia patients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018;8(8):CD010747. Doi: 10.1002/14651858.CD010747.pub2.
19. Westrich J, Yeager P, He C, et al. Factors affecting residence time of mesenchymal stromal cells (MSC) injected into the myocardium. *Cell Transplant.* 2010;19(8):937–948. Doi: 10.3727/096368910X494911.
20. Li Y, Liu W, Liu F, et al. Primed 3D injectable microchips enabling low-dosage cell therapy for critical limb ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(37):13511–13516. Doi: 10.1073/pnas.1411295111.
21. Al-Rifai R, Nguyen P, Bouland N et al. In vivo efficacy of endothelial growth medium stimulated mesenchymal stem cells derived from patients with critical limb ischemia. *J Transl Med.* 2019;17(1):261. Doi: 10.1186/s12967-019-2003-3).
22. Korpisalo P, Hytönen JP, Laitinen JT et al. Capillary enlargement, not sprouting angiogenesis, determines beneficial therapeutic effects and side effects of angiogenic gene therapy. *Eur Heart J.* 2011;32(13):1664–1672. Doi: 10.1093/eurheartj/ehq433.
23. Lee HC, An SG, Lee HW, et al. Safety and effect of adipose tissue-derived stem cell implantation in patients with critical limb ischemia: a pilot study. *Circ J.* 2012;76(7):1750–1760. Doi: 10.1253/circj.cj-11-1135.
24. Yang SS, Kim NR, Park KB, et al. A phase I study of human cord blood-derived mesenchymal stem cell therapy in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Int J Stem Cells.* 2013;6(1):37–44. Doi: 10.15283/ijsc.2013.6.1.37.
25. Santema TB, Stoekenbroek RM, van Loon J, Koelemay MJ, Ubbink DT. Not All Patients with Critical Limb Ischaemia Require Revascularisation. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2017 Mar;53(3):371–379.
26. Conte MS, Bradbury AW, Kolh P, et al. Global Vascular Guidelines on the Management of Chronic Limb-Threatening Ischemia [published correction appears in *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2020 Mar;59(3):492–493] [published correction appears in *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2020 Jul;60(1):158–159]. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2019;58(1S):S1–S109.e33. Doi: 10.1016/j.ejvs.2019.05.006

Информация об авторах

Вавилов Валерий Николаевич – д-р мед. наук, профессор кафедры факультетской хирургии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: vnvavilov@yandex.ru.

Зарицкий Андрей Юрьевич – д-р мед. наук, профессор, директор Института онкологии и гематологии, главный научный сотрудник лаборатории онкогематологии, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия, ORCID: 0000-0001-7682-440X, e-mail: zaritskey@gmail.com.

Полынцева Дмитрий Генрихович – канд. мед. наук, президент группы компаний «Алкор Био», Санкт-Петербург, Россия, ORCID: 0000-0002-0130-7739, e-mail: info@alkorbio.ru.

Курьянов Павел Сергеевич – канд. мед. наук, врач отделения сосудистой хирургии больницы № 14, Санкт-Петербург, Россия, ORCID: 0000-0001-5844-2547, e-mail: pkurjanov@gmail.com.

Крутиков Александр Николаевич – канд. мед. наук, внештатный научный сотрудник НИО инфильтративных заболеваний сердца, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия, ORCID: 0000-0001-6897-6171, e-mail: ankrutikov@yandex.ru.

Зенкова Елена Анатольевна – директор Банка стволовых клеток «Транс-Технологии», Санкт-Петербург, Россия, ORCID: 0000-0003-2810-543X, e-mail: ezenkova@alkorbio.ru.

Ширитова Фатима Зауровна – врач отделения сосудистой хирургии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: zaurovnafatima@gmail.com.

Information about authors

Vavilov Valery N. – MD, PhD, professor of the Department of faculty surgery, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, e-mail: vnvavilov@yandex.ru.

Zaritskey Andrey Yu. – MD, PhD, director of the Institute of Hematology, Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia, ORCID: 0000-0001-7682-440X, e-mail: zaritskey@gmail.com.

Polyntsev Dmitry G. – PhD, President of the AlkorBio Group, Saint Petersburg, Russia, ORCID: 0000-0002-0130-7739, e-mail: info@alkorbio.ru.

Kurianov Pavel S. – MD, PhD, Saint Petersburg State hospital № 14, Saint Petersburg, Russia, ORCID: 0000-0001-5844-2547, e-mail: pkurjanov@gmail.com.

Krutikov Alexander N. – PhD, leading researcher of the research Department of infiltrative heart disease, Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia, ORCID: 0000-0001-6897-6171, e-mail: ankrutikov@yandex.ru.

Zenkova Helena A. – director of the stem cells bank «Trans-Techologies», Saint Petersburg, Russia, ORCID: 0000-0003-2810-543X, e-mail: ezenkova@alkorbio.ru.

Shiritova Fatima Z. – MD, Department of faculty surgery, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, e-mail: zaurovnafatima@gmail.com.

УДК 616.833.24-008.6

DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-50-61

В. В. АНДРЕЕВ^{1–3}, С. В. ЗЕВАХИН¹, Е. Р. БАРАНЦЕВИЧ¹,
А. И. СЫЧЕВ¹, Н. Н. ПЕТРИЩЕВ¹

Эффективность применения лазеротерапии для лечения пояснично-крестцовых радикулоишемий

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт онкологии
имени Н. Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия
197758, Россия, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68

³ Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения
«Городская многопрофильная больница № 2», Санкт-Петербург, Россия
194354, Россия, Санкт-Петербург, Учебный пер., д. 5
E-mail: nevro-fpo@mail.ru

Статья поступила в редакцию 17.06.20; принята к печати 25.12.20

Резюме

Введение. Проведенное исследование посвящено оценке эффективности лазеротерапии при лечении спондилогенных радикулоишемий. Применялась низкоинтенсивная лазеротерапия и технология вapoризации. **Цель** – улучшить лечение и исходы у больных при компримировании спинномозговых корешков при грыжах межпозвонковых дисков с использованием различных методов лазеротерапии. **Материалы и методы.** В двух группах проанализированы результаты лечения 225 больных с клиническими проявлениями спондилогенных пояснично-крестцовых радикулоишемий по методикам лазеротерапии. В 115 наблюдениях (группа 1) выполнено лазерное лечение по методике пункционной поликанальной лазерной декомпрессии диска. У 110 пациентов (группа 2) применяли чрезкожную низкоинтенсивную лазеротерапию. Регистрировали динамику клинико-неврологических проявлений заболевания: сроки уменьшения болевого синдрома, динамику двигательных и чувствительных нарушений соответствующего корешка, изменение параметров по опроснику Роланда – Морриса и Освестри. **Результаты.** В обеих группах получено улучшение клинико-неврологических проявлений: уменьшается интенсивность болевого синдрома по визуально-аналоговой шкале более чем у 70 % наблюдаемых. Выявлено значимое улучшение параметров жизнедеятельности по шкалам с длительно сохраняющимся эффектом (более 12 месяцев) с улучшением кровоснабжения спинномозговых корешков. **Заключение.** Лазерное излучение обладает значительной клинической эффективностью, важными параметрами являются длина волны и мощность излучения. Достигается структурно-модифицирующее действие, улучшение микроциркуляции (артериального и венозного русла). Оценка эффективности пункционной поликанальной лазерной декомпрессии целесообразна с использованием шкал и опросников. Чрезкожная низкоинтенсивная лазеротерапия и моноканальная внутритканевая лазеротерапия обеспечивают направленное противоотечное и нейропротекторное действие с возможностью дозирования и контроля. Проводимое лечение высокоэффективно и улучшает прогноз заболевания.

Ключевые слова: пояснично-крестцовая дорсопатия, радикулоишемия, болевой синдром, лазерная вapoризация межпозвонковых дисков, низкоинтенсивная лазеротерапия, микроциркуляция

Для цитирования: Андреев В. В., Зевахин С. В., Баранцевич Е. Р., Сычев А. И., Петрищев Н. Н. Эффективность применения лазеротерапии для лечения пояснично-крестцовых радикулоишемий. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2021;20(1):50–61. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-50-61.

UDC 616.833.24-008.6

DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-50-61

V. V. ANDREEV^{1–3}, S. V. ZEVAKHIN¹, E. R. BARANTSEVICH¹,
A. I. SYCHOV¹, N. N. PETRISHEV¹

Effectiveness of laser therapy for the treatment of lumbosacral radiculosischemias

¹ Pavlov University, Saint Petersburg, Russia
6-8, L'va Tolstogo street, Saint Petersburg, Russia, 197022

² N. N. Petrov Institute of Oncology, Saint Petersburg, Russia
70, Leningradskaia str., Pesochny, Saint Petersburg, Russia, 197758

³ City Multidisciplinary Hospital No 2, Saint Petersburg, Russia
5, Uchebny per., Saint Petersburg, Russia, 194354
E-mail: nevro-fpo@mail.ru

Received 17.06.20; accepted 25.12.20

Summary

Introduction. The study was devoted to assessing the effectiveness of laser therapy in the treatment of spondylogenic radiculosischemias. Low-intensity laser therapy and vaporization technology were used. **Aim** – to improve treatment and outcomes in

patients with compression of the spinal roots in herniated intervertebral discs using various methods of laser therapy. *Materials and methods.* In two groups, the results of treatment of 225 patients with clinical manifestations of spondylogenic lumbosacral radiculopathies were analyzed using laser therapy techniques. In 115 cases (group 1), laser treatment was performed using the method of puncture polychannel laser disk decompression. In 110 patients (group 2), low-intensity percutaneous laser therapy was used. The dynamics of the clinical and neurological manifestations of the disease was recorded: the time of pain syndrome reduction, the dynamics of motor and sensory disorders of the corresponding root, changes in parameters according to the Roland-Morris and Oswestry Disability questionnaire. *Results.* In both groups, an improvement in clinical and neurological manifestations was obtained: the intensity of pain syndrome according to VAS decreased in more than 70 % of the observed individuals. A significant improvement in the parameters of vital activity was revealed according to scales with a long-lasting effect (more than 12 months) with an improvement in the blood supply to the spinal roots. *Conclusion.* Laser radiation has significant clinical effectiveness; the important parameters are the wavelength and rate of the radiation. Structural-modifying action and improvement of microcirculation (of arterial and venous bed) are achieved. Evaluation of the effectiveness of polychannel laser puncture decompression is advisable using scales and questionnaires. Low-intensity percutaneous laser therapy and monochannel interstitial laser therapy provide a targeted antiedemic and neuroprotective effect with the possibility of dosing and control. The treatment is highly effective and improves the prognosis of the disease.

Keywords: lumbosacral dorsopathy, radiculopathy, pain syndrome, laser vaporisation of intervertebral discs, low-intensity laser therapy, microcirculation

For citation: Andreev V. V., Zevakhin S. V., Barantsevich E. R., Syrov A. I., Petrishev N. N. Effectiveness of laser therapy for the treatment of lumbosacral radiculopathies. *Regional blood circulation and microcirculation.* 2021;20(1):50–61. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-50-61.

Введение

Неспецифическая боль в спине имеет распространенность у 80 % населения в возрасте 20–50 лет. Среди причин обращения к врачу эта патология является 2-й по частоте и уступает только респираторным заболеваниям, по частоте причин госпитализации находится на 3-м месте [1–3]. Также дорсопатии занимают 1–2-е место по инвалидизации взрослого населения вместе с патологией сердечно-сосудистой системы [4]. Важным является и то обстоятельство, что эта группа заболеваний является наиболее распространенной причиной снижения качества жизни [5–7]. Самым драматичным проявлением дорсопатий является возникновение грыжи диска с компримированием спинномозгового корешка. Основным механизмом патогенеза развития спондилогенных пояснично-крестцовых радикулопатий обусловлен стенозированием межпозвонкового отверстия. Повреждение межпозвонкового диска с формированием грыжи этой локализации является наиболее частой причиной возникновения корешкового синдрома. В большинстве случаев ограничение резервного пространства наблюдается при формировании грыжи межпозвонкового диска с латерализацией в направлении расположения спинномозгового корешка. Реже наблюдается выраженный дегенеративно-дистрофический процесс в пульпозном ядре и фиброзном кольце между смежными телами позвонков. Также могут иметь значение суставной синдром на уровне дегенеративно-дистрофического или обызвествления задней продольной связки. Независимо от причины возникновения происходит компримирование артерии, обеспечивающей кровоснабжение соответствующего спинномозгового корешка. Возникает радикулопатия с нарушением функции двигательной и чувствительной части волокон. Применение противовоспалительных, вазоактивных, вентонизирующих препаратов позволяет уменьшить острые боли и уменьшить до определенного предела сдавление аксонов и дендритов афферентных и эфферентных волокон, повреждение миелиновой оболочки. Нейротропные витамины способствуют восстановлению поврежденных осевых цилиндров и миелиновой оболочки

по неспецифическому механизму влияния. Методы использования преформированных физических факторов (лазеротерапии) изучены не до конца. С наибольшей эффективностью используются вапоризация межпозвонковых дисков и чрескожное облучение низкоинтенсивным диапазоном на уровне стенозирования межпозвонкового отверстия. Основные механизмы компримирования спинномозгового корешка показаны на рис. 1.

В первую очередь, происходит нарушение кровоснабжения спинномозгового корешка, соответствующего уровню стеноза межпозвонкового отверстия. Ухудшается венозный кровоток, возникает локальный застой, и страдает артериальный приток. Ключевые клиничко-неврологические изменения возникают вследствие нарушения кровообращения невралических структур в зоне компримирования. Возникает повреждение невралических структур – двигательных и чувствительных волокон спинномозгового корешка. По данным разных авторов, частота возникновения клиничко-значимой грыжи диска составляет от 5 до 12 %. Установлено, что с большей частотой встречаются дегенеративно-дистрофические изменения межпозвонковых дисков на уровне пояснично-крестцового отдела позвоночника в сравнении с другими отделами позвоночника. Для лечения таких больных актуальными являются разработка и применение методик, обеспечивающих улучшение кровоснабжения в поврежденных участках спинномозгового корешка. Предпочтительными являются немедикаментозные методы – использование преформированных физических факторов, таких как лазеротерапия. Для лечения дорсалгий широко применяются методики физиотерапии [8]. Известно, что подобные методики широко применяются при различных заболеваниях и патологических состояниях. Лазерное излучение относится к уникальным физическим факторам с широким диапазоном мощности и длины волны. Многочисленными исследованиями и практическими данными показана возможность улучшения микроциркуляции в участке облучения. Наиболее активно происходит влияние на приток и отток при использовании низкоинтенсивного лазерного

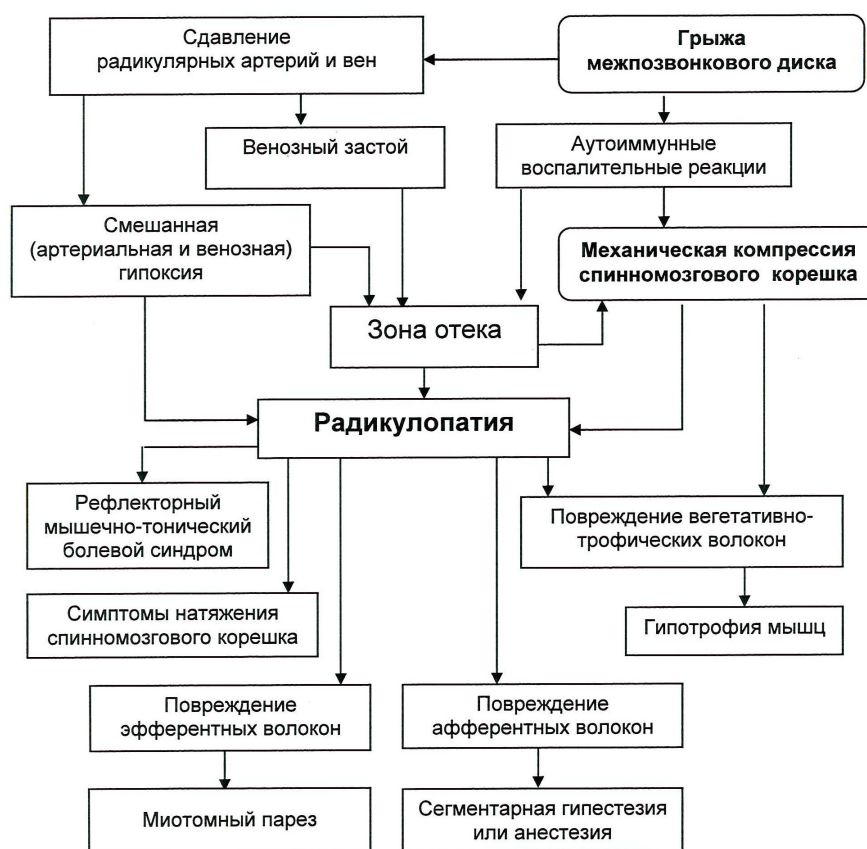


Рис. 1. Патогенез радикулоишемий

Fig. 1. Pathogenesis of radiculopathy

излучения. Также доказана возможность воздействия в значительном объеме тканей, происходит своего рода феномен «доставки» физического фактора [9].

На сегодняшний день разработано и успешно применяется большое количество методов и технологий лечения болевых синдромов при дорсопатиях, а также грыж, протрузий и пролапсов межпозвонковых дисков (МПД). Высокую эффективность показывает консервативное и хирургическое лечение. Одним из направлений лечения дорсопатий является использование преформированных физических факторов – лазерного излучения. На сегодняшний день активно используются пункционное воздействие на МПД («needle technique» в англоязычной литературе) и чрескожная низкоинтенсивная лазеротерапия. Доказано, что применение лазерного излучения в режиме низкоинтенсивного воздействия улучшает сегментарную микроциркуляцию в структурах периферической нервной системы [10].

Пункционные методики лечения являются мало-травматичными хирургическими технологиями лечения при клинически значимом стенозировании межпозвонкового отверстия [11–13]. Их использование оправдано при недостаточной эффективности медикаментозной терапии и ограничении выполнения операций открытого типа. Многими авторами лазерное излучение признано наиболее перспективным при разработке малоинвазивного и консервативного лечения болевых синдромов при дорсопатиях [14]. При неврологических заболеваниях широко используются полупроводниковые лазерные устройства [3, 14–16]. Первоначально лазерное воздействие на

МПД [17] осуществлялось с целью создания «резервной полости» и условий для миграции структур пульпозного ядра и фиброзного кольца, так называемый «вакуум-эффект» [18, 19]. В последующем было подтверждено более сложное воздействие лазерного излучения при доставке физического фактора к месту повреждения [3, 14, 20]. В частности, отмечены структурно-модифицирующий, противоотечный, противовоспалительный эффекты.

Применение низкоинтенсивной лазеротерапии оказывает более физиологическое действие на ткани. Достигается локальный антиоксидантный, антигипоксический эффект, нормализуется венозный отток и артериальный приток на уровне микроциркуляторного русла. Это обеспечивает уникальность лечебного действия преформированного физического фактора при компрессионных радикуло-миелоишемиях спондилогенного характера. Низкоинтенсивная лазеротерапия также широко применяется в неврологии, в том числе и при дорсопатиях. Принципиальным отличием является отсутствие инвазивного воздействия на биологические ткани пациента. Это связано с меньшей мощностью лазерного излучения, прохождением его через ткани в области воздействия. Подобная методика обеспечивает менее щадящее и более физиологичное (многокомпонентное) действие на уровне компрессии спинномозгового корешка.

Актуальность проведенного исследования обусловлена необходимостью комплексной оценки динамики неврологических расстройств у пациентов с грыжами дисков пояснично-крестцового уровня после пункционного лазерного лечения, а также уточне-

Таблица 1

Дизайн исследования

Table 1

Study design

Параметр	Примечание
Скрининг – оценка соответствию критериям включения и невключения	–
Рандомизация	Распределение в группу 1 или 2 в соответствии с критериями включения и невключения
Наблюдения (группа 1/2)	Интервал 7 дней/1 месяц
Катамнестическое наблюдение	*

* – в группе 1 в течение 1 года; в группе 2 в течение 28 дней.

Таблица 2

Критерии включения

Table 2

Inclusion criteria

Критерий	Параметр	Примечание
Возраст, лет	18–75	–
Пол	м/ж	–
Жалобы	Люмбагия, корешковые боли	L4-L5; L5-S1
Давность заболевания	До 1 года	В том числе хирургическое лечение
Наличие корешкового синдрома	+	Двигательные, чувствительные, вегетативно-трофические проявления, снижения сегментарного рефлекса
МРТ (КТ) пояснично-крестцового отдела позвоночника	+	Предпочтительно МРТ, КТ – при невозможности проведения МРТ
Грыжа диска больших размеров (8–9 мм и более)	+	Дорсальные, латеральные, дорсолатеральные
ЭНМГ	+	Н-рефлекс и F-волна
Предшествующее консервативное и хирургическое лечение	+	–

Примечание: МРТ – магнитно-резонансная томография; КТ – компьютерная томография; ЭНМГ – электромиография.

ния наиболее значимых физических механизмов развития лечебного эффекта при лазерном воздействии в сопоставлении с методиками низкоинтенсивной лазеротерапии.

Цель исследования – улучшить лечение и исходы у больных с компрессионно-ишемическими радикулопатиями при грыжах межпозвонковых дисков с использованием преформированных физических факторов (лазерного излучения).

Материалы и методы исследования

В соответствии с поставленной целью был разработан дизайн исследования, критерии включения и невключения.

Дизайн исследования показан в табл. 1.

Критерии включения приведены в табл. 2.

Критерии невключения приведены в табл. 3.

Дизайн исследования показан в табл. 4.

Для достижения цели было проанализировано лечение 225 пациентов, которые были разделены на две группы. Размер выборки определялся с уче-

том распространенности патологии и эффективности консервативного лечения радикулоишемий при дорсопатиях. Отбор пациентов проводили в соответствии критериям включения (табл. 2). Первая группа включала в себя 115 пациентов, которым проводили лечение в ФГУ «Северо-Западный окружной медицинский центр» и клиники неврологии ФГОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова». Вторая группа (110 пациентов) – из числа пациентов клиники неврологии и амбулаторные больные. Их лечение проводили совместно с межклиническим отделением лазерной медицины ПСПбГМУ им. И. П. Павлова. Основным критерием включения пациентов в исследование являлось наличие неврологических проявлений пояснично-крестцовой радикулоишемии. Всем пациентам проводили лечение с использованием лазерного излучения. В группе 1 выполняли пункционное лазерное лечение по методике ППЛДД в период 2003–2009 гг. Лечение у этих пациентов было направлено непосредственно

Таблица 3

Критерии невключения в исследование

Table 3

Study exclusion criteria

Критерий	Невключение	Группа		Примечание
		1	2	
Беременность/лактация	+	+	+	Независимо от сроков
Онкологические заболевания в анамнезе	+	+	+	Независимо от характера процесса и применяемых методов лечения
Некупирующиеся боли	+/-	+/-	+	Оценивался индивидуально
Выраженный стеноз позвоночного канала	+/-	+/-	-	Верификация МРТ (КТ) пояснично-крестцового отдела позвоночника
Острая травма позвоночника	+	+	+	Независимо от характера и механизма
Непереносимость физического фактора	+	+	+	Независимо от специфичности симптомов
Применение других методов физиотерапевтического лечения	+	+/-	+	Предшествующее лечение с использованием лучевых, электромагнитных и лазерных методик
Выраженная оссификация грыжи диска, грубые рубцово-спаечные изменения	+/-	+	-	По результатам нейровизуализации (КТ/МРТ)
Спондилолистез более 1-й степени	+/-	+	-	
Узкий позвоночный канал	+/-	+	-	
Значительная миграция секвестра	+/-	+	-	
Фораминальная латерализация грыжи	+/-	+	-	

Таблица 4

Дизайн исследования сравнения эффективности применения различных методик лазеротерапии при лечении дорсопатий

Table 4

Design of a study comparing the effectiveness of the use of various methods of laser therapy in the treatment of dorsopathies

Клинический синдром	Группа 1 (n=115)	Группа 2 (n=110)
Боли корешкового типа L4-L5, L5-S1 D/S	+	+
Люмбалгия	+	+
Миотомный парез L4-L5, L5-S1 2–3 балла	+	+
Миотомный парез L4-L5, L5-S1 3–4 балла	+	+
Сегментарная гипестезия L4-L5, L5-S1 D/S	+	+
Симптом Ласега D/S	+	+
Корешковый синдром L4-L5, L5-S1 D/S	+	+
Грыжа диска L4-L5, L5-S1 D/S	+	+
Нарушение статики и динамики пояснично-крестцового отдела позвоночника	+	+
Число процедур лазеротерапии	1 (2)	15–20
Оценка динамики клинических синдромов (улучшение)	+	+
Длительность наблюдения	1 год	28 дней

Таблица 5

Параметры облучения в группе 1 и 2

Table 5

Irradiation parameters in groups 1 and 2

Параметр	Группа 1	Группа 2	
Область воздействия	Межпозвоночный диск	Паравертебрально	Сегментарно
Анатомические ориентиры	Пояснично-крестцовый отдел позвоночника	Пояснично-крестцовая область	Задне-боковая/наружная поверхность бедра и голени
Длина волны, нм	970	632,8 и 850	632,8
Частота модуляции, Гц	*	0 до 1000	1 до 15
Мощность	3±0,5 Вт	20 мВт	20 мВт
Доза, Дж	1000±150		
Экспозиция (на 1 поле/точку), мин.	**	3–5	3–5
Доставка ЛИ	Пункционно поликанально	Чрезкожно	Чрезкожно
Число точек/полей	4–6	4–6	3–4
Диаметр каналов/ полей	1,2±0,3 мм	2 см	–
Число процедур	1	10–15	
Общая длительность облучения, мин.	*	20	
Оборудование	ЛАХТА-МИЛОН -970-10 и ЛСП-970-5	«Шатл-комби»	СЛСФ-01.20К
Производитель оборудования	ООО «Лакта Милон», СПб.	(СПб. фирма «Медлаз»)	(НПО «Скала»)

* – параметр не регулируется; ** – подбор параметра проводился индивидуально.

на структуры межпозвоночного диска. В группе 2 проводили чрескожное облучение полей на уровне выявленных изменений межпозвоночных дисков и при их сопоставлении с клиническими проявлениями (радикулоишемия). В этой группе воздействие производили с другими параметрами излучения и преимущественно на окружающие мягкие ткани в области формирования компримирования соответствующего уровня. В последующем пациентов этой группы облучали в соответствующем дерматоме по сканирующей методике. Проведенное исследование являлось открытым.

Описание методики лечения пациентов группы 1. Для лечения пациентов группы 1 воздействия на МПД проводили лазерными скальпелями ЛАХТА-МИЛОН-970-10 и ЛСП-970-5 (рег. № ФС 02262001/2930-06) производства ООО «Лакта Милон» (Санкт-Петербург, Россия). Длина волны – 970 нм, применяемая мощность – 3±0,5 Вт, суммарная доза воздействия – 1000±150 Дж. Предварительно до момента проведения процедуры в межпозвоночный диск дробно вводился стерильный физиологический раствор, использовался набор пункционных инструментов для создания большого количества каналов малого диаметра (1,2±0,3 мм), через которые осуществлялась доставка лазерного излучения в участок воздействия (МПД). Лечебные манипуляции – пункция межпозвоночного диска и лазерное воздействие в условиях стерильной операционной с применением

местной анестезии. Для контроля положения иглы при пункции МПД, визуализации процессов, происходящих в диске при лазерном воздействии, контроля динамики грыжи в отдаленном периоде применялось диагностическое оборудование: электронно-оптический преобразователь (ЭОП) – «BV Endura Philips» (Голландия), «ddR MultiSystem Swissray» (Швейцария); магнитно-резонансный томограф – «Opart Toshiba» (Япония) и «Espree Siemens» (Германия); компьютерный томограф – «Asteion Toshiba» (Япония) и «Aquilion 64 Toshiba» (Япония). При КТ-исследовании использовалась программа измерения плотности (в единицах Хаунсфилда – HU) ткани грыжи МПД. Преимущественно в эту группу включались пациенты, ранее не имевшие эффекта от консервативного лечения и не получившие пункционное лазерное лечение. Решение о проведении пункционного лазерного лечения методом ППЛДД принимали на основании анализа данных КТ и МРТ, сопоставления данных с клиническими проявлениями заболевания, оценки целесообразности дальнейшего консервативного лечения. Ситуация, когда при неэффективности консервативного лечения врач-невролог сталкивается с необходимостью рекомендовать пациенту метод для дальнейшего лечения, является довольно распространенной в практическом здравоохранении.

Перед началом лечения определяли показания и противопоказания на основании литературных данных [3, 14] и собственных биофизических

Таблица 6

Распределение по возрасту

Table 6

Distribution by age		
Параметр	Группа 1 (n=115)	Группа 2 (n=110)
Возраст, лет	30–59	40–58
Пол: мужчины/женщины	62 (53,9 %)/53 (46,1 %)	60 (54,5 %)/50 (45,5 %)
Достоверность различий	(p<0,05)	(p<0,05)

Таблица 7

Длительность обострения и проведенное консервативное лечение до применения преформированных физических факторов

Table 7

Duration of exacerbation and conservative treatment carried out before the use of preformed physical factors			
Особенности лечения до применения лазеротерапии	Группа 1 (n=115)	Группа 2 (n=110)	Примечание
Длительность обострения до ЛТ, недели	8,1±2,5	3,1±2,1	–
Стационарное/амбулаторное лечение	98 (85,2 %)/17 (14,8 %)	20 (22 %)/80 (78 %)	–
Медикаментозная терапия	115 (100 %)	102 (93 %)	*
ФТЛ	85 (77,3 %)	90 (82 %)	**
Мануальная терапия и массаж			***

* – преимущественно применялись нестероидные противовоспалительные препараты (селективные ингибиторы ЦОГ-2), миорелаксанты; ** – диадинамические токи и амплипульс-терапия; *** – были исключены высокоскоростные и малоамплитудные техники на уровне формирования компрессии корешка.

исследований. Показания для проведения пункционного лазерного лечения – неэффективное консервативное лечение сроком 8,1±2,5 недели, подтвержденные КТ или МРТ грыжи размером более 5 мм, противопоказания к операциям открытого типа. Пациенты не включались в исследование в следующих случаях: КТ- или МРТ-признаки выраженной оссификации грыжи, грубые рубцово-спаечные изменения, выраженный спондилоартроз, спондилолистез более 1-й степени, узкий позвоночный канал, наличие и миграция секвестра, фораминальная локализация грыжи, онкологические, инфекционные, травматические заболевания позвоночника. Это критерии относятся к противопоказаниям для применения пункционного лазерного лечения.

Описание методики лечения пациентов группы 2. Для проведения лечения использовались лазерные аппараты: «Шатл-комби» (СПб. фирма «Медлаз»), генерирующий излучение с длиной волны 632,8 и 850 Нм, мощность на выходе излучателя – до 20 мВт, частота импульсов – от 0 до 1000 Гц, и аппарат СЛСФ-01.20К (НПО «Скала»). Длина волны излучения – 632,8 Нм, мощность на выходе излучающей головки – 20 мВт, частота модуляции – от 1 до 15 Гц. Курс лазеротерапии включал в себя 10–15 процедур, проводимых ежедневно с перерывом на выходные дни.

Методика лазеротерапии подбиралась индивидуально для каждого пациента с учетом клинических проявлений заболевания и возраста больного. Во всех случаях курс лазеротерапии начинался с назначения 5–7 процедур. Воздействие осуществлялось по по-

лям (точкам) паравертебрально на уровне поражения с двух сторон с облучением выше и ниже на 1 сегмент. Диаметр поля облучения – до 2,5 см. Всего за 1 сеанс воздействовали на 4–6 полей (точек) по 3–5 мин. Кроме того, применялась дистантная сканирующая методика на мышцы голени и бедра на стороне компрессии корешка. Облучение осуществлялось в соответствующем дерматоме. Время воздействия – 1–2 мин. Общее время облучения на одну процедуру не превышало 20 мин.

Применение описанной методики связано с разной глубиной проникновения излучения в ткани. При применении дистанционно-сканирующей методики глубина проникновения излучения – до 2,0 см (аппарат СЛСФ-01.20К, НПО «Скала»). Это способствует уменьшению мышечно-тонического и болевого синдромов. ИК-излучение (аппарат «Шатл-комби», СПб. фирма «Медлаз») обладает большей проникающей способностью – до 6–8 см – и усиливает противоотечное, противоболевое действие, улучшает локальное кровообращение, в том числе и компримированного корешка на уровне микроциркуляции, улучшает венозный отток. Воздействие сканирующим лазерным излучением на мышцы бедра и голени оказывает трофостимулирующее действие.

Параметры облучения приведены в табл. 5.

Для оценки клинического эффекта в обеих группах выполнялся сбор анамнеза и неврологический осмотр. Мы обращали внимание на провоцирующие факторы (в том числе и особенности профессиональной деятельности, связанной с подъемом тяже-

сти или длительным пребыванием в положении стоя или сидя), предшествующее лечение (консервативное и хирургическое). При анализе жалоб особое внимание обращали на наиболее значимые критерии – боль и функциональные расстройства. Мышечную силу оценивали по 5-балльной системе, акцентировали внимание на соответствующем миотоме. Использовалась 5-балльная система для оценки силы мышц [23]. Исследовали глубокие рефлекс, чувствительные расстройства, симптомы натяжения.

Интенсивность боли оценивали по результатам анкетирования с использованием визуально-аналоговой шкалы (ВАШ), опросника нарушений жизнедеятельности при поясничной боли Освестри – ODI (Oswestry Low Back Pain Disability Questionnaire), опросника Роланда – Морриса – RDQ «Боль в нижней части спины и нарушение жизнедеятельности» (Low back pain and disability Questionnaire, Roland – Morris), который использовали через $3,1 \pm 0,2$ и $6,2 \pm 1,2$ недели после ППЛДД. С учетом специфики методики лечения все пациенты группы 1 были обследованы на этапе до ППЛДД, при выписке на $7,1 \pm 0,3$ -й день, через $6,2 \pm 1,2$ недели, $6,3 \pm 0,8$ месяца, $12,5 \pm 1,3$ месяца. Статистический анализ проводили с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA» (версия 6.0). Пациенты группы 2 осматривались в динамике с интервалом через $7,1 \pm 0,3$ дня на протяжении 28 дней.

Результаты исследования и их обсуждение

В обеих группах возраст и пол больных достоверно не отличались. Данные приведены в табл. 6.

Средняя длительность обострения и консервативного лечения в группе 1 (до применения методики ППЛДД) составила $8,1 \pm 2,5$ недели. В группе 2 – от 1 недели до 1 месяца. Все пациенты обеих групп во время обострения до применения пункционно-лазерного лечения и НИЛИ получили в группе 1 консервативное стационарное – 98 (85,2 %) – или амбулаторное – 17 (14,8 %) – лечение, в группе 2 – стационарное – 20 (22 %) – и амбулаторное – 80 (78 %). В группе 1 все пациенты ($n=115$; 100,0 %) получили медикаментозное лечение, 94 (81,7 %) – физиотерапевтическое лечение, мануальную терапию и массаж – 84 (73,1 %). В группе 2 медикамен-

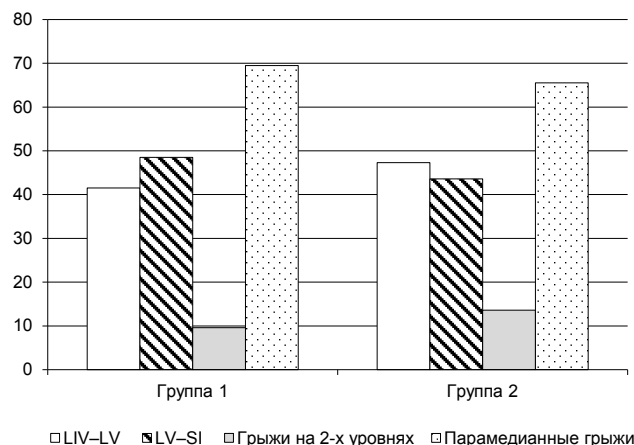


Рис. 2. Результаты нейровизуализации у пациентов группы 1 и группы 2

Fig. 2. Results of neuroimaging in patients of group 1 and group 2

тозная терапия была применена (по показаниям) у 102 (93 %), соответственно, без медикаментозной терапии были пролечены 8 пациентов (7 %). Физиотерапия и мануальная терапия, включая массаж, назначалась в 85 (77,3 %) и 90 (82 %) наблюдений из числа пациентов группы 2. Данные приведены в табл. 7.

Перед применением ППЛДД всем пациентам проведено КТ- или МРТ-исследование пояснично-крестцового отдела позвоночника. Получены следующие результаты: в группе 1 изменения межпозвонковых дисков на уровне $L_{IV}-L_V$ были выявлены у 48 пациентов (41,5 %); на уровне L_V-S_1 – 56 пациентов (48,5 %), в 11 (9,6 %) случаях обнаружены грыжи диска на двух уровнях, поэтому определяли клинически значимый уровень. Преобладали парамедианные грыжи – 80 (69,5 %) наблюдений. Средний размер грыжевого выпячивания составлял $7,6 \pm 1,1$ мм.

В группе 2 изменения межпозвонковых дисков на соответствующих уровнях имели следующую частоту встречаемости: на уровне $L_{IV}-L_V$ были выявлены у 52 (47,3 %) пациентов; на уровне L_V-S_1 – 48 (43,6 %) пациентов, в 15 (13,6 %) случаях обнаружены грыжи диска на двух уровнях, поэтому определяли клинически значимый уровень. Парамедианные грыжи, как и в группе 1, преобладали и встречались у 72 (65,5 %) больных. Средний размер грыжевого выпячивания был

Таблица 8

Распределение наиболее значимых клинико-неврологических синдромов

Table 8

Distribution of the most significant clinical and neurological syndromes

Симптом	Группа 1 (n=115)	Группа 2 (n=110)	Примечание
Люмбалгия	107 (93,6 $\pm$ 1,9 %)	107 (97,3 $\pm$ 1,7 %)	(p<0,05)
<i>Корешковый (сегментарный) синдром</i>			
Боль	95 (82,6 $\pm$ 3,1 %)	90 (81,9 $\pm$ 3,9 %)	(p<0,05)
Гипестезия	87 (75,4 $\pm$ 2,8 %)	91 (82,7 $\pm$ 1,9 %)	(p<0,05)
Парез	82 (71,3 $\pm$ 4,9 %)	78 (70,9 $\pm$ 3,9 %)	(p<0,05)
Выпадение глубоких рефлексов	80 (69,6 $\pm$ 4,1 %)	105 (95,5 $\pm$ 2,7 %)	(p<0,05)
Симптомы натяжения	78 (67,8 $\pm$ 2,9 %)	100 (90,9 $\pm$ 1,5 %)	(p<0,05)

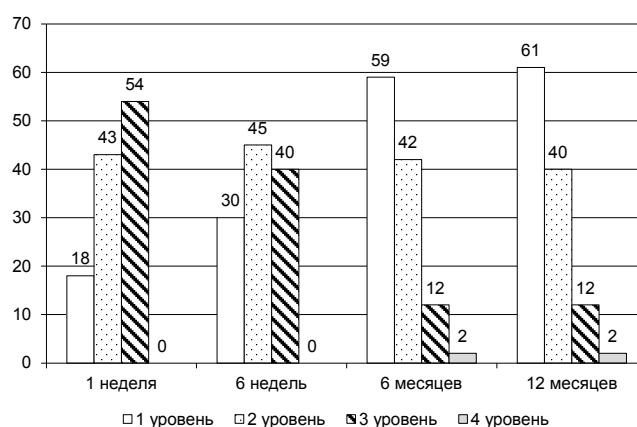


Рис. 3. Результаты оценки неврологических расстройств на разных сроках наблюдения по шкале Nurick: 1 уровень – значительное неврологическое улучшение или выздоровление; 2 уровень – неврологическое улучшение; 3 – состояние без изменений; 4 – ухудшение неврологического статуса

Fig. 3. The results of the assessment of neurological disorders at different periods of observation according to the Nurick scale

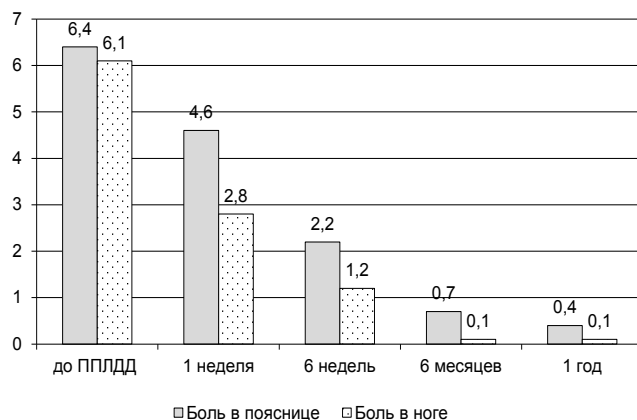


Рис. 4. Динамика боли, баллы (1 балл=10 мм) по шкале ВАШ

Fig. 4. Dynamics of pain, points (1 point = 10 mm) according to the VAS scale

меньшим в сравнении с группой 1 и составлял $5,5 \pm 1,1$ мм. Результаты нейровизуализации показаны на рис. 2.

В неврологическом статусе больных группы 1 и 2 отмечены следующие симптомы: боль в пояснично-крестцовой области – у 107 (93,6 %) пациентов, 110 (100 %) соответственно; корешковая боль с иррадиацией в ногу – у 95 (82,6 %), 105 (95,5 %) соответственно; расстройства чувствительности в зоне иннервации корешка – у 87 (75,4 %), 90 (82 %); снижение мышечной силы в ноге – у 82 (71,3 %), снижение или отсутствие глубоких рефлексов – у 80 (69,6 %), 80 (72,7 %); симптомы натяжения выявлялись у 78 (67,8 %), 68 (61,8 %) соответственно. Распределение клинко-неврологических синдромов приведено в табл. 8.

Клинические результаты лечения в группе 1 оценивали по шкале Nurick (рис. 3).

В течение 1-й недели после пункционного лазерного лечения число отличных и хороших результатов (сумма уровней 1 и 2) отмечено более чем у половины больных – 61 ($53,1 \pm 3,4$ %). Наилучший результат был отмечен по динамике симптомов натяжения – регресс у $78,2 \pm 3,6$ % пациентов. Полное или частичное восстановление силы – у $34,6 \pm 2,0$ %. Полный и частичный регресс корешковых болей наступил

у 46 ($48,3 \pm 1,6$ %) из 95 пациентов, у которых эти нарушения были выявлены. Следует отметить, что у пациентов, ранее не имевших эффекта от приема анальгетиков и НПВС, после проведения ППЛДД эффективность приема этих препаратов была отчетливо выражена. При выписке пациенты получали рекомендации по ношению корсета в течение 4–6 недель, а также по постепенному расширению режима и физических нагрузок.

Через $6,2 \pm 1,2$ недели после ППЛДД число хороших и отличных результатов увеличилось до $65,2 \pm 1,9$ % – 75 пациентов. Поясничная боль сохранилась у $30,9 \pm 1,8$ % больных. Эпизодические корешковые боли отмечены у 12 ($10,4 \pm 0,3$ %) больных. Снижение интенсивности корешковой боли произошло у всех пациентов, боли возникали при длительной ходьбе или сидении. Боли хорошо купировались приемом анальгетиков и НПВС. Снижение или отсутствие глубоких рефлексов сохранялось у 48 ($41,7 \pm 1,9$ %) и гипестезия у – 47 ($40,9 \pm 2,3$ %) пациентов. Снижение силы ноги в дистальных отделах сохранялось у 24 ($20,9 \pm 2,1$ %) пациентов. Таким образом, к сроку $6,2 \pm 1,2$ недели после ППЛДД восстановление силы почти в 2 раза опережает восстановление чувствительных и рефлекторных расстройств. Эта разница в скорости восстановления была менее выражена в период 1-й недели после ППЛДД. Вероятно, это связано с расширением двигательного режима, особенно ходьбы, вследствие уменьшения болевого синдрома. На этом сроке возможно назначение реабилитационных мероприятий: ФТЛ, массажа, мягкотканной мануальной терапии, остеопатии, ЛФК.

Через $6,3 \pm 0,8$ месяца после пункционного лазерного лечения число хороших и отличных результатов составило $87,7 \pm 2,7$ %. Жалобы на боль в пояснице сохранялись у 13 ($11,3 \pm 0,8$ %) пациентов, снижение мышечной силы в стопе зафиксировано у 10 ($8,9 \pm 0,2$ %) пациентов. Нарушения статики позвоночника в виде остаточной кифосколиотической деформации и ограничения подвижности в поясничном отделе сохранились у 8 пациентов ($7,5 \pm 0,4$ %). Все 8 пациентов были старше 50 лет с длительным сроком заболевания, исходным размером грыжи МПД не более 8 мм. У 2 пациентов после неадекватной физической нагрузки возникли ситуации, потребовавшие нейрохирургического вмешательства.

Через $12,5 \pm 1,3$ месяца после ППЛДД жалобы на частую боль в пояснице предъявляли 10 ($8,7 \pm 0,5$ %) пациентов. Боль имела непостоянный характер, была связана с физическими нагрузками или переохлаждением. У 9 ($8,1 \pm 0,9$ %) пациентов сохранялось снижение силы в стопе. Сохранение зон гипестезии было у $10,2 \pm 0,8$ % пациентов. Изменения неврологического статуса в срок от полугода до года после ППЛДД незначительны. Таким образом, основные неврологические улучшения после ППЛДД происходят в срок до полугода, при этом максимально интенсивно в срок до $6,2 \pm 1,2$ недели, что следует учитывать врачу-неврологу при назначении дополнительного лечения и проведении реабилитационных мероприятий.

Была изучена динамика болевого синдрома по визуально-аналоговой шкале (рис. 4).

Исходные уровни боли в поясничном отделе – $6,4 \pm 0,8$ балла и корешковой боли в ноге – $6,1 \pm 0,6$ – соответствовали показателям сильно выраженной боли (6–8 баллов) и были близки по значению. Быстрое и значимое ($p < 0,01$) снижение уровня болевых ощущений происходило в течение 1-й недели после ППЛДД до $4,6 \pm 0,7$ – выраженной (4–6 балла) боли в пояснице и $2,8 \pm 0,6$ – умеренно выраженной (2–4 балла) в ноге. Эта тенденция к регрессу болевого синдрома ($p < 0,01$) отмечена и через 6 недель: $2,2 \pm 0,5$ – умеренные поясничные боли и $1,2 \pm 0,4$ – слабовыраженная боль в ноге. Анализ значений ВАШ указывает на максимальное уменьшение боли на 1-й неделе после ППЛДД, плавное снижение до 6 недель, дальнейшее снижение и стабилизацию показателей через полгода после лечения. Значения ВАШ подтверждают данные, полученные при неврологическом наблюдении. Таким образом, ВАШ информативна для болевого аудита и отображения неврологической динамики.

Были исследованы изменения нарушений жизнедеятельности по опроснику Роланда – Морриса (RDQ) через $3,1 \pm 0,2$ и $6,2 \pm 1,2$ недели после ППЛДД. Исходное число отмеченных утверждений составило $11,6 \pm 0,5$. Через 3 недели их число составило $6,4 \pm 1,1$ (относительное улучшение – $44,8 \pm 0,6$ %). Через $6,2 \pm 1,2$ недель – $5,4 \pm 1,3$, что соответствует показателям умеренно выраженного влияния болей на нарушения жизнедеятельности. Таким образом, опросник Роланда – Морриса подтверждает данные о значительном улучшении через $6,2 \pm 1,2$ недели после ППЛДД. RDQ прост в использовании, особенно у людей с низким образовательным уровнем, и может быть использован при телефонном анкетировании, но в связи с большей информативностью опросника Освестри на сроке $6,2 \pm 1,2$ недели и далее переходили на использование последнего.

Изучены изменения индекса нарушений жизнедеятельности по опроснику Освестри (ODI). Значение индекса ODI до применения ППЛДД составило $56,3 \pm 4,1$ %, что соответствует градации тяжелых нарушений жизнедеятельности. Через $6,2 \pm 1,2$ недели значения индекса ODI составили $20,8 \pm 1,3$ % (относительное снижение на $63,1 \pm 1,9$ %) и находились на условной границе умеренных (21–40 %) и легких (0–20 %) нарушений жизнедеятельности. К $6,3 \pm 0,8$ месяцу произошло уверенное снижение до значений легких нарушений жизнедеятельности – $10,7 \pm 3,8$ % (относительное снижение на $50,5 \pm 1,9$ %) – и стабилизация – $7,8 \pm 0,8$ % – через $12,5 \pm 1,3$ месяца после ППЛДД. Таким образом, ODI отражает выраженное уменьшение нарушений жизнедеятельности через $6,2 \pm 1,2$ недели и стабилизацию показателей через $6,3 \pm 0,8$ месяца, что отражает динамику неврологического восстановления. Преимуществом Освестровского опросника по сравнению с RDQ является его градация по категориям жизнедеятельности, на которые влияет болевой синдром, что позволяет индивидуализировать программу реабилитации.

Для поиска раннего нейровизуализационного критерия клинической эффективности были исследованы 43 (37,4 %) пациента, у которых при проведении ППЛДД применялся КТ-контроль. Среди них

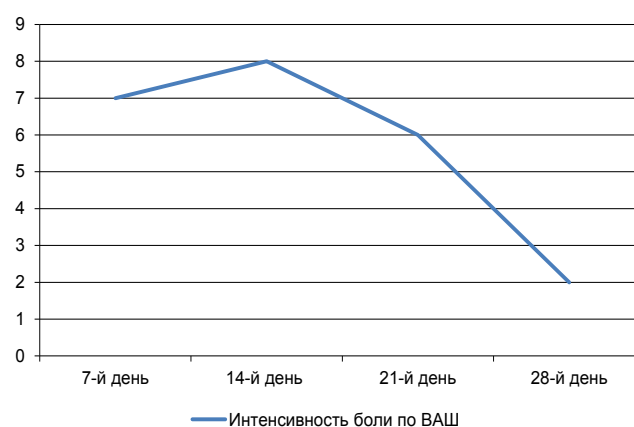


Рис. 5. Динамика болевого синдрома у пациентов группы 2 по ВАШ

Fig. 5. Dynamics of pain syndrome in patients of group 2 according to VAS

наблюдали 23 ($53,5 \pm 3,2$ %) пациента, у которых неврологическое улучшение развивалось опережающими темпами, часто сразу после проведения ППЛДД. У всех 23 пациентов по данным КТ отмечено образование большого количества газовых пузырьков низкой HU-плотности в веществе грыжи (снижение на $32,4 \pm 8,2$ HU) и одномоментное уменьшение ее размеров более чем в 2 раза. Таким образом, понижение плотности грыжи на $32,4 \pm 8,2$ HU, уменьшение ее аксиального размера в 2 и более раз может быть использовано в качестве раннего нейровизуализационного критерия клинической эффективности ППЛДД.

В группе 2 оценивали динамику болевого синдрома с интервалом 1 раз в течение 7 дней за время наблюдения 28 дней. Исходно была зафиксирована интенсивность боли на уровне 7 баллов. Динамика болевого синдрома в группе 2 показана на рис. 5.

Более устойчивый эффект был достигнут к 28-му дню наблюдения, в течение 7–10 дней после окончания курса лечения.

Заключение

Результаты нашего исследования позволяют говорить о том, что использование преформированного физического фактора (лазерного излучения) обладает значительной клинической эффективностью у пациентов с компрессионными радикулопатиями. При выборе методики существенными являются длина волны и мощность излучения. В зависимости от преимущественного структурно-модифицирующего действия необходимо учитывать особенности доставки и проникновения физического фактора. Поликанальная лазерная декомпрессия показывает большую эффективность у больных с грыжами дисков при отсутствии эффекта от консервативного лечения в срок $8,1 \pm 2,5$ недели, отсутствие выраженного спондилоартроза, стеноза позвоночного канала, спондилолистеза более 1-й степени и других причин заболевания. Не менее важным является наличие общесоматических и психоэмоциональных противопоказаний к дискэктомии. После проведения пункционной поликанальной лазерной декомпрессии контроль динамики неврологических синдромов целесообразно проводить с использо-

ванием шкал и опросников по следующей схеме: визуально-аналоговая шкала для текущего болевого аудита, опросник Роланда – Морриса в срок до $6,2 \pm 1,2$ недели после лечения и опросник Освестри через $6,2 \pm 1,2$ недели для оценки результатов лечения и индивидуализации реабилитационных мероприятий. Применение низкоинтенсивной лазеротерапии чрескожно и при выполнении моноканальной внутритканевой лазеротерапии обеспечивает улучшение противоотечного и нейропротекторного действия в области возникновения компримирования спинномозгового корешка. Наиболее значимым является эффект нормализации венозной и артериальной гипоксии сегментарного характера на уровне компрессионного воздействия, которая возникает при грыже диска или стенозе межпозвонкового отверстия. Чрескожное облучение в режиме НИЛИ обладает более щадящим действием у больных с повреждением спинномозгового корешка. Использование преформированных физических факторов значительно улучшает эффективность лечения, является безопасным и доступно в программе восстановительно-реабилитационных мероприятий.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Литература / References

1. Системный подход к выбору тактики лечения болевых синдромов у пациентов с дегенеративно-дистрофическими заболеваниями позвоночника. Мануальная терапия / В. П. Михайлов, А. А. Кузьмичев, Е. А. Головкин, М. В. Ковтун. – 2011. – № 4 (44). – С. 3–10. [Mikhaylov VP, Kuz'michev AA, Golovko YeA, Kovtun MV. Sistemnyy podkhod k vyboru taktiki lecheniya bolevykh sindromov u patsiyentov s degenerativno-distroficheskimi zabolevaniyami pozvonochnika. Manual'naya terapiya. 2011;4(44):3–10. (In Russ.)].
2. Шустин В. А. и др. Диагностика и хирургическое лечение неврологических осложнений поясничного остеохондроза. СПб: Фолиант, 2006. – 168 с. [Shustin VA. Diagnostika i khirurgicheskoye lecheniye nevrologicheskikh oslozhneniy poynasichnogo osteokhondroza / V.A. Shustin i soavt. SPb; Foliant, 2006:168. (In Russ.)].
3. Басков А. В., Борщенко И. А. Техника и принципы хирургического лечения заболеваний и поврежденных позвонков. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 136 с. [Tekhnika i printsipy khirurgicheskogo lecheniya zabolevaniy i povrezhdeniy pozvonochnika / Baskov AV, Borshchenko IA. Moscow, GEOTA -Media, 2007:136. (In Russ.)].
4. Кузнецов В. Ф. Вертеброневрология. Клиника, диагностика, лечение заболеваний позвоночника. – СПб.: Книжный дом, 2004. – 640 с. [Kuznetsov VF. Vertebronevrologiya. Klinika, diagnostika, lecheniye zabolevaniy pozvonochnika. SPb., Knizhnyy dom, 2004:640. (In Russ.)].
5. Котова О. В. Лечение боли в спине // ПМЖ. – 2012. – № 8. – С. 414–415. [Kotova OV. Lecheniye boli v spin. // RMZH, 2012;(8):414–415. (In Russ.)].
6. Парфенов В. А., Исайкин А. И. Боль в нижней части спины: мифы и реальность. – М.: ИМА ПРЕСС, 2016. [Parfenov VA, Isaykin AI. Bol' v nizhney chasti spiny: mify i real'nost'. Moscow, IMA PRESS, 2016. (In Russ.)].
7. Boos N, Aebi M. Spinal disorders: fundamental of diagnosis and treatment. Berlin, Springer Medicine, 2008:990.
8. Заинчуковская Л. П., Галлямова А. Ф., Новиков Ю. О. Опыт лечения миофасциального болевого синдрома грудной клетки с применением методов физиотерапии // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. – 2001. – № 6. – С. 27–29. [Zainchukovskaya LP, Gallyamova AF, Novikov YUO. Opyt lecheniya miofastsial'nogo bolevogo sindroma grudnoy kletki s primeneniym metodov fizioterapii. Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoy fizicheskoy kul'tury. 2001;(6):27–29. (In Russ.)].
9. Андреев В. В., Порхун Н. Ф., Порхун Ф. Н. Влияние низкоэнергетического лазерного излучения на микроциркуляцию спинномозгового корешка при радикулопатиях у больных с грыжами межпозвонковых дисков большого размера // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2007. – Т. 6, № 1 (21). – С. 16–18. [Andreyev VV, Porkhun NF, Porkhun FN. Vliyaniye nizkoenergeticheskogo lazernogo izlucheniya na mikrotsirkulyatsiyu spinnomozgovogo koresheka pri radikuloishemiyakh u bol'nykh s gryzhami mezhpozvonkovykh diskov bol'shogo razmerov. Regionarnoye krovoobrashcheniye i mikrotsirkulyatsiya. 2007;6(1(21)):16–18. (In Russ.)].
10. Harada J, Dohi M, Fukuda K. Harada J. CT-guided Percutaneous Laser Disk Decompression (PLDD) for cervical disc hernia. Radiation Medicine. 2001;19(5):263–266.
11. Хелимский А. М. Хронические дискогенные болевые синдромы шейного и поясничного остеохондроза. – Хабаровск: РИОТИП, 2000. – С. 256. [Khelimskiy AM. Khronicheskiye diskogennyye bolevyye sindromy sheynogo i poynasichnogo osteokhondroza. Khabarovsk, RIOTIP, 2000:256. (In Russ.)].
12. Акберов Р. Ф., Михайлов С. Л., Радзевич. Пункционная лазерная дискэктомия у больных поясничным остеохондрозом // Вертеброневрология. – 2001. – Т. 8, № 1–2. – С. 12–18. [Akberov RF, Mikhaylov SL, Radzevich. Punksionnaya lazernaya dissektomiya u bol'nykh poynasichnym osteokhondrozom // Vertebronevrologiya. 2001;8(1(2)):12–18. (In Russ.)].
13. Акберов Р. Ф., Радзевич С. Л. Отдаленные результаты пункционной лазерной дискэктомии у больных поясничным остеохондрозом // Казан. мед. журн. – 2001. – Т. 82, № 5. – С. 340–344. [Akberov RF, Radzevich S.L. Otdalennyye rezul'taty punktsionnoy lazernoy dissektomii u bol'nykh poynasichnym osteokhondrozom. Kazanskiy med. zhurnal. 2001;82(5):340–344 (In Russ.)].
14. Баграшвили В. Н., Баграшвили Н. В., Гапонцев В. П. Изменения оптических свойств гелиевого хряща при нагреве лазерным излучением ближнего ИК диапазона. // Квантовая электроника. – 2001. – № 6. – С. 534–539. [Bagratishvili VN, Bagratishvili NV, Gapontsev VP. Izmeneniya opticheskikh svoystv gyalinovogo khryashcha pri nagreve lazernym izlucheniym blizhnego IK diapazona. Kvantovaya elektronika. 2001;(6):534–539. (In Russ.)].
15. Hellinger J. Erfahrungen mit der perkutanen Laserkoeagulation des Discus intervertebralis. Orthop. Mitteilungen. 1991;(3):157.
16. Choy DS. Percutaneous Laser Disc Decompression: A 17-Year Experience. Photomed. and Laser Surgery. 2004;22(5):407–410.
17. Choy DS, Case RB, Ascher PW. Percutaneous Laser ablation of lumbar discs. 33 red. Ann. Meeting Orthop. Research Soc. 1987;(1):19–22.
18. Мусалатов Х. А., Аганесов М. Хирургическая реабилитация корешкового синдрома при остеохондрозе поясничного отдела позвоночника. – М.: Медицина, 1998. – С. 88. [Musalatov XA, Aganesov M. Khirurgicheskaya rehabilitatsiya koreshekovogo sindroma pri osteokhondroze poynasichnogo otdela pozvonochnika. – M.: Meditsina, 1998. – С. 88. (In Russ.)].

reabilitatsiya koreshkovogo sindroma pri osteokhondroze poynasnichnogo otdela pozvonochnika. Meditsina. 1998;(88). (In Russ.)].

19. Дзяк Л. А., Зорин Н. А., Зорина Т. В. Показания к перкутанной лазерной дискэктомии и ближайшие послеоперационные результаты // Бюлл. Укр. ассоциации нейрохирургов. 1998. – № 6. – С. 191. [Dzyak LA, Zorin NA, Zorina TV. Pokazaniya k perkutannoy lazernoy diskektomii i blizhayshiye posleoperatsionnyye rezul'taty. Byul. Ukr. Assotsiatsii neyrokhirurgov. Kyiv, 1998;(6):191. (In Russ.)].

20. Перспективы лечения дискогенных компрессионных форм пояснично-крестцовых радикулитов с помощью неэндоскопических лазерных операций / В. М. Чудновский, В. И. Юсупов, Б. И. Сандлер, О. В. Косарева. – Владивосток: Дальнаука, 2004. – С. 181 [Chudnovskiy VM, Yusupov VI, Sandler BI, Kosareva OV. Perspektivy lecheniya diskogennykh kompressionnykh form poynasnichno-kresttsovykh radikulitov s pomoshch'yu neendoskopicheskikh lazernykh operatsiy. Vladivostok, Dal'nauka, 2004:181. (In Russ.)].

Информация об авторах

Андреев Владислав Викторович – канд. мед. наук, доцент кафедры неврологии и мануальной медицины, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, eLibrary SPIN: 6277-8960, ORCID: 0000-0003-2578-5783, e-mail: nevro-fpo@mail.ru.

Зевахин Сергей Валентинович – ассистент кафедры неврологии и мануальной медицины, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия.

Баранцевич Евгений Робертович – профессор, д-р мед. наук, зав. кафедрой неврологии и мануальной медицины, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, eLibrary SPIN: 9715-2844, ORCID: 0000-0003-3804-3877, Author ID: 268933, e-mail: professorerb@mail.ru.

Сычев Александр Иванович – ассистент кафедры неврологии и мануальной медицины, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, eLibrary SPIN: 4585-8704, ORCID: 0000-0003-0609-7731, e-mail: dr-ss1@ya.ru.

Петришев Николай Николаевич – д-р мед. наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, профессор кафедры патофизиологии с курсом клинической патофизиологии, руководитель Центра лазерной медицины, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, руководитель Российской Ассоциации по региональной гемодинамике и микроциркуляции, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: lazmed@yandex.ru.

Information about authors

Andreev Vladislav V. – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of Department of Neurology and Manual Medicine, Pavlov University, Saint Petersburg, eLibrary SPIN: 6277-8960, ORCID: 0000-0003-2578-5783, e-mail: nevro-fpo@mail.ru.

Zevachin Sergei V. – Assistant of the Department of Neurology and Manual Medicine, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia.

Barantsevich Evgenii R. – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Neurology and Manual Medicine, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, eLibrary SPIN: 9715-2844, ORCID: 0000-0003-3804-3877, Author ID: 268933, e-mail: professorerb@mail.ru.

Sychev Alexander I. – Assistant of the Department of Neurology and Manual Medicine, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, eLibrary SPIN: 4585-8704, ORCID: 0000-0003-0609-7731, e-mail: dr-ss1@ya.ru.

Petrishchev Nikolay N. – Dr. of Sci. (Med.), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Professor of the Department of Pathophysiology with the course of clinical pathophysiology, Head of the Center for Laser Medicine, Pavlov University, Head of the Russian Association for Regional Hemodynamics and Microcirculation, Saint Petersburg, Russia, e-mail: lazmed@yandex.ru.

УДК 616.132.2

DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-62-70

И. С. ТРУСОВ, Е. М. НИФОНТОВ, А. В. БИРЮКОВ,
А. К. БАЗУНОВ

Факторы, влияющие на исходы стентирования коронарных артерий эверолимус-содержащими стентами при остром коронарном синдроме без подъема сегмента ST

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8
E-mail: trus-medic@rambler.ru

Статья поступила в редакцию 01.11.20; принята к печати 29.01.21

Резюме

Чрескожные вмешательства, применяемые при лечении острого коронарного синдрома (ОКС), могут осложняться рецидивом клиники ишемии в связи с потерей просвета стента. Факторы, влияющие на риск развития рестеноза, могут различаться в зависимости от клинической ситуации и характеристик стентов. *Цель* – выявить факторы риска повторной реваскуляризации у пациентов с ОКС без подъема сегмента ST после установки эверолимус-покрытых стентов. *Материалы и методы*. В исследование включены 126 пациентов с ОКС, которым были установлены платина-хром-содержащие эверолимус-покрытые стенты. Анализировали основные клинико-лабораторные показатели пациентов. Через 12 месяцев оценивали комбинированную конечную точку (смерть, инфаркт миокарда в бассейне стентированной артерии, повторная реваскуляризация стентированного сосуда). *Результаты*. За время наблюдения комбинированной конечной точки достигли 18 из 126 больных (14,3 %). Среди пациентов, достигших конечной точки, было больше женщин (10 (24,4 %) и 8 (9,4 %); $p=0,02$). У пациентов, достигших конечной точки, уровень высокочувствительного тропонина был достоверно выше (0,032 (0,007; 0,32) нг/мл против 0,005 (0,002; 0,022) нг/мл; $p=0,005$), отмечалась более низкая фракция выброса левого желудочка ($52,2 \pm 12,3$ и $58,6 \pm 8,9$ %; $p=0,02$) и скорость клубочковой фильтрации ($68,5 \pm 15,7$ и $76,3 \pm 18,2$ мл/мин; $p=0,04$), а также имел место достоверно меньший уровень триглицеридов ($1,3 \pm 0,4$ и $1,8 \pm 0,9$ ммоль/л, $p=0,004$) и ЛПОНП ($0,6 \pm 0,2$ и $0,8 \pm 0,4$ ммоль/л, $p=0,006$). По данным многофакторного регрессионного анализа, ведущими факторами, влиявшими на риск повторной реваскуляризации, стали сахарный диабет (ОШ 4,25; 95 % ДИ: 1,12–16,15; $p=0,03$), скорость клубочковой фильтрации и уровень триглицеридов (ОШ 0,25; 95 % ДИ: 0,07–0,93; $p=0,03$). *Выводы*. При применении эверолимус-покрытых стентов одними из основных факторов, влияющих на риск сужения просвета стента, являются сахарный диабет, снижение скорости клубочковой фильтрации и низкий уровень триглицеридов крови.

Ключевые слова: острый коронарный синдром, эверолимус, триглицериды, сахарный диабет, скорость клубочковой фильтрации, рестеноз

Для цитирования: Трусов И. С., Нифонтов Е. М., Бирюков А. В., Базунов А. К. Факторы, влияющие на исходы стентирования коронарных артерий эверолимус-содержащими стентами при остром коронарном синдроме без подъема сегмента ST. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2021;20(1):62–70. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-62-70.

UDC 616.132.2

DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-62-70

I. S. TRUSOV, E. M. NIFONTOV, A. V. BIRYUKOV,
A. K. BAZUNOV

Factors influencing the outcomes of coronary artery stenting with everolimus-eluting stents in acute coronary syndromes without ST segment elevation

Pavlov University, Saint Petersburg, Russia
6-8, L'va Tolstogo street, Saint Petersburg, Russia, 197022
E-mail: trus-medic@rambler.ru

Received 01.11.20; accepted 29.01.21

Summary

Introduction. Percutaneous interventions used in the treatment of acute coronary syndrome (ACS) may be complicated by the recurrence of the ischemia clinical picture due to the late lumen loss of the stent. Factors influencing the risk of the restenosis developing may differ depending on the clinical situation and stent characteristics. **Objective.** To identify risk factors for repeated

revascularization in patients with ACS without ST-segment elevation after placement of everolimus-eluting stents. *Materials and methods.* The study included 126 patients with ACS, who received platinum-chromium containing everolimus-eluting stents. The main clinical and laboratory parameters of the patients were analyzed. After 12 months, the combined endpoint (death, myocardial infarction in the basin of the stented artery, repeated revascularization of the stented vessel) was assessed. *Results.* During the follow-up, 18 of 126 patients (14.3 %) reached the combined endpoint. Among patients who reached the endpoint, there were more women (10 (24.4 %) and 8 (9.4 %); $p=0.02$). In patients who reached the endpoint, the level of highly sensitive troponin was significantly higher (0.032 (0.007 ; 0.32) ng/ml versus 0.005 (0.002 ; 0.022) ng/ml; $p=0.005$), there was a lower left ventricular ejection fraction (52.2 ± 12.3 % vs 58.6 ± 8.9 %; $p=0.02$) and glomerular filtration rate (68.5 ± 15.7 ml/min vs 76.3 ± 18.2 ml/min; $p=0.04$), and there was also a significantly lower level of triglycerides (1.3 ± 0.4 mmol/L and 1.8 ± 0.9 mmol/L, $p=0.004$) and VLDL (0.6 ± 0.2 mmol/L and 0.8 ± 0.4 mmol/L, $p=0.006$). According to multivariate regression analysis, the leading factors influencing the risk of repeated revascularization were diabetes mellitus (OR 4.25; 95 % CI: 1.12–16.15; $p=0.03$), glomerular filtration rate and triglyceride level (OR 0.25; 95 % CI: 0.07–0.93; $p=0.03$). *Conclusions.* When using everolimus-eluting stents, diabetes mellitus, decreased glomerular filtration rate and low blood triglyceride levels are among the main factors affecting the risk of in-stent restenosis.

Keywords: acute coronary syndrome, everolimus, triglycerides, diabetes mellitus, GFR, restenosis

For citation: Trusov I. S., Nifontov E. M., Biryukov A. V., Bazunov A. K. Factors influencing the outcomes of coronary artery stenting with everolimus-eluting stents in acute coronary syndromes without ST segment elevation. *Regional blood circulation and microcirculation.* 2021;20(1):62–70. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-62-70.

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания остаются ведущей причиной смертности населения [1]. Среди форм острого коронарного синдрома (ОКС) лидирующие позиции занимает острый коронарный синдром без подъема сегмента ST, который достигает 80 % всех случаев ОКС [2]. Одним из способов снижения смертности является реваскуляризация миокарда при острых формах ишемической болезни сердца (ИБС), что нашло свое отражение в современных рекомендациях [3]. Ведущее место в лечении острого коронарного синдрома в настоящее время занимает ангиопластика и стентирование коронарных артерий. Первые поколения голометаллических стентов позволили улучшить исходы острого коронарного синдрома, однако их применение ассоциировалось с достаточно высокой частотой повторных ишемических событий, обусловленных рестенозом в области ранее установленного стента, который встречался в 17–41 % случаев [4]. Использование стентов с лекарственным покрытием позволило уменьшить частоту развития повторного сужения сосудов до 6–8 % [5, 6], поэтому их применение стало предпочтительным [7].

Одним из наиболее распространенных типов стентов являются эверолимус-содержащие стенты [8, 9]. Применение стентов данного типа позволило значительно снизить частоту рестенозов и повторной реваскуляризации, однако частота развития отдаленных осложнений остается достаточно высокой (до 13,8 %, среди которых повторная реваскуляризация – 5,7 %) [10]. С целью уменьшения потребности в повторной реваскуляризации разрабатываются различные модификации платформ: более тонкие страты, биодеградируемые покрытия, аблюминальное расположение лекарственного вещества [11]. В клинических исследованиях данные платформы подтвердили свою безопасность и эффективность по сравнению со стентами с постоянным полимером, однако значимого положительного эффекта в плане снижения риска отдаленных осложнений получено не было [12]. Несмотря на успехи в снижении риска повторных инфарктов и реваскуляризации стентированной ранее артерии, частота развития данных осложнений остается достаточно высокой. Рестенозы и тромбозы стентов являются состоянием, на которое влияют

множество факторов, связанных как с процедурой стентирования, так и с самим пациентом [13].

Целью исследования стало изучение факторов, влияющих на развитие отдаленных осложнений стентирования при применении стентов с эверолимус-содержащим лекарственным покрытием.

Материалы и методы исследования

В исследование были включены 126 пациентов от 35 до 80 лет, поступивших в клинику с острым коронарным синдромом без подъема сегмента ST, которым были установлены платина-хром-содержащие эверолимус-покрытые стенты (Promus, *Boston Scientific*; Synergy, *Boston Scientific*). Критериями не включения в исследования были известные системные воспалительные заболевания, в том числе воспалительные заболевания миокарда (эндо-, мио- или перикардиты), наличие онкологического анамнеза, острая сердечная недостаточность на момент поступления (Kilip III–IV), а также наличие почечной или печеночной недостаточности. Все пациенты принимали двойную антиагрегантную терапию аспирином в сочетании с Клопидогрелом либо Тикагрелором, а также высокодозную терапию статинами (Аторвастатин или Розувастатин) при отсутствии противопоказаний. Коронароангиография выполнялась трансрадиальным или трансфеморальным доступом с использованием катетеров 6F и 7F на ангиографических установках Innova 3100 (*General Electrics*) или Allura Xper FD20 (*Phillips*), с записью 6 стандартных проекций для бассейна левой коронарной артерии и 2 проекций для правой коронарной артерии. Лабораторные показатели оценивали на момент госпитализации или через несколько суток после стентирования. Расчет скорости клубочковой фильтрации (СКФ) проводили по уровню креатинина с применением формулы СКД-EPI. Эхокардиография выполнялась на аппарате VIVID 7 (*General Electrics*), оценка структурных и функциональных эхокардиографических показателей выполнялась в соответствии с рекомендациями [14]. Исходы стентирования оценивали через 12 месяцев, под комбинированной конечной точкой подразумевалась смерть, повторный инфаркт миокарда, повторная реваскуляризация стентированной артерии.

Таблица 1

Клинико-анамнестические характеристики пациентов с острым коронарным синдромом без подъема ST, достигших комбинированной конечной точки

Table 1

Clinical and anamnestic characteristics of patients with acute coronary syndrome without ST-segment elevation who reached the combined endpoint

Показатель	Группа больных		p
	с повторной реваскуляризацией стентированной артерии (n=18)	без повторной реваскуляризации стентированной артерии (n=108)	
Возраст, лет	65±12,1	62,8±9,3	0,14
Мужской пол, n (%)	8 (44,4)	77 (71,3)	0,02
Курение, n (%)	8 (47,1)	50 (46,7)	0,97
ИМТ, кг/м ²	27,2±4,7	29,3±5,2	0,09
Сахарный диабет, n (%)	6 (33,3)	25 (23,2)	0,35
Гликированный гемоглобин, %	6,5±1,1	6,6±1,4	0,90
Фибрилляция предсердий, n (%)	4 (22,2)	14 (13,0)	0,30
Хроническая сердечная недостаточность, n (%)	5 (27,8)	42 (38,9)	0,36

Примечание: ФВ ЛЖ – фракция выброса левого желудочка; ИМТ – индекс массы тела; p – достоверность различий.

Протокол исследования был одобрен Локальным этическим комитетом. Исследование выполнено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации. До включения в исследование от всех участников было получено письменное информированное согласие.

Статистический анализ. Обработка данных осуществлялась с использованием программы «SAS 9.4». При сравнении групп использовался однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с проверкой равенства дисперсий с использованием теста Левена для параметрических величин и тест Вилкоксона для непараметрических критериев. Для анализа дискретных величин использовался критерий Фишера. Для выявления порогового уровня исследуемых параметров использовался метод построения классификационных деревьев. Для оценки связи между определенным исходом и фактором риска рассчитывалось отношение шансов (ОШ). При оценке исходов использовался анализ логистической регрессии с оценкой полной модели, пошаговым включением и последовательной выборкой. С целью расчета чувствительности и специфичности полученных математических моделей использовался ROC-анализ.

Результаты исследования и их обсуждение

В течение года после стентирования комбинированной конечной точки достигли 18 (14,3 % случаев) пациентов из 126. В структуре комбинированной конечной точки зафиксировано 2 (1,6 %) летальных исхода, 2 (2,4 %) подтвержденных поздних тромбоза стента, а также 14 повторных реваскуляризаций.

Среди пациентов, достигших конечной точки, чаще встречались женщины, в остальной группы не отличались по основным клинико-анамнестическим показателям. Основные клинические и анамнестические данные пациентов приведены в табл. 1.

По результатам эхокардиографии, в группе повторной реваскуляризации отмечалась более низкая фракция выброса по сравнению с группой без повторной реваскуляризации. По остальным структурным показателям миокарда достоверных различий получено не было. Также не было получено убедительных данных за значимую клапанную патологию, в частности, в исследуемых группах не было ни одного случая патологии аортального клапана, а также тяжелого поражения митрального клапана (митральный стеноз или митральная недостаточность 3-й и более степени). Основные показатели приведены в табл. 2.

При анализе лабораторных данных группы, достигшие и не достигшие конечной точки, не различались по показателям углеводного обмена, маркерам воспаления на момент госпитализации, а также по уровням общего холестерина и липопротеинов низкой плотности. При этом в группе с повторной реваскуляризацией стентированной артерии выявлялся более низкий уровень триглицеридов и холестерина липопротеинов очень низкой плотности (ЛПНП). Кроме того, в группе повторной реваскуляризации выявлялся более высокий уровень высокочувствительного тропонина I, чем в группе без отдаленных осложнений (0,032 (0,007; 0,32) нг/мл в группе повторной реваскуляризации и 0,005 (0,002; 0,022) нг/мл в группе без повторной реваскуляризации соответственно; p=0,005). Основные лабораторные показатели приведены в табл. 3.

К моменту повторной реваскуляризации терапию статинами продолжали принимать 81 % пациентов. Риск развития рестеноза не зависел от факта приема статинов (83,3 % пациентов в группе рестеноза против 78,7 % в контрольной группе, p=0,21). Целевого значения уровня ЛПНП достигли 41,2 % пациентов, при этом пациенты в группе повторной реваскуляризации чаще имели целевой уровень ЛПНП, чем в

Таблица 2

Эхокардиографические показатели пациентов с острым коронарным синдромом без подъема ST, достигших комбинированной конечной точки

Table 2

Echocardiographic parameters of patients with acute coronary syndrome without ST-segment elevation who reached the combined endpoint

Показатель	Группа больных		Р
	с повторной реваскуляризацией стентированной артерии (n=18)	без повторной реваскуляризации стентированной артерии (n=108)	
ИММ ЛЖ, г/м ²	130,6±47,7	113,1±26,6	0,08
ФВ ЛЖ, %	52,2±12,3	58,6±8,9	0,02
КДО ЛЖ, мл	85,2±23,5	90,9±33,8	0,32
Задняя стенка ЛЖ, мм	9,3±1,8	10,7±1,8	0,07
МЖП, мм	11,7±3,3	11,3±1,7	0,44
Давление в ЛА, мм рт. ст.	30±5,3	30,8±11,8	0,30
Наличие митральной регургитации, n (%)	9 (50)	49 (45,3)	0,71
Наличие зон нарушения локальной сократимости или аневризм, n (%)	9 (50)	42 (38,8)	0,37

Примечание: ФВ ЛЖ – фракция выброса левого желудочка; ИММ ЛЖ – индекс массы миокарда левого желудочка; КДО ЛЖ – конечно-диастолический объем левого желудочка; МЖП – межжелудочковая перегородка; ЛА – легочная артерия; р – достоверность различий.

Таблица 3

Лабораторные показатели пациентов с острым коронарным синдромом без подъема сегмента ST, достигших комбинированной конечной точки

Table 3

Laboratory parameters of patients with acute coronary syndrome without ST-segment elevation who reached the combined endpoint

Показатель	Группа больных		Р
	повторная реваскуляризация (n=18), n (%)	без повторной реваскуляризации (n=108), n (%)	
ОХС, ммоль/л	4,5±1,4	4,4±1,1	0,45
ХС ЛПНП, ммоль/л	2,5±1,3	2,3±1,0	0,27
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,4±0,3	1,3±0,3	0,10
ХС ЛПОНП, ммоль/л	0,6±0,2	0,8±0,4	0,006
Триглицериды, ммоль/л	1,3±0,4	1,8±0,9	0,004
Глюкоза, ммоль/л	6,5±1,2	6,4±2,3	0,09
С-реактивный белок, мг/дл	21,9±31,4	6,3±8,7	0,08
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	8,0±2,5	8,0±2,8	0,98
Нейтрофилы, 10 ⁹ /л	5,4±2,3	5,0±2,2	0,78
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	1,9±0,5	2,0±0,6	0,81
рСКФ, мл/мин/1,73м ²	68,5±15,7	76,3±18,2	0,04
Мочевина крови, ммоль/л	7,0±1,9	5,8±1,7	0,03
Высокочувствительный тропонин I, нг/мл	0,032 (0,007; 0,320)	0,005 (0,002; 0,022)	0,005

Примечание: ОХС – общий холестерин; ХС ЛПНП – холестерин липопротеинов низкой плотности; ХС ЛПВП – холестерин липопротеинов высокой плотности; ХС ЛПОНП – холестерин липопротеинов очень низкой плотности; рСКФ – расчетная скорость клубочковой фильтрации; р – достоверность различий.

Таблица 4

**Характеристики сосудистого русла и установленных стентов у пациентов,
достигших комбинированной конечной точки**

Table 4

Characteristics of the vascular bed and implanted stents in patients who reached the combined endpoint

Показатель	Группа больных		P
	повторная реваскуляризация (n=18)	без повторной реваскуляризации (n=108)	
Характер поражения, n (%):			0,40
однососудистое	5 (27,8)	17 (15,7)	
двухсосудистое	3 (16,7)	26 (24,1)	
многососудистое	10 (55,6)	65 (60,2)	
Показатель Syntax score	19,1±10,4	20,8±10,0	0,50
Диаметр стента, мм	2,8±0,4	3,0±0,5	0,13
Длина стентированного сегмента, мм	36,9±22,6	35,2±21,5	0,87

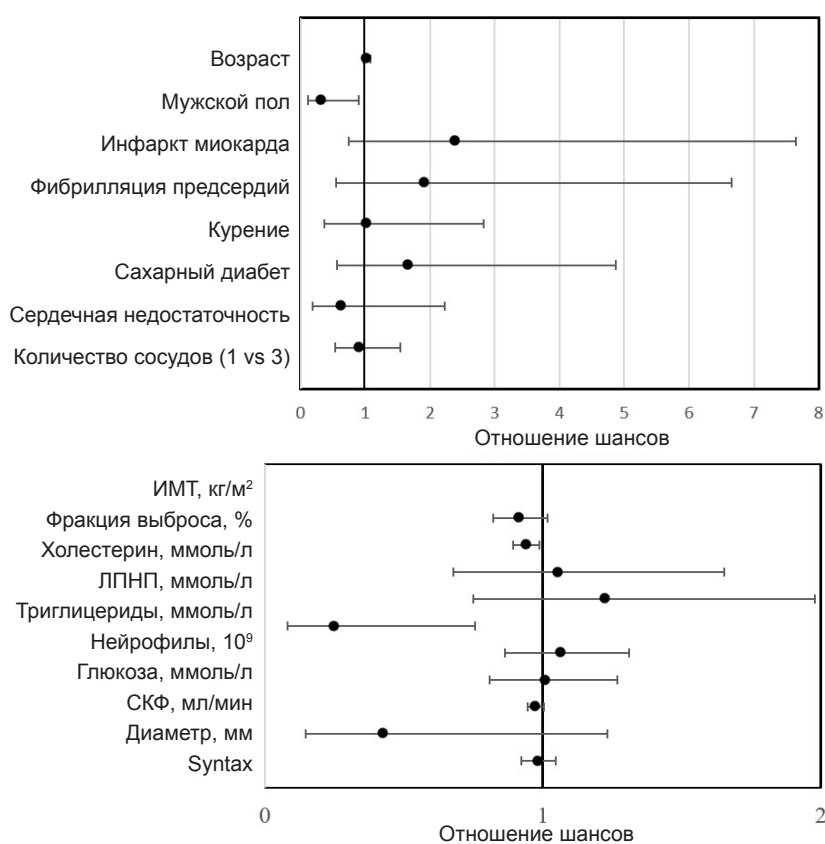


Рис. 1. Факторы, влияющие на риск развития комбинированной конечной точки по данным логического регрессионного анализа

Fig. 1. Factors influencing the risk of developing a combined endpoint according to logical regression analysis

Таблица 5

**Факторы, ассоциированные с развитием конечной точки по данным многофакторного
регрессионного анализа**

Table 5

Factors associated with the development of the endpoint according to multivariate regression analysis

Фактор	B	Стандартная ошибка	χ^2 Вальда	ОШ	95 % ДИ	p
Триглицериды	-1,83	0,683	7,19	0,16	0,04–0,61	0,007
Сахарный диабет	0,64	0,32	4,06	3,63	1,03–12,75	0,043
Расчетная скорость клубочковой фильтрации	-0,04	0,018	4,10	0,97	0,93 – 0,99	0,042

группе без реваскуляризации (10 (55,6 %) пациентов и 42 (38,9 %) пациентов соответственно; $p=0,18$)

Комбинированная конечная точка не зависела от числа пораженных артерий, степени поражения коронарного русла по данным SYNTAX Score, а также от геометрических характеристик установленного стента (табл. 4).

По результатам регрессионного анализа, на исходы стентирования не влияли возраст пациентов, наличие сахарного диабета или инфаркта миокарда на момент стентирования. Наиболее значимыми факторами, влияющими на развитие сужения стентированного сегмента, стали женский пол (ОШ 3,1; 95 % ДИ 1,12–8,60; $p=0,03$), уровень фракции выброса левого желудочка по Simpson (ОШ 0,94; 95 % ДИ 0,90–0,99; $p=0,01$ при увеличении фракции выброса на 1 %), а также уровень триглицеридов на момент госпитализации пациента в стационар (ОШ 0,25; 95 % ДИ 0,08–0,76; $p=0,01$). При построении классификационных деревьев методом CHAIDS узловым значением триглицеридов, определяющим исходы стентирования коронарных артерий, является 1,64 ммоль/л ($p=0,03$).

По данным логистической регрессии, наибольшее влияние на развитие комбинированной конечной точки оказали наличие сахарного диабета на момент госпитализации, уровень скорости клубочковой фильтрации, а также более низкий уровень триглицеридов на момент поступления в стационар (чувствительность модели – 64,7 %, специфичность – 73,5 %, $AUC=0,792$).

Известно, что на риск развития отдаленных осложнений стентирования влияют множество факторов, которые можно разделить на три группы: особенности стента; факторы, связанные с процедурой стентирования, а также клинко-анамнестические особенности пациента [13, 15]. В результате нашего исследования выявлена ассоциация женского пола с увеличением частоты неблагоприятных исходов. Стоит отметить, что в исследуемой группе женщины были старше мужчин ($69,4 \pm 8,2$ лет для женщин, $60,0 \pm 8,9$ года для мужчин, $p<0,0001$), у них чаще в анамнезе встречался сахарный диабет (15 (36,6 %) женщин и 16 (18,8 %) мужчин, $p=0,03$), а также отмечалась более низкая расчетная скорость клубочковой фильтрации ($64,3 \pm 16,5$ и $80,5 \pm 16,4$ мл/мин/1,73 м²; $p<0,0001$). Наиболее вероятно, повышение частоты первичных конечных точек для женщин ассоциировано именно с коморбидной патологией. При многофакторном анализе пол пациента не оказал влияния на исходы стентирования. В ряде крупных когортных исследований также показано, что женский пол ассоциировался с повышением частоты неблагоприятных исходов. В исследовании J. Nicolas et al. [16], изучавшем отдаленные результаты 5000 сложных стентирований, женщины достоверно чаще достигали больших сердечно-сосудистых событий, чем мужчины (14 против 11,6 %; $p=0,02$). У женщин также был выше риск повторного инфаркта миокарда по сравнению с мужчинами. В большинстве исследований при сопоставлении пациентов по возрасту и сопутствующей патологии влияние пола было нивелировано, и

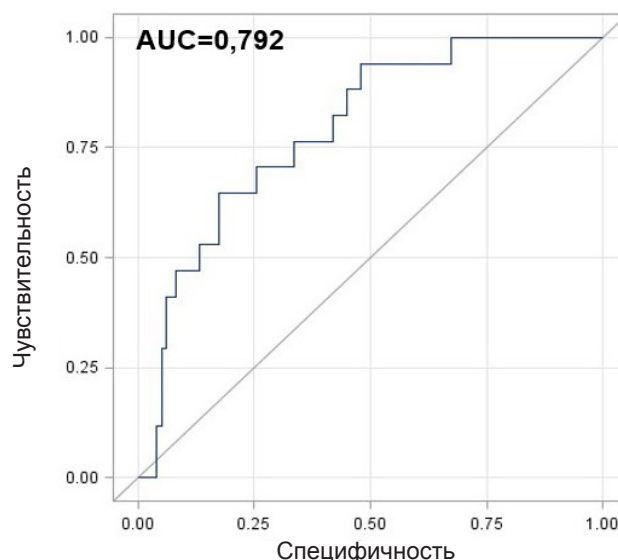


Рис. 2. Чувствительность и специфичность модели прогнозирования риска развития комбинированной конечной точки после стентирования коронарной артерии эверолиму-покрытыми стентами по поводу острого коронарного синдрома без подъема сегмента ST

Fig. 2. Sensitivity and specificity of a model for predicting the risk of developing a combined endpoint after coronary stenting with everolimus-eluted stents for acute coronary syndrome without ST-segment elevation

достоверных различий в группах получено не было [17, 18]. Однако даже среди женщин моложе 50 лет частота неблагоприятных сердечно-сосудистых событий после стентирования в ряде исследований превышает таковую для мужчин соответствующего возраста [19].

Особый интерес представляют клинические факторы, которые могут оказать влияние на риск повторной реваскуляризации после стентирования. Сахарный диабет является известным фактором, влияющим на развитие патологического сосудистого ремоделирования коронарной артерии [20, 21]. Риск рестеноза стента с лекарственным покрытием при наличии сахарного диабета достигает 10–15 % [22]. Еще одним фактором, влиявшим на необходимость повторной реваскуляризации, стала расчетная скорость клубочковой фильтрации. Известно, что тяжелая патология почек со снижением СКФ <30 мл/мин/1,73 м² является независимым предиктором неблагоприятных исходов при остром коронарном синдроме вне зависимости от тактики ведения пациента [23]. В то же время даже умеренная хроническая болезнь почек является фактором риска повторной реваскуляризации, в особенности в отдаленном периоде [24].

Довольно неожиданным оказалось выявление более низких значений триглицеридов на момент индексного события у пациентов, которым потребовалась повторная реваскуляризация. Этот факт кажется противоречащим традиционному представлению о неблагоприятном влиянии гипертриглицеридемии на исходы сердечно-сосудистой патологии. Так, в ряде работ было показано, что повышенный уровень триглицеридов может неблагоприятно влиять на поздние осложнения стентирования, особенно у пациентов с сахарным диабетом и при установке

голометаллических стентов [25, 26]. Однако стоит отметить, что в одной из работ [27] обнаружена связь более низкого уровня триглицеридов на момент поступления с неблагоприятным прогнозом как в ранние, так и в отдаленные сроки после стентирования по поводу острого коронарного синдрома с подъемом сегмента ST. В исследование были включены 247 пациентов, среди них 163 в группе с низким уровнем триглицеридов (менее 1,7 ммоль/л) и 84 – с высоким (более 1,7 ммоль/л). В ходе госпитализации 3,7 % пациентов из группы с низким уровнем триглицеридов умерли от осложнений, при 0 % в группе с высоким уровнем триглицеридов. В дальнейшем комбинированной конечной точки достигли 41 пациент (26,1 %) из группы низкого уровня триглицеридов и 10 (11,9 %) из группы с более высоким уровнем. По данным регрессионного анализа показано, что уровень триглицеридов является негативным предиктором риска повторной реваскуляризации и больших кардиологических событий (ОШ 0,993; 95 % ДИ 0,988–0,998; $p=0,007$). Такая же закономерность отмечена и при стентировании пациентов с ОКСбпST [28]. В исследование О. А. Khawaja et al. были включены 517 пациентов с ОКСбпST, из них 395 пациентов с низким уровнем триглицеридов и 124 с высоким уровнем. Через 3 года наблюдения смертность от всех причин была выше в группе с низким уровнем триглицеридов (13,4 и 5,6 % соответственно, $p=0,016$), а низкий уровень триглицеридов, по данным многофакторного анализа, являлся независимым фактором увеличения смертности (ОШ 2,5; 95 % ДИ 1,04–5,9; $p=0,04$). Данный эффект может объясняться, в том числе, составом жирных кислот, входящих в структуру триглицеридов. В исследовании В. Bermúdez et al. [29] показано, что хиломикроны, содержащие в своем составе триглицериды, входящие в состав сливочного масла, вызывают активацию генов, отвечающих за пролиферацию гладких миоцитов и воспаления, а триглицериды после употребления оливкового масла, напротив, снижают активность этих генов *in vitro*. Также свой вклад в развитие сужения стентированного сосуда может вносить изменение уровня сыровоточных триглицеридовых липаз, активность которых ассоциируется с риском рестеноза [30]. Возможно, что умеренная гипертриглицеридемия оказывает протективный эффект в отношении риска повторной реваскуляризации у пациентов с ОКС без подъема сегмента ST с установленным эверолимуc-покрытым стентом. Подобный эффект может быть ассоциирован с типом лекарственного покрытия, что требует продолжения исследований.

Данное исследование имеет определенные ограничения в связи с небольшим объемом выборки, что не позволило выявить различий в исходах стентирования различными типами эверолимуc-покрытых стентов. Тем не менее получены сведения о значении ряда клинико-лабораторных показателей (сахарный диабет, низкий уровень триглицеридов) в отношении риска рестеноза после стентирования. Не исключено, что выявленное в нашей работе негативное влияние более низкого уровня триглицеридов на исходы стентирования относится только к эверолимуc-покрытым

стентам. Несомненно, влияние триглицеридов на исходы стентирования требует дальнейшего изучения.

Заключение

При применении эверолимуc-покрытых стентов при остром коронарном синдроме без подъема сегмента ST частота больших сосудистых событий достигает 14,3 %. Одними из основных факторов, влияющих на риск сужения просвета эверолимуc-покрытых стентов, являются сахарный диабет, снижение скорости клубочковой фильтрации и низкий уровень триглицеридов крови. Требуется индивидуально подходить к снижению уровня триглицеридов у пациентов с острым коронарным синдромом после проведенного коронарного стентирования.

Финансирование / Acknowledgments

Исследование инициировано авторами. Работа выполнена в рамках темы государственного задания «Совершенствование методов, направленных на ограничение ишемического повреждения миокарда и головного мозга и выявление механизмов эффективного функционального восстановления», № гос. регистрации АААА-А18-118070690075-6. / Research initiated by the authors. The work was carried out within the framework of the topic of the state assignment «Improvement of methods aimed at limiting ischemic damage to the myocardium and brain and identifying the mechanisms of effective functional recovery», № state. registration АААА-А18-118070690075-6.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Литература / References

1. Шальнова С. А., Драпкина О. М. Тренды смертности от болезней системы кровообращения и злокачественных новообразований у российских мужчин и женщин 2000–2016 гг. // Рационал. фармакотерапия в кардиологии. – 2019. – Т. 15. – С. 77–83. [Shalnova SA, Drapkina OM. The Trends of Cardiovascular and Cancer Mortality in Russian Men and Women from 2000 to 2016 years. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology* 2019;15(1):77–83. (In Russ.).] Doi: 10.20996/1819-6446-2019-15-1-77-83
2. Neumann JT, Gößling A, Sörensen NA, Blankenberg S, Magnussen C, Westermann D. Temporal trends in incidence and outcome of acute coronary syndrome. *Clinical Research in Cardiology*. 2020;(1):7. Doi: 10.1007/s00392-020-01612-1
3. Collet JP, Thiele H, Barbato E, Barthélémy O, Bauersachs J, Bhatt D. L et al. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation The Task Force for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*. 2020. Doi: 10.1093/eurheartj/ehaa575.
4. Agostoni P, Valgimigli M, Biondi-Zoccai GG, Abbate A, Garcia HMG, Anselmi M et al. Clinical effectiveness of bare-metal stenting compared with balloon angioplasty in total coronary occlusions: insights from a systematic overview of randomized trials in light of the drug-eluting stent era. *American heart journal*. 2006;3(151):682–689. Doi: 10.1016/j.ahj.2005.05.001.

5. Pleva L, Kukla P, Hlinomaz O. Treatment of coronary in-stent restenosis: a systematic review. *Journal of geriatric cardiology*. JGC. 2018;15(2):173.
6. Nakamura K, Keating JH, Edelman ER. Pathology of endovascular stents. *Interventional cardiology clinics*. 2016; 5(3):391. Doi: 10.11909 %2Fj.issn.1671-5411.2018.02.007.
7. Neumann FJ, Sousa-Uva M, Ahlsson A, Alfonso F, Banning AP, Benedetto U et al. 2018 ESC/EACTS guidelines on myocardial revascularization. *European heart journal*. 2019; 2(40):87–165. Doi: 10.1093/eurheartj/ehy394.
8. Thakkar AS, Dave BA. Revolution of drug-eluting coronary stents: an analysis of market leaders. *Eur Med J*. 2016; 1(4):114–125.
9. Дыгай А. М. К вопросу об антипролиферативном покрытии коронарных стентов // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2018. – Т. 22, № 2. – С. 22–29. [Digay AM. On the question of the antiproliferative coating of coronary stents. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya*. *Circulation Pathology and Cardiac Surgery*. 2018;22(2):22–29. (In Russ.)]. Doi: 10.21688/1681-3472-2018-2-22-29.
10. Kalesan B, Stefanini GG, Räber L, Schmutz M, Baumgartner S, Hitz S et al. Long-term comparison of everolimus- and sirolimus-eluting stents in patients with acute coronary syndromes. *JACC: Cardiovascular Interventions*. 2012;2(5):145–154. Doi: 10.1016/j.jcin.2011.11.005
11. Bennett J, Dubois C. A novel platinum chromium everolimus-eluting stent for the treatment of coronary artery disease. *Biologics: targets & therapy*. 2017;(7):149. Doi: 10.2147/btt.s34939.
12. Kereiakes DJ, Meredith IT, Windecker S, Lee Jobe R, Mehta SR, Sarembock IJ et al. Efficacy and safety of a novel bioabsorbable polymer-coated, everolimus-eluting coronary stent: the EVOLVE II Randomized Trial. *Circulation: Cardiovascular Interventions*. 2015;(4):8. Doi: 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.114.002372.
13. Buccheri D, Piraino D, Andolina G, Cortese B. Understanding and managing in-stent restenosis: a review of clinical data, from pathogenesis to treatment. *Journal of thoracic disease*. 2016;8(10):1150–162. Doi: 10.21037/jtd.2016.10.93.
14. Рекомендации по количественной оценке структуры и функции камер сердца // Рос. кардиол. журн. – 2012. – № 3 (прил.). – 28 с. [Rekomendacii po kolichestvennoj ocenke struktury i funkcii kamer serdca. *Ros. kardiolog. zhurn.* 2012; (3 (pril.)):28. (In Russ.)].
15. de la Torre-Hernández JM, Alfonso F, Hernández F, Elizaga J, Sanmartín M, Pinar E et al. Drug-eluting stent thrombosis: results from the multicenter Spanish registry ESTROFA. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;51(10):986–990. Doi: 10.1016/j.jacc.2007.10.057
16. Nicolas J, Claessen BE, Cao D, Chiarito M, Sartori S, Qiu H et al. A sex paradox in clinical outcomes following complex percutaneous coronary intervention. *International journal of cardiology*. 2020;1-7. Doi: 10.1016/j.ijcard.2020.11.067
17. Stefanini GG, Kalesan B, Pilgrim T, Räber L, Onuma Y, Silber S et al. Impact of sex on clinical and angiographic outcomes among patients undergoing revascularization with drug-eluting stents. *JACC: Cardiovascular interventions*. 2012;5(3):30–310. Doi: 1016/j.jcin.2011.11.011
18. Mikhail GW, Gerber RT, Cox DA, Ellis SG, Lasala JM, Ormiston JA et al. Influence of sex on long-term outcomes after percutaneous coronary intervention with the paclitaxel-eluting coronary stent: results of the «TAXUS Woman» analysis. *JACC: Cardiovascular Interventions*. 2010;3(12):1250–1259. Doi: 10.1016/j.jcin.2010.08.020
19. Epps KC, Holper EM, Selzer F, Vlachos HA, Gualano SK, Abbott JD et al. Sex differences in outcomes following percutaneous coronary intervention according to age. *Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes*. 2016;9(2):16–25. Doi: 10.1161/CIRCOUTCOMES.115.00248.2
20. Шкала оценки риска развития рестеноза в стенках с лекарственным покрытием/ З. А. Габбасов, И. С. Мельников, С. В. Бязрова, С. Г. Козлов // Рос. кардиолог. журнал. – 2018. – № 9. [Gabbasov ZA, Melnikov IS, Byazrova SV, Kozlov SG. Risk assessment score for drug eluting stent restenosis. *Russian Journal of Cardiology*. 2018;(9):23–27. (In Russ.)]. Doi: 10.15829/1560-4071-2018-9-23-27
21. Choi IJ et al. Predictors of Early and Late Target Lesion Revascularization after Drug-Eluting Stent Implantation. *Journal of Interventional Cardiology*. 2013;26(2):137–144. Doi: 10.1111/joic.12001.
22. Paramasivam G, Devasia T, Ashwal Jayaram AR, Rao MS, Vijayvergiya R, Nayak K. In-stent restenosis of drug-eluting stents in patients with diabetes mellitus: Clinical presentation, angiographic features, and outcomes. *Anatolian journal of cardiology*. 2020;1(23):28. Doi: 10.14744 %2FAnatolJCardiol.2019.72916.
23. Bae EH, Lim SY, Cho KH, Choi JS, Kim CS, Park JW et al. GFR and cardiovascular outcomes after acute myocardial infarction: results from the Korea Acute Myocardial Infarction Registry. *American journal of kidney diseases*. 2012;59(6):79–802. Doi: 10.1053/j.ajkd.2012.01.016.
24. Charytan D, Forman JP, Cutlip DE. Risk of target lesion revascularization after coronary stenting in patients with and without chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2007;22(9):2578–2585. Doi: 10.1093/ndt/gfm241.
25. Kim JS et al. Impact of metabolic syndrome on in-stent restenosis and clinical outcomes after percutaneous coronary stent implantation. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2010;88(3):38–41. Doi: 10.1016/j.diabres.2010.03.024.
26. Kundi H et al. Is in-stent restenosis after a successful coronary stent implantation due to stable angina associated with TG/HDL-C ratio?. *Angiology*. 2017;68(9):816–822. Doi: 10.1177 %2F0003319716689366.
27. Cheng YT, Liu TJ, Lai HC, Lee WL, Ho HY, Su CS et al. Lower serum triglyceride level is a risk factor for in-hospital and late major adverse events in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention-a cohort study. *BMC cardiovascular disorders*. 2014;1(14):143. Doi: 10.1186 %2F1471-2261-14-143.
28. Khawaja OA, Hatahet H, Cavalcante J, Khanal S, Al-Mallah MH. Low admission triglyceride and mortality in acute coronary syndrome patients. *Cardiology journal*. 2011; 3(18):297–303. PMID: 21660920.
29. Bermúdez B, López S, Pacheco YM, Villar J, Muri-ana FJ, Hoheisel JD. Influence of postprandial triglyceride-rich lipoproteins on lipid-mediated gene expression in smooth muscle cells of the human coronary artery. *Cardiovascular research*. 2008;2(79):294–303. Doi: 10.1093/cvr/cvn082.
30. Yu X et al. Serum Triglyceride Lipase Concentrations are Independent Risk Factors for Coronary Artery Disease and In-Stent Restenosis. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2019;46821. Doi: 10.5551 %2Fjat.46821.

Информация об авторах

Трусов Иван Сергеевич – врач-кардиолог приемного отделения № 1 НИИ хирургии и неотложной медицины, ассистент кафедры терапии факультетской с курсом эндокринологии, кардиологии и функциональной диагностики с клиникой, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, ORCID: 0000-0002-4869-2195, e-mail: trus-medic@rambler.ru.

Нифонтов Евгений Михайлович – д-р мед. наук, профессор кафедры терапии факультетской с курсом эндокринологии, кардиологии и функциональной диагностики с клиникой, заведующий лабораторией неотложной кардиологии НИИ сердечно-сосудистых заболеваний НКИЦ, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: nifontovem@1spbgmu.ru.

Бирюков Алексей Владимирович – канд. мед. наук, зав. отделением рентгенохирургических методов диагностики и лечения № 1 НИИ хирургии и неотложной медицины, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, ORCID: 0000-0003-2872-5663, e-mail: m.l.m@bk.ru.

Базунов Алексей Константинович – врач-рентгеноэндоваскулярный хирург отделения рентгенохирургических методов диагностики и лечения № 1 НИИ хирургии и неотложной медицины, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: bazunovak@yandex.ru.

Information about authors

Trusov Ivan S. – Cardiologist of the admission department of the Research Institute of Surgery and Emergency Medicine, Assistant of the Faculty Therapy Department, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, ORCID: 0000-0002-4869-2195, e-mail: trus-medic@rambler.ru.

Nifontov Evgeniy M. – PhD, professor, Professor of the Faculty Therapy Department, Head of the Emergency Cardiology Laboratory of the Research Institute of Cardiovascular Diseases, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, e-mail: nifontovem@1spbgmu.ru.

Biryukov Alexey V. – Cand. Of Sci (Med.), Head of the Department of X-ray Surgical Diagnostic and Treatment Methods No. 1 of the Research Institute of Surgery and Emergency Medicine, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, ORCID: 0000-0003-2872-5663, e-mail: m.l.m@bk.ru.

Bazunov Alexey K. – doctor of the department of x-ray diagnostic methods and treatment No. 1 of the Research Institute of Surgery and Emergency Medicine, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, e-mail: bazunovak@yandex.ru.

УДК 615.015.2: 612.146.3:612.146:616.151.4-073.213:599.323.45
DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-71-76

А. В. СИДЕХМЕНОВА, О. И. АЛИЕВ, А. М. АНИЩЕНКО,
О. И. ДУНАЕВА, М. Б. ПЛОТНИКОВ

Влияние совместного введения метопролола и дигидро-кверцетина на реологические свойства крови крыс SHR

Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е. А. Гольдберга, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия
634028, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 3
E-mail: mbp2001@mail.ru

Статья поступила в редакцию 09.07.20; принята к печати 25.12.20

Резюме

Введение. Синдром повышенной вязкости крови играет важную роль в патогенезе артериальной гипертензии и ее осложнений, связанных с нарушением микроциркуляции в органах-мишенях. Поэтому, наряду с применением антигипертензивных препаратов, важно уделять внимание коррекции синдрома повышенной вязкости крови с помощью гемореологических средств. **Цель** – изучить влияние метопролола и его совместного применения с дигидрокверцетином (ДГК) на реологические параметры крови у крыс со спонтанной артериальной гипертензией. **Материалы и методы.** Эксперименты проведены на крысах самцах со спонтанной артериальной гипертензией линии SHR и нормотензивных крысах-самцах линии Wistar-Kyoto. Крысы SHR опытных групп получали метопролол (50 мг/кг) или метопролол и ДГК (по 50 мг/кг) ежедневно внутривентрикулярно в течение 6 недель в 1%-й крахмальной слизи; крысы SHR контрольной группы и нормотензивные крысы получали эквивалентно 1%-ю крахмальную слизь по той же схеме. Системное артериальное давление регистрировали у бодрствующих животных. Кровь для исследований забирали из общей сонной артерии. Определяли вязкость цельной крови и плазмы, гематокрит, агрегацию и деформируемость эритроцитов. **Результаты.** По сравнению с показателями у нормотензивных крыс, у крыс SHR выявлено достоверное повышение вязкости крови, гематокрита, агрегации эритроцитов и снижение деформируемости эритроцитов. Курсовое введение метопролола приводило к дальнейшему увеличению вязкости крови на низких скоростях сдвига ($15\text{--}45\text{ с}^{-1}$); вязкость плазмы, гематокрит и микрореологические показатели у крыс этой группы существенно не отличались от показателей в контроле. При совместном введении метопролола и ДГК вязкость крови на скоростях сдвига 300 и 450 с^{-1} и агрегационная активность эритроцитов были статистически значимо ниже, чем у контрольных крыс SHR. **Выводы.** Метопролол при курсовом введении спонтанно гипертензивным крысам усиливает выраженность синдрома повышенной вязкости крови. Применение ДГК совместно с метопрололом частично устраняет неблагоприятные эффекты бета-блокатора на показатели реологии крови.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, реологические свойства крови, метопролол, дигидрокверцетин

Для цитирования: Сидехменова А. В., Алиев О. И., Анищенко А. М., Дунаева О. И., Плотников М. Б. Влияние совместного введения метопролола и дигидрокверцетина на реологические свойства крови крыс SHR. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2021;20(1):71–76. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-71-76.

UDC 615.015.2: 612.146.3:612.146:616.151.4-073.213:599.323.45
DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-71-76

A. V. SIDEKHMENOVA, O. I. ALIEV, A. M. ANISHCHENKO,
O. I. DUNAEVA, M. B. PLOTNIKOV

Effect of the combined administration of metoprolol and dihydroquercetin on the rheological properties of blood in spontaneously hypertensive rats (SHRs)

Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia
3, Lenina pr., Tomsk, Russia, 634028
E-mail: mbp2001@mail.ru

Received 09.07.20; accepted 25.12.20

Summary

Introduction. Hyperviscosity syndrome plays an important role in the pathogenesis of arterial hypertension and its complications associated with impaired microcirculation in target organs. Therefore, along with the use of antihypertensive drugs, it is important to pay attention to the correction of the hyperviscosity syndrome with means of hemorheological agents. **The aim** is to study the effect of metoprolol and its combined use with dihydroquercetin (DHQ) on the rheological parameters of blood in rats with spontaneous arterial hypertension. **Materials and methods.** The experiments were carried out on normotensive male Wistar-Kyoto (WKY) rats and spontaneously hypertensive rats (SHRs). SHRs of the experimental groups received metoprolol (50 mg/kg) or metoprolol and DHQ (50 mg/kg each) daily intragastrically for 6 weeks in 1 % starch mucus; SHRs of the control group and normotensive rats received 1 % starch mucus according to the same scheme. Systemic blood pressure was registered in awake animals. Blood was sampled from the catheterized right common carotid artery. Blood viscosity, plasma viscosity, hematocrit, erythrocyte aggregation and deformability

were studied. *Results.* Compared with the parameters in normotensive rats, SHR showed significant increase of blood viscosity, hematocrit, erythrocyte aggregation, and decrease of erythrocyte deformability. The course administration of metoprolol induced to a further increase in blood viscosity at low shear rates ($15\text{--}45\text{ s}^{-1}$); plasma viscosity, hematocrit and micro-rheological parameters in rats of this group did not significantly differ from those in the control. With the combined administration of metoprolol and DHQ, blood viscosity at shear rates of 300 and 450 s^{-1} and erythrocyte aggregation were significantly lower than in the control SHR. *Conclusions.* The course administration of metoprolol increases the severity of the hyperviscosity syndrome in SHR. The use of DHQ together with metoprolol partially eliminates adverse effects of the beta blocker on blood rheology parameters.

Keywords: arterial hypertension, rheological properties of blood, metoprolol, dihydroquercetin

For citation: Sidekhmenova A. V., Aliev O. I., Anishchenko A. M., Dunaeva O. I., Plotnikov M. B. Effect of the combined administration of metoprolol and dihydroquercetin on the rheological properties of blood in spontaneously hypertensive rats (SHRs). *Regional blood circulation and microcirculation* 2021;20(1):71–76. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-71-76.

Введение

В настоящее время для лечения артериальной гипертензии используют пять основных классов антигипертензивных препаратов: ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, антагонисты рецепторов к ангиотензину II (AT1-подтип), блокаторы медленных кальциевых каналов, диуретики и бета-адреноблокаторы [1]. Несмотря на широкий спектр антигипертензивных препаратов с различными механизмами действия, проблема управления уровнем артериального давления и развития сердечно-сосудистых осложнений до конца не решена [2, 3]. В многочисленных клинических и экспериментальных исследованиях было показано, что при артериальной гипертензии происходят нарушения гемореологических параметров [4–6]. Синдром повышенной вязкости крови играет важную роль в патогенезе формирования осложнений артериальной гипертензии, связанных с нарушением микроциркуляции в органах-мишенях [4, 7, 8]. В связи с этим представляется целесообразным изучение влияния антигипертензивных препаратов на реологические свойства крови и перспективы использования средств с гемореологической активностью в комплексной терапии артериальной гипертензии.

Бета-блокаторы в качестве терапии артериальной гипертензии начали использовать в конце 1960-х гг. [9]. Фармакологические эффекты данной группы препаратов направлены на снижение сердечного выброса за счет уменьшения частоты и силы сердечных сокращений. Бета-блокаторы также угнетают секрецию ренина, тормозят центральную вазомоторную активность [10]. Влияние бета-блокаторов на реологические свойства крови мало изучено, и их эффекты неоднозначны [11].

Флавоноид дигидрокверцетин (ДГК) обладает гемореологической активностью и способен снижать вязкость крови, ослаблять агрегацию эритроцитов и повышать их деформируемость [12]. Эффективность применения ДГК или его комплекса с аскорбиновой кислотой для коррекции гемореологических нарушений была показана на моделях сердечно-сосудистых заболеваний [13, 14] и в клинической практике [15–17].

Цель работы – изучить влияние метопролола и его совместного применения с ДГК на реологические параметры крови у крыс со спонтанной артериальной гипертензией.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на животных категории SPF: 8 нормотензивных крысах-самцах линии Wistar-Kyoto (WKY) и 20 гипертензивных крысах-самцах линии SHR, полученных из вивария ИБХ

РАН, г. Пущино. Крысы линии SHR являются общепринятой моделью для изучения развития эссенциальной артериальной гипертензии и ее осложнений [18]. В виварии НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга животные содержались в неполной барьерной системе при следующих параметрах окружающей среды: температура – $20\text{--}24\text{ }^{\circ}\text{C}$, относительная влажность – $50\pm 20\%$, воздухообмен – 12–15 объемов помещения в час, световой режим – 12:12 ч. Содержание животных и уход за ними осуществлялись в соответствии с правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986 г.). Протокол исследования утвержден Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных НИИФиРМ им. Е. Д. Гольдберга (протокол № 166092019). Животных включали в эксперимент после достижения возраста 12 недель. Масса крыс SHR на момент включения в эксперимент составляла $227\pm 2\text{ г}$, масса крыс WKY составляла $263\pm 5\text{ г}$.

Крысы SHR были рандомизированно разделены на контрольную и опытные группы. Крысам SHR опытных групп внутривенно вводили метопролол (Эгилок®, ЗАО «Фармацевтический завод ЭГИС», Венгрия) 50 мг/кг и совместно метопролол (50 мг/кг) и ДГК (Лавитол® пищевой, ЗАО «Аметис», Россия) (50 мг/кг) в 1 %-й крахмальной слизи ежедневно в течение 6 недель. Последнее введение веществ осуществляли за 3 ч до измерения исследуемых показателей. Выбор доз исследуемых препаратов обоснован ранее проведенными исследованиями [19, 20]. Крысы WKY и крысы SHR контрольной группы получали эквивалентное количество крахмальной слизи по той же схеме.

Системное артериальное давление регистрировали неинвазивным методом на хвосте у бодрствующих животных с помощью системы измерения артериального давления у мелких животных NIBP200A (Biopac Systems, Inc., США). Запись и обработка данных производилась на компьютере с помощью программы «AcqKnowledge 4.2 for MP150».

Кровь для исследований забирали через катетер из общей сонной артерии у наркотизированных животных (тиопентал натрия (ОАО «Синтез», Россия), 80 мг/кг). Кровь стабилизировали 2 % K_2EDTA (Sigma-Aldrich, Германия) в соотношении 20 мкл антикоагулянта на 1 мл крови. Вязкость цельной крови (в диапазоне скоростей сдвига $15\text{--}450\text{ c}^{-1}$) и плазмы (450 c^{-1}) измеряли на ротационном вискозиметре (LVDV-II+ Pro, CP40, Brookfield Engineering Labs Inc., США) при $36\text{ }^{\circ}\text{C}$. Гематокрит определяли методом центрифугирования в стеклянных капиллярах при 1300 г в течение 20 мин (центрифуга PC-6) и выражали в

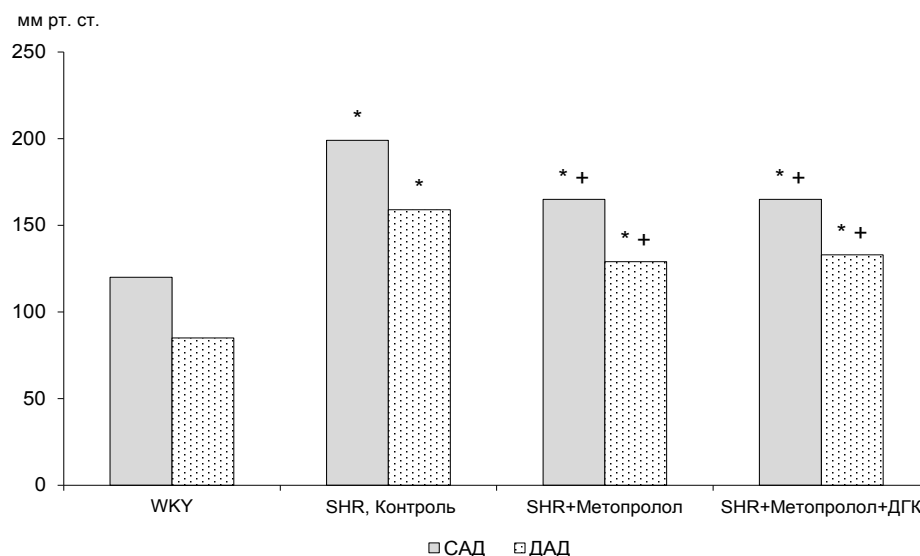


Рис. 1. Влияние курсового внутрижелудочного введения метопролола и метопролола совместно с ДГК на систолическое (САД) и диастолическое (ДАД) артериальное давление у крыс SHR: * – достоверные различия по сравнению со значениями у крыс WKY ($p < 0,05$); + – достоверные различия по сравнению со значениями у крыс SHR контрольной группы ($p < 0,05$)

Fig. 1. Effect of intragastric course administration of metoprolol and metoprolol with DHQ on the systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressure in SHRs: * – significant differences compared with the values in WKY rats ($p < 0.05$); + – significant differences compared with the values in the control group SHRs ($p < 0.05$)

Таблица 1

Влияние курсового внутрижелудочного введения метопролола и метопролола совместно с ДГК на вязкость плазмы (ВП), гематокрит (Ht) и показатели агрегации эритроцитов в сдвиговом потоке (Ct и Cs) у крыс SHR

Table 1

Effect of intragastric course administration of metoprolol and metoprolol with DHQ on the plasma viscosity, hematocrit and indices of erythrocyte aggregation in shear flow (Ct and Cs) in SHRs

Группа	ВП, мПа·с	Ht	Ct, с	Cs, мПа
WKY (n=8)	1,06±0,01	42±1	16,1±0,6	90,3±3,2
SHR, контроль (n=8)	1,08±0,01	49±1*	11,4±0,7*	131,1±2,6*
SHR+Метопролол (n=6)	1,07±0,01	49±1*	12,3±0,6*	130,7±4,7*
SHR+Метопролол+ДГК (n=6)	1,09±0,01	48±1*	13,7±0,4*+	115,2±4,4*+

* – достоверные различия по сравнению со значениями у крыс WKY ($p < 0,05$); + – достоверные различия по сравнению со значениями у крыс SHR контрольной группы ($p < 0,05$).

процентах. Агрегацию и деформируемость эритроцитов исследовали на анализаторе «RheoScan-AnD 300» (Rheo Meditech, Inc., Республика Корея). Этаназию производили в CO_2 -камере.

Анализ данных проводили с использованием пакета статистических программ «Statistica 8.0». Данные представлены в виде «среднее значение ± стандартная ошибка среднего значения». Для оценки достоверности различий использованы непараметрические критерии Краскела – Уоллиса и Манна – Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

Перед началом эксперимента значения САД/ДАД у крыс WKY и SHR в возрасте 12 недель составляли $123 \pm 6/88 \pm 3$ мм рт. ст. и $167 \pm 3/127 \pm 3$ мм рт. ст. соответственно. К 18-й неделе эксперимента у крыс SHR контрольной группы САД и ДАД достигали значений 199 ± 4 и 159 ± 4 мм рт. ст. и были статистически

значимо выше, чем у крыс WKY, на 27 и 30 % соответственно (рис. 1).

По сравнению с показателями у нормотензивных крыс WKY, у крыс SHR контрольной группы выявлено достоверное повышение вязкости крови в диапазоне скоростей сдвига $30\text{--}450\text{ с}^{-1}$, гематокрита, увеличение агрегации эритроцитов (снижение Ct и увеличение Cs) и уменьшение деформируемости эритроцитов (снижение индекса элонгации эритроцитов при напряжениях сдвига 1 и 3 Па) (табл. 1; 2; рис. 2).

Курсовое введение метопролола крысам SHR статистически значимо снижало показатели САД и ДАД на 17 и 19% соответственно по сравнению с контролем (рис. 1). Снижение САД и ДАД после введения метопролола в дозе 50 мг/кг не достигало уровня давления у нормотензивных животных. Значения вязкости крови после курсового введения метопролола статистически значимо не отличались от значений

Влияние курсового внутрижелудочного введения метопролола и метопролола совместно с ДГК на индекс элонгации эритроцитов у крыс SHR

Table 2

Effect of intragastric course administration of metoprolol and metoprolol with dihydroquercetin on erythrocyte elongation index in SHR

Группа	Напряжение сдвига, Па	
	1	3
WKY (n=8)	0,221±0,003	0,364±0,003
SHR, контроль (n=8)	0,209±0,006*	0,352±0,003*
SHR+метопролол (n=6)	0,210±0,001*	0,354±0,002*
SHR+метопролол+ДГК (n=6)	0,212±0,004	0,356±0,004

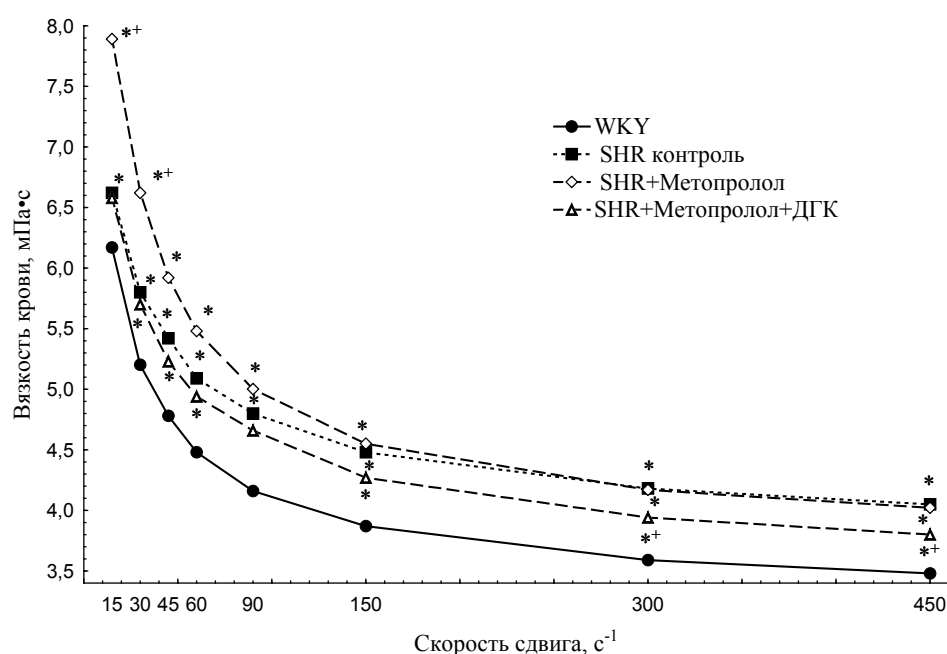
* – достоверные различия по сравнению со значениями у крыс WKY ($p<0,05$).

Рис. 2. Влияние курсового внутрижелудочного введения метопролола и метопролола совместно с ДГК на вязкость крови у крыс SHR: * – достоверные различия по сравнению со значениями у крыс WKY ($p<0,05$); + – достоверные различия по сравнению со значениями у крыс SHR в контрольной группе ($p<0,05$)

Fig. 2. Effect of intragastric course administration of metoprolol and metoprolol with dihydroquercetin on whole blood viscosity in SHR: * – significant differences compared with the values in WKY rats ($p<0,05$); + – significant differences compared with the values in the control group SHR ($p<0,05$)

в группе контроля на скоростях сдвига 45–450 с^{-1} , а на скоростях сдвига 15 и 30 с^{-1} были статистически значимо выше (рис. 2). Значения вязкости плазмы и гематокрита у животных, получавших метопролол, не отличались от значений контрольной группы SHR (табл. 1). Статистически значимых отличий микрореологических показателей после курсового введения метопролола от значений показателей в контрольной группе не было выявлено (табл. 1; 2).

Совместное введение метопролола и ДГК приводило к закономерному снижению САД и ДАД по сравнению с группой контроля SHR на 17 и 16 % соответственно (рис. 1). В этой группе крыс вязкость крови на скоростях сдвига 300 и 450 с^{-1} была достоверно ниже, чем в контроле (рис. 2). Выявлено также снижение агрегационной активности (повышение Ct

и снижение Cs) по сравнению с контрольной группой SHR (табл. 1). Наконец, деформируемость эритроцитов достоверно не отличалась от значений у нормотензивных животных (табл. 2).

Исследования влияния бета-блокаторов на реологические свойства крови у больных артериальной гипертензией немногочисленны, результаты их противоречивы [11]. Полученные нами данные показывают, что препарат из группы бета-блокаторов метопролол не влиял на микрореологические показатели (агрегацию и деформируемость эритроцитов), гематокрит и вязкость плазмы и повышал значения вязкости крови на низких скоростях сдвига у спонтанно гипертензивных крыс. Микрореологические свойства крови являются одним из факторов, определяющих уровень микроциркуляции [21]. Было

показано, что метопролол в дозах 6 и 20 мг/кг не оказывал положительного влияния на микроциркуляцию у крыс SHR [22], что согласуется с полученными нами результатами. Отсутствие влияния метопролола на микроциркуляцию у крыс SHR при нормализации артериального давления, вероятно, может быть связано с его отсутствием влияния на микрореологические параметры и увеличением вязкости крови.

В связи с этим добавление средств с гемореологической активностью к терапии артериальной гипертензии метопрололом может быть целесообразным. ДГК — хорошо изученное средство, проявляющее множество биологических эффектов, включая гемореологическую активность [12, 23, 24]. Способность ДГК снижать вязкость крови, ослаблять агрегацию эритроцитов и повышать их деформируемость была продемонстрирована на модели гипервязкости крови *in vitro* и на различных моделях сердечно-сосудистых нарушений, сопровождающихся синдромом повышенной вязкости крови [12–14, 20, 25]. Так, ДГК в дозе 20 мг/кг при курсовом введении (6 недель) крысам SHR снижал вязкость крови и агрегацию эритроцитов [25]. Курсовое введение ДГК (6 недель) крысам SHR в дозе 50 мг/кг способствовало увеличению среднего диаметра капилляров, плотности капиллярной сети и доли капилляров, проходимых для эритроцитов [20]. Введение ДГК (5 дней) в дозе 20 мг/кг совместно с аскорбиновой кислотой нормотензивным крысам с ишемией головного мозга и инфарктом миокарда оказывало положительное влияние на реологические показатели крови [12–14]. Имеются данные о гипотензивном эффекте курсового введения ДГК (14 дней) в дозах 10, 20, 50, 150 мг/кг у крыс SHR [26].

При совместном введении метопролола с ДГК отмечено снижение вязкости крови. Однако выявленное снижение вязкости крови не было достаточным для дальнейшего снижения артериального давления. ДГК при совместном введении с метопрололом снижал агрегацию эритроцитов. Особенно значимы сдвиги вязкости крови в системе микроциркуляции, где поведение форменных элементов крови, прежде всего, эритроцитов (деформируемость, агрегация) определяет эффективность ее функционирования и адекватность оксигенации органов и тканей [21]. Таким образом, выявленные положительные гемореологические эффекты ДГК при совместном применении с метопрололом обосновывают дальнейшее изучение применения средств с гемореологической активностью в комплексной фармакотерапии артериальной гипертензии.

Выводы

1. Метопролол в дозе 50 мг/кг при курсовом введении (6 недель) спонтанно гипертензивным крысам увеличивает вязкость крови на низких скоростях сдвига.

2. ДГК в дозе 50 мг/кг совместно с метопрололом в дозе 50 мг/кг при курсовом введении (6 недель) снижает вязкость крови на высоких скоростях сдвига и агрегационную активность эритроцитов.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Литература / References

1. Чазова И. Е., Жернакова Ю. В. Клинические рекомендации. Диагностика и лечение артериальной гипертензии // Системные гипертензии. — 2019. — Т. 16, № 1. — С. 6–31. [Chazova IE, Zhernakova YV. Clinical guidelines. Diagnosis and treatment of arterial hypertension. Systemic Hypertension. 2019;16(1):6–31. (In Russ.)]. Doi: 10.26442/2075082X.2019.1.190179.
2. Collins R, Peto R, MacMahon S, Hebert P, Fiebach NH, Eberlein KA, Godwin J, Qizilbash N, Taylor JO, Hennekens CH. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2: Short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet*. 1990;335(8693):827–838. Doi: 10.1016/0140-6736(90)90944-z.
3. Hiremath S, Sapir-Pichhadze R, Nakhla M, Gabor JY, Khan NA, Kuyper LM, Ruzicka M, Tobe SW, Tran K, Rabi DM, Daskalopoulou SS. Hypertension Canada's 2020 Evidence Review and Guidelines for the Management of Resistant Hypertension. *Can J Cardiol*. 2020;36(5):625–634. Doi: 10.1016/j.cjca.2020.02.083.
4. Sloop G, Holsworth RE. Jr, Weidman JJ, St Cyr JA. The role of chronic hyperviscosity in vascular disease. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2015;9(1):19–25. Doi: 10.1177/1753944714553226.
5. Lominadze D, Joshua IG., Schuschke DA. In vivo platelet thrombus formation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 1997;10(10 Pt 1):1140–1146. Doi: 10.1016/s0895-7061(97)00214-8.
6. Синдром повышенной вязкости крови у крыс линии SHR: анализ адекватной модели / М. Б. Плотников, О. И. Алиев, А. А. Колтунов, М. Ю. Маслов // Бюлл. эксперимент. биол. и мед. — 1998. — Т. 126, № 8. — С. 150–151. [Plotnikov MB, Aliev OI, Koltunov AA, Maslov MYu. Blood hyperviscosity syndrome: adequacy of experimental model in SHR rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1998;126(2):775–776. (In Russ.)].
7. Ciuffetti G, Pasqualini L, Pirro M, Lombardini R, De Sio M, Schillaci G, Mannarino E. Blood rheology in men with essential hypertension and capillary rarefaction. *J Hum Hypertens*. 2002;16(8):533–537. Doi: 10.1038/sj.jhh.1001454.
8. Meiselman HJ, Baskurt OK. Hemorheology and hemodynamics: Dove and are? *Clin Hemorheol Microcirc*. 2006;35(1–2):37–43.
9. Wiysonge CS, Opie LH. β -Blockers as initial therapy for hypertension. *JAMA*. 2013;310(17):1851–1852. Doi: 10.1001/jama.2013.277510.
10. Wiysonge CS, Bradley HA, Volmink J, Mayosi BM, Opie LH. Beta-blockers for hypertension. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;1(1):CD002003. Doi: 10.1002/14651858.CD002003.pub5.
11. Анищенко А. М., Сидехменова А. В., Плотников М. Б. и др. Синдром повышенной вязкости крови у больных артериальной гипертензией и гемореологические эффекты антигипертензивных средств // Рос. кардиолог. журнал. — 2016. — Т. 21, № 4. — С. 97–102. [Shamanaev AY, Aliev OI, Anishchenko AM, Sidekhmenova AV, Plotnikov MB. i dr. Hyperviscosity syndrome in arterial hypertension and hemorheological effects of antihypertensive drugs. *Russian Journal of Cardiology*. 2016;(4):97–102. (In Russ.)]. Doi: 10.15829/1560-4071-2016-4-97-102.
12. Плотников М. Б., Тюкавкина Н. А., Плотникова Т. М. Лекарственные препараты на основе диквертина. Томск, 2005. [Plotnikov MB, Tyukavkina NA, Plotnikova TM. *Lekarstvennye preparaty na osnove dikvertina*. Tomsk, 2005. (In Russ.)].
13. Plotnikov MB, Aliev OI, Maslov MJ, Vasiliev AS, Tyukavkina NA. Correction of the high blood viscosity syndrome by

a mixture of diquertin and ascorbic acid in vitro and in vivo. *Phytother Res.* 2003;17(3):276–278. Doi: 10.1002/ptr.1113.

14. Plotnikov MB, Aliev OI, Maslov MJ, Vasiliev AS, Tjukavkina NA. Correction of haemorheological disturbances in myocardial infarction by diquertin and ascorbic acid. *Phytother Res.* 2003;17(1):86–88. Doi: 10.1002/ptr.1082.

15. Бритов А. Н., Апарина Т. В. Роль «Капилара» (дигидрокверцетина) в коррекции гемодинамических и метаболических нарушений у больных с атеросклерозом и артериальной гипертензией // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2006. – Т. 5, № 2. – С. 46–53. [Britov AN, Aparina TV. The role of «Kapilar» (dihydroquercetin) in the correction of hemodynamic and metabolic disorders in patients with atherosclerosis and arterial hypertension. *Regionar. Krovoobr. Mikrotsirk.* 2006;5(2):46–53. (In Russ.)].

16. Плотников М. Б., Павлюкова Е. Н., Богач Е. В. и др. Гемореологические и кардиопротекторные эффекты аскорветина у больных ишемической болезнью сердца. Тромбоз, гемостаз и реология. – 2005. – Т. 2, № 22. – С. 34–41. [Plotnikov MB, Pavlyukova EN, Bogach EV, Aliev OI, Maslov MYu, Vasil'ev AS, Tyukavkina NA, Plotnikov TM. Gemoreologicheskie i kardioprotekturnye efekty askorvetina u bol'nykh ishemicheskoy bolezni yu serdtsa Tromboz, gemostaz i reologiya. 2005;2(22):34–41. (In Russ.)].

17. Плотников М. Б., Плотников Д. М., Алифиров В. М. и др. Клиническая эффективность нового гемореологического препарата асковертин у больных с дисциркуляторной энцефалопатией // Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2004. – Т. 104, № 12. – С. 33–37. [Plotnikov MB, Plotnikov DM, Alifirova VM, Aliev OI, Maslov Mlu, Vasil'ev AS, Tyukavkina NA. Clinical efficacy of a novel hemoreological drug ascovertin in patients with vascular encephalopathy. *Zh Nevrol Psikiatr Im S. S. Korsakova.* 2004;104(12):33–37. (In Russ.)].

18. Dornas WC, Silva ME. Animal models for the study of arterial hypertension. *J Biosci.* 2011;36(4):731–737. Doi: 10.1007/s12038-011-9097-y.

19. Potnuri AG, Allakonda L, Appavoo A, Saheera S, Nair RR. Association of histamine with hypertension-induced cardiac remodeling and reduction of hypertrophy with the histamine-2-receptor antagonist famotidine compared with the beta-blocker metoprolol. *Hypertens Res.* 2018;41(12):1023–1035. Doi: 10.1038/s41440-018-0109-2.

20. Plotnikov MB, Aliev OI, Sidekhmenova AV, Shamaev AY, Anishchenko AM, Fomina TI, Chernysheva GA, Smol'yakova VI, Arkhipov AM. Dihydroquercetin Improves Microvascularization and Microcirculation in the Brain Cortex of SHR Rats during the Development of Arterial Hypertension. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2017;163(1):57–60. Doi: 10.1007/s10517-017-3737-7.

21. Saldanha C. Hemorheology, microcirculation and macrocirculation. *Rev Port Cardiol.* 2020;39(1):25–26. Doi: 10.1016/j.repc.2020.02.004.

22. Li B, Yang ZB, Lei SS, Su J, Jin ZW, Chen SH, Lv GY. Combined Antihypertensive Effect of Paeoniflorin Enriched Extract and Metoprolol in Spontaneously Hypertensive Rats. *Pharmacognosy magazine.* 2018;14(53):44–52. Doi: 10.4103/pm.pm-483-16.

23. Weidmann AE. Dihydroquercetin: More than just an impurity? *Eur J Pharmacol.* 2012;684(1–3):19–26. Doi: 10.1016/j.ejphar.2012.03.035.

24. Sunil C, Xu B. An insight into the health-promoting effects of taxifolin (dihydroquercetin). *Phytochemistry.* 2019;166:112066. Doi: 10.1016/j.phytochem.2019.112066.

25. Plotnikov MB, Aliev OI, Sidekhmenova AV, Shamaev AY, Anishchenko AM, Nosarev AV, Pushkina EA. Modes of Hypotensive Action of Dihydroquercetin in Arterial Hypertension. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2017;162(3):353–356. Doi: 10.1007/s10517-017-3614-4.

26. Tikhonov VP, Makarova MN, Zajtseva MA, Makarov VG. Efficacy of (±)-taxifolin from *larix sibirica* (munchh.) ledeb. on blood pressure in experiments in vivo. *Planta Med.* 2006;(72):174. Doi: 10.1055/s-2006-949974.

Информация об авторах

Сидехменова Анастасия Витальевна – канд. мед. наук, научный сотрудник лаборатории фармакологии кровообращения Научно-исследовательского института фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия, e-mail: sidekhmenova@yandex.ru.

Алиев Олег Ибрагимович – д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории фармакологии кровообращения Научно-исследовательского института фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия, e-mail: oal67@yandex.ru.

Анищенко Анна Марковна – д-р мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории фармакологии кровообращения Научно-исследовательского института фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия, e-mail: anishchenkoam@gmail.com.

Дунаева Ольга Ивановна – аспирант, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия, e-mail: olgadunaeva24@mail.ru.

Плотников Марк Борисович – д-р биол. наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, зав. лабораторией фармакологии кровообращения Научно-исследовательского института фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия, e-mail: mbp2001@mail.ru.

Information about authors

Sidekhmenova Anastasia V. – MD, PhD, Researcher, Laboratory of Circulation Pharmacology, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia, e-mail: sidekhmenova@yandex.ru.

Aliev Oleg I. – MD, PhD, DSc, Principal Researcher, Laboratory of Circulation Pharmacology, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia, e-mail: oal67@yandex.ru.

Anishchenko Anna M. – MD, PhD, DSc, Senior Researcher, Laboratory of Circulation Pharmacology, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia, e-mail: nuska-80@mail.ru.

Dunaeva Olga I. – post-graduate student, Laboratory of Circulation Pharmacology, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia, e-mail: nuska-80@mail.ru.

Plotnikov Mark B. – MD, PhD, DSc, Professor, Head, Department of Pharmacology Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia, e-mail: mbp2001@mail.ru.

УДК 616.155.1-008.1

DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-77-83

А. А. ФАБРИЧНОВА¹, В. Б. КОШЕЛЕВ², И. В. МИСНИКОВА²,
Ю. А. КОВАЛЕВА², А. Н. СЕМЕНОВ¹, А. Е. ЛУГОВЦОВ¹,
И. М. КАДАНОВА¹, А. И. НЕЗНАНОВ¹, А. В. ПРИЕЗЖЕВ¹

Исследование сил парного взаимодействия эритроцитов при их агрегации методом оптического захвата при сахарном диабете 1 и 2 типов

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», Москва, Россия 119991, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1

² Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М. Ф. Владимирского», Москва, Россия 129110, Россия, Москва, ул. Шепкина, д. 61/2, корп. 1
E-mail: anastasia.fabrichnova@mail.ru

Статья поступила в редакцию 30.11.20; принята к печати 15.01.21

Резюме

Цель – измерение и сравнение сил агрегации и дезагрегации отдельных эритроцитов при образовании или развале парного агрегата *in vitro* в крови больных сахарным диабетом 1 типа (СД1) и сахарным диабетом 2 типа (СД2), используя метод оптического захвата. **Материалы и методы.** Всего в исследование были включены 50 человек. Из них 10 человек с СД1 (в возрасте $28 \pm 15,8$ года), 26 человек с СД2 (в возрасте 66 ± 13 лет). Группу контроля составили 14 практически здоровых добровольцев (46 ± 21 год). Измерения сил парного взаимодействия эритроцитов в разбавленной суспензии проводились *in vitro* методом двухканального оптического захвата. Измерялась сила агрегации эритроцитов F_A (пН), сила дезагрегации F_D (пН) и вычислялось отношение сил F_D/F_A . **Результаты.** Значение сил агрегации эритроцитов значительно не отличалось в группе СД1 от группы контроля. Однако силы дезагрегации в группе СД1 оказались достоверно ниже по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). Отношение сил дезагрегации к силам агрегации было меньше в группе СД1 по сравнению с группой контроля ($p < 0,005$). При СД2 силы агрегации эритроцитов были выше по сравнению с группой контроля ($p < 0,005$). Силы дезагрегации эритроцитов в группе СД2 были также выше в тенденции ($p = 0,05$). Отношения сил дезагрегации к силам агрегации эритроцитов при СД2 с высокой достоверностью были ниже по сравнению с группой контроля ($p < 0,005$). При этом отношения сил дезагрегации к силам агрегации при СД1 и СД2 не отличались. **Заключение.** Как для СД1, так и СД2 характерна гиперагрегация эритроцитов. Однако, учитывая полученные данные, можно предположить, что механизмы такой гиперагрегации различны.

Ключевые слова: агрегация эритроцитов, дезагрегация эритроцитов, оптический пинцет, сахарный диабет 1 типа, сахарный диабет 2 типа

Для цитирования: Фабричнова А. А., Кошелев В. Б., Мисникова И. В., Ковалева Ю. А., Семенов А. Н., Луговцов А. Е., Каданова И. М., Незнанов А. И., Приезжев А. В. Исследование сил парного взаимодействия эритроцитов при их агрегации методом оптического захвата при сахарном диабете 1 и 2 типов. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2021;20(1):77–83. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-77-83.

UDC 616.155.1-008.1

DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-77-83

A. A. FABRICHNOVA¹, V. B. KOSHELEV²,
I. V. MISNIKOVA², Y. A. KOVALEVA², A. N. SEMENOV¹,
A. E. LUGOVTSOV¹, I. M. KADANOVA¹, A. I. NEZNANOV¹,
A. V. PRIEZZHEV¹

Assessment of the forces of pair interaction of erythrocytes during their aggregation by the optical tweezers in Type 1 and Type 2 diabetes mellitus

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia 1, Leninskie Gory, Moscow, Russia, 119991

² Moscow Regional Research and Clinical Institute («MONIKI»), Moscow, Russia 61/2, Schepkina str., Moscow, Russia, 129110
E-mail: anastasia.fabrichnova@mail.ru

Received 30.11.20; accepted 15.01.21

Summary

Objective. Measurement and comparison of the aggregation and disaggregation forces of individual erythrocytes during the formation or breakdown of a paired aggregate *in vitro* in the blood of patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM) and type 2 dia-

betes mellitus (T2DM) using the optical tweezers method. *Materials and methods.* A total of 50 people were included in the study. Of these, 10 people with T1DM (aged 28 ± 15.8), 26 people with T2DM (aged 66 ± 13). The control group consisted of 14 apparently healthy volunteers (46 ± 21 years old). Measurements of the forces of pair interaction of erythrocytes in a diluted suspension were carried out in vitro by the method of dual-channel optical tweezers. The force of aggregation of erythrocytes FA (pN) and the force of disaggregation FD (pN) were measured and their ratio FD/FA was calculated. *Results.* The erythrocyte aggregation forces in the T1DM group did not differ significantly from the control group. However, the forces of disaggregation in the T1DM group were significantly lower than in the control group ($p < 0.05$). The ratio of the forces of disaggregation to the forces of aggregation was lower in the T1DM group compared to the control group ($p < 0.005$). In T2DM group, erythrocyte aggregation forces were higher compared to the control group ($p < 0.005$). The erythrocyte disaggregation forces in the T2DM group were also higher ($p = 0.05$). The ratios of the forces of disaggregation to the forces of aggregation of erythrocytes in T2DM group were significantly lower than in the control group ($p < 0.005$). At the same time, the ratios of the forces of disaggregation to the forces of aggregation in T1DM group and T2DM group did not differ. *Conclusion.* Both T1DM group and T2DM group are characterized by hyperaggregation of erythrocytes. However, given the data obtained, it can be assumed that the mechanisms of such hyperaggregation are different.

Keywords: erythrocyte aggregation, erythrocyte disaggregation, optical tweezers, type 1 diabetes mellitus, type 2 diabetes mellitus

For citation: Fabrichnova A. A., Koshelev V. B., Misnikova I. V., Kovaleva Y. A., Semenov A. N., Lugovtsov A. E., Kadanova I. M., Neznanov A. I., Priezhnev A. V. Assessment of the forces of pair interaction of erythrocytes during their aggregation by the optical tweezers in Type 1 and Type 2 diabetes mellitus. *Regional blood circulation and microcirculation.* 2021;20(1):77–83. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-77-83.

Введение

Сахарный диабет (СД) — это группа метаболических заболеваний, при которых хроническая гипергликемия приводит к развитию патологии со стороны большинства органов и систем. Распространенность сахарного диабета стремительно растет. Так, по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), мировой уровень заболеваемости СД с 1980 по 2014 г. увеличился практически вдвое (с 4,7 до 8,5 %) [1]. Поздние осложнения сахарного диабета развиваются, в первую очередь, вследствие поражения сосудистой системы в виде специфического поражения сосудов — диабетической микроангиопатии и макроангиопатии, представляющей собой ускоренный атеросклеротический процесс. Однако при СД также наблюдается нарушение реологических свойств крови (от гр. *rhē'os* — «течение, поток»), определяющих текучесть крови в сосудистой системе.

Эффективность работы системы кровообращения достигается благодаря сложным образом организованной регуляции кровотока на уровне микрососудов. В условиях сравнимости просвета микрососудов и характерных размеров форменных элементов крови кровотоки можно рассматривать как движение эритроцитов, способных к деформации и агрегации [2].

Эритроциты несут на своей поверхности отрицательный заряд, что обуславливает наличие электростатических сил отталкивания между ними. Под действием внешних факторов, таких как напряжение сдвига в потоке крови, эритроциты сближаются и преодолевают отталкивающие силы, агрегируя друг с другом. В процессе образования агрегатов происходит парное взаимодействие клеток. При приведении двух эритроцитов в непосредственный контакт возникает сила агрегации, не зависящая от внешних сил, которая способствует образованию парного агрегата, что может протекать как «наползание» одной клетки на другую или как «схлопывание» их поверхностей после частичного контакта [3]. Агрегация является обратимым процессом: в норме в кровотоке непрерывно происходит динамический процесс агрегации и дезагрегации эритроцитов. Для разделения образовавшегося парного агрегата необходимо приложить силу дезагрегации. Эритроцитарные агрегаты дезагрегируют в потоке под действием сдвиговых сил.

Факторами, которые способствуют дезагрегации, являются электростатическое отталкивание между клетками, упругие силы мембраны эритроцита. Силы взаимодействия эритроцитов при агрегации и дезагрегации могут отличаться по величине.

Способность эритроцитов к агрегации зависит от многих факторов. Среди них — гемодинамические, концентрация плазменных белков (в основном фибриногена, макроглобулинов, альбумина), электростатические. Важную роль в агрегации клеток играют вязкоупругие свойства мембраны клетки, деформируемость и форма эритроцита. Установлено, что на агрегацию эритроцитов могут влиять различные взаимодействия с рецепторным аппаратом клетки. Показана возможность рецепторного взаимодействия фибриногена с эритроцитами в процессах их агрегации [4]. Также показано, что стимуляция α - и β -агонистами адренорецепторов (в большей степени α -агонистами) стимулирует агрегацию эритроцитов [5].

Существование эритроцитарных агрегатов в норме доказано в венозной части сосудистой системы, где сдвиговые скорости потока низки. При выраженной патологической агрегации появление эритроцитарных агрегатов наблюдается в артериолах. Патологическая агрегация, увеличивая неравномерность распределения эритроцитов по сетям микрососудов, приводит к нарушению локального кровоснабжения, снижению скорости кровотока, может препятствовать вхождению клеток в капилляры и способствовать шунтированию эритроцитов по более широким сосудам, в обход капиллярных сетей, увеличивая вероятность развития зон локальной гипоксии [6].

Существует точка зрения, что именно гиперагрегация эритроцитов является наиболее важным гемореологическим нарушением у пациентов с плохим гликемическим контролем при СД. Показано, что патологическая агрегация может служить причиной сосудистых нарушений у больных СД, не имеющих специфических сосудистых осложнений — диабетических микро- и макроангиопатий [7]. Нарушение реологических свойств крови, а также гемостаза на фоне гипергликемии является причиной снижения скорости капиллярного кровотока при СД [8].

Показано, что способность эритроцитов к агрегации находится в прямой зависимости от уровня

Таблица 1

Распределение больных СД1 и СД2, группы контроля по числу исследованных лиц, полу, возрасту

Table 1

Distribution of patients with T1DM and T2DM, control group by the number of individuals studied, by gender, by age

Показатель	СД1	СД2	Контроль
Всего больных	10	26	14
Женщины, n (%)	6 (60)	16 (62)	3 (21)
Мужчины, n (%)	4 (40)	10 (38)	11 (79)
Возраст, лет (средний возраст, лет)	21–44 (28±15,8)	49–81 (66±13)	25–67 (46±21)

глюкозы в крови [9]. Хроническая гипергликемия приводит к дестабилизации липидного бислоя, нарушению белок-липидных взаимодействий, модификации цитоскелета эритроцита, изменению ионотранспортных мембранных систем, изменению мембрано-рецепторных комплексов, нарушению процессов энергообеспечения клетки, интенсификации перекисного окисления липидов [10]. Нарушения структуры мембраны эритроцита ведет к снижению концентрации молекул сиаловых кислот, несущих отрицательный заряд на мембране клетки, что способствует уменьшению сил электростатического отталкивания эритроцитов и повышению их способности к агрегации [11].

Ранее при исследовании способности эритроцитов к агрегации при сахарном диабете различными оптическими методами было показано, что, как при СД1, так и при СД2, агрегация эритроцитов повышается [9, 12–15]. Данные исследования проводились с использованием цельной крови, на большом ансамбле клеток.

Пилотное исследование деформируемости эритроцитов на уровне отдельных клеток методом двухканального оптического пинцета при СД2 было проведено в 2016 г. Rupesh et al. По результатам исследования, деформируемость эритроцитов больных СД2 была значимо ниже по сравнению с контролем [16]. Исследование способности отдельных эритроцитов образовывать парные агрегаты при СД с использованием метода оптического захвата проведено А. Н. Семеновым и др. [17] в Международном лазерном центре МГУ им. М. В. Ломоносова в 2017 г. Исследование включало совместно пациентов с сахарным диабетом 1 типа (СД1) и сахарным диабетом 2 типа (СД2). Согласно полученным данным, сила агрегации эритроцитов у больных СД обоих типов достоверно ($p < 0,05$) превышала силу агрегации в контрольной группе. Достоверных отличий между СД и группой контроля при измерении силы дезагрегации выявлено не было. Подобные результаты получены также А. И. Масляницыной и др. [18] на подгруппе пациентов с СД2 и артериальной гипертензией: при оценке сил взаимодействия отдельных эритроцитов методом оптического захвата отмечалось увеличение силы агрегации эритроцитов.

Однако до сих пор исследования агрегационно-деагрегационных сил эритроцитов на уровне отдельных клеток при сахарном диабете 1 и 2 типов раздельно не проводились.

Целью исследования явилось измерение и сравнение сил агрегации и дезагрегации отдельных эритроцитов при образовании или разделении парного агрегата (дублета) *in vitro* в крови больных СД1 и СД2 с использованием метода двухканального оптического захвата.

Материалы и методы исследования

Всего в исследование были включены 50 пациентов. Среди них 10 пациентов с сахарным диабетом 1 типа, 26 пациентов с сахарным диабетом 2 типа, 14 практически здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту. Более подробное распределение исследуемых групп по полу и возрасту приведено в табл. 1.

Исследование гемореологических показателей проводили в образцах венозной крови, взятой из локтевой вены натошак. Кровь стабилизировали в пластиковых пробирках с EDTA (0,002 г/мл), сохраняя при температуре 23 °С. Измерение проводилось в течение 3 ч после взятия пробы, в стеклянной микрокювете толщиной 100 мкм, в которую помещался образец суспензии эритроцитов в аутологичной плазме. Измерения проводили при комнатной температуре. Для каждого приготовленного образца измерения повторялись не менее чем на 15 парах различных эритроцитов. Итоговые результаты были получены после усреднения измеренных значений.

Измерение сил взаимодействия эритроцитов с помощью лазерного пинцета. Для измерения сил взаимодействия двух одиночных эритроцитов использовался метод оптического захвата, реализованный при помощи двухканального лазерного пинцета [19, 20].

В качестве источников излучения использовали два Nd:YAG-лазера (длина волны – 1064 нм, выходная мощность – 200 мВт). Один лазерный пучок всегда неподвижен, на пути второго пучка установлено зеркало, вращение которого позволяет перемещать область фокусировки пучка. Регулировка мощности пучка осуществляется при помощи полуволновых пластинок, установленных после лазера. Перед проведением измерений выполняется калибровка установки. Подробным образом методика измерения при помощи двухканального лазерного пинцета описана в статье [17].

При измерении сил агрегации и дезагрегации эритроцитов два эритроцита захватываются подвижным и неподвижным пучками ловушки. При этом клетки поднимаются со дна кюветы и ориентируются параллельно друг другу (рис. 1, шаг 1).

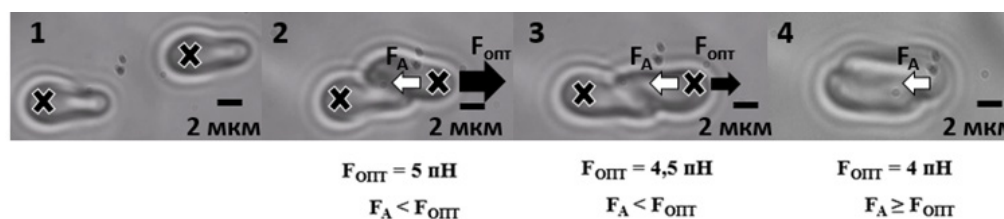


Рис. 1. Схема измерения силы агрегации эритроцитов. Крестовыми метками указаны положения оптических ловушек, стрелки указывают направления приложенных сил

(F_A – белая стрелка; $F_{\text{опт}}$ – черная стрелка)

Fig. 1. Scheme for measuring the aggregation force of erythrocytes. Cross marks indicate the positions of optical traps, arrows indicate the directions of applied forces (F_A – white arrow; $F_{\text{опт}}$ – black arrow)

Таблица 2

Результаты измерений сил взаимодействия пар эритроцитов при их агрегации и дезагрегации в норме, при СД1, СД2

Table 2

The results of measurements of the forces of interaction of erythrocytes during their aggregation and disaggregation in normal conditions, in T1DM, T2DM

Показатель	Контроль	СД1	p	СД2	p
Сила агрегации эритроцитов F_A , пН	3,0 [1,4; 3,9]	2,9 [2,5; 4,0]	0,9	4,3 [3,5; 5,2]	0,002
Сила дезагрегации эритроцитов F_D , пН	5,0 [4,1; 6,2]	4,2 [3,3; 4,8]	0,04	5,5 [4,7; 7,0]	0,05
Отношение средних величин	1,7 [1,4; 2,2]	1,3 [1,2; 1,4]	0,007	1,3 [1,2; 1,4]	0,001

Примечание: для каждой величины указаны медиана и квантили [25 %, 75 %].

Далее эритроциты приводятся в контакт так, что область их соприкосновения составляет 40 % от длины каждой клетки (рис. 1, шаг 2). Мощность пучка уменьшается до тех пор, пока удерживающей силы со стороны ловушки – силы оптического захвата ($F_{\text{опт}}$) (черная стрелка на рис. 2) – становится недостаточно для преодоления спонтанной агрегации эритроцитов (сила агрегации на рис. 2 обозначена белой стрелкой). Клетка вырывается из ловушки, и начинается процесс агрегации клеток. Значение мощности ловушки в момент начала агрегации фиксируется и по калибровочной кривой сопоставляется с силой оптического захвата в этот момент, который и соответствует силе агрегации (F_A).

Измерение силы дезагрегации (F_D) – минимальной силы, необходимой для разделения парного агрегата эритроцитов, – включает в себя три последовательных шага. 1-й и 2-й шаги идентичны процессу измерения F_A . На 3-м шаге, после приведения клеток в контакт, подвижная оптическая ловушка перемещалась таким образом, чтобы попытаться разделить дуплет. При каждой новой попытке мощность лазера уменьшалась до минимального значения, когда силы оптического захвата недостаточно для дезагрегации дуплета. Это значение силы оптического захвата фиксировалось. Значения больше данной пороговой силы оптического захвата при этом представляют собой силу дезагрегации.

Для сопоставления сил агрегации и дезагрегации вводился параметр R , задаваемый отношением средних величин сил дезагрегации и агрегации отдельных эритроцитов:

$$R = \frac{F_D}{F_A}$$

Этот параметр рассчитывался для каждого образца крови и далее усреднялся по всей группе.

Полученные средние значения R сравнивались между контрольной группой и группой с СД1 и СД2.

Статистическая обработка. Статистическая обработка результатов проводилась с применением пакета прикладных программ «SPSS Statistics 15.0» (IBM). Для количественной оценки данных вычисляли статистические показатели: медиана, 25 %-й и 75 %-й квантили (Me [25 %, 75 %]). При сравнении групп пациентов применяли непараметрический критерий Манна – Уитни для сравнения двух независимых признаков. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования приведены в табл. 2.

После статистической обработки данных получены следующие результаты: при СД1 значение сил агрегации эритроцитов (F_A , пН) значимо не отличалось от группы контроля: F_A при СД1 2,9 [2,5; 4,0] пН, F_A в группе контроля 3,0 [1,4; 3,9] пН ($p = 0,9$). Однако силы дезагрегации в группе СД1 оказались достоверно ниже: F_D при СД1 – 4,2 [3,3; 4,8] пН, F_D в группе контроля – 5,0 [4,1; 6,2] пН ($p = 0,04$). Отношение величин сил дезагрегации к силам агрегации $R = F_D/F_A$ с высокой достоверностью отличалось между СД1 и группой контроля: СД1 $R = 1,3$ [1,2; 1,4], в группе контроля $R = 1,7$ [1,4; 2,2], $p = 0,002$ (результаты приведены на рис. 2).

При сравнении данных, полученных при исследовании образцов СД2 и группы контроля, силы агрегации эритроцитов при СД2 были выше и с высокой достоверностью отличались от группы контроля (F_A (СД2) – 4,3 [3,5; 5,2] пН, F_A (контроль) – 3,0 [1,4; 3,9] пН, $p = 0,002$). Силы дезагрегации эритроцитов были в тенденции выше в группе СД2, по сравнению

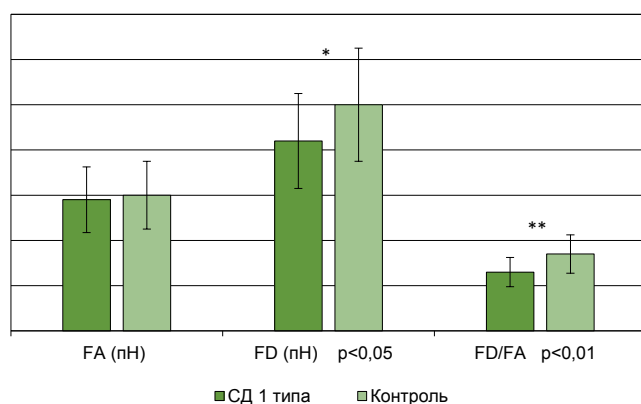


Рис. 2. Силы агрегации и дезагрегации одиночных эритроцитов крови пациентов с СД1 и контрольной группы

Fig. 2. Forces of aggregation and disaggregation of single erythrocytes in blood of patients with type 1 diabetes mellitus and in the control group

с группой контроля: F_D (СД2) – 5,5 [4,7; 7,0] пН, F_D (контроль) – 5,0 [4,1; 6,2] пН, $p=0,05$. Сравнение отношения сил дезагрегации к силам агрегации $R = F_D / F_A >$ эритроцитов обеих групп при СД2 и в группе контроля показало, что так же, как и в случае СД1, отношение R с высокой достоверностью ниже у больных СД2, по сравнению с группой контроля. R (СД2)=1,3 [1,2; 1,4] пН, R (контроль)=1,7 [1,4; 2,2] пН, $p=0,001$ (результаты показаны на рис. 3).

Таким образом, в ходе эксперимента, как при СД1, так и при СД2, наблюдалось смещение равновесия процесса агрегации-деагрегации в сторону гиперагрегации. При СД1 гиперагрегация наблюдалась за счет снижения сил дезагрегации при неизменной силе агрегации, а при СД2 силы агрегации были с высокой достоверностью выше нормы, силы дезагрегации превышали норму в тенденции ($p=0,05$). Полученные данные могут говорить о существовании различных механизмов нарушения процессов агрегации-деагрегации эритроцитов при СД1 и СД2.

Различие в механизмах гиперагрегации возможно объяснить существенным отличием в патогенезе и особенностях лечения диабетов обоих типов. СД1 и СД2 – это два различных заболевания, объединенных в одну группу на основании наличия гипергликемии. При СД1 наблюдается абсолютная недостаточность инсулина, вследствие чего развивается гипергликемия, и основные патофизиологические последствия СД1 связаны с глюкозотоксичностью.

При СД2 пусковым фактором, присутствующим еще до манифестации заболевания, является инсулинорезистентность. Показано, что инсулинорезистентность самостоятельно связана с повышением способности эритроцитов к агрегации [21]. Инсулинорезистентность, наряду с ожирением, является основой развития метаболического синдрома, на фоне которого в большинстве случаев развивается СД2. При метаболическом синдроме наблюдаются нарушения липидного, пуринового, углеводного обменов, повышение провоспалительного статуса организма, уровня фибриногена, макроглобулинов, что приводит к нарушению реологических свойств крови и повышению агрегации эритроцитов [22, 23]. По некоторым данным, повышение уровня фибриногена играет при этом

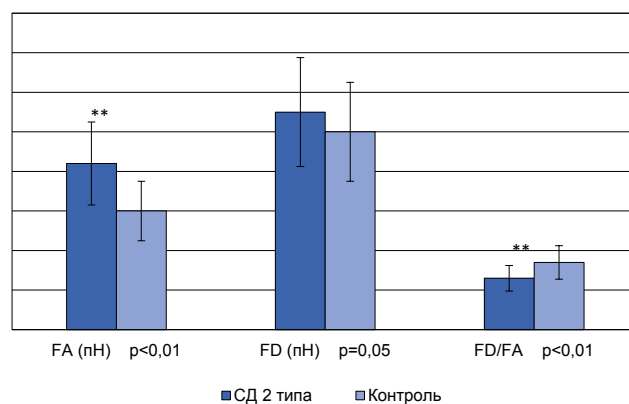


Рис. 3. Силы агрегации и дезагрегации одиночных эритроцитов в крови пациентов с СД2 и контрольной группы

Fig. 3. Forces of aggregation and disaggregation of single erythrocytes in blood of patients with type 2 diabetes mellitus and in the control group

наиболее важную роль в развитии гиперагрегации эритроцитов [24]. Избыточное включение липидов в мембраны эритроцитов при дислипидемии ведет к нарушению асимметрии липидов в бислой мембран, повышению перекисного окисления липидов, вследствие чего происходит потеря мембранами клеток их вязкоупругих свойств, снижение отрицательного заряда мембраны и, как следствие, нарушение микро-реологических свойств эритроцитов [25].

Однако было показано, что при введении больным СД2 инсулина в различных концентрациях (в том числе в физиологической) наблюдается снижение гиперагрегации эритроцитов [26]. В другом эксперименте пациентам с СД2, получающим инсулин в качестве терапии, введение инсулина *in vivo* снижало агрегацию эритроцитов до нормы, а также снижало агрегацию эритроцитов у лиц без диабета [27].

Анализируя полученные экспериментальные и литературные данные, можно предположить, что наблюдаемое в опыте снижение сил дезагрегации при нормальной агрегации эритроцитов у больных СД1 может быть связано с улучшением агрегации эритроцитов при введении инсулина (который с необходимостью присутствует в терапии данных больных). Кроме того, больные СД1 не имеют метаболического синдрома с сопутствующими ему дополнительными патологическими факторами, способствующими гиперагрегации эритроцитов. Одним из механизмов снижения сил дезагрегации при СД1 может быть снижение отрицательного заряда мембран эритроцитов и, соответственно, сил электростатического отталкивания клеток, наблюдаемого при гипергликемии [11].

Стоит отметить, что исследования на ансамбле клеток у больных СД1, как правило, указывают на повышение способности эритроцитов к агрегации [9, 12–15]. Однако при наиболее распространенных оптических методах исследования, таких, например, как метод диффузного светорассеяния, оцениваемые параметры агрегации (размер, прочность эритроцитарных агрегатов, кинетика агрегации и др.) являются результирующей отношения сил дезагрегации-агрегации, в то время как метод оптического захвата позволяет измерить данные силы отдельно для обоих процессов. В целом такой же результат (повышение

способности эритроцитов к агрегации) получен и в ходе данного эксперимента, однако за счет снижения сил дезагрегации эритроцитов.

Больные СД2, «отягощенные» метаболическим синдромом, могут иметь более существенный спектр причин для нарушения микрогемореологических свойств эритроцитов, кроме глюкозотоксичности: инсулинорезистентность, гиперлипидемия, повышение уровня провоспалительных глобулинов, более высокий уровень фибриногена. Кроме того, такие больные, как правило, не получают инсулин в составе терапии. Результаты эксперимента говорят о наличии повышения способности эритроцитов к агрегации при СД2 с высокой достоверностью ($p=0,002$) и увеличении сил, необходимых для дезагрегации дуплета эритроцитов в тенденции ($p=0,05$). Поскольку агрегация и дезагрегация, несмотря на функционально различную природу, являются сторонами единого процесса, одновременное увеличение сил агрегации и дезагрегации выглядит логичным.

Выводы

Таким образом, в ходе эксперимента было показано следующее.

1. Как при СД1, так и при СД2, в процессе парной агрегации-деагрегации эритроцитов результирующие силы процесса агрегации выше по сравнению с нормой с высокой достоверностью.

2. При СД1 агрегация не отличалась от нормы, при этом силы дезагрегации были достоверно ниже нормы.

3. У больных СД2 как силы агрегации, так и силы дезагрегации превышали норму.

4. Полученные отношения сил дезагрегации и агрегации при СД1 и СД2 не отличались между собой.

5. Учитывая полученные данные, можно предположить, что механизмы гиперагрегации при СД1 и СД2 различны.

Дальнейшие исследования сил взаимодействия эритроцитов при СД1 и СД2 и патогенеза процесса агрегации-деагрегации требуются для получения более полных данных.

Финансирование / Acknowledgments

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-52-51015. / This work was carried out with the financial support of the RFBR grant No. 19-52-51015.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Литература / References

1. Global report on diabetes / World Health Organization. Geneva, 2018.
2. Соколова И. А. Агрегация эритроцитов // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2010. – № 4. – С. 4–6. [Sokolova I. A. Aggregation of erythrocytes. Regional blood circulation and microcirculation. 2010;(4):4–6. (In Russ.).]
3. Khokhlova MD, Lyubin EV, Zhdanov AG, Rykova SYu, Krasnova TN, Sokolova IA, Fedyanin AA. Peculiarities of RBC aggregation studied by double trap optical tweezers. Proc. of SPIE. 2010 Apr;7715(0M):1–8. Doi: 10.1117/12.854502
4. Соколова И. А., Рыкова С. Ю., Шахназаров А. А. и др. Агрегация эритроцитов: некоторые вопросы и гипотезы // Рос. журн. биомеханики. – 2011. – Т. 15, № 1(51). – С. 7–22. [Sokolova IA, Rykova SYu, Shakhnazarov AA, Gafarova ME, Krasnova TN, Khokhlova MD, Lyubin EV, Skryabina MN, Zhdanov AG, Fedyanin AA. Aggregation of erythrocytes: some questions and hypotheses. Russian Journal of Biomechanics. 2011;15(1)51:7–22. (In Russ.).]
5. Муравьев А. В. Муравьев А. А. Вне- и внутриклеточные механизмы изменения агрегации эритроцитов // Физиология человека. – 2005. – Т. 31, № 4. – С. 108–112. [Muravyov AV, Muravyov AA. Extra- and intracellular mechanisms of erythrocyte aggregation changes. Human Physiology. 2005;31(4):108–112. (In Russ.).]
6. Bronkhorst PJ, Grimbergen J, Brakenhoff GJ, Heethaar RM, Sixma JJ. The mechanism of red cell (dis)aggregation investigated by means of direct cell manipulation using multiple optical trapping. Br. J. Haematol. 1997;96(2):256–258.
7. Le Dévéhat C, Khodabandehlou T, Vimeux M. Impaired hemorheological properties in diabetic patients with lower limb arterial ischaemia. Clin Hemorheol. 2001;25(2):43–48.
8. Barrett-Connor E, Giardina E, Gitt A, Gudat U, Steinberg H, Tschoepe D. Women and heart disease: the role of diabetes and hyperglycemia. Arch Intern Med. 2004;164(9):934–942. Doi: 10.1001/archinte.164.9.934
9. Babu N, Singh M. Influence of hyperglycemia on aggregation, deformability and shape parameters of erythrocytes. Clin Hemorheol Microcirc. 2004;31(4):273–280.
10. Szablewski L, Sulima A. The structural and functional changes of blood cells and molecular components in diabetes mellitus. Biol Chem. 2017;398(4):411–423. Doi: 10.1515/hsz-2016-0196.
11. Budak Y, Demirci H, Akdogan MYavuz D. Erythrocyte membrane anionic charge in type 2 diabetic patients with retinopathy. BMC Ophthalmology. 2004;(4):14. Doi: 10.1186/1471-2415-4-14.
12. Le Dévéhat C, Vimeux M, Khodabandehlou T. Blood rheology in patients with diabetes mellitus. Clin Hemorheol Microcir. 2004;(30):297.
13. Young ICh, Mooney MP, Daniel JCh. Hemorheological disorders in Diabetes Mellitus. Journal of Diabetes Science and Technology. 2006;2(6):24–28 Doi: 10.1177/193229680800200622.
14. Torregiani F, Umansky-Zeverin M, Riqueline B, Rasia R. Hemorheological alterations in diabetic patients. Clin Hemorheol. 1995;(15):687. Doi: 10.1530/endoabs.37.EP442
15. Singh M, Shin S. Changes in erythrocyte aggregation and deformability in diabetes mellitus: A brief review. Indian Journal of Experimental Biology. 2009;47(1):7–15.
16. Agrawal R, Smart T, Nobre-Cardoso J, Richards Ch, Bhatnagar Rh, Tufail A, Shima D, Jones PhI, Pavesio C. Assessment of red blood cell deformability in type 2 diabetes mellitus and diabetic retinopathy by dual optical tweezers stretching technique. Sci. Rep. 2016 Mar15;(6):15873. Doi: 10.1038/srep15873.
17. Семенов А. Н., Луговцов А. Е., Лу К. и др. Использование методов диффузного рассеяния света и оптического захвата для исследования реологических свойств крови: агрегация эритроцитов при сахарном диабете // Изв. Саратов. ун-та. Сер.: Физика. – 2017. – Т. 17, № 2. – С. 85–97. [Semenov AN, Lugovtsov AE, Li K, Fabrichnova AA, Priezzhev AV. Applying Methods of Diffuse Light Scattering and Optical Trapping for Assessing Blood Rheological Parameters: Erythrocytes Aggregation in Diabetes Mellitus. Izv. Sarat. un. New ser. Ser. Physics 2017;17(2):85–97. (In Russ.).]
18. Масляницyna А. И., Каданова И. М., Незнанов А. И. и др. Микрореологические свойства крови и капиллярный

кровоток при артериальной гипертензии и сахарном диабете второго типа: исследование оптическими методами *in vitro* и *in vivo* // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2020. – Т. 9, № 2. – С. 53–63. [Maslyanitsyna AI, Kadanova IM, Neznanov AI, Ermolinsky PB, Gurfinkel YuI, Pigurenko AA, Dyachuk LI, Lugovtsov AE, Priezzhev AV. Micro-rheological properties of blood and capillary blood flow in arterial hypertension and type 2 diabetes mellitus: study by optical methods *in vitro* and *in vivo*. Complex problems of cardiovascular diseases. 2020;9(2):53–63. (In Russ.)]. Doi: 10.17802/2306-1278-2020-9-2-53-63.

19. Lee K, Kinnunen M, Khokhlova MD, Lyubin EV, Priezzhev AV, Meglinski I, Fedyanin AA. Optical tweezers study of red blood cell aggregation and disaggregation in plasma and protein solutions. *J. Biomed. Opt.*, 2016;21(3):035001. Doi: 10.1117/1.JBO.21.3.035001.

20. Fernandes PH, Fontes A, Thomaz A, Castro V, Cesar CL, and Barjas-Castro ML. Measuring red blood cell aggregation forces using double optical tweezers. *Scand J Clin Lab Invest.* 2013;73(3):262–264. Doi: 10.3109/00365513.2013.765961.

21. Brun JF, Varlet-Marie E, Raynaud de Mauverger E. Relationships between insulin sensitivity measured with the oral minimal model and blood rheology. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2012;51(1):29–34. Doi: 10.3233/CH-2011-1426.

22. Toker S, Rogowski O, Melamed S, Shirom A, Shapira I, Berliner S, Zeltser D. Association of components of the metabolic syndrome with the appearance of aggregated red blood cells in the peripheral blood. An unfavorable hemorheological finding. *Diabetes Metab Res Rev.* 2005 Mar-Apr; 21(2):197–202. Doi: 10.1002/dmrr.502.

23. Gyawali P, Richards RS, Hughes DL, Tinley P. Erythrocyte aggregation and metabolic syndrome. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2014;57(1):73–83. Doi: 10.3233/CH-131792.

24. Schechner V, Shapira I, Berliner S, Comaneshter D, Hershcovici T, Orlin J, Zeltser D, Rozenblat M, Lachmi K, Hirsch M, Beigel Y. Significant dominance of fibrinogen over immunoglobulins, C-reactive protein, cholesterol and triglycerides in maintaining increased red blood cell adhesiveness/aggregation in the peripheral venous blood: a model in hypercholesterolaemic patients. *Eur J Clin Invest.* 2003 Nov;33(11):955–961. Doi: 10.1046/j.1365-2362.2003.01260.x.

25. Torregiani F, Umansky-Zeveri M, Riqueline B, Rasia R. Hemorheological alterations in diabetic patients. *Clin. Hemorheol.* 1995;(15):687–690.

26. Coppola L, Verrazzo G, La Marca C, Ziccardi P, Grassia A, Tirelli A, Giugliano D. Effect of insulin on blood rheology in non-diabetic subjects and in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 1997;14(11):959–963. Doi: 10.1002/(SICI)1096-9136(199711)14:11<959::AID-DIA499>3.0.CO;2-U.

27. Mantskava M, Pargalava N, Mchedlishvili G. Direct beneficial effect of insulin on blood rheological disorders in the microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2004;30(3–4):431–433.

Информация об авторах

Фабричнова Анастасия Анатольевна – ассистент кафедры терапии Факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия, e-mail: anastasia.fabrichnova@mail.ru.

Кошелев Владимир Борисович – д-р биол. наук, зав. кафедрой физиологии и общей патологии Факультета фундаментальной медицины, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия, e-mail: vkoshelev@fbm.msu.ru.

Мисникова Инна Владимировна – д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник отделения терапевтической эндокрино-

логии, профессор кафедры эндокринологии, Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского, Москва, Россия, e-mail: inna-misnikova@mail.ru.

Ковалева Юлия Александровна – канд. мед. наук, старший научный сотрудник отделения терапевтической эндокринологии, Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского, Москва, Россия, e-mail: yulia.kovaleva@mail.ru.

Семенов Алексей Николаевич – аспирант Физического факультета, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Международный лазерный центр Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия, e-mail: semenov@physics.msu.ru.

Луговцов Андрей Егорович – канд. физ.-мат. наук, научный сотрудник, Физический факультет, Международный лазерный центр Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия, e-mail: anlug1@gmail.com.

Каданова Ирина Михайловна – студент магистратуры, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия, e-mail: kadanovairina@mail.ru.

Незнанов Антон Игоревич – студент магистратуры, Физический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия, e-mail: neznanov.ai@mail.ru.

Приезжев Александр Васильевич – канд. физ.-мат. наук, доцент, Физический факультет, Международный лазерный центр Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия, e-mail: avp2@mail.ru.

Information about authors

Fabrichnova Anastasia A. – Assistant, Department of Therapy, Faculty of Fundamental Medicine, Moscow State University named after M. V. Lomonosov, Moscow, Russia, e-mail: fabrichnova@mail.ru.

Koshelev Vladimir B. – Doctor of Biological Sciences, Head of the Department of Physiology and General Pathology, Faculty of Fundamental Medicine, Moscow State University, Moscow State University named after M. V. Lomonosov, Moscow, Russia, e-mail: vkoshelev@fbm.msu.ru.

Misnikova Inna V. – Doctor of Medical Sciences, Leading Researcher of the Department of Therapeutic Endocrinology, Professor of the Department of Endocrinology, Moscow Regional Research Clinical Institute named after M. F. Vladimirovsky, Moscow, Russia, e-mail: inna-misnikova@mail.ru.

Kovaleva Yulia A. – PhD, Senior Researcher, Department of Therapeutic Endocrinology, Moscow Regional Research Clinical Institute named after M. F. Vladimirovsky, Moscow, Russia, e-mail: yulia.kovaleva@mail.ru.

Semenov Alexey N. – PhD student, Faculty of Physics, Moscow State University named after M. V. Lomonosov, International Laser Center of Moscow State University named after M. V. Lomonosov, Moscow, Russia, e-mail: semenov@physics.msu.ru.

Lugovtsov Andrey E. – PhD in Physics and Mathematics, Researcher, Faculty of Physics, Moscow State University named after M. V. Lomonosov, International Laser Center of Moscow State University named after M. V. Lomonosov, Moscow, Russia, e-mail: anlug1@gmail.com.

Kadanova Irina M. – Master's student, Moscow State University named after M. V. Lomonosov, Moscow, Russia, e-mail: kadanovairina@mail.ru.

Neznanov Anton I. – Master's student, Faculty of Physics, Moscow State University named after M. V. Lomonosov, Moscow, Russia, e-mail: neznanov.ai@mail.ru.

Priezzhev Alexander V. – Candidate of Physical and Mathematical Sciences, Associate Professor, Faculty of Physics, Moscow State University named after M. V. Lomonosov, International Laser Center of Moscow State University named after M. V. Lomonosov, Moscow, Russia, e-mail: avp2@mail.ru.

УДК 616.1:618.14

DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-84-90

П. В. МИХАЙЛОВ, А. В. МУРАВЬЕВ, И. А. ОСЕТРОВ,
Р. С. ОСТРОУМОВ, И. А. ТИХОМИРОВА

Структура взаимосвязей показателей аэробной работоспособности, центральной гемодинамики, микроциркуляции и реологии крови

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Ярославский государственный педагогический университет имени К. Д. Ушинского», г. Ярославль, Россия

150000, г. Ярославль, ул. Республиканская, д. 108/1

E-mail: mpv.yar@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 14.12.20; принята к печати 29.01.21

Резюме

Введение. Поиск взаимосвязей между параметрами, характеризующими функциональное состояние организма на разных его уровнях, является важной задачей при проведении исследований в области физиологии. Поскольку эти взаимосвязи могут быть сложными, опосредованными дополнительными факторами и при использовании парной корреляции не выявляться, то в этом случае представляется оправданным для поиска скрытой структуры связей множества переменных применение факторного анализа. **Цель** – проведение факторного анализа комплекса данных, включающего показатели аэробной работоспособности, центральной гемодинамики, микроциркуляции (МЦ) и реологии крови. **Материалы и методы.** В исследовании приняли участие 172 мужчины в возрасте от 20 до 60 лет. Уровень физической работоспособности оценивали по результатам теста PWC₁₇₀. Параметры МЦ определяли с помощью метода биомикроскопии и лазерной доплеровской визуализации (LDI). Среди гемореологических характеристик измеряли вязкость крови и плазмы, агрегацию и деформируемость эритроцитов. Статистическую обработку полученных данных, включающую факторный анализ, проводили с использованием программного пакета «Statistica 6.0». При построении факторной модели, включающей 32 параметра, учитывались переменные с факторной нагрузкой более 0,60. **Результаты.** Было выделено три фактора, которые составили 71 % от общей дисперсии. Первый фактор был тесно взаимосвязан с параметрами, характеризующими уровень аэробной производительности организма и его адаптационный потенциал. Второй фактор коррелировал с параметрами системы кровообращения, характеризующими условия гемодинамики на центральном уровне и микроциркуляторном, включая интегральные реологические показатели. Третий фактор был взаимосвязан с параметрами, характеризующими кровоток на уровне микрососудов, а также реологические свойства эритроцитов. **Заключение.** Построенная факторная модель демонстрирует иерархическую структуру взаимосвязей показателей аэробной работоспособности, центральной гемодинамики, МЦ, реологии крови. Выделенные факторы – скрытые элементы этой структуры, связывающие отдельные переменные, – были интерпретированы как уровни интеграции: организменный, системный и микроуровневый.

Ключевые слова: факторный анализ, аэробная работоспособность, микроциркуляция, реологические свойства крови, деформируемость эритроцитов

Для цитирования: Михайлов П. В., Муравьев А. В., Осетров И. А., Остроумов Р. С., Тихомирова И. А. Структура взаимосвязей показателей аэробной работоспособности, центральной гемодинамики, микроциркуляции и реологии крови. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2021;20(1):84–90. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-84-90.

UDC 616.1:618.14

DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-84-90

P. V. MIKHAYLOV, A. V. MURAVYOV, I. A. OSETROV,
R. S. OSTROUMOV, I. A. TIKHOMIROVA

The structure of the relationship between indicators of aerobic performance, central hemodynamics, microcirculation and hemorheology

Yaroslavl State Pedagogical University named after K. D. Ushinsky, Yaroslavl, Russia

108/1, Respublikanskaya str., Yaroslavl, Russia, 150000

E-mail: mpv.yar@yandex.ru

Received 14.12.20; accepted 29.01.21

Summary

Introduction. In physiological research, an important task is to find the relationship between the various functional parameters of the organism, its individual systems and its elements. These relationships can be complex, mediated by additional factors and when using pair correlation, they cannot be detected. In this case, it seems justified to use factor analysis to search

for the hidden structure of relationships between many variables. *The aim.* Factor analysis of a set of data, including indicators of aerobic performance, central hemodynamics, microcirculation (MC) and hemorheology. *Materials and methods.* The study involved 172 men aged 20 to 60 years. Physical performance was determined using the PWC₁₇₀ test. Microcirculation parameters were determined using biomicroscopy and Laser Doppler Imaging (LDI). The complex of hemorheological characteristics included the viscosity of blood and plasma, aggregation and deformability of erythrocytes. Statistical processing, including factor analysis, was carried out using the Statistica 6.0 software package. The factorial model included 32 parameters. When interpreting the results of factor analysis, variables with factor loadings of more than 0.60 were considered. *Results.* Three factors were identified, which accounted for 71 % of the total variance. The first factor closely correlated with the level of the body's aerobic performance parameters and its adaptive potential. The second factor correlated with hemodynamic parameters at the central and microcirculatory level, including integral rheological parameters. The third factor correlated with the parameters of microvessels and the rheological properties of erythrocytes. *Conclusions.* The constructed factor model demonstrates the level structure of the relationships of indicators of aerobic performance, central hemodynamics, microcirculation, and hemorheology. The selected factors – the hidden elements of this structure linking individual variables – were interpreted as levels of integration: organismic, systemic and microlevel.

Keywords: factor analysis, aerobic performance, microcirculation, rheological properties of blood, deformability of erythrocytes

For citation: Mikhaylov P. V., Muravyov A. V., Osetrov I. A., Ostroumov R. S., Tikhomirova I. A. The structure of the relationship between indicators of aerobic performance, central hemodynamics, microcirculation and hemorheology. *Regional blood circulation and microcirculation*. 2021;20(1):84–90. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-84-90.

Введение

Для доставки в тканевый микрорайон дыхательных газов, субстратов окисления и регуляторных молекул необходима скоординированная работа системной гемодинамики, регионарного кровотока, микроциркуляции и реологии крови [1]. Поэтому одной из важных задач при проведении исследований в области физиологии является поиск взаимосвязей между показателями, характеризующими функциональное состояние организма как единого целого, отдельных его систем и входящих в них элементов. Установление связей необходимо для более глубокого понимания структурной организации многокомпонентной системы, а также является важным этапом в поиске биомаркеров различных физиологических и патологических состояний [2–6]. Как правило, для этого используют парную корреляцию, которая позволяет определить тесноту взаимосвязи двух переменных. Но поскольку в организме человека связи отдельных взятых показателей могут быть сложными и опосредованы дополнительными факторами, то возможности данного статистического метода не всегда позволяют их в полной мере выявить и получаемые коэффициенты корреляции могут быть ниже гипотетических. Подобные ситуации могут иметь место при корреляционном анализе параметров, относящихся к разным уровням интеграции организма, например, системному и клеточному, так как связи между этими уровнями могут зависеть от факторов, которые при определении парной корреляции в расчет не принимаются. В этом случае представляется оправданным для поиска скрытой структуры взаимосвязей множества переменных применение факторного анализа – статистического метода, который позволяет объединить информацию по большому числу показателей [7, 8]. Выделенные факторы являются скрытыми элементами этой структуры, связывающими (нагружающими) отдельные переменные. Основываясь на факторных нагрузках параметров, появляется возможность количественной оценки факторов и дальнейшей интерпретации построенной факторной модели [8–10].

Цель работы – проведение факторного анализа комплекса данных, включающего показатели аэроб-

ной работоспособности, центральной гемодинамики, микроциркуляции и реологии крови.

Материалы и методы исследования

В исследовании приняли участие 172 мужчины в возрасте от 20 до 60 лет, имеющие разный уровень физической работоспособности, который оценивали по результатам теста PWC₁₇₀. У испытуемых определяли параметры центральной гемодинамики в состоянии покоя: систолическое артериальное давление (САД) и диастолическое (ДАД); частоту сердечных сокращений (ЧСС); рассчитывали среднее артериальное давление (АД_{ср.}) и двойное произведение (ДП). На основании результатов теста PWC₁₇₀ рассчитывали величину максимального потребления кислорода (МПК), пульсовой критерий экономичности (ПКЭ) и критическую мощность (W_{кр.}), под которой понимали отношение достигнутой мощности работы на велоэргометре (Вт) к массе тела испытуемого (кг). Состояние микроциркуляции (МЦ) оценивали с помощью биомикроскопии бульбарной конъюнктивы: измеряли диаметры параллельно идущих артериол (DA) и венул (DB) и ногтевого ложа, а также измеряли диаметр переходной части капилляров (DK) и подсчитывали плотность функционирующих капилляров (ПФК). При помощи лазерной доплеровской визуализации (LDI) измеряли перфузию кожи на середине предплечья (ПМ – показатель МЦ). Все параметры МЦ определяли в покое и сразу после теста PWC₁₇₀. Зарегистрированные изменения выражали в процентах к исходным значениям.

Цельную кровь получали венопункцией в вакуумные пробирки (6 мл, 13×100 мм, «VACUETTE» с K2 ЭДТА для гематологии, без резьбы) в условиях клинической лаборатории квалифицированным медицинским персоналом после получения информированного согласия донора. Все измерения и манипуляции с цельной кровью проводили в течение 4 ч после ее забора, при комнатной температуре 20,0±0,5 °С, которую контролировали с помощью кондиционера. Среди гемореологических характеристик определяли гематокрит (Hct), концентрацию гемоглобина в крови (Hb), вязкость цельной крови (ВК) при относительно высоких (2,0 мПа) и низких (0,2 мПа) напряжениях

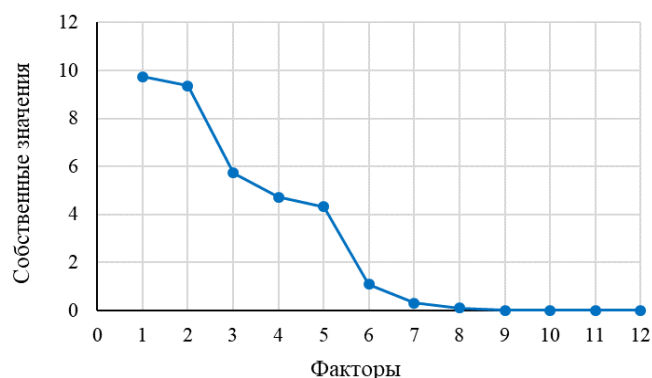


Рис. 1. График собственных значений

Fig. 1. Graph of eigenvalues

сдвига, вязкость плазмы (ВП), вязкость суспензии эритроцитов со стандартизированным гематокритом 40 % (ВС), рассчитывали показатель эффективности транспорта кислорода (Нст/ВК). Для оценки микро-реологических свойств эритроцитов определяли показатель агрегации (ПА), среднее число клеток в эритроците (Ч/А) и индекс удлинения эритроцитов (ИУЭ), характеризующий их деформируемость. Все испытуемые дали информированное согласие на участие в исследовании, и исследование было одобрено Этическим комитетом университета (протокол № 6 от 18.06.2020 г.).

Статистическую обработку полученных данных, включающую в себя факторный анализ, проводили с использованием программного пакета «Statistica 6.0». Структуру взаимосвязей указанных выше показателей определяли с помощью метода главных компонентов. Он заключается в выделении ограниченного числа компонентов (главных факторов), вносящих наибольший вклад в общую дисперсию данных, при этом остальные факторы исключаются из анализа для упрощения интерпретации результатов. Соотношение числа наблюдений к числу признаков составило 5:1, что соответствует требованиям к применению данного статистического метода. Для стандартизации множества показателей, имеющих разную размерность, все исходные данные подвергали нормированию. При построении факторной модели, включающей в себя 32 параметра, учитывали переменные с факторной нагрузкой более 0,60. Число факторов, подлежащих интерпретации, определяли с использованием критерия «каменистой осыпи» Кеттелла, суть которого состоит в поиске точки на графике (рис. 1), где убывание собственных значений слева направо максимально замедляется [7]. Применение методов вращения компонентов, которые часто используются для усиления факторных нагрузок, не приводило к упрощению факторной модели и не делало ее более понятной для дальнейшей интерпретации, поэтому в нашей работе описана модель без вращения компонентов.

Результаты исследования и их обсуждение

На рис. 1 показан график убывания собственных значений от фактора к фактору. Характерный излом кривой, свидетельствующий о замедлении убывания, был после третьего критерия, соответственно, это

число факторов и было выделено для описания и дальнейшей интерпретации. Суммарная доля трех выделенных факторов в общей дисперсии составила 71 %.

Первый фактор (28 % от общей дисперсии) имеет высокую положительную корреляцию с показателем физической работоспособности, выраженным через индекс PWC_{170} ($r=0,86$), критической мощностью ($r=0,89$) и уровнем МПК/кг ($r=0,84$). Этот фактор оказался отрицательно связан с пульсовыми характеристиками, зарегистрированными в покое ($r=-0,86$) и в условиях мышечной нагрузки (ПКЭ) ($r=-0,81$). Он был интерпретирован как «организменный», так как был тесно взаимосвязан с параметрами, характеризующими уровень аэробной производительности организма и его адаптационный потенциал, при этом факторная нагрузка показателей МЦ и реологии крови была низкой (табл. 1).

Второй фактор (27 % от общей дисперсии) имеет отрицательную взаимосвязь с параметрами артериального давления ($r=-0,73-0,86$), величинами вязкости крови при высоких и низких напряжениях сдвига ($r=-0,77-0,80$) и вязкости суспензии эритроцитов со стандартным гематокритом при высоких скоростях течения ($r=-0,76$). Прямая взаимосвязь второго фактора была с диаметром артериол конъюнктивы ($r=0,71$), диаметром капилляров кожи ($r=0,87$) и с показателем эффективности транспортной функции крови ($r=0,87$). Он был интерпретирован как «системный», так как тесно коррелировал с параметрами системы кровообращения, характеризующими условия гемодинамики на центральном уровне и микроциркуляторном, включая интегральные реологические показатели.

Третий фактор (16 % от общей дисперсии) имеет положительную взаимосвязь с диаметром венул ($r=0,77$), плотностью функционирующих капилляров кожи ($r=0,66$), изменением их диаметра в ответ на функциональную нагрузку ($r=0,68$), резервом перфузии ($r=0,67$) и вязкостью плазмы ($r=0,61$). Обратная взаимосвязь третьего фактора была с изменением диаметра венул конъюнктивы после мышечной нагрузки ($r=-0,70$) и деформируемостью эритроцитов ($r=-0,81$). Данный фактор был интерпретирован как «микроциркуляторный», поскольку коррелировал с показателями, характеризующими кровоток на уровне микрососудов, а также микрореологические свойства эритроцитов, при этом факторная нагрузка параметров центральной гемодинамики и физической работоспособности снижалась.

Результаты факторного анализа демонстрируют иерархическую структуру взаимосвязей комплекса рассматриваемых параметров, относящихся к физической работоспособности, центральной гемодинамике, микроциркуляции и гемореологии (рис. 2).

В представленной факторной модели основной вклад в общую дисперсию вносит первый фактор, в котором наибольшие факторные нагрузки имели показатели, характеризующие организменный уровень интеграции – его аэробную производительность, при этом корреляционные взаимосвязи данного фактора с параметрами микроциркуляции и реологии крови

Результаты факторного анализа параметров физической работоспособности, центральной гемодинамики, МЦ и реологии крови (в скобках указана факторная нагрузка параметров, вошедших в факторную модель)**Results of factor analysis of parameters of physical working capacity, central hemodynamics, microcirculation and hemorheology (factor load of the parameters included in the factor model is indicated in brackets)**

Показатель	M±σ	Фактор 1 (28 % от общей дисперсии)	Фактор 2 (27 % от общей дисперсии)	Фактор 3 (16 % от общей дисперсии)
ЧСС, уд./мин	66,0±12,7	-0,86	0,21	0,04
САД, мм рт. ст.	127,9±12,0	0,20	-0,73	0,12
ДАД, мм рт. ст.	78,9±10,5	-0,10	-0,86	0,34
АД ср., мм рт. ст.	95,0±10,2	-0,01	-0,84	0,28
ДП, отн. ед.	84,6±19,0	-0,75	-0,06	0,07
PWC170/кг, кг·м/мин/кг	20,1±5,0	0,86	0,38	-0,11
МПК/кг, мл/мин/кг	49,8±9,4	0,84	0,36	0,02
Wкр., Вт/кг	3,3±0,8	0,89	0,32	-0,08
ПКЭ, отн. ед.	0,165±0,052	-0,81	-0,46	-0,17
DA, мкм	14,6±4,8	-0,43	0,70	0,26
DB, мкм	28,5±11,1	0,16	0,58	0,77
A/B, отн. ед.	0,54±0,11	-0,53	0,10	-0,55
DK, мкм	16,3±3,7	-0,42	0,87	0,56
ПФК, 1/мм ²	60,1±15,0	0,11	-0,33	0,66
ПМ, отн. ед.	7,6±2,3	0,10	0,44	-0,43
Hct, %	47,0±2,7	0,47	0,01	0,03
Hb, г/л	147,8±9,5	0,14	-0,52	0,39
МСНС, г/дл	31,5±2,1	-0,41	-0,28	0,18
BK1, мПа·с	2,77±0,43	0,46	-0,77	-0,2
BK2, мПа·с	4,86±1,20	0,01	-0,80	-0,2
BC, мПа·с	1,57±0,27	0,11	-0,76	-0,49
BP, мПа·с	1,94±0,20	0,5	-0,42	0,71
Hct/BK1, отн. ед.	17,3±2,3	-0,22	0,87	0,32
ПА, отн. ед.	0,037±0,025	0,37	0,14	-0,38
Ч/А	4,60±0,68	0,05	-0,27	-0,1
ИУЭ, отн. ед.	0,236±0,020	-0,44	0,08	-0,81
DA изм., %	6,4±30,7	0,31	-0,73	0,26
DB изм., %	5,0±38,1	0,35	-0,2	-0,70
A/B изм., %	4,9±21,0	0,02	-0,29	0,53
DK изм., %	5,1±10,1	0,26	0,43	0,68
ПФК изм., %	12,0±15,4	0,08	-0,48	0,18
ПМ изм., %	70,6±60,5	0,4	-0,48	0,67

Примечание: ЧСС – частота сердечных сокращений; САД – артериальное давление систолическое; ДАД – артериальное давление диастолическое; АД ср. – артериальное давление среднее; ДП – двойное произведение; PWC170/кг – относительный показатель аэробной работоспособности; МПК/кг – относительный показатель максимального потребления кислорода; Wкр. – критическая мощность; ПКЭ – пульсовый критерий экономичности; DA – диаметр артериол; DB – диаметр венул; A/B – артериоловеноулярное соотношение; DK – диаметр капилляров; ПФК – плотность функционирующих капилляров; ПМ – показатель МЦ (перфузия); Hct – гематокрит; Hb – концентрация гемоглобина в крови; МСНС – средняя концентрация гемоглобина в эритроците; BK1 – вязкость крови при относительно высоком напряжении сдвига (2,0 мПа); BK2 – вязкость крови при относительно низком напряжении сдвига (0,2 мПа); BC – вязкость суспензии эритроцитов; BP – вязкость плазмы; Hct/BK1 – показатель эффективности транспортной функции крови; ПА – показатель агрегации эритроцитов; Ч/А – число клеток в агрегате; ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов; DAизм. – изменение диаметра артериол после дозированной физической нагрузки (ДФН); DBизм. – изменение диаметра венул после дозированной физической нагрузки; A/Визм. – изменение артериоловеноулярного соотношения после ДФН; DKизм. – изменение диаметра капилляров после ДФН; ПФКизм. – изменение числа функционирующих капилляров после ДФН; ПМизм. – изменение показателя МЦ после ДФН (прирост перфузии).



Рис. 2. Структура взаимосвязей параметров, относящихся к разным уровням интеграции организма, в соответствии с предложенной интерпретацией результатов факторного анализа

Fig. 2. The structure of the relationship of parameters related to different levels of integration of the organism, in accordance with the proposed interpretation of the results of factor analysis

были слабыми. Известно, что выполнение абсолютного большинства бытовых и производственных физических усилий связано с аэробной энергопродукцией и величина МПК тесно связана с уровнем здоровья и продолжительностью жизни человека [11–13]. Это позволяет рассматривать показатель МПК в качестве интегрального количественного критерия, характеризующего адаптационный потенциал организма.

Вклад второго фактора в общую дисперсию был лишь на 1 % меньше, чем первого, а параметры, имеющие наибольший факторный вес, относились к системному уровню организации гемодинамики. Известно, что в системе кровообращения эффективность реализации транспортной функции определяется оптимальным сочетанием ряда факторов, среди которых движущая сила – давление, диаметр сосудов и вязкость крови [14, 15]. Регуляторные изменения этих параметров лежат в основе адаптационных и компенсаторных перестроек гемодинамики. Например, для долговременной адаптации к аэробным упражнениям характерно умеренное снижение вязкости крови, что способствует повышению эффективности кровотока на всех уровнях, включая и микроциркуляцию [16]. Примером компенсаторных изменений может быть увеличение вязкости крови для сохранения тканевой перфузии на адекватном запросе тканей уровне при повышенном артериальном давлении, которое часто сопровождается сужением

сосудов притока [17]. В этом случае повышенная вязкость создает большее напряжение сдвига на сосудистой эндотелии, что, в свою очередь, способствует образованию оксида азота в эндотелиоцитах, его диффузии к гладкомышечным клеткам артериол и дилатации последних [15].

Третий выделенный фактор имеет существенно меньший вклад в общую дисперсию, чем первый и второй (на 12 и 10 % соответственно), а наибольшую факторную нагрузку имели показатели, относящиеся к микроциркуляторному уровню и характеризующие микрососудистый и клеточный компоненты. При этом корреляционные взаимосвязи третьего фактора с параметрами центральной гемодинамики и физической работоспособности были существенно менее выраженными. На уровне МЦ на величину тканевой перфузии и на ее функциональный резерв существенное влияние оказывает слаженность сосудистых реакций [18]. Изменение просвета сосудов притока и оттока в системе МЦ позволяет регулировать число перфузируемых капилляров. Кроме того, микроциркуляторные параметры эритроцитов – их деформируемость и агрегация, а также активация и адгезия к эндотелию лейкоцитов – могут влиять на кровоток в микрососудах [19, 20]. Известно, что эритроциты, представляющие самую многочисленную популяцию клеток крови, в процессе прохождения через пути МЦ значительно деформируются. От того, насколько легко они могут изменять свою форму под действием внешних сил, зависит эффективность реализации кислородтранспортной функции крови [21]. В комплекс важных гемореологических параметров входит вязкость плазмы, поскольку движущее давление передается на клетки крови через плазму, а, следовательно, ее вязкость может влиять на эффективность этой передачи и перфузию тканей [22]. В представленной факторной модели все эти параметры, относящиеся к микроуровню интеграции, имели выраженные взаимосвязи с третьим фактором (рис. 3).

Представленная факторная модель согласуется и в определенной мере может объяснять результаты парной корреляции, при использовании которой не всегда удается выявить выраженные взаимосвязи между переменными, характеризующими разные

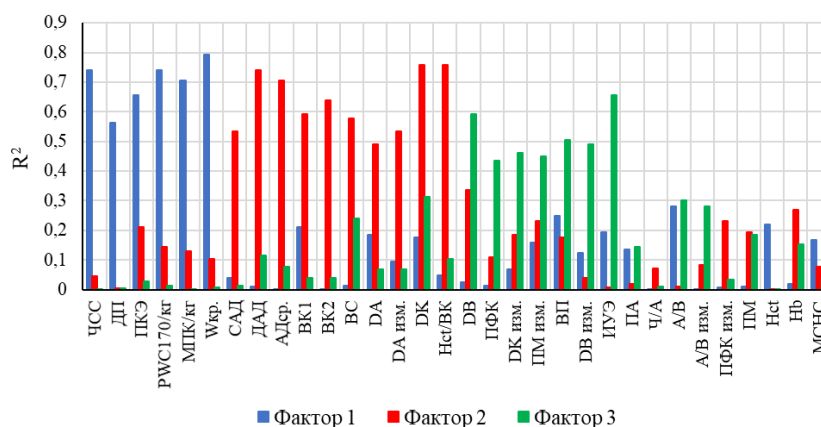


Рис. 3. Графическое изображение обобщенной факторной модели: R^2 – факторные нагрузки, возведенные в квадрат; сокращения показателей те же, что в таблице

Fig. 3. Graphical representation of generalized factor model: R^2 – factor loads squared; abbreviated designations of indicators are the same as in table

уровень интеграции организма. Так, например, величина МПК слабо коррелирует с параметрами микроциркуляции. Это может быть обусловлено тем, что МПК представляет собой комплексный показатель, обобщающий влияние трех основных компонентов: минутного объема кровообращения, кислородной емкости крови и способности мышц усваивать кислород [23]. При этом сходный уровень аэробной производительности у разных лиц может достигаться за счет различного по величине вклада каждого из вышеуказанных компонентов, и применение парной корреляции может не выявить высокой взаимосвязи между МПК и одним из параметров, относящихся к клеточному уровню организации (микроциркуляция и микрореология клеток крови). Это согласуется с результатами исследований, в которых описаны различные стратегии долговременной адаптации к аэробным мышечным нагрузкам, затрагивающие в разной мере центральный и периферический отделы сердечно-сосудистой системы [16, 24]. В представленной факторной модели выделенные факторы были интерпретированы как уровни интеграции организма, так как связывали переменные, относящиеся к определенному уровню организации. Полученные данные могут являться статистическим подтверждением интуитивно понятных, но не всегда доступных для количественной оценки факторов, влияющих на результаты парной корреляции.

Заключение

Таким образом, представленная факторная модель демонстрирует уровневую структуру связей показателей, относящихся к физической работоспособности, центральной гемодинамике, микроциркуляции, реологии крови и микрореологии эритроцитов. Наибольший факторный вес в каждом отдельно рассматриваемом факторе имели параметры, относящиеся к определенному уровню интеграции – организменному, системному, органному и клеточному.

Финансирование / Acknowledgments

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

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Литература / References

1. Pries AR, Secomb TW. Rheology of the microcirculation. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2003; 29(3–4):143–148.
2. Huang Y, Liu A, Liang L, Jiang J, Luo H, Deng W, Lin G, Wu M, Li T, Jiang Y. Diagnostic value of blood parameters for community-acquired pneumonia. *Int Immunopharmacol.* 2018;(64):10–15. Doi: 10.1016/j.intimp.2018.08.022.
3. Martin-Ruiz C, Dickinson HO, Keys B, Rowan E, Kenny RA, von Zglinicki T. Telomere length predicts post-stroke mortality, dementia and cognitive decline. *Ann. Neurol.* 2006;(60):174–180. Doi: 10.1002/ana.20869.
4. Reinhart K, Bayer O, Brunkhorst F, Meisner M. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Crit Care Med.* 2002;30(5):302–312. Doi: 10.1097/00003246-200205001-00021.
5. Wagner K, Cameron-Smith D, Wessner B, Franzke B. Biomarkers of aging: from function to molecular biology nutrients. 2016;(8):338. Doi:10.3390/nu8060338.
6. Cohen AA, Milot E, Li Q, Bergeron P, Poirier R, Dusseault-Bélanger F, Fülöp T, Leroux M, Legault V, Metter J, Fried L, Ferrucci L. Detection of a novel, integrative aging process suggests complex physiological integration. *PLoS One.* 2015;(10):3. Doi: 10.1371/journal.pone.0116489.
7. Bartholomew D, Knotts M, Moustaki I. Latent variable models and factor analysis: a unified approach. John Wiley & Sons, 2011:296.
8. Dusseault-Bélanger F, Cohen AA, Hivert MF, Courteau J, Vanasse A. Validating metabolic syndrome through principal component analysis in a medically diverse, realistic cohort. *Metabolic Syndrome and Related Disorders.* 2013;(11):21–28. Doi: 10.1089/met.2012.0094.
9. Johnson RA, Wichern DW. Applied multivariate statistical analysis. Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall, 2002:773.
10. Floyd FJ, Widaman K. Factor analysis in the development and refinement of clinical assessment instruments. *Psychol Assessment.* 1995;(7):286–299. Doi: 10.1037/1040-3590.7.3.286.
11. Апанасенко Г. Л., Науменко Р. Г. Соматическое здоровье и максимальная аэробная способность индивида // Теория и практика физкультуры. – 1988. – № 4. – С. 29–31. [Apanasenko GL, Naumenko RG. Somatic health and maximum aerobic capacity of the individual. Theory and practice of physical culture. 1988;(4):29–31. (In Russ.)].
12. Белозерова Л. М. Физическая работоспособность и биологический возраст мужчин // Клини. геронтол. – 2008. – № 5. – С. 21–24. [Belozerova LM. Physical performance and biological age of men. Clinical. gerontol. 2008;(5): 21–24. (In Russ.)].
13. Kodama S, Saito K, Tanaka S, Maki M, Yachi Y, Asumi M, Sugawara A, Totsuka K, Shimano H, Ohashi Y, Yamada N, Sone H. Cardiorespiratory fitness as a quantitative predictor of all-cause mortality and cardiovascular events in healthy men and women: A meta-analysis. *JAMA.* 2009;(301):2024–2035. Doi: 10.1001/jama.2009.681.
14. Baskurt OK, Meiselman HJ. Blood rheology and hemodynamics Semin. *Thromb. Hemost.* 2003;(29):435–450. Doi: 10.1055/s-2003-44551.
15. Popel AS, Johnson PC. Microcirculation and Hemorheology. *Ann. Rev. Fluid. Mech.* 2005;(37):43–69. Doi. org/10.1146/annurev.fluid.37.042604.133933.
16. Муравьев А. В., Левин В. Н., Михайлов П. В. и др. Две стратегии адаптации текучести крови к потребностям организма человека при мышечной деятельности // Ярослав. педагог. вест. – 2012. – Т. 3, № 1. – С. 125–130. [Muravyov AV, Levin VN, Mikhailov PV, Muravyov AA, Osetrov IA, Bakanova IA. Two strategies for adapting blood flow to the needs of the human body during muscular activity. Yaroslavl Pedagogical Bulletin. 2012;3(1):125–130. (In Russ.)].
17. Муравьев А. В., Кислов Н. В., Тухомирова И. А. и др. Влияние вязкости плазмы и гематокрита на деформацию эритроцитов // Рос. журнал биомеханики. – 2013. – Т. 17, № 2. – С. 75–83. [Muravyov AV, Kislov NV, Tikhomirova IA, Mikhailov PV, Muravyov AA. Influence of plasma viscosity and hematocrit on erythrocyte deformation. Russian Journal of Biomechanics. 2013;17(2):75–83. (In Russ.)].
18. Микроциркуляция в коже при мышечной нагрузке как модель для изучения общих механизмов изменения микрокровотока / А. В. Муравьев, А. А. Ахапкина, П. В. Му-

хайлов, А. А. Муравьев // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2014. – Т. 13, № 2 (50). – С. 64–68. [Muravyov AV, Akharkina AA, Mikhaylov PV, Muravyev AA. Microcirculation in the skin under muscular load as a model for studying the general mechanisms of microcirculation changes. Regional blood circulation and microcirculation. 2014;13(2):64–68. (In Russ.)].

19. Brun JF, Varlet-Marie E, Romain AJ, Guiraudou M, de Mauverger ER. Exercise hemorheology: Moving from old simplistic paradigms to a more complex picture. Clin. Hemorheol. Microcirc. 2013;55(1):15–27. Doi: 10.3233/CH-131686.

20. Фирсов Н. Н., Климова Н. В., Коротаева Т. В. Степень зависимости периферического кровотока от изменений микрореологических свойств крови // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 58–62. [Firsov NN, Klimova NV, Korotaeva TV. The degree of dependence of peripheral blood flow on changes in microreological properties of blood. Regional blood circulation and microcirculation. 2010;9(4):58–62. (In Russ.)].

21. Muravyov AV, Tikhomirova IA. Role of molecular signaling pathways in changes of red blood cell deformability. Clin. Hemorheol. Microcirc. 2013;(53):45–59. Doi: 10.3233/CH-2012-1575.

22. Salazar Vázquez BY, Martini J, Chávez Negrete A, Tsai AG, Forconi S, Cabrales P, Johnson PC, Intaglietta M. Cardiovascular benefits in moderate increases of blood and plasma viscosity surpass those associated with lowering viscosity: Experimental and clinical evidence. Clin. Hemorheol. Microcirc. 2010;2(44):75–85. Doi: 10.3233/CH-2010-1261.

23. Bassett DR, Howley ET. Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. Med Sci Sports Exerc. 2000;(32):70–84. Doi: 10.1097/00005768-200001000-00012.

24. Lepers R, Stapley PJ. Master athletes are extending the limits of human endurance. Front. Physiol. 2016;(7):613. Doi: 10.3389/fphys.2016.00613.

Информация об авторах

Михайлов Павел Валентинович – канд. биол. наук, доцент кафедры спортивных дисциплин, Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского,

г. Ярославль, Россия, e-mail: mpv.yar@yandex.ru, ORCID: 0000-0003-1491-3882.

Муравьев Алексей Васильевич – д-р биол. наук, профессор кафедры медико-биологических основ спорта, Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского, г. Ярославль, Россия, e-mail: alexei.47@mail.ru, ORCID: 0000-0002-5502-9164.

Осетров Игорь Александрович – канд. биол. наук, доцент кафедры спортивных дисциплин, Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского, г. Ярославль, Россия, e-mail: igos@yandex.ru ORCID: 0000-0002-3269-2262.

Остроумов Роман Сергеевич – преподаватель кафедры физической подготовки, Ярославское высшее военное училище противовоздушной обороны, г. Ярославль, Россия.

Тихомирова Ирина Александровна – д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой медицины, биологии, теории и методики обучения биологии, Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского, г. Ярославль, Россия, e-mail: tikhom-irina@yandex.ru, ORCID: 0000-0001-9521-4017.

Information about authors

Mikhaylov Pavel V. – Cand. of Sci. (Biol.), associate professor of the department of sports disciplines, Yaroslavl state pedagogical university named after K. D. Ushinsky, Yaroslavl, Russia, e-mail: mpv.yar@yandex.ru, ORCID: 0000-0003-1491-3882.

Muravyov Alexey V. – Doctor of biological sciences, professor of the department of medical and biological foundations of sports, Yaroslavl state pedagogical university named after K. D. Ushinsky, Yaroslavl, Russia, e-mail: alexei.47@mail.ru, ORCID: 0000-0002-5502-9164.

Osetrov Igor A. – Cand. of Sci. (Biol.), associate professor of the department of sports disciplines, Yaroslavl state pedagogical university named after K. D. Ushinsky, Yaroslavl, Russia, e-mail: igos@yandex.ru, ORCID: 0000-0002-3269-2262.

Ostroumov Roman S. – teacher of the department of physical training, Yaroslavl higher military school of air defense, Yaroslavl, Russia.

Tikhomirova Irina A. – Doctor of biological sciences, professor, head of department of medicine, biology, theory and methods of teaching biology, Yaroslavl state pedagogical university named after K. D. Ushinsky, Yaroslavl, Russia, e-mail: tikhom-irina@yandex.ru, ORCID: 0000-0001-9521-4017.

УДК 546.221.1:612.822:616
DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-91-99

А. В. МУРАВЬЕВ

Роль газовых медиаторов (CO, NO и H₂S) в регуляции кровообращения: анализ участия микрореологии клеток крови

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Ярославский государственный педагогический университет имени К. Д. Ушинского», г. Ярославль, Россия
150000, г. Ярославль, ул. Республиканская, д. 108/1
E-mail: alexei.47@mail.ru

Статья поступила в редакцию 06.12.20; принята к печати 22.01.21

Резюме

Среди сигнальных молекул, участвующих в регуляции внутри- и межклеточных систем в различных типах клеток, особое место занимают газообразные соединения – газотрансмиттеры (ГТ). В настоящее время наиболее изученными являются три молекулы: оксид азота (NO), монооксид углерода (CO) и сероводород (H₂S). Для них определены ферментативные системы внутриклеточного синтеза и деградации, доказано физиологическое действие и определены внутриклеточные механизмы, изменение работы которых под влиянием ГТ вызывает развитие физиологических и/или патофизиологических реакций. Эти ГТ участвуют в регуляции различных органов и систем организма человека в норме и при патологии и, в том числе, структуры и функции системы кровообращения. В данной статье особое внимание уделено влиянию всех трех газотрансмиттеров и их доноров на сосудистый и гемореологический аспект кровообращения и особенно на малоразработанную проблему – микрореологию эритроцитов. Показано, что все три ГТ, наряду с известным вазодилатирующим эффектом, снижают адгезию и агрегацию тромбоцитов и лейкоцитов, а также умеренно стимулируют деформируемость эритроцитов и выражено угнетают их агрегацию. Выполненный анализ данных свидетельствует о том, что, наряду с особенными сигнальными каскадами, для каждого ГТ в микрореологических ответах может быть использован общий сигнальный путь, ассоциированный с растворимой гуанилатциклазой и NO-синтазой. Пересечение сигнальных путей запускаемых NO, CO и H₂S на общих эффекторах, а также взаимодействие их между собой (cross-talk) может определять конечный, результирующий функциональный ответ клетки.

Ключевые слова: газотрансмиттеры, оксид азота, сероводород, монооксид углерода, кровообращение, микро-реология, эритроциты

Для цитирования: Муравьев А. В. Роль газовых медиаторов (CO, NO и H₂S) в регуляции кровообращения: анализ участия микрореологии клеток крови. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2021;20(1):91–99. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-91-99.

UDK 546.221.1:612.822:616
DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-91-99

A. V. MURAVYOV

The role of gaseous mediators (CO, NO and H₂S) in the regulation of blood circulation: analysis of the participation of blood cell microrheology

Yaroslavl State Pedagogical University named after K. D. Ushinsky, Yaroslavl, Russia
108/1, Respublikanskaya str., Yaroslavl, Russia, 150000
E-mail: alexei.47@mail.ru

Received 06.12.20; accepted 22.01.21

Summary

Among the signaling molecules involved in the regulation of intra- and intercellular systems in various types of cells, a special place is occupied by gaseous compounds – gasotransmitters (GTs). Currently, the most studied are three molecules: nitrogen oxide (NO), carbon monoxide (CO) and hydrogen sulfide (H₂S). For them, the enzymatic systems of intracellular synthesis and degradation have been determined, the physiological effect has been proved, and the intracellular mechanisms have been determined. Changes in the work of these mechanisms under the influence of GTs causes the development of physiological and/or pathophysiological reactions. These GTs are involved in the regulation of various organs and systems of the human body under normal and pathological conditions, including the structure and function of the circulatory system. In this article, special attention is paid to the influence of all three GTs and their donors on the vascular and hemorheological aspect of the work of blood circulation, and especially on an underdeveloped problem – the microrheology of erythrocytes. It has been shown that all three GTs, along with the well-known vasodilating effect, reduce the adhesion and aggregation of platelets and leukocytes, as well as moderately stimulate the deformability of erythrocytes and strongly inhibit their aggregation. The performed analysis of the data indicates that, along with the specific signaling cascades for each GT, the use of a common signaling pathway associated with soluble guanylate cyclase and NO synthase was also revealed in microrheological responses. The intersection of signaling pathways triggered by NO, CO and H₂S on common effectors, as well as their interaction with each other (cross-talk), can determine the final, resulting functional response of the cell.

Keywords: gasotransmitters, nitric oxide, hydrogen sulfide, carbon monoxide, blood circulation, microrheology, erythrocytes

For citation: Muravyov A. V. The role of gaseous mediators (CO, NO and H₂S) in the regulation of blood circulation: analysis of the participation of blood cell microrheology. Regional blood circulation and microcirculation. 2021;20(1):91–99. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-1-91-99.

Введение

В передаче регуляторных сигналов к эффекторным клеткам, наряду с синаптической формой, используется и другой способ межклеточной и внутриклеточной коммуникации – передача информации с помощью газовых медиаторов, или газотрансмиттеров (ГТ). К ним относятся оксид азота (NO), монооксид углерода (CO) и сульфид водорода (H₂S) [1–3].

Все три указанных газа соответствуют всем критериям, определяющим их как газовые медиаторы или трансммиттеры. Термин «газотрансмиттер» относится к газообразной молекуле, которая синтезируется и высвобождается в биологической системе и обладает функцией преобразования сигнала. Ниже приведены критерии идентификации для газотрансмиттера. Соединение должно [4]:

- 1) быть газом;
- 2) быть эндогенно и ферментативно вырабатываемым регулируемым образом;
- 3) вызывать, при экзогенном применении, четко определенные физиологические эффекты в соответствующих концентрациях, которые имитируют действие эндогенно продуцируемого ГТ на клетки тканей;
- 4) действовать на определенные клеточные мишени;
- 5) использовать особый механизм инактивации.

В течение многих десятилетий оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода описывались как токсичные газы, оказывающие повреждающее действие на организм человека. Вместе с тем относительно недавно было установлено, что указанные выше соединения эндогенно синтезируются клетками организма и являются сигнальными молекулами, выполняющими как аутокринную, так и паракринную регуляцию во многих тканях и органах тела человека и животных [5]. Изучение действия механизмов газовых трансммиттеров – важная задача современной физиологии.

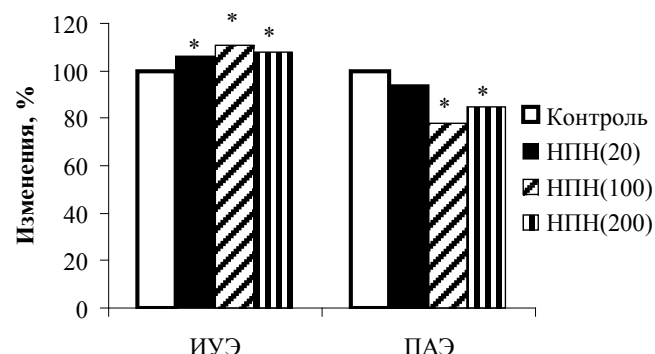


Рис. 1. Изменение деформируемости (ИУЭ) и агрегации эритроцитов (ПАЭ) после их инкубации с нитропруссидом натрия (НПН): ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов как показатель их деформируемости; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов; концентрации НПН (мкМ) указаны в скобках; * – отличие от контроля статистически достоверно ($p < 0,05$)

Fig. 1. Change in deformability (IEE) and aggregation of erythrocytes (IAE) after their incubation with sodium nitroprusside (SNP): IEE is an index of elongation of erythrocytes as an indicator of their deformability; IAE is an indicator of aggregation of erythrocytes; SNP concentrations (μM) are indicated in brackets; * – the difference from the control is statistically significant ($p < 0,05$)

Объектом регуляторного воздействия являются и клеточные структуры системы кровообращения. Известно, что артериальное давление и перфузия тканей в значительной мере регулируются артериолами, сосудами, расположенными непосредственно перед нутритивными капиллярами. Они известны как резистивные сосуды и составляют обширную сеть. Для поддержания перфузии адекватной запросу тканей эти сосуды реагируют на эндокринные, паракринные и аутокринные сигналы. Паракринные регуляторные воздействия и, в том числе, газотрансмиттеры, расширяют мелкие артерии и артериолы и тем самым обеспечивают эффективную тканевую перфузию [2]. Известно, что все они стимулируют образование циклических нуклеотидов (цАМФ/цГМФ) и активируют внутриклеточные протеинкиназы (РКА/РКГ). Сигнальный молекулярный путь этих газотрансмиттеров может включать регуляцию калиевых каналов, что также вызывает вазодилатацию. Кроме того, показано, что вазорелаксация в ответ на действие H₂S возникает в результате активации АТФ-зависимых калиевых каналов (K⁺_{ATP}), а также потенциалзависимых калиевых каналов [6]. Что касается монооксида углерода, то его сосудорасширяющий эффект может быть связан с активацией кальцийзависимых калиевых каналов [7]. При этом необходимо заметить, что активация РКГ или РКА, с помощью NO, также приводит к открытию этих каналов.

Таким образом, можно полагать, что все три газотрансмиттера участвуют в регуляции кровообращения, включая сосудистый компонент, а также и текущую по сосудам кровь, управляя ее текучестью и транспортным потенциалом через регуляторное воздействие на микроциркуляцию ее клеток и, особенно, эритроцитов.

Роль оксид азота в регуляции кровообращения и микроциркуляции клеток крови

Среди трех упомянутых выше газовых медиаторов первым был описан оксид азота. NO служит ключевым вторичным мессенджером в животном мире позвоночных и играет важную роль в межклеточной и внутриклеточной трансдукции регуляторных сигналов [8]. Эта молекула является одним из наиболее важных элементов внутриклеточных сигнальных каскадов в сосудистой системе [9, 10]. Оксид азота был впервые описан как биоактивная молекула благодаря его способности стимулировать растворимую гуанилатциклазу (р-ГЦ) [11, 12]. Исследования, проведенные за последние 30 лет, показали значительное разнообразие передачи сигналов с помощью NO в сосудистой системе, которое включает, кроме активации р-ГЦ, также и S-нитрозилования белков [13].

Важную роль в NO-сигнальных каскадах играет эндотелиальная NO-синтаза (eNOS). Этот фермент обеспечивает синтез большей части NO и является кальцийзависимым ферментом [14]. Выделяют три основные изоформы NO-синтаз: нейрональную, макрофагальную и эндотелиальную. Главным источником синтеза NO в организме служит аминокислота L-аргинин.

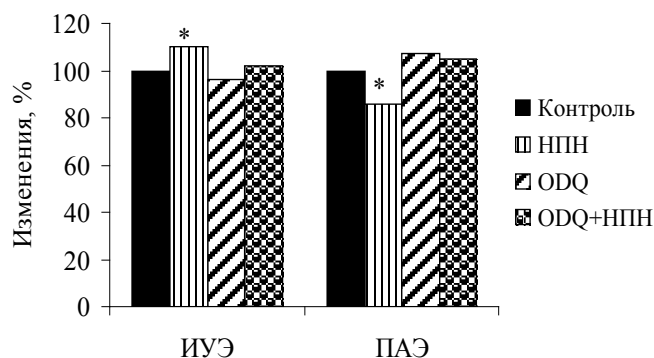


Рис. 2. Изменение деформируемости (ИУЭ) и агрегации эритроцитов (ПАЭ) после их инкубации с нитропруссидом натрия (НПН), ODQ и их сочетанным воздействием (НПН + ODQ): * – отличие от контроля статистически достоверно ($p < 0,05$)

Fig. 2. Change in deformability (IEE) and aggregation of erythrocytes (IAE) after their incubation with sodium nitroprusside (SNP), ODQ and their combined effects (SNP + ODQ): * – the difference from the control is statistically significant ($p < 0.05$)

Таким образом, можно заключить, что функция оксида азота как газотрансмиттера в регуляторных изменениях тонуса артериол и микрососудистой перфузии основательно изучена [3, 15]. Важно заметить, что в сосудистой системе только просвет сосуда (сосудистый тонус) может быть объектом регуляторных воздействий сигнальных молекул [16]. Тогда как гемореологический компонент располагает более широким спектром регуляторных ответов: 1) изменение вязкости плазмы и гемокрита создает на сосудистом эндотелии необходимую величину напряжения сдвига для продукции эндотелиальными клетками NO [17]; 2) в капиллярах, лишенных мышечных элементов, оптимизация тканевой перфузии возможна при положительных изменениях деформируемости эритроцитов; 3) в условиях гипоксии или механического напряжения на мембране эритроцитов происходит выделение АТФ. Это соединение используется эндотелиальными клетками в качестве сигнальной молекулы для образования NO и последующей релаксации гладкомышечных клеток, ведущей к вазодилатации [18]; 4) эритроциты, при оптимальной деформируемости, могут более эффективно транспортировать NO, а наличие собственной NO-синтазы в активной форме позволяет генерировать этот ГТ [19, 20]. В работе P. Ulker et al. [21] подтверждается гипотеза о том, что NOS в эритроцитах активна и экспорт NO из RBC усиливается механическим напряжением сдвига на мембране клетки.

При инкубации эритроцитов с донором оксида азота, с нитропруссидом (НПН) было показано умеренное увеличение (на 8–10 %, $p < 0,05$) их деформируемости и выраженное снижение агрегации, при этом выявляется дозозависимый эффект (рис. 1).

Следовательно, инкубация эритроцитов с донорами оксида азота или со стимулятором NOS (L-аргинин) приводит к положительным изменениям микрореологии эритроцитов [22, 23]. Что касается клеточной молекулярной мишени для NO в эритроцитах, то было установлено, что после ингибирования p-ГЦ с помощью 1H-[1,2,4]-oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ, 0,5 мкМ) микрореологические ответы на НПН практически полностью устранялись (рис. 2).

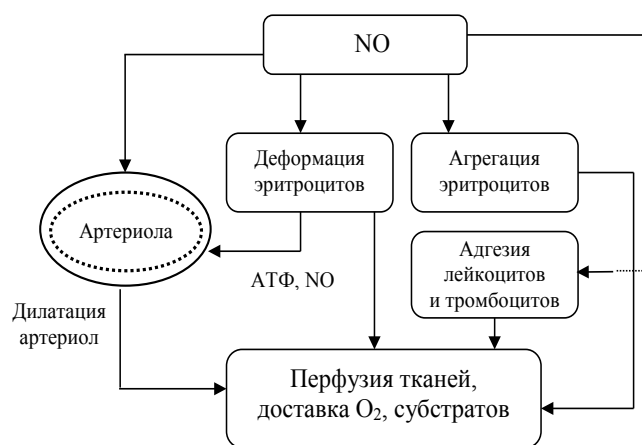


Рис. 3. Схема распределения влияний оксида азота на сосуды и реологию крови

Fig. 3. Scheme of distribution of the effects of nitric oxide on blood vessels and blood rheology

Показано, что ODQ ингибирует гем-содержащие ферменты – NO-синтазу и цитохромы P-450, катализирующие образование NO из НПН [24].

Следовательно, в системе кровообращения роль NO заключается в регулировании кровяного давления и сосудистого тонуса, повышении деформируемости эритроцитов, ингибировании агрегации эритроцитов, тромбоцитов и адгезии лейкоцитов [23, 25]. Сниженная биодоступность NO считается одним из основных факторов сердечно-сосудистых заболеваний [26]. Экзогенные доноры NO и вещества, стимулирующие внутриклеточную NO-синтазу, широко используются в клинической практике и служат основой для разработки новых поколений лекарственных препаратов на основе метаболизма NO [27].

Таким образом, можно заключить, что оксид азота регулирует тканевую перфузию и доставку кислорода в клеточный микрорайон по двум направлениям:

- 1) дилатация артериол;
- 2) изменение реологии крови и микрореологических характеристик ее клеток и, главным образом, деформируемости и агрегации эритроцитов.

При этом важно заметить, что сосуды в ответ на NO имеют только один вариант изменений – вазодилата-

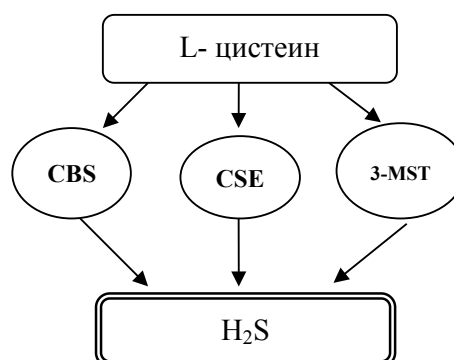


Рис. 4. Пути биосинтеза эндогенного сероводорода (H_2S): CBS – цистатионин-β-синтаза; CSE – цистатионин-γ-лиаза; 3-MST – 3-меркаптопируват серотрансфераза

Fig. 4. Ways of biosynthesis of endogenous hydrogen sulfide (H_2S): CBS – cystathionine-β-synthase; CSE – cystathionine-γ-lyase; 3-MST – 3-mercaptopyruvate serotransferase

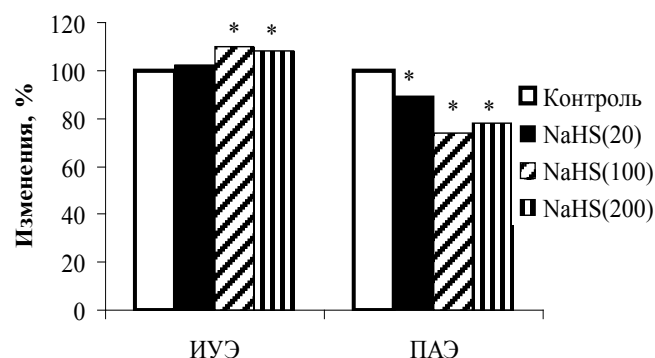


Рис. 5. Изменение деформируемости (ИУЭ) и агрегации эритроцитов (ПАЭ) после их инкубации с гидросульфидом натрия (NaHS) в трех концентрациях: NaHS (20) – концентрация 20 мкМ; NaHS (100) – концентрация 100 мкМ; NaHS (200) – концентрация 200 мкМ; * – отличие от контроля статистически достоверно при $p < 0,05$

Fig. 5. Change in deformability (IEE) and aggregation of erythrocytes (IAE) after their incubation with sodium hydrosulfide (NaHS) in three concentrations: NaHS (20) – concentration 20 μ M; NaHS (100) – concentration 100 μ M; NaHS (200) – concentration 200 μ M; * – the difference from the control is statistically significant at $p < 0.05$

цию. Тогда как в крови этот ГТ создает более сложную композицию регуляторных ответов, которые включают повышение деформируемости эритроцитов, выраженное снижение их агрегации, а это ведет к приросту скоростей сдвига и формированию большего напряжения сдвига на эндотелии сосудов. Последнее является стимулом образования новых количеств NO (рис. 3).

Кроме того, снижение агрегации и адгезии лейкоцитов и тромбоцитов в этих условиях способствует повышению эффективности капиллярной перфузии. Прирост деформируемости эритроцитов сочетается с большим выходом из них АТФ, обладающей вазодилатирующим эффектом. Существенное снижение агрегации эритроцитов под влиянием NO ведет к уменьшению вязкости крови при низких скоростях сдвига, что характерно для венул и вен, и тем самым способствует приросту текучести крови в этом важном отделе системы кровообращения, где формируется оптимальный диастолический объем сердца на основе эффективного венозного возврата.

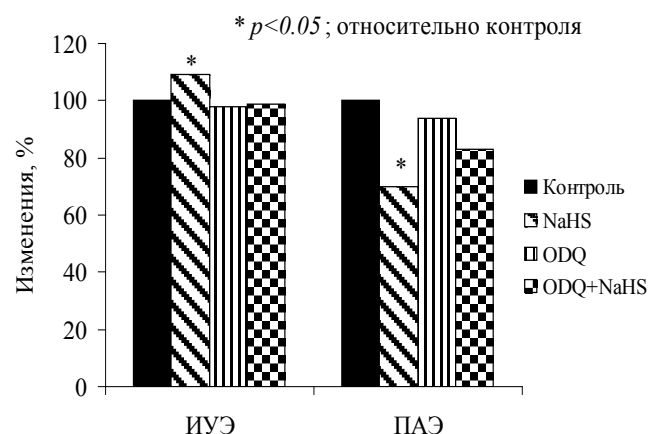


Рис. 7. Изменения деформируемости и агрегации эритроцитов под влиянием донора сульфида водорода после ингибирования р-ГЦ с помощью ODQ: * – отличие от контроля статистически достоверно при $p < 0,05$

Fig. 7. Changes in deformability and aggregation of erythrocytes under the influence of the hydrogen sulfide donor after inhibition of s-GC using ODQ: * – the difference from the control is statistically significant at $p < 0.05$

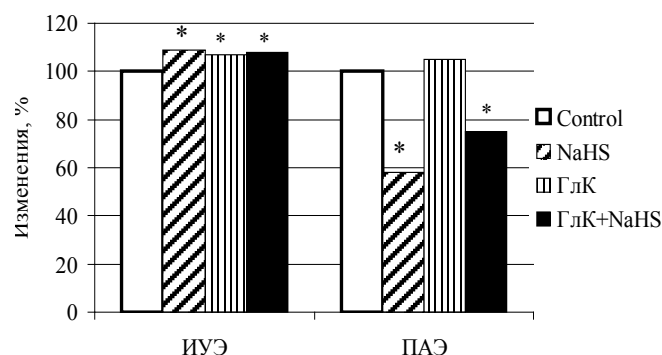


Рис. 6. Изменение деформируемости (ИУЭ) и агрегации эритроцитов (ПАЭ) под влиянием донора сероводорода NaHS и его сочетания с блокатром К+АТФ-каналов глибенкламидом (ГлК, 50 мкМ): * – отличие от контроля статистически достоверно при $p < 0,05$

Fig. 6. Change in deformability (IEE) and aggregation of erythrocytes (IAE) under the influence of the hydrogen sulfide donor NaHS and its combination with the blocker of K+ATP-channels glibenclamide (Glib, 50 μ M): * – the difference from the control is statistically significant at $p < 0.05$

Роль сероводорода в регуляции кровообращения и микроциркуляции клеток крови

Сероводород (H_2S) известен как токсичный газ с запахом, напоминающим запах тухлых яиц. Это важный компонент в происхождении жизни, и он продолжает оставаться критически важным для жизни на нашей планете. Это бесцветный газ, хорошо растворимый в воде. H_2S проницаем для плазматических мембран, так как его растворимость в липофильных растворителях в 5 раз выше, чем в воде. Следовательно, газ может легко диффундировать через клетки и достигать внутриклеточных компартментов [28].

Биосинтез H_2S наблюдается в клетках современных животных и растений, а также у прокариот и грибов. Такие ферменты, как цистатионин- γ -синтаза (CGS) и цистатионин- β -лиаза (CBL), а также 3-меркаптопируват серотрансфераза (3-MST), участвуют в этом процессе (рис. 4):

- 1) CBS – цистатионин- β синтаза;
- 2) CSE – цистатионин- γ -лиаза;
- 3) 3-MST – 3-меркаптопируват серотрансфераза.

Все три фермента используют L-цистеин для образования сульфида водорода [29]. В процессе метаболизма H_2S окисляется до сульфата в митохондриях при помощи фермента тиосульфат-редуктазы [30]. Сигнальная роль H_2S главным образом связана с его способностью модифицировать различные белковые мишени, в частности, путем персульфидирования белковых остатков цистеина и взаимодействием с металлическими центрами, главным образом геммами [31]. Было показано, что H_2S регулирует множество клеточных процессов и, в том числе, играет существенную роль как сигнальная молекула в функционировании сердечно-сосудистой системы [32–34].

H_2S эндогенно генерируется в клетках гладких мышц (ГМК) сосудов, при этом в экспериментальных условиях он индуцирует зависимое от концентрации расслабление тканей аорты крысы, на которое не влияла денервация сосудов [35]. Аналогичным образом ингибирование e-NOS или блокада K(Ca)-каналов снижали вызванную H_2S релаксацию ткани аорты

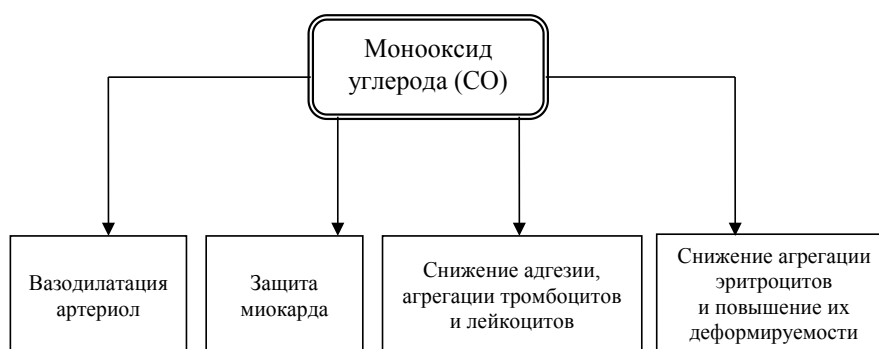


Рис. 8. Эффекты монооксида углерода как сигнальной молекулы в микроциркуляции и гемореологии

Fig. 8. Effects of carbon monoxide as a signaling molecule in microcirculation and hemorheology

с интактным эндотелием. Важно заметить, что релаксация, вызванная нитропруссидом натрия (НПН), полностью устранялась ODQ – ингибитором р-ГЦ. Однако в этих условиях ингибирование р-ГЦ усиливало вызванную H_2S вазорелаксацию, которая подавлялась супероксиддисмутазой. Вазорелаксирующий эффект H_2S также значительно снижался при удалении из инкубационной среды Ca^{2+} . Кроме того, предварительная обработка тканей аорты H_2S снижала релаксацию ГМК сосудов в ответ на донор NO, НПН [35]. Эти данные демонстрируют, что сосудистый эффект H_2S частично опосредован функциональным состоянием эндотелия и зависит от поступления Ca^{2+} из внеклеточной среды, но не зависит от активации гуанилатциклазного сигнального каскада.

Таким образом, имеется достаточное число работ, посвященных анализу влияния H_2S на сосудистый тонус. Вместе с тем есть только отдельные публикации, где сообщается об ингибирующем влиянии H_2S на агрегацию тромбоцитов [36], и практически отсутствуют сведения о его действии на микрореологию эритроцитов. Полученные нами данные позволяют в некоторой степени устранить этот пробел в изучении влияния этого газотрансмиттера на текучесть крови, микрореологию эритроцитов и их транспортный потенциал [23].

Было установлено, что инкубация эритроцитов с донором H_2S гидросульфидом натрия (NaHS) сопровождалась приростом их деформируемости (на 8–12 %, $p < 0,01$) и заметным уменьшением агрегации, на 16–24 % (рис. 5).

В качестве молекулярной мишени H_2S в клетках чаще всего рассматривают АТФ-зависимые K^+ -каналы (K^+ATP) [37]. Они блокируются глибенкламидом. В наших опытах глибенкламид не препятствовал приросту деформируемости эритроцитов под действием NaHS и не устранял полностью снижения ПАЭ (рис. 6).

С другой стороны, ингибирование р-ГЦ с помощью ODQ полностью устраняло прирост деформируемости и значительно ограничило снижение ПАЭ под влиянием NaHS (рис. 7).

Сравнение микрореологических ответов эритроцитов на действие донора H_2S в условиях блокирования K^+ATP -каналов и ингибирования р-ГЦ позволяет предположить, что сероводород как газовый медиатор в значительной степени использует NO-ассоциированный сигнальный путь. Поскольку эндогенные концентрации H_2S обычно низкие, что затрудняет определение точных биологических функций, исследования физиологической роли H_2S с его экзогенной доставкой в виде доноров на клеточных моделях микрореологических ответов эритроцитов

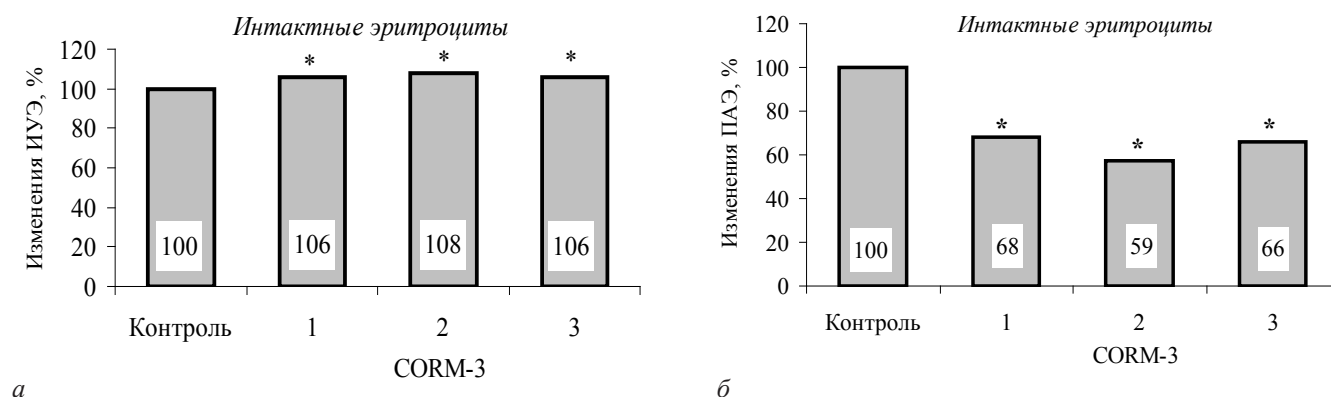


Рис. 9. Изменения деформируемости (а) и агрегации эритроцитов (б) относительно контроля после их инкубации с CORM-3 в разных концентрациях: 1 – 15 мкМ; 2 – 50 мкМ; 3 – 100 мкМ; * – отличие от контроля статистически значимо ($p < 0,01$)

Fig. 9. Changes in deformability (a) and aggregation of erythrocytes (b) compared to the control (cell suspension without preparation) after their incubation with CORM-3 at different concentrations: 1 – 15 μM ; 2 – 50 μM ; 3 – 100 μM ; * – difference from control is statistically significant ($p < 0.01$)

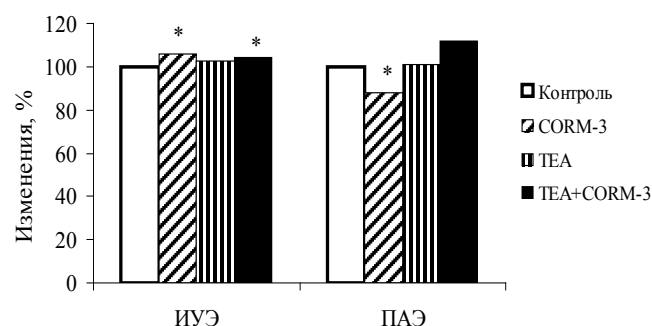


Рис. 10. Изменения деформируемости (ИУЭ) и агрегации эритроцитов (ПАЭ) под влиянием донора монооксида углерода (CORM-3) и его сочетанного воздействия с блокатором К(Са)-каналов тетраэтиламмонием (ТЕА): * – отличие от контроля статистически достоверно при $p < 0,05$

Fig. 10. Changes in deformability (IEE) and aggregation of erythrocytes (IAE) under the influence of the carbon monoxide donor (CORM-3) and its combined effect with the blocker of KCa-channels tetraethylammonium (TEA): * – the difference from the control is statistically significant at $p < 0.05$

помогут понять механизмы его действия и уточнить внутриклеточные молекулярные мишени.

Таким образом, H_2S представляет собой важную сигнальную молекулу сердечно-сосудистой системы, подобную оксиду азота и монооксиду углерода, с сильным влиянием на функции кровообращения и микрореологию клеток крови. Понимание механизмов защитного действия H_2S на сердце и сосуды в сочетании с разработкой новых веществ-доноров, высвобождающих H_2S , может способствовать продвижению в клиническую практику этого газового медиатора.

Роль монооксида углерода в изменениях кровообращения и микрореологии клеток крови

Монооксид углерода, наряду с оксидом азота и сероводородом, принадлежит к семейству газотрансмиттеров и вовлечен в регуляцию многих физиологических процессов организма [38, 39]. Для понимания регуляторных эффектов в системе кровообращения важно иметь в виду, что СО индуцирует вазорелаксацию в результате прямого воздействия на гладкие мышцы сосудов [8]. Он образуется в процессе клеточного метаболизма с участием фермента гемоксигеназы (НО), которая вместе с NADPH-цитохром-Р450-редуктазой расщепляет гемовое кольцо в гемопротеинах на биливердин, СО и железо [32, 40].

Выделены индуцибельная НО (НО-1) и конститутивная НО (НО-2). Экспрессия НО-1 реализуется как в эндотелии, так и в гладких мышцах кровеносных сосудов. Индукция НО-1 происходит как общий клеточный и тканевый ответ на стресс. Образование эндогенного СО в этих условиях может обеспечивать цитопротекцию и являться важным фактором, участвующим в модуляции тонуса сосудов при гипоксии [38].

В системе микроциркуляции СО вызывает вазодилатацию артериол, а также оказывает защитное действие на сосуды миокарда. Кроме того, эндогенный СО ингибирует агрегацию тромбоцитов и их адгезию к стенкам сосудов [41], а также регулирует роллинг и адгезию лейкоцитов [42] (рис. 8).

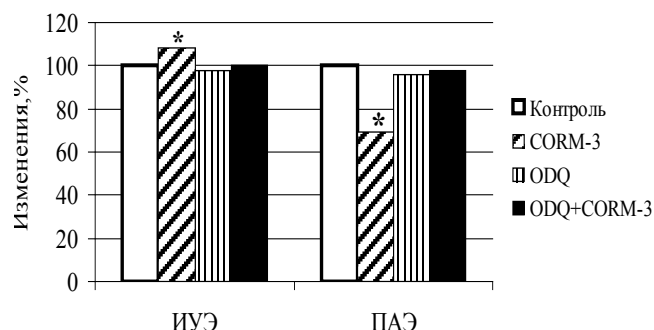


Рис. 11. Изменения деформируемости (ИУЭ) и агрегации эритроцитов (ПАЭ) под влиянием CORM-3 – донора монооксида углерода – и после ингибирования р-ГЦ с помощью ODQ: * – отличие от контроля статистически достоверно при $p < 0,05$

Fig. 11. Changes in erythrocyte deformability (IEE) and aggregation (IAE) under the influence of CORM-3, a carbon monoxide donor, and after inhibition of s-GC by ODQ:

* – the difference from the control is statistically significant at $p < 0.05$

СО, как и другие газообразные посредники (NO и H_2S), действует через принципиально отличные от классических трансмисмиттеров рецептор-независимые механизмы, в том числе прямо через химическую модификацию белков ионных каналов, например, кальцийзависимых калиевых каналов [38], а также косвенно – через ряд вторичных посредников, которые влияют на основную клеточную функцию ГМК – на их сократимость [43].

Предложено три основных клеточных механизма для объяснения сосудорасширяющего действия СО, они включают в себя:

- 1) активацию растворимой гуанилатциклазы (р-ГЦ) [24];
- 2) стимуляцию различных типов К-каналов (например, Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов [38]);
- 3) ингибирование системы цитохрома Р450-зависимой монооксигеназы в клетках гладких мышц сосудов [32].

Было установлено, что СО расширяет артерии и артериолы за счет активации К(Са)-каналов гладкомышечных клеток сосудов. Доноры СО и сам газовый медиатор активировали ВКСа-каналы в вырезанных участках плазматической мембраны аорты, в условиях, когда цитозольные сигнальные белки отсутствуют, а киназы неактивны [7].

Известно, что эффективность доставки кислорода и субстратов окисления в тканевые микрорайоны зависит не только от состояния регионарного кровотока и микроциркуляции. На уровне обменных капилляров существенное влияние оказывает деформируемость эритроцитов, а в посткапиллярном отделе сосудистой системы – их обратимая агрегация [16]. Исследование влияние донора СО – монооксида углерода высвобождающей молекулы-3 (CORM-3) – показало, что так же, как и в ответ на доноры NO и H_2S , происходит достоверный умеренный прирост деформируемости эритроцитов (на 8–11 %, $p < 0,01$) и выраженное уменьшение агрегации клеток, более чем на 40 % (рис. 9).

Указанные выше микрореологические эффекты дозозависимые (рис. 9). Как было показано выше,

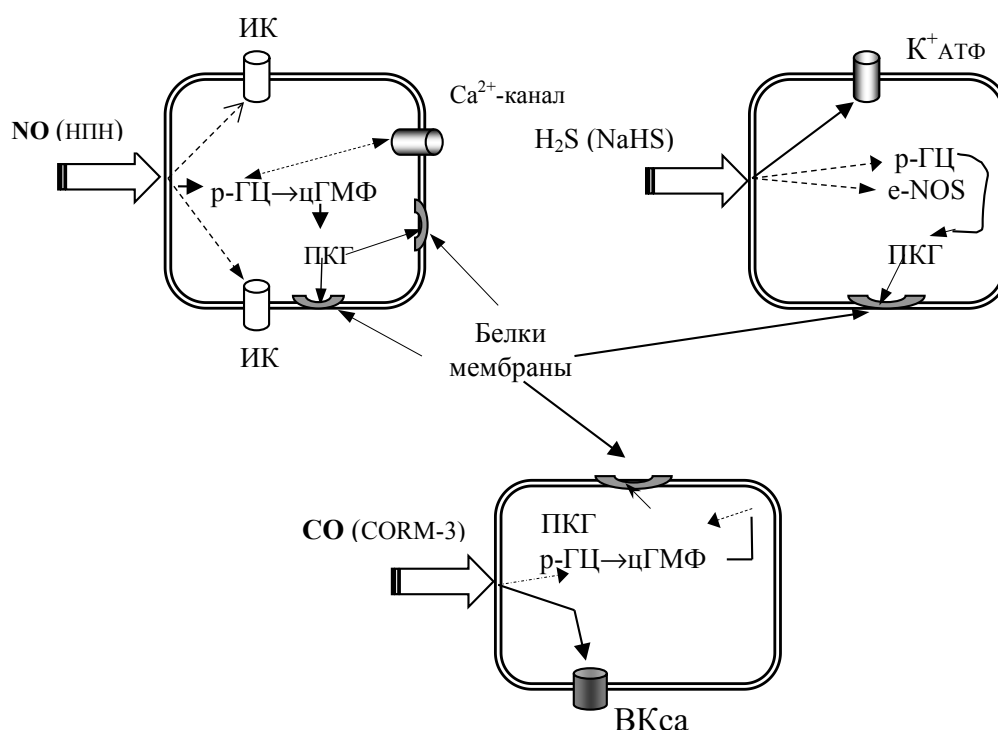


Рис. 12. Основные сигнальные пути, ассоциированные с влиянием трех доноров газотрансмиттеров на микрореологические свойства эритроцитов: ИК – ионные каналы; ПКГ – протеинкиназа Г; р-ГЦ – растворимая гуанилат-циклаза; е-NOS – NO-синтаза; ВКса – кальцийзависимые калиевые каналы; К+АТФ – АТФ-зависимые калиевые каналы

Fig. 12. The main signaling pathways associated with the influence of three donors of gasotransmitters on the microreological properties of erythrocytes

в качестве основной молекулярной мишени для действия СО в клетках рассматривают К(Са)-каналы. Их можно блокировать тетраэтиламмонием (ТЕА). Было установлено, что CORM-3 умеренно повышал ИУЭ (на 9 %, $p < 0,01$), а снижение агрегации достигло 38 % ($p < 0,05$). ТЕА уменьшил влияние CORM-3 на деформируемость эритроцитов, но не устранил его полностью. Что касается агрегации, то ТЕА полностью устранял снижение ПАЭ, происходящее под влиянием CORM-3 (рис. 10).

Известно, что NO- и СО-индуцированные изменения клеточных функций опосредуются с участием р-ГЦ и ц-ГМФ, хотя СО как газотрансмиттер гораздо менее эффективен при активации гуанилатциклазы, чем NO [44].

Мы проверили предположение о том, что микрореологические ответы эритроцитов могут быть связаны с этой сигнальной системой. Было найдено, что ингибитор р-ГЦ, ODQ, практически полностью устранял эффект донора СО. Это было подтверждено на двух моделях, как в опытах с деформируемостью эритроцитов, так и при регистрации их агрегации (рис. 11).

Если ингибировать активность NO-синтазы (NOS) с помощью N-Nitroarginine methyl ester (L-NAME, 200 мкМ), то, как и при воздействии на р-ГЦ, полностью устраняется микрореологический эффект донора СО. Более того, под влиянием отдельно L-NAME и его сочетанном воздействии с CORM-3 агрегация эритроцитов заметно возрастала (на 14 %). Следует полагать, что ингибитор NO-синтазы обладает выраженным проагрегантным свойством.

Рассмотрение влияния СО на микрореологические свойства эритроцитов и анализ вероятных внутриклеточных сигнальных путей позволили установить положительные эффекты этого газотрансмиттера, которые по направленности и величине были сопоставимы с двумя другими газовыми медиаторами – оксидом азота и сероводородом. В целом очевидно, что монооксид углерода является важной сигнальной молекулой в системе кровообращения, он участвует как в регуляции тонуса сосудов, так и в изменениях микрореологических свойств клеток крови. Для эффективного транспорта кислорода в тканевые микрорайоны важно положительное влияние этого газотрансмиттера на деформируемость эритроцитов и на их обратимую агрегацию. Многие из основных механизмов, контролирующих паракринно артериолы, зависят от передачи сигналов, которые могут исходить от эритроцитов, которые выступают и как сенсоры и как регуляторы локального кровотока [45].

Заключение

На основе проведенного анализа литературы и рассмотрения собственных данных исследования микрореологических ответов эритроцитов на доноры трех газотрансмиттеров можно заключить, что каждый из них является:

- одной из важных эндогенных сигнальных молекул;
- модулирует функции сердечно-сосудистой системы и микрореологии клеток крови;
- ингибирует агрегацию эритроцитов и особенно тромбоцитов, их адгезию к стенкам сосудов, а также

повышает деформируемость эритроцитов и их кислородтранспортные возможности;

– является перспективным соединением, которое может быть включено в одну из важных терапевтических стратегий при ряде заболеваний.

Для всех трех газотрансмиттеров выявлены наиболее вероятные сигнальные каскады с ключевыми молекулярными мишенями. Поскольку все три газотрансмиттера – H_2S , NO и CO – имеют схожие способы действия и параллельные регулирующие цели, то накапливается все больше свидетельств о кросс-общении между этими газовыми медиаторами [8]. Имеются данные, свидетельствующие о том, что H_2S и CO используют в своих эффектах NO-ассоциированный сигнальный путь (рис. 12). При этом газотрансмиттер или стимулирует р-ГЦ, или активирует NOS для последующего синтеза оксида азота, который далее и выполняет регуляторную роль [27, 44].

Дальнейшие исследования призваны уточнить роль газотрансмиттеров в понимании патогенных механизмов многих болезней, связанных с нарушениями их метаболизма, а также проложить путь для инновационных, профилактических и терапевтических стратегий, основанный на физиологических эффектах газотрансмиттеров.

Финансирование / Acknowledgments

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и БРФФИ в рамках научного проекта № 20-515-00019. / The reported study was funded by RFBR and BRFFR, project number 20-515-00019.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Автор заявил об отсутствии конфликта интересов. / The author declare no conflict of interest.

Литература / References

1. Li H, Förstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *The Journal of Pathology*. 2000;190(3):244–254. Doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190.
2. Mustafa AK, Gadalla MM, Snyder SH. Signaling by gasotransmitters. *Sci Signal*. 2009;2(68):2. Doi: 10.1126/scisignal.268re2. PATH575>3.0.CO;2-8.
3. Sélley E, Kun S, Szijártó IA et al. Exenatide induces aortic vasodilation increasing hydrogen sulphide, carbon monoxide and nitric oxide production. *Cardiovascular Diabetology*. 2014;(13):69–76. Doi: 10.1186/1475-2840-13-69.
4. Belew M, Quazi F, Willmore W, Aitken S. Kinetic characterization of recombinant human cystathionine β -synthase purified from *E. coli*. *Protein Expression and Purification*. 2009;(64):139–145. Doi: 10.1016/j.pep.2008.10.012.
5. Ситдикова Г. Ф., Яковлев А. В., Зефиоров А. Л. Газомедиаторы: от токсических эффектов к регуляции клеточных функций и использованию в клинике // Бюлл. сибир. мед. – 2014. – Т. 13, № 6. – С. 185–200. [Sitdikova GF, Yakovlev AV, Zefirov AL. Gasotransmitters: from the toxic effects to the regulation of cellular function and clinical application. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2014;13(6):185–200. (In Russ.)]. Doi: 10.20538/1682-0363-2014-6-185-200.
6. Martelli A, Testai L, Breschi MC, Lawson K, McKay NG, Miceli F, Tagliatela M, Calderone V. Vasorelaxation by hydrogen sulphide involves activation of Kv7 potassium channels. *Pharmacol Res*. 2013;(70):27–34. Doi: 10.1016/j.phrs.2012.12.005.
7. Jaggar JH, Li A, Parfenova H, Liu J, Umstot ES, Dopico AM, Leffler CW. Heme is a carbon monoxide receptor for large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Circ Res*. 2005;(97):805–812. Doi: 10.1161/01.RES.0000186180.47148.7b.
8. Wang R. Gasotransmitters: growing pains and joys. *Trends Biochem Sci*. 2014;39(5):227–232. Doi: 10.1016/j.tibs.2014.03.003.
9. Ignaro LG, Buga GM, Wood KS. Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1987;(84):9265–9269. Doi: 10.1073/pnas.84.24.9265.
10. Dessy C, Ferron O. Pathophysiological Roles of Nitric Oxide: In the Heart and the Coronary Vasculature. *Current Medical Chemistry – Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents*. 2004;3(3):207–216. Doi: 10.2174/1568014043355348.
11. Derbyshire ER, Marletta MA. Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. *Annu. Rev. Biochem*. 2012;(81):533–539. Doi: 10.1146/annurev-biochem-050410-100030.
12. Wobst J, Rumpf PM, Dang TA, Segura-Puimedon M, Erdmann J, Schunkert H. Molecular variants of soluble guanylyl cyclase affecting cardiovascular risk. *Circ. J*. 2015;(79):463–469. Doi: 10.1253/circj.CJ-15-0025.
13. Irwin C, Roberts W, Naseem KM. Nitric oxide inhibits platelet adhesion to collagen through cGMP-dependent and independent mechanisms: the potential role for S-nitrosylation. *Platelets*. 2009;(20):478–486. Doi: 10.3109/09537100903159375.
14. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829–837. Doi: 10.1093/eurheartj/ehs304.
15. Buerk DG, Barbee KA, Jaron D. Nitric oxide signaling in the microcirculation. *Crit Rev Biomed Eng*. 2011;39(5):397–433.
16. Popel AS, Johnson PC. Microcirculation and Hemorheology. *Annu. Rev. Fluid. Mech*. 2005;(37):43–69. Doi: 10.1146/annurev.fluid.37.042604.133933.
17. Salazar Vázquez, Tsai AG, Intaglietta M. Nonlinear cardiovascular regulation consequent to changes in blood viscosity. *Clin. Hemorheol. Microcirc*. 2011;49(1–4):29–36. Doi: 10.3233/CH-2011-1454.
18. Sprague RS, Ellsworth ML. Erythrocyte-derived ATP and perfusion distribution: role of intracellular and intercellular communication. *Microcirculation*. 2012;19(5):430–439. Doi: 10.1111/j.1549-8719.2011.00158.x.
19. Kleinbongard P, Keymel S, Kelm M. New functional aspects of the L-arginine-nitric oxide metabolism within the circulating blood. *Thromb Haemost*. 2007;98(5):970–974.
20. Uyuklu M, Meiselman HJ, Baskurt OK. Role of hemoglobin oxygenation in the modulation of red blood cell mechanical properties by nitric oxide. *Nitric Oxide*. 2009;(21):20–26. Doi: 10.1016/j.niox.2009.03.004.
21. Ulker P, Sati L, Celik-Ozenci C, Meiselman HJ, Baskurt OK. Mechanical stimulation of nitric oxide synthesizing mechanisms in erythrocytes. *Biorheology*. 2009;46(2):121–132. Doi: 10.3233/BIR-2009-0532.
22. Mozar A, Connes P, Collins B, Hardy-Dessources MD, 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. Doi: 10.3233/CH-162042.
23. Muravyov AV, Antonova N, Tikhomirova IA. 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;(33):34–40.
24. Feelisch M, Kotsonis P, Siebe J, Clement B, Schmidt HH. The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxa-

diazolo[4,3,-a] quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. *Mol. Pharmacol.* 1999;56(2):243–253. Doi: 10.1124/mol.56.2.243.

25. Starzyk D, Korbut R, Gryglewski RJ. Effects of nitric oxide and prostacycline on deformability and aggregability of red blood cells of rats ex vivo and in vitro. *J Physiol Pharmacol.* 1999;(50):629–637.

26. Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med.* 2005; 26(1–2):33–65. Doi: 10.1016/j.mam.2004.09.003.

27. Wallace JL, Ianaro A. Signal Transduction and the Gasotransmitters. NO, CO and H₂S in Biology and Medicine. Totowa, Humana Press, 2004:377.

28. Mancardi D, Penna C, Merlino A, Del Soldato P. Physiological and pharmacological features of the novel gasotransmitter: Hydrogen sulfide. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2009; (1787):864–872. Doi: 10.1016/j.bbabo.2009.03.005.

29. Shen Y, Shen Z, Luo S, Guo W, Zhu Yi Z. The Cardioprotective Effects of Hydrogen Sulfide in Heart Diseases: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Potential. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2015. Article ID: 925167:13. Doi: 10.1155/2015/925167.

30. Kamoun H. H₂S, a new neuromodulator. *Medecine/Sciences.* 2004;20(6–7):697–700. Doi: 10.1051/medsci/2004206-7697.

31. Giuffrè A, Vicente JB. Hydrogen Sulfide Biochemistry and Interplay with Other Gaseous Mediators in Mammalian Physiology. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2018:6290931. Doi: 10.1155/2018/6290931.

32. Beltowski J. Hydrogen sulfide as a biologically active mediator in the cardiovascular system. *Postepy. Hig. Med. Dosw.* 2004;(58):285–291.

33. Geng B, Yang J, Qi Y, Zhao J, Peng Y, Du J, Tang C. H₂S generated by heart in rat and its effects on cardiac function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;(313):362–368. Doi: 10.1016/j.bbrc.2003.11.130.

34. Smith RP. A short history of hydrogen sulfide. *American Scientist.* 2010;(98):6–9. Doi: 10.1511/2010.82.6.

35. Zhao, Weimin, Rui Wang. H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;(283):474–480. Doi: 10.1152/ajpheart.00013.

36. Truss NJ, Warner TD. Gasotransmitters and platelets. *Pharmacol. Ther.* 2011;(132):196–203. Doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.07.001.

37. Green BD, Hand KV, Dougan JE, McDonnell BM, Cassidy RS, Grieve DJ. GLP-1 and related peptides cause

concentration-dependent relaxation of rat aorta through a pathway involving KATP and cAMP. *Arch Biochem Biophys.* 2008;(478):136–142. Doi: 10.1016/j.abb.2008.08.001.

38. Leffler ChW, Parfenova H, Jagger JH. Carbon monoxide as an endogenous vascular modulator. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2011;(301):1–11. Doi: 10.1152/ajpheart.00230.2011.

39. Durante W, Peyton KJ, Schafer AJ. Platelet-derived growth factor stimulates heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999;(19):2666–2672. Doi: 10.1161/01.ATV.19.11.2666.

40. Wang R. Resurgence of carbon monoxide: an endogenous gaseous vasorelaxing factor. *Can J* 1998;76(1):1–15. Doi: 10.1139/cjpp-76-1-1.

41. Brune B, Ullrich V. Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol Pharmacol.* 1987;(32):497–504.

42. Shinobu Hayashi, Rina Takamiya, Tokio Yamaguchi, Kenji Matsumoto, Shinichiro J. Tojo, Takuya Tamatani, Masaki Kitajima, Nobuya Makino, Yuzuru Ishimura, Makoto Suematsu. Induction of Heme Oxygenase-1 Suppresses Venular Leukocyte Adhesion Elicited by Oxidative Stress: Role of Bilirubin Generated by the Enzyme. *Circulation Research.* 1999; 85(8):663–671. Doi: 10.1161/01.RES.85.8.663.

43. Jagger JH, Parfenova H, Liu J. Heme is a carbon monoxide receptor for large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Circ. Res.* 2007;(97):805–812.

44. Koneru P, Leffler CW. Role of cyclic GMP in carbon monoxide induced vasodilation in piglets. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;(286):304–309. Doi: 10.1152/ajpheart.00810.2003.

45. Ellsworth ML, Ellis CG, Goldman D. Erythrocytes: oxygen sensors and modulators of vascular tone. *Physiology.* 2009;(24):107–116. Doi: 10.1152/physiol.00038.2008.

Информация об авторе

Муравьев Алексей Васильевич – д-р биол. наук, профессор кафедры медико-биологических основ спорта, Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского, г. Ярославль, Россия, ORCID: 0000-0002-5502-9164, e-mail: alexei.47@mail.ru.

Information about author

Muravyov Aleksey V. – MD (Biology), PhD, Professor, Department of Medical and Biological Fundamentals of Sports, Yaroslavl state pedagogical university named after K. D. Ushinsky, Yaroslavl, Russia, ORCID: 0000-0002-5502-9164, e-mail: alexei.47@mail.ru.

Правила для авторов

Журнал «Регионарное кровообращение и микроциркуляция» входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук по научным специальностям и соответствующим им отраслям науки:

с 28.12.2018 г.

- 14.01.04 – Внутренние болезни (медицинские науки);
- 14.01.05 – Кардиология (медицинские науки);
- 14.01.11 – Нервные болезни (медицинские науки);
- 14.01.13 – Лучевая диагностика, лучевая терапия (медицинские науки);
- 14.01.17 – Хирургия (медицинские науки);
- 14.01.26 – Сердечно-сосудистая хирургия (медицинские науки).

Дополнительно к вышеприведенному списку с 15.10.2019 г.

- 03.03.01 – Физиология (биологические науки);
- 03.03.01 – Физиология (медицинские науки);
- 14.01.05 – Кардиология (биологические науки);
- 14.03.01 – Анатомия человека (медицинские науки);
- 14.03.03 – Патологическая физиология (медицинские науки);
- 14.03.03 – Патологическая физиология (биологические науки).

При направлении статьи в редакцию рекомендуется руководствоваться следующими правилами, составленными с учетом «Единых требований к рукописям, предоставляемым в биомедицинские журналы» (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals), разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов (International Committee of Medical Journal Editors).

1. Рукопись. Направляется в редакцию в электронном варианте через online-форму. Загружаемый в систему файл со статьей должен быть представлен в формате Microsoft Word (иметь расширение *.rtf, так как в нем исключается конфликт между различными версиями программы MS Word).

2. Объем полного текста рукописи должен составлять примерно 0,5 авторского листа (20 000 знаков).

3. Формат текста рукописи. Текст должен быть напечатан шрифтом Times New Roman, иметь размер 12 pt и межстрочный интервал 1,0 pt. Отступы с каждой стороны страницы – 2 см. Выделения в тексте можно проводить ТОЛЬКО курсивом или полужирным начертанием букв, но НЕ подчеркиванием. Из текста необходимо удалить все повторяющиеся пробелы и лишние разрывы строк (в автоматическом режиме через сервис MS Word «Найти и заменить»).

4. Файл с текстом статьи, загружаемый в форму для подачи рукописей, должен содержать всю информацию для публикации (в том числе рисунки и таблицы). При регистрации на сайте журнала всем авторам необходимо указать ORCID!

Структура рукописи должна соответствовать следующему шаблону:

Русскоязычная аннотация

• *Авторы статьи.* При написании авторов статьи фамилию следует указывать после инициалов имени и отчества (П.С. Иванов, С.И. Петров, И.П. Сидоров).

• *Название статьи.*

• *Название учреждения.* Необходимо привести официальное ПОЛНОЕ название учреждения (без сокращений). Если в написании рукописи принимали участие авторы из разных учреждений, необходимо соотнести названия учреждений и ФИО авторов путем добавления цифровых индексов в верхнем регистре перед названиями учреждений и фамилиями соответствующих авторов.

• *Резюме статьи* должно быть (если работа оригинальная) структурированным: введение, цель, материалы и методы, результаты, заключение. Резюме должно полностью соответствовать содержанию работы. Объем текста резюме должен быть в пределах 150–200 слов.

Аббревиатуры и сокращения в аннотации необходимо раскрыть.

В аннотации не должно быть общих слов. Рекомендуем обратиться к руководствам по написанию аннотаций, например: <http://authorservices.taylorandfrancis.com/abstracts-and-titles/> (анг.) или: <http://www.scieditor.ru/jour/article/view/19> (рус.)

• *Ключевые слова.* Необходимо указать ключевые слова – от 4 до 10, способствующие индексированию статьи в поисковых системах. Ключевые слова должны попарно соответствовать на русском и английском языках.

Англоязычная аннотация

• *Author names.* ФИО необходимо писать в соответствие с заграничным паспортом или так же, как в ранее опубликованных в зарубежных журналах статьях, корректный формат: Evgeniy A. Ivanov, Yuriy V. Petrov, Anatoliy Yu. Sidorov. Авторам, публикующимся впервые и не имеющим заграничного паспорта, следует воспользоваться стандартом транслитерации BGN/PCGN.

• *Article title.* Англоязычное название должно быть грамотно с точки зрения английского языка, при этом по смыслу полностью соответствовать русскоязычному названию.

• *Affiliation.* Необходимо указывать ОФИЦИАЛЬНОЕ АНГЛОЯЗЫЧНОЕ НАЗВАНИЕ УЧРЕЖДЕНИЯ. В англоязычной аффилиации не рекомендуется писать приставки, определяющие статус организации, например: «Федеральное государственное бюджетное научное учреждение» («Federal State Budgetary Institution of Science»), «Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования», или аббревиатуру этой части названия («FGBNU», «FGBOU VPO»).

Наиболее полный список названий российских учреждений и их официальной англоязычной версии можно найти на сайте РУНЭБ: eLibrary.ru.

• **Abstract.** Англоязычная версия резюме статьи должна по смыслу и структуре полностью соответствовать русскоязычной и быть грамотной с точки зрения английского языка.

• **Keywords.** Необходимо указать ключевые слова – от 4 до 10 (должны соответствовать русскоязычной версии). Для выбора ключевых слов на английском языке следует использовать тезаурус Национальной медицинской библиотеки США – Medical Subject Headings (MeSH).

Основной текст статьи (на русском и/или английском языках) должен быть структурированным по разделам. Структура полного текста рукописи, посвященной описанию результатов оригинальных исследований, должна соответствовать формату IMRAD (Introduction, Methods, Results and Discussion). Рекомендуется соблюдать следующую структуру: введение, цель, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение.

• **Таблицы** (должны быть выполнены в программе MS Word) следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не должны дублировать представленную в нем информацию. Ссылки на таблицы в тексте обязательны. Названия таблиц необходимо перевести на английский язык.

• **Рисунки** (графики, диаграммы, схемы, чертежи и другие иллюстрации, рисованные средствами MS Office) должны быть помещены в текст и сопровождаться нумерованной подписью, которую необходимо перевести на английский язык. Кроме того, каждый рисунок следует дополнительно загрузить на сайт (в специальной форме для подачи статьи) отдельным файлом того программного обеспечения, в котором рисунок был выполнен (*.rtf, *.xls, и т.п.). Ссылки на рисунки в тексте обязательны.

• **Фотографии** и другие нерисованные иллюстрации должны быть помещены в текст и сопровождаться нумерованной подписью, которую необходимо перевести на английский язык. Кроме того, каждую фотографию следует дополнительно загрузить на сайт (в специальную форму для подачи статьи) отдельным файлом в формате *.tif (*.doc и *.docx – только в том случае, если на изображение нанесены дополнительные пометки). Разрешение изображения должно быть ≥ 300 dpi.

Файлам изображений необходимо присвоить название, соответствующее номеру рисунка в тексте. В описании файла следует отдельно привести подписную подпись, которая должна соответствовать названию изображения, помещаемого в текст (пример: Рис. 1. Сеченов Иван Михайлович).

Дополнительная информация (на русском и английском языках)

• Благодарности на русском языке (в этом разделе должны быть указаны люди, которые помогали в работе над статьей, но не являются авторами, а также информация о финансировании как научной работы, так и процесса публикации статьи – фонд, коммерческая или государственная организация, частное лицо и др.). Указывать размер финансирования не требуется.

• Благодарности на английском языке (Acknowledgements).

• Информация о конфликте интересов (перевод этой информации также должен быть сделан). Авторы должны раскрыть потенциальные и явные конфликты интересов, связанные с рукописью. Конфликтом интересов может считаться любая ситуация (финансовые отношения, служба или работа в учреждениях, имеющих финансовый или политический интерес к публикуемым материалам, должностные обязанности и др.), способная повлиять на автора рукописи и привести к сокрытию, искажению данных или изменить их трактовку. Наличие конфликта интересов у одного или нескольких авторов не является поводом для отказа в публикации статьи. Выявленное редакцией сокрытие потенциальных и явных конфликтов интересов со стороны авторов может стать причиной отказа в рассмотрении и публикации рукописи.

Список литературы

Оформление списка литературы осуществляется в соответствии с требованиями «Ванкуверского стиля» с указанием в конце источника индекса DOI (digital object identifier, уникальный цифровой идентификатор статьи в системе CrossRef). Поиск DOI на сайте <http://search.crossref.org>. Для получения DOI нужно ввести в поисковую строку название статьи на английском языке.

Правила оформления списка литературы

Нумерация в списке литературы осуществляется по мере цитирования, а не в алфавитном порядке. В тексте статьи библиографические ссылки даются цифрами в квадратных скобках: [1, 2, 3, 4, 5].

ВНИМАНИЕ!

Не цитируются:

тезисы, если они не обнаруживаются поисковыми системами;
учебники, учебные пособия;
статистические сборники (указываются в постраничных сносках);
диссертации;
авторефераты диссертаций.

Источниками в списке литературы могут быть печатные (опубликованные, изданные полиграфическим способом) и электронные издания (книги, имеющие ISBN, или статьи из периодических журналов, имеющие ISSN).

Все имена авторов русскоязычных источников дополнительно необходимо указать на транслите в системе «BSI». Название русскоязычных журналов на английском языке должно быть взято у издателя (как правило, на сайте журнала есть английская версия). Названия иностранных журналов и книги следует ставить в оригинале.

При транслитерации следует использовать стандарт BGN/PCGN (United States Board on Geographic Names/ Permanent Committee on Geographical Names for British Official Use), рекомендованный международным издательством Oxford University Press как «British Standard». Для транслитерации текста в соответствии со стандартом BGN можно воспользоваться ссылкой <http://www.translit.ru>. Автор несет полную ответственность за точность и достоверность данных, приведенных в рукописи статьи, присылаемой в редакцию журнала.

Примеры оформления ссылок:

Статья в журнале на английском языке:

Kim J.Y., Lim B.J., Sohn H.J., Shin D., Oh S.H. Increased expression of cathelicidin by direct activation of protease activated receptor 2: possible implications on the pathogenesis of rosacea. Yonsei Med J. 2014;55(6):1648–1655. Doi:10.3349/ymj.2014.55.6.1648.

Статья в журнале на русском языке:

Короткевич А.А., Коков А.Н. Гибридные технологии лучевой диагностики ишемической болезни сердца: современные возможности и перспективы // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2015. – № 1. – С. 5–9. [Korotkevich A.A., Kokov A.N. Hybrid technology of beam diagnostics in the diagnosis of coronary heart disease: current opportunities and prospects. Complex Issues of Cardiovascular Diseases. 2015;(1):5–9. (In Russ.)]. Doi: 10.17802/2306-1278-2015-1-5-9.

ВНИМАНИЕ! В списке литературы следует приводить всех авторов публикации!

Сведения об авторах

Необходимо указать полные сведения о каждом авторе на русском и английском языке (ФИО, ученая степень, ученое звание, должность, место работы, e-mail).

5. Соответствие нормам этики. Для публикации результатов оригинальной работы необходимо указать, что все пациенты и добровольцы, участвовавшие в научном и клиническом исследовании, дали на это письменное добровольное информированное согласие, которое должны хранить автор(-ы) статьи, а исследование выполнено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (в ред. 2013 г.). В случае проведения исследований с участием животных – соответствовал ли протокол исследования этическим принципам и нормам проведения биомедицинских исследований с участием животных. В обоих случаях необходимо указать, был ли протокол исследования одобрен этическим комитетом (с приведением названия соответствующей организации, ее расположения, номера протокола и даты заседания комитета).

6. Сопроводительные документы. При подаче рукописи в редакцию журнала необходимо дополнительно загрузить файлы, содержащие сканированные изображения заполненных и заверенных сопроводительных документов (в формате *.pdf).

К сопроводительным документам относятся:

1) письмо-направление от учреждения (на официальном бланке). Письмо предоставляется с места работы автора, заверяется печатью и подписью руководителя организации. Для каждой указанной в рукописи организации необходимо предоставить отдельное сопроводительное письмо. Документ должен содержать сведения, что данный материал не был опубликован в других изданиях и не принят к печати другим издательством/издающей организацией, конфликт интересов отсутствует. В статье отсутствуют сведения, не подлежащие опубликованию.

2) письмо-согласие, подписанное каждым автором: «Настоящим подтверждаю(ем) передачу прав на публикацию статьи ФИО авторов «Название статьи» в неограниченном количестве экземпляров в журнале «Регионарное кровообращение и микроциркуляция», включая электронную версию журнала».

7. Авторские права. Авторы, публикующие статьи в данном журнале, соглашаются со следующим:

1) авторы сохраняют за собой авторские права на работу и предоставляют журналу право первой публикации работы на условиях лицензии Creative Commons Attribution License, которая позволяет другим распространять данную работу с обязательным сохранением ссылок на авторов оригинальной работы и оригинальную публикацию в этом журнале.

2) авторы сохраняют право заключать отдельные контрактные договоренности, касающиеся не-эксклюзивного распространения версии работы в опубликованном здесь виде, со ссылкой на ее оригинальную публикацию в этом журнале.

3) авторы имеют право размещать их работу в сети Интернет до и во время процесса рассмотрения ее данным журналом, так как это может привести к продуктивному обсуждению и большему количеству ссылок на данную работу (См. The Effect of Open Access).

МАТЕРИАЛЫ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ СЛЕДУЕТ ЗАГРУЖАТЬ НА САЙТ ЖУРНАЛА

Информация по заполнению электронной формы для отправки статьи в журнал подробно описана на сайте <http://www.microcirc.ru>.

Тел/факс (812) 338-70-69 • e-mail: microcirculation@yandex.ru

15371 – индекс в каталоге «Роспечать»
42410 – индекс в каталоге «Пресса России»

Главный редактор – профессор *Н. Н. Петрищев*
Зам. главного редактора – д-р мед. наук *Т. Д. Власов*
Научный редактор – д-р мед. наук *С. Н. Тульцева*
Ответственный секретарь – канд. биол. наук *В. А. Пугач*

Верстка – А. А. Чиркова
Корректор – В. А. Черникова
Адрес редакции: 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8

«Regional blood circulation and microcirculation» is on the list of peer-reviewed scientific journals that publish the main results of dissertations for a Candidate of Sciences degree, for a Doctor of Sciences degree in scientific specialties and related fields of science:

from December 28th 2018:

- 14.01.04 – Internal medicine (Medical Sciences);
- 14.01.05 – Cardiology (Medical Sciences);
- 14.01.11 – Nervous diseases (Medical Sciences);
- 14.01.13 – Radiology (Medical Sciences);
- 14.01.17 – Surgery (Medical Sciences);
- 14.01.26 – Cardiovascular surgery (Medical Sciences)

Additional list from November 15th 2019:

- 03.03.01 – Physiology (Biological Sciences),
- 03.03.01 – Physiology (Medical Sciences),
- 14.01.05 – Cardiology (Biological Sciences),
- 14.03.01 – Human anatomy (Medical Sciences),
- 14.03.03 – Pathological physiology (Medical Sciences),
- 14.03.03 – Pathological physiology (Biological Sciences).

Submitting the manuscript, the authors are kindly requested to adhere to the following regulations based on the «Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals», developed by the International Committee of Medical Journal Editors.

1. Manuscript requirements. We accept submissions strictly online, via the form available at our website. Please upload your manuscript as a Microsoft Office Word document. The best format is *.rtf as it excludes conflict between different versions of MS Word program.

2. Length of the manuscript should be about 20,000 typographical units.

3. Text formatting. Lettering should be in Times New Roman (font size 12 pt with 1.0 line spacing and 2 cm margins from both sides. Kindly refrain from using underlining in your document (italic and bold formatting is acceptable). Repeating blanks and excessive line breaks should be removed from the text in automatic regime through Microsoft word service «find and replace text».

4. The file with the text of the article, uploaded to the form for submission of manuscripts, should contain all the information for publication (including figures and tables). When registering on the journal's website, all authors must indicate ORCID!

Please organize your text according to the following template:

- *Authors of the article.* The authors' names should be indicated as follows: first name, patronym initial, family name (Evgeniy A. Ivanov, Yuriy V. Petrov, Anatoliy Yu. Sidorov).

- *Article title.*

- *The name of the institution.* It should be official and complete, without abbreviations. If the authors are from different institutions, it is necessary to link the names of institutions and family names, given names and patronymics by adding superscript numbers before the names of institutions and family names of the corresponding authors.

- *Annotation of an original article* should be structured: introduction, aims of the study, followed by materials and methods and finishing with the results and conclusions. The resume should completely correspond to the article content. Please note that your abstract should be within 150–200 words. Abbreviations in annotation must be explained. Non-specific terms should be avoided. Instructions on writing annotations can be found at <http://authorservices.taylorandfrancis.com/abstracts and titles/>.

- *Keywords.* Provide 4–10 keywords necessary for indexing purposes.

Full text must be properly structured. Full text structure should conform to IMRAD (Introduction, Methods, Results and Discussion) format; subdivisions should be indicated. The following structure is recommended: introduction, the objective of the study, materials and methods, results, discussion, conclusions.

- *Tables* must be drawn in MS Word. They should be put in the text, they should have numbered title and user-friendly clearly denoted graphic charts. Please make sure that table data is in line with the numbers in the body of the text but does not duplicate them. Table references must be given in the text.

- *Figures* (graphs, diagrams, schemes and other illustrations prepared by means of MS Office) must be put in the text and have a numbered legend. In addition, each figure should be additionally uploaded to the website (in a special form for submitting the article) as a separate file of the software in which the figure was prepared (*.rtf, *.xls, etc.). References to figures in the text are required.

- *Photographs* and other illustrations must be placed in the text and accompanied by a numbered caption. In addition, each photo must be additionally uploaded to the website (in a special form for submitting an article) as a separate file in *.tif format (*.doc and *.docx – only if additional marks are made on the image). Image resolution should be ≥ 300 dpi.

An image file must be given a name corresponding to the number of the figure in the text. A separate figure legend corresponding to the title of photograph in the text should be included in file description (example: Fig 1. Hans Selye).

Additional information

- *Acknowledgements.* This section indicates individuals who provided help during the research but are not authors as well as information about funding of research and preparation of the paper (fund, commercial or governmental organization, private individual, etc). It is not required to indicate the amount of funding.

- *Conflict of interest.* The authors are required to disclose potential and evident conflicts of interest related to the manuscript. A conflict of interest is any situation (financial relationships, work at institutions interested in published material financially or

politically, job duties, etc) that can influence the author(s) and lead to concealing, falsification of the data or their misinterpretation. Disclosure of the conflict of interest by one or a few authors does not cause rejection to publish the paper. Evidence for concealment of potential and evident conflicts of interest may imply rejection of consideration and publication of the manuscript;

Reference list.

Reference list should comply with the requirements of the Vancouver style, with indication of DOI (digital object identifier) at the end of each reference. DOI can be found at <http://search.crossref.org>. To obtain DOI, it is necessary to type article title in English in search box.

References

Number the references in square brackets ([1, 2, 3, 4, 5]) in the list in the order in which they appear in the text, not in alphabetical order.

ATTENTION!

Not cited:

- abstracts if they are not found by search engines;
- textbooks, teaching aids;
- statistical collectors (indicated in page footnotes);
- dissertations;
- abstracts of dissertations.

Sources in the list of references can be printed (published, published by printing) and electronic publications (books with ISBN, or articles from periodicals having ISSN).

Example of a reference: Kim J.Y., Lim B.J., Sohn H.J., Shin D., Oh S.H. Increased expression of cathelicidin by direct activation of protease activated receptor 2: possible implications on the pathogenesis of rosacea. Yonsei Med J. 2014;55(6):1648–1655. Doi:10.3349/ymj.2014.55.6.1648.

ATTENTION! All authors of publications should be indicated in the list of references!

Information about authors.

Complete information about each author must be provided (full name, academic degree, academic title, position, place of work, e-mail).

5. Ethics statement. In order to publish the results of the original work, it is necessary to indicate that all patients and volunteers who participated in the scientific and clinical study gave written voluntary informed consent to this, which should be kept by the author (s) of the article, and the study was carried out in accordance with the requirements of the World Medical Association Declaration of Helsinki (updated in 2013). In the case of studies involving animals, it is necessary to indicate whether the protocol of the research corresponds to the ethical principles and standards of biomedical research involving animals. In both cases, it is necessary to indicate whether the protocol of the research has been approved by the ethics committee (with the name of the organization, its location, protocol number and date of the meeting of the committee).

6. Supporting documents. Manuscript submission requires uploading scanned images of certified supporting documents (in *.pdf format).

Supporting documents include:

1) Referral letter from the author's place of work authenticated by seal and signed by the head of institution and by all coauthors (for each institution indicated in manuscript a separate cover letter is required). The letter must state that the submitted material has not been previously published or accepted by another publisher, that there is no conflict of interest, and article contains no information that is not subject to publishing.

2) Letter of consent signed by each author: «Herewith we confirm transfer of publication right, authors' names, article title in unlimited number of copies in journal «Regional blood circulation and microcirculation», including on-line version».

7. Copyright. Authors who publish with this journal agree to the following terms:

1) the authors retain their copyrights of the work and grant the journal the right to publish the work in the first place under the terms of the Creative Commons Attribution License, which allows others to distribute this work with the mandatory preservation of references to authors of the original work and the original publication in this journal;

2) the authors retain their rights to conclude separate contractual arrangements for the non-exclusive distribution of the published version of the work with reference to its original publication in this journal;

3) the authors have the right to post their article on the Internet before and during the process of reviewing it by this journal, as this can lead to productive discussion and more references citing the article (see the Effect of open access).

THE CONTENTS SHOULD BE UPLOADED TO THE JOURNAL WEBSITE

Detailed information on completing an online form for article submission can be found at <http://www.microcirc.ru>.

Telephone/Fax (812) 338-70-69 • e-mail: microcirculation@yandex.ru

15371 – index in the «Rospechat» agency catalog
42410 – index in the «Russian pressa» agency catalog

Editor-in-chief – N. N. Petrishchev
Vice editor – T. D. Vlasov
Scientific Editor – S. N. Tultseva
Executive Secretary – V. A. Pugach
E-mail address for correspondence: tultseva@yandex.ru

Layout designer – A. A. Chirkova
Corrector – V. A. Chernikova
Editorial board address: 6-8, Lev Tolstoy Str., St. Petersburg, Russian Federation, 197022