

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ ВЕЩЕСТВ, ВЛИЯЮЩИХ НА РЕОЛОГИЮ КРОВИ

М. Б. Плотников, О. И. Алиев, Т. М. Плотникова¹

В работе представлен дизайн доклинического исследования веществ, влияющих на реологические свойства крови, с кратким описанием этапов. Приводятся сведения о моделях, воспроизводящих синдром повышенной вязкости крови, описаны подходы к изучению механизмов гемореологической активности исследуемых соединений.

Ключевые слова: гемореологические средства, синдром повышенной вязкости, модели на животных, вязкость крови, вязкость плазмы, гематокрит, агрегация эритроцитов, деформируемость эритроцитов

Кровь способна выполнять свои важные для организмы функции благодаря уникальному свойству — текучести [38]. Нарушение текучести крови возникает при разнообразных патологических состояниях и проявляется в возрастании вязкости крови [1, 2, 6, 7, 46, 55]. Повышение вязкости крови формируется в результате односторонних сдвигов реологических показателей: повышения гематокрита, вязкости плазмы, возрастания агрегации эритроцитов и снижения их деформируемости. Этот феномен обозначается, как “синдром повышенной вязкости крови” (СПВК; hyperviscosity syndrome) — термин, впервые предложенный L. Dintenfass [43]. Развитие СПВК вызывает замедление потока крови, повышение общего периферического сопротивления и артериального давления [44], депонирование крови в венозном русле [17], ишемию органов и другие гемодинамические последствия, которые приводят к расстройству микроциркуляции, уменьшению доставки кислорода тканям [53], способствуют развитию тромбозов [32]. Наибольшей выраженности СПВК достигает при сердечно-сосудистых заболеваниях, особенно их острых формах — ишемическом инсульте и инфаркте миокарда [1, 6]. Серьезные нарушения реологических свойств крови наблюдаются также у больных диабетом [2, 55], онкологическими заболеваниями, особенно в условиях химиотерапии [7].

Исходя из этого, важной проблемой экспериментальной фармакологии является поиск и изучение лекарственных средств, обладающих специфической гемореологической активностью — гемореологических средств (hemorheological drugs [45]), которые, воздействуя на макро- и/или микрореологические параметры, способны снижать вязкость крови и ослаблять выраженность СПВК при различных патологических состояниях. Решение данной проблемы затруднено многообразием и сложной взаимосвязью факторов, определяющих вязкостные свойства крови на различных уровнях — макро- и микрореологическом.

Целью данной работы является описание оптимального алгоритма — дизайна доклинического исследования фармакологических веществ, влияющих на реологиче-

ские свойства крови, включающего оценку их эффективности на различных моделях, при которых формируется СПВК, и изучение основных механизмов гемореологической активности исследуемых соединений.

Кровь является неньютоновской жидкостью (ее вязкость зависит от скорости сдвига), что и определяет особенности ее реологического поведения в различных участках кровеносного русла [8, 38]. Неньютоновские свойства крови связаны с наличием в ней клеток (преимущественно эритроцитов), способных деформироваться и образовывать агрегаты, и крупномолекулярных белков. Данная многофакторность, лежащая в основе изменения вязкостных свойств крови, обязывает при изучении влияния соединения на реологические свойства крови проводить комплексную оценку гемореологического профиля с обязательным исследованием основных параметров. Прежде всего, это вязкость цельной крови (величина, обратная текучести) — интегральный реологический показатель, обусловленный внутренним трением между соседними, движущимися с разными скоростями слоями крови. Наиболее адекватным способом измерения вязкости цельной крови является использование ротационных вискозиметров разнообразных конструкций [11, 37]. Этот метод позволяет измерять вязкость в широком диапазоне скоростей сдвига, что отражает условия течения крови в различных участках сосудистого русла.

Факторы (параметры), определяющие вязкость крови, условно разделяют на макрореологические (гематокрит, вязкость плазмы) и микрореологические (агрегация и деформируемость эритроцитов) [13]. Гематокрит — часть объема крови, приходящаяся на форменные элементы крови (главным образом, эритроциты), является важнейшим фактором, определяющим вязкость крови [11]. Вязкость плазмы — вязкость неклеточной части крови, которая в основном определяется концентрацией и составом плазменных белков и может быть измерена на вискозиметрах различных типов, т.к. плазма проявляет свойства неньютоновской жидкости [8, 11].

Основными параметрами реологии крови, на которые оказывают влияние соединения, перспективные в плане разработки эффективных гемореологических средств, являются микрореологические показатели — агрегация и

¹ НИИ фармакологии СО РАМН, 634028, Томск, пр. Ленина, 3.

деформируемость эритроцитов. Агрегация эритроцитов — способность клеток объединяться в “монетные столбики” и более крупные агрегаты [11, 13, 38, 43]. Агрегацию эритроцитов изучают, применяя различные методы [1, 11, 36, 52], но наиболее приемлемым и лишенным недостатков большинства других является метод силектометрии с измерением интенсивности обратного светорассеивания в куэтовской ячейке (соосно-цилиндрическая система) [18, 37]. Деформируемость эритроцитов — свойство клеток изменять форму при приложении к ним сдвигового напряжения [1, 13, 37, 43]. Деформируемость эритроцитов предпочтительно изучать методом эктацитометрии (лазерной дифрактометрии) [37, 42] или путем измерения индекса удлинения эритроцитов, фиксированных в проточной камере [14].

Исследования фармакологических веществ, обладающих гемореологической активностью, проводят поэтапно. На I этапе (скрининг) у исследуемого соединения выявляют способность снижать повышенную вязкость крови в сопоставлении с активностью эталонного средства. Исследования проводят *in vitro* и/или *ex vivo* на модели “гипервязкости” крови [19]. При использовании донорской крови и крови крыс условием воспроизведения модели “гипервязкости” крови является тепловое воздействие: пробы инкубируют в течение часа при 42 – 45 °С. Вязкость цельной крови измеряют до начала инкубации и добавления исследуемого вещества (опыт) или растворителя (контроль) и через 60 мин после. Водорастворимые исследуемые средства или растворитель (контроль) вносят в пробы крови в объёме, исключающем гемодилюцию, способную повлиять на значение вязкости крови. На этой стадии также можно провести исследование “доза-эффект”, для этого исследуемые вещества вносят в пробы крови в различных концентрациях. Если исследуемые соединения нерастворимы в воде или используемый растворитель оказывает влияние на реологические свойства крови, исследования проводят *ex vivo*. В зависимости от задач исследования препараты вводят внутрь или парентерально, однократно или курсом, контрольным крысам вводят эквивалентное количество растворителя. Исследования *ex vivo* повышают достоверность полученных на этапе скрининга результатов, так как в этом случае отрабатываются как эффективные дозы, так и способы введения перспективного соединения. Вязкость крови достаточно измерять в двух диапазонах скоростей сдвига: 20 с^{-1} и менее (изменение вязкости крови в этом диапазоне зависит в основном от агрегации эритроцитов) и 200 с^{-1} и более (изменение вязкости крови в этом диапазоне обусловлено преимущественно деформируемостью эритроцитов) [5].

В качестве препаратов сравнения используют вещества, обладающие доказанной гемореологической активностью: пентоксифиллин [41] и дигидрокверцетин — флавоноид, выделенный из древесины лиственницы [16]. Пентоксифиллин и дигидрокверцетин обладают выраженной гемореологической активностью: в опытах *in vitro* при добавлении к пробам крови в конечной концентрации $1 \cdot 10^{-5} \text{ г/мл}$; в опытах *ex vivo* и *in vivo* на крысах при однократном и курсовом (5 дней) внутривенном введении в дозах 50 – 100 мг/кг и 20 – 50 мг/кг соответственно.

Целью II этапа является исследование влияния отобранных веществ на основные гемореологические параметры в сравнении с эталонным препаратом в условиях модели СПВК, которую выбирают в соответствии с предполагаемой областью применения гемореологического средства.

Модель СПВК при ишемии головного мозга у крыс Вистар воспроизводят ограничением кровотока по общим сонным артериям [19]. Для этого под общей анестезией выделяют сонные артерии и измеряют кровоток расходомером крови. Затем полностью перевязывают левую общую сонную артерию и дозированной перевязкой под контролем расходомера крови ограничивают кровоток по правой сонной артерии до 40 – 50 % от исходного уровня. Острую ишемию миокарда у крыс вызывают перевязкой коронарной артерии [10]. При этом у животных формируется модель СПВК при инфаркте миокарда [49]. На этих 2-х моделях изменения гемореологических показателей выявляются уже через сутки, однако в течение 1 – 3 суток в формирование СПВК существенный вклад вносит операционная травма (судя по данным, полученным у ложноперированных животных). Максимальное возрастание вязкости крови наблюдается на 3 – 5-е сутки опыта, а к 7-м суткам начинается процесс восстановления гемореологических показателей.

В качестве модели СПВК при артериальной гипертензии используют линию спонтанно гипертензивных крыс (линия SHR). У крыс этой линии наблюдается изменение основных гемореологических параметров (вязкости крови, агрегации и деформируемости эритроцитов), аналогичное сдвигам при артериальной гипертонии у человека, что позволяет с высоким прогностическим успехом оценивать эффективность гемореологических препаратов на данной модели [21].

Существуют модели СПВК при эндокринной патологии. СПВК при инсулинозависимом сахарном диабете моделируют введением аллоксана или стрептозотоцина белым беспородным крысам или крысам Вистар [23, 35]. Модель СПВК, развивающегося при гипозэстрогемии, создают удалением яичников у крыс Вистар [29]. Исследуемые вещества вводят не ранее, чем через 7 дней после овариоэктомии. Моделью СПВК при несхарном диабете могут служить крысы линии Brattleboro [12]. Это линия крыс с генетически детерминированным нарушением продукции антидиуретического гормона [51].

У животных с перечисленными моделями развивается СПВК, который характеризуется однотипными изменениями реологических показателей крови: значительным повышением вязкости крови в широком диапазоне скоростей сдвига, усилением агрегационной активности эритроцитов, снижением деформируемости эритроцитов. Вместе с тем имеются определенные качественные и количественные особенности гемореологического “профиля” на отдельных моделях, в особенности касающиеся макрореологических показателей. Так, на моделях ишемии головного мозга, инфаркта миокарда, гипозэстрогемии у крыс линии Brattleboro гематокрит повышен, а у крыс линии SHR и крыс Вистар значения этого показателя существенно не отличаются. При сахарном диабете, вызванном стрептозотоцином, СПВК формируется при

отсутствии выраженной гиперфибриногенемии и повышения гематокрита.

Имеются другие модели нарушений реологических свойств крови, формирующиеся при различных патологических состояниях: опухолевой болезни и химиотерапии [22, 24], синдроме длительного сдавления [40], γ -облучении [26], при отравлении химическими веществами (фенилгидразином, изопропанолом) [25, 28].

Наиболее приемлемым видом лабораторных животных для моделирования СПВК с целью оценки эффективности перспективных гемореологических средств являются крысы различных линий. При проведении исследований в условиях *in vivo* необходимо придерживаться общих правил. Кровь следует забирать из магистральных артерий (общая сонная артерия, бедренная артерия). Все основные гемореологические показатели (вязкость крови и плазмы, гематокрит, агрегация и деформируемость эритроцитов) измеряют на одном животном. Ввиду нестабильности реологических показателей крови при хранении [48] измерение вязкости крови, агрегации и деформируемости эритроцитов осуществляют сразу после забора крови. При измерении вязкости крови нежелательно использовать “стандартизацию по гематокриту”, так как процессы центрифугирования, ресуспендирования или хранения проб крови могут приводить к изменению функционального состояния эритроцитов у крыс.

Для перспективных соединений, отобранных на первых двух этапах исследования, представляется важным углубленное изучение механизма их действия. Дизайн III этапа исследования определяется теми макро- и/или микро-реологическими факторами, изменение которых под влиянием изучаемых средств выявлено на II этапе исследований. Как правило, поиск механизмов реализации специфических гемореологических эффектов у перспективных соединений необходимо сфокусировать на процессах, определяющих воздействие вещества на микро-реологические показатели — агрегацию и деформируемость эритроцитов.

Агрегация эритроцитов, помимо плазменных факторов (содержание в плазме фибриногена, иммуноглобулинов и альбумина), зависит от клеточных параметров: заряда, фосфолипидного состава мембран, а также от морфологической формы эритроцитов [31]. Влияние фармакологических средств на заряд мембран эритроцитов оценивают с помощью флуоресцентных зондов, в частности, *n*-толуолсульфонат-4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния (ДСМ⁺) [4]. Другим подходом к изучению влияния соединений на заряд мембран является исследование электрофоретической подвижности эритроцитов [34, 39].

Деформируемость эритроцитов, кроме морфологической формы эритроцитов, зависит от вязкоэластических свойств мембраны и цитоплазматической вязкости [42]. При нормальных значениях гемоглобина деформируемость эритроцитов обусловлена в основном состоянием мембраны клетки [50]. В связи с этим при изучении механизмов действия фармакологических веществ на деформируемость эритроцитов достаточной является оценка их влияния на вязкоэластические свойства мембран. Микровязкость мембран эритроцитов определяют с помощью флуоресцентных зондов [4], в частности, пирена

[30], или методом электронного парамагнитного резонанса [54].

Исследование влияния фармакологических веществ на морфологические формы эритроцитов осуществляют методами электронной микроскопии.

Важное значение для состояния агрегации и деформируемости эритроцитов имеет состав и состояние липидного бислоя мембран: асимметричное распределение и соотношение различных фракций фосфолипидов; их способность модифицировать активность мембранных ферментов; содержание холестерина, влияющего на микровязкость мембран [15]. Влияние фармакологических веществ на липидный состав мембран эритроцитов изучают с помощью хроматографических методов. При оценке липидного состава мембран необходимым и достаточным является определение содержания основных липидных фракций: фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, сфингомиелина, холестерина, а также лизоформ фосфолипидов [3].

При различных патологических состояниях значимым фактором изменения состояния липидного бислоя мембран эритроцитов являются процессы перекисного окисления липидов, активирующие фосфолипиды и, как следствие, вызывающие изменение фосфолипидного состава мембран, трансформацию дискоцитов в эхиноциты и стоматоциты [47] с повышением агрегации и нарушением деформируемости клеток. В связи с этим рационально исследовать влияние потенциальных гемореологических средств на один из важнейших факторов, которые изменяют клеточные параметры и, следовательно, вязкость крови — процессы ПОЛ в мембранах эритроцитов [27, 46].

Конечной целью использования гемореологических средств является улучшение микроциркуляции, что должно проявляться в улучшении функционирования органов. Поэтому для доказательства эффективности выбранных гемореологических средств рационально провести расчет индекса доставки кислорода тканям (отношение Ht /вязкость крови) [53], изучить действие исследуемого вещества на показатели микроциркуляции с применением различных методов, включая морфологические, оценить наличие у исследуемого вещества “органопротекторной” эффективности, а именно, церебропротекторной на модели ишемии головного мозга, кардиопротекторной на модели инфаркта миокарда и т.д.

Дальнейшие работы по изучению общетоксического действия перспективных гемореологических средств проводят по требованиям соответствующих Методических указаний [33].

Полагаем, что предложенный дизайн доклинического исследования позволит осуществить отбор перспективных гемореологических средств, оценить их активность в условиях различных моделей, воспроизводящих синдром повышенной вязкости крови, изучить механизм их влияния на клеточные гемореологические параметры, а применение гемореологических средств повысит эффективность лечения заболеваний, течение которых осложняет синдром повышенной вязкости крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Э. С. Габриелян, С. Э. Акопов, *Клетки крови и кровообращение*, Айтастан, Ереван (1985).
2. В. А. Галенко, Е. В. Гостинская, В. Е. Диккер, *Гемореология при нарушениях сахарного диабета*, Наука, Новосибирск (1987).
3. Р. Геннис, *Биомембраны: Молекулярная структура и функции*, Мир, Москва (1997).
4. Г. Е. Добрецов, *Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов*, Наука, Москва, (1989).
5. К. П. Иванов, *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*, **81**(6), 1 – 18 (1995).
6. В. Г. Ионова, З. А. Суслина, *Неврол. журн.*, **102**(3), 4 – 9 (2002).
7. Г. И. Карабанов, К. С. Инченко, *Акуш. и гин.*, № 12, 47 – 48. (1981).
8. К. Каро, Т. Педли, Р. Шротер, У. Сид, *Механика кровообращения*, Мир, Москва (1981).
9. Я. Д. Киршенблат, *Практикум по эндокринологии*, Москва (1969).
10. А. Х. Коган, А. Н. Кудрин, Л. В. Хуторянский, Н. И. Лосев, *Пат. физиол.*, № 2, 5 – 15 (1992).
11. В. А. Левтов, С. А. Регирер, Н. Х. Шадрина, *Реология крови*, Медицина, Москва (1982).
12. М. Ю. Маслов, А. С. Васильев, О. И. Алиев, М. Б. Плотников, *Актуальные проблемы экспериментальной и клинической фармакологии*, Изд-во Том. ун-та, Томск (2002), сс. 93 – 96.
13. А. В. Муравьев, С. В. Чепоров, *Гемореология (экспериментальные и клинические аспекты реологии крови)*, Изд. ЯГПУ, Ярославль (2009).
14. А. В. Муравьев, И. А. Тихомирова, А. А. Муравьев и др., *Клин. и лаб. диагностика*, № 1, 28 – 32 (2010).
15. В. В. Новицкий, В. В. Резанцева, Е. А. Степовая, *Физиология и патофизиология эритроцита*, Изд. Том. ун-та, Томск (2004).
16. Патент РФ № 2138285 “Гемореологическое средство”. Зарегистрировано в Госреестре изобретений РФ 27.09.1999 г.
17. Е. Б. Петухов, В. Ш. Березов, И. В. Кошкина, *Тромбоз, гемостаз и реология*, № 2, 36 – 38 (2001).
18. М. Б. Плотников, О. И. Алиев, Ф. В. Попель, *Клин. лаб. диагностика*, № 3, 57 – 58 (1995).
19. М. Б. Плотников, А. А. Колтунов, О. И. Алиев, *Экспер. и клин. фармакол.*, **59**(6), 57 – 58 (1996).
20. М. Б. Плотников, А. А. Колтунов, О. И. Алиев, *Бюл. экспер. биол.*, **122**(9), 274 – 275 (1996).
21. М. Б. Плотников, О. И. Алиев, А. А. Колтунов, М. Ю. Маслов, *Бюл. экспер. биол.*, **126**(8), 150 – 151 (1998).
22. М. Б. Плотников, М. Ю. Маслов, О. И. Алиев и др., *Экспер. онкология*, № 4, 228 – 230 (2000).
23. М. Б. Плотников, М. Ю. Маслов, О. И. Алиев и др., *Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии*, № 4, 26 – 28 (2001).
24. М. Б. Плотников, М. Ю. Маслов, О. И. Алиев и др., *Вопр. онкол.*, **47**(3), 335 – 337 (2001).
25. М. Б. Плотников, О. И. Алиев, А. С. Васильев и др., *Бюл. экспер. биол.*, Приложение 1, 73 – 75 (2005).
26. М. Б. Плотников, Н. А. Тюкавкина, М. Ю. Маслов и др., *Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии*, № 2, 20 – 24. (2005).
27. М. Б. Плотников, Н. А. Тюкавкина, Т. М. Плотникова, *Лекарственные препараты на основе диквертина*, Изд-во Том. ун-та, Томск (2005).
28. М. Б. Плотников, Г. А. Чернышева, В. И. Смольякова, и др., *Биомедицина*, № 2, 46 – 52 (2010).
29. А. М. Плотникова, З. Т. Шульгау, Т. М. Плотникова и др., *Бюл. экспер. биол.*, **146**(7), 101 – 104 (2008).
30. Т. М. Плотникова, Н. Н. Фирсов, О. Е. Ваизова, *Экспер. и клин. фармакол.*, **55**(4), 29 – 31 (1992).
31. Н. В. Резанцева, В. В. Новицкий, Е. А. Степовая и др., *Бюл. экспер. биол.*, **135**(1), 33 – 36 (2003).
32. Е. В. Ройтман, *Тромбоз, гемостаз и реология*, № 3, 13 – 27 (2003).
33. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Р. У. Хабриев (ред.), 2 изд., перераб. и доп., ОАО “Издательство “Медицина”, Москва (2005).
34. С. А. Селезнев, С. М. Вашетина, Г. Е. Мазуркевич, *Комплексная оценка кровообращения в экспериментальной патологии*, Медицина, Ленинград (1976).
35. А. А. Спасов, А. Ф. Кучерявенко, О. А. Салазникова, *Экспер. и клин. фармакол.*, **72**(5), 31 – 34 (2009).
36. Р. Т. Тухватулин, В. А. Левтов, В. Н. Шуваева, Н. Х. Шадрина, *Физиол. журн. СССР*, **72**(6), 775 – 784 (1986).
37. Н. Н. Фирсов, П. Х. Джанашия, *Введение в экспериментальную и клиническую гемореологию*, Москва (2008).
38. Б. Фолков, Э. Нил, *Кровообращение*, Медицина, Москва (1976).
39. С. С. Харамоненко, А. А. Ракирянская, *Электрофорез клеток крови в норме и патологии*, Минск (1974).
40. Г. А. Чернышева, М. Б. Плотников, В. И. Смольякова и др., *Бюл. экспер. биол.*, **130**(11), 509 – 511 (2000).
41. *Энциклопедия лекарств*, Г. Л. Вышковский (гл. ред.), ООО “РЛС”, Москва (2009).
42. M. Bessis, N. Mohandas, *Blood Cells*, **1**, 307 – 313 (1975).
43. L. Dintenfass, *Rheology of blood in diagnostic and preventative medicine*, London (1976).
44. V. Hossmann, G. Bonner, G. Wambach, et al., *Clin. Exp. Hypertens.*, **8**, 673 – 680. (1986).
45. M. Leschke, W. Motz, *Wien Med. Wochenschr.*, **136**, Spec. No. 17 – 24 (1986).
46. J. Mo, J. Fan, Z. Guo, et al., *Med. Hypotheses*, **41**(6), 516 – 620 (1993).
47. D. J. Moor, R. H. Sills, R. Mendelsohn, *Biochemistry*, **36**(3), 660 – 664 (1997).
48. N. Nemeth, O. K. Baskurt, H. J. Meiselman, et al., *Korea-Australia Rheology J.*, **21**(2), 127 – 133 (2009).
49. M. B. Plotnikov, O. I. Aliiev, M. Yu. Maslov, et al., *Phytother. Res.*, **17**(1), 86 – 88 (2003).
50. B. Sandhagen, *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, **21**(3 – 4), 179 – 181 (1999).
51. H. Schmale, D. Richter, *Nature*, **308**(5961), 705 – 709 (1984).
52. H. Schmid-Schönbein, E. Volger, H. J. Klose, *Pflugers Arch.*, **333**(2), 140 – 155 (1972).
53. J. F. Stoltz, M. Donner, *Schweiz. Med. Wochenschr.*, **43**, Suppl., 41 – 49 (1991).
54. K. Tsuda, Y. Kinoshita, K. Kimura, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **21**(8), 1306 – 1312 (2001).
55. J. Vekasi, Z. Marton, G. Kesmarky, et al., *Orv. Hetil.*, **142**(20), 1045 – 1048 (2001).

Поступила 06.04.11

METHODOLOGICAL APPROACHES TO STUDYING SUBSTANCES INFLUENCING BLOOD RHEOLOGY

M. B. Plotnikov, O. I. Aliiev, and T. M. Plotnikova

Research Institute of Pharmacology, Siberian Branch of the, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, 634028, Russia

Optimum design of preclinical research for pharmacological agents influencing the rheological properties of blood is presented. Models of hyperviscosity syndrome and approaches to studying the hemorheological activity mechanisms are described.

Key words: Hemorheological drugs, hyperviscosity syndrome, animal models, blood viscosity, plasma viscosity, hematocrit, aggregation of erythrocytes, deformability of erythrocytes