

*На правах рукописи*

Волкова Елена Леонидовна

**МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА И СЕРОВОДОРОДА И  
СУБСТРАТОВ ИХ СИНТЕЗА НА МИКРОРЕОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ  
ЭРИТРОЦИТОВ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ**

Специальность 1.5.5 – Физиология человека и животных

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Ярославль - 2026

Работа выполнена в лаборатории кафедры медико-биологических основ спорта и теории физической культуры ФГБОУ ВО Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского.

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Научный руководитель:</b>  | <b>Муравьев Алексей Васильевич</b> д. б. н., профессор кафедры медико-биологических основ спорта и теории физической культуры ФГБОУ ВО ЯГПУ им. К. Д. Ушинского.   |
| <b>Официальные оппоненты:</b> | <b>Ройтман Евгений Витальевич</b> д. б. н, старший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ФГБНУ «Российский центр неврологии и нейронаук» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.<br><br><b>Евлахов Вадим Иванович</b> д. м. н. доцент, заведующий лабораторией физиологии висцеральных систем К.М. Быкова, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». |
| <b>Ведущая организация:</b>   | ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России.<br>Отзыв готовит <b>Науменко Людмила Владимировна</b> д. м. н., профессор кафедры фармакологии и биоинформатики.  |

Защита диссертации состоится « 21 » мая 2026 г. в 13.00 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.137.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6) и на сайте <http://www.infran.ru>

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат биологических наук

Иванова Галина Тажимовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Эффективность перфузии и оксигенации тканей напрямую определяется объемной скоростью кровотока и зависит от: *гемодинамических*, *сосудистых* и *гемореологических* факторов (Baskurt, Meiselman, 2003, 2007). Поэтому комплекс гемореологических характеристик во многом обуславливает величину объемного кровотока, тканевой перфузии и доставки кислорода клеткам (Baskurt, Meiselman, 2007; Pries, Secomb, 2008; Fu et al., 2017). Хотя из анализа эмпирического закона Пуазейля следует, что объемный кровоток обусловлен диаметром сосудов (Pries, Secomb, 1997, Капо с соавт., 1981; Джонсон, 1982), однако его роль становится менее значительной на уровне обменных капилляров из-за отсутствия мышечных элементов в их стенке и ограничения контроля сосудистого диаметра (Куприянов с соавт., 1975; Baskurt, Meiselman, 2003, 2007). Поэтому эффективность локальной оксигенации тканей, в значительной степени, определяется микрореологическими свойствами эритроцитов (МСЭ), главным образом их деформируемостью (ДЭ) (Negrean et al., 2004; Lipowsky, 2005; Pinho et al., 2020; Steele et al., 2024). Другая микрореологическая характеристика эритроцитов, их обратимая агрегация (АЭ), связанная с проявлением неньютоновских свойств крови, существенно влияет на кислородтранспортные возможности крови (Meiselman, et al, 2006; Wang, Zennadi, 2020; Dhalla et al., 2025). Свойства неньютоновской жидкости проявляются ею при снижении напряжения сдвига (Abbasian et al., 2020). Течение такой жидкости не подчиняется закону Пуазейля и не зависит от радиуса сосуда в четвертой степени (Уилкинсон, 1964). Полагают, что транспортные возможности крови снижаются при увеличении степени ее неньютоновости (Stoltz et al., 1991; Kandangwa, et al., 2022). Однако эта проблема требует более детального анализа (Wajihah, Sankar, 2023). Кроме того, вязкость крови (ВК), а также ДЭ и АЭ влияют на сосудистое сопротивление и, следовательно, на величину *артериального давления* (АД) (Селезнев с соавт., 1976; Lipowsky, 2007). Поэтому более подробное исследование вклада отдельных гемореологических характеристик в величину АД представляет важную теоретическую и практическую задачу (Baskurt, Meiselman, 2007). Кроме того, поиск средств коррекции негативно измененных микрореологических характеристик эритроцитов и их кислородтранспортного потенциала – это новая интересная стратегия прикладных научных исследований (Sharina, Martin, 2017; Pinho et al., 2020; Grau, Pericas, 2022). Для решения подобных задач необходимо тщательно исследовать роль МСЭ и, в первую очередь, их ДЭ и АЭ, в текучести цельной крови, которая определяет эффективность  $O_2$ -транспорта (Галенок с соавт, 1987; Van Cromvoirt et al., 2021). Следует сконцентрировать внимание на эритроцитах, объем которых занимает почти половину объема цельной крови. Сами зрелые эритроциты человека, несмотря на простоту клеточной конструкции, сохранили активные элементы молекулярных сигнальных каскадов (Muravyov, Tikhomirova., 2013; Minetti et al., 2004) в том числе G-белки, аденилатциклазы, гуанилатциклазы, цАМФ и цГМФ, мембранные ионные каналы, фосфодиэстеразы, протеинкиназы и фосфатазы (Minetti et al., 2004; Günay et al., 2025), которые могут быть молекулярными внутриклеточными мишенями для триггеров, кондиционирующих МСЭ (Kuck et al., 2019; Moreau et al., 2022; Park et al., 2024). Эритроциты, количество которых достигает  $2 \times 10^{13}$  (Lew et al., 2011; Ugurel et al., 2022), и благодаря своей деформируемости и текучести обеспечивают продукцию (АТФ, NO, CO,  $H_2O_2$ ), транспорт сигнальных молекул (González-Alonso et al., 2012) и, следовательно, регуляцию и интеграцию огромного числа

клеток разных тканей и органов (Richardson et al., 2020). Для решения этих интегративных и регуляторных задач хорошо подходят представители относительно нового класса биологически активных соединений, газовые медиаторы или газотрансммиттеры, а именно NO, CO и H<sub>2</sub>S (Olas, 2015; Лобов, Непиющих, 2020, Лобов, Соколова, 2020; Russo et al., 2023). В большом числе публикаций сообщается о важной роли ГТ в регуляции функций организма (Северина, 1998; Marini et al., 2023; Лобов, 2021; Lobov, 2021), в том числе клеток крови (Тихомирова, 2022; Truss et al., 2011; Grau et al., 2021). Было отмечено, что МСЭ положительно изменяются вследствие действия донора NO нитропруссид натрия и субстрата NO-синтазы, L-аргинина (Муравьев с соавт., 2019; Bor-Kucukataay, 2003; Uyuklu et al., 2009; Mozar et al., 2016). Вместе с тем незаслуженно меньше внимания уделено влиянию другого газотрансммиттера, сульфида водорода, на функции красных клеток крови и, в частности, на их микрореологические характеристики и на транспортный потенциал. В литературных источниках представлено лишь несколько работ на эту тему, опубликованных членами нашей научной группы (Муравьев с соавт., 2021, 2024). Разработанные *in vitro* модели микрореологических реакций эритроцитов в условиях действия доноров ГТ и субстратов их эндогенного синтеза позволяют получить сведения о влиянии этих соединений на клетки крови, выявить элементы внутриклеточных сигнальных каскадов и показать возможные варианты кросс-общения (cross-talking) разных ГТ и их субстратов (Муравьев с соавт., 2022; Gheibi et al., 2018; Wu et al., 2018) и наметить пути практического применения в клинической практике.

Исходя из всего вышеизложенного, были сформулированы цель и основные задачи настоящего исследования.

**Цель:** Изучение влияния микрореологических свойств эритроцитов на текучесть крови и ее транспортный потенциал, анализ микрореологических изменений эритроцитов под влиянием газотрансммиттеров у здоровых людей, у лиц с артериальной гипертензией (АГ) и с избыточной массой тела (ИзбМТ).

**Задачи исследования:**

1. Выполнить анализ комплекса гемореологических характеристик и микрореологии эритроцитов и оценить их вклад в транспортный потенциал крови (ТПК) у здоровых лиц, а также исследовать микрореологические изменения эритроцитов под влиянием доноров NO, субстрата его синтеза, L-аргинина, донора H<sub>2</sub>S и субстрата его синтеза, L-цистеина.
2. Определить макро- и микрореологические характеристики крови и эритроцитов, а также вклад ДЭ и АЭ в текучесть крови и ее ТПК у лиц с АГ и оценить у них микрореологические изменения эритроцитов под влиянием нитропруссид натрия, L-аргинина, гидросульфида натрия и L-цистеина.
3. Определить макро- и микрореологические характеристики крови и эритроцитов, а также оценить вклад ДЭ и АЭ в текучесть крови и ее ТПК у лиц с ИзбМТ и исследовать у них микрореологические изменения эритроцитов под влиянием нитропруссид натрия, L-аргинина, гидросульфида натрия и L-цистеина.
4. Исследовать внутриклеточные молекулярные сигнальные каскады, ассоциированные с действием ГТ на микрореологические характеристики эритроцитов.

**Научная новизна.** Научная новизна проведенного исследования отражена в выявлении количественного вклада отдельных макро- и микрореологических характеристик крови и эритроцитов в ее текучесть и транспортный потенциал. Впервые показана роль неньютоновости крови в проявлении ее текучести и транспортных возможностей у здоровых

людей с оптимальными значениями ВК и на двух моделях с патологически повышенной ВК: у людей с АГ и с ИзбМТ. Были исследованы величины микрореологических нарушений при перечисленных состояниях и оценена возможность их восстановления до уровня нормальных величин. Разработаны и апробированы модели микрореологических ответов эритроцитов на действие доноров ГТ и субстраты их эндогенного синтеза у здоровых лиц при АГ и ИзбМТ. Получены новые данные о положительных изменениях ДЭ и АЭ в ответ на воздействие доноров ГТ (NO и H<sub>2</sub>S). На разработанных моделях микрореологических ответов интактных эритроцитов и их восстановленных теней впервые получены сведения о вкладе эластичности мембран в общую клеточную деформируемость при нормальных физиологических условиях и при нарушениях АД и метаболизма. Впервые проведен комплекс исследований и получены оригинальные данные о сигнальных каскадах эритроцитов, ассоциированных с их микрореологическими изменениями под влиянием H<sub>2</sub>S. Впервые показаны возможности кросс-общения (cross-talk) NO и H<sub>2</sub>S на модели микрореологических реакций эритроцитов на эти ГТ. Впервые экспериментально проверено предположение о роли кальций-зависимых калиевых каналов средней проводимости (KCa3.1) – Гардош-каналов в ответах эритроцитов на действие NaHS.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные в проведенном нами исследовании величины количественной оценки вклада МСЭ в изменение текучести цельной крови и ее ТПК имеют существенное теоретическое и практическое значение. Выявлено, что негативные изменения ДЭ и АЭ при АГ и у лиц с ИзбМТ, заметно коррелировали с уменьшением текучести крови и ее транспортных возможностей. Это также имеет существенное теоретическое значение и может быть использовано при анализе ряда патологических состояний. Данные, выявленные на моделях микрореологических ответов эритроцитов при их взаимодействии с донорами ГТ открывают исследования применения нового класса сигнальных молекул (NO и H<sub>2</sub>S) в практике для восстановления нарушенных микрореологических свойств эритроцитов. В диссертации систематизированы данные о прямых регуляторных воздействиях сигнальных молекул пара- и аутокринной природы (ГТ) на микрореологическое поведение эритроцитов. Впервые установлено, что не только доноры ГТ, но и субстраты их эндогенного синтеза позитивно изменяют микрореологию эритроцитов. Эффективное применение метода проточной микрокамеры и анализ микрореологических ответов клеток крови на биологически активные соединения позволяют использовать микрофлюидный метод для доклинического тестирования разрабатываемых лекарственных препаратов на клеточных моделях. Разработанные, по результатам исследования однофакторные регрессионные модели, включающие вязкость крови, как прогнозируемый фактор и деформируемость эритроцитов, как предиктор, могут быть использованы для проектирования вязкости и текучести крови, в том числе, для применения в системах искусственного кровообращения и для корректного использования трансфузий концентрированной эритроцитарной массы. Полученные результаты исследования могут быть актуальны при чтении соответствующих разделов физиологии и патофизиологии в вузах биологического и медицинского профилей подготовки, а также для совершенствования методов диагностики и прогноза нарушений гемореологии и оксигенации тканей при заболеваниях и патологических состояниях.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Микрореологические свойства эритроцитов у здоровых лиц вносят более 30% вклада в текучесть цельной крови и ее ТПК, наряду с вязкостью плазмы (ВП) и гематокритом (Hct).

2. Доноры ГТ нитропруссид натрия и гидросульфид натрия, а также L-аргинин и L-цистеин достоверно повышают ДЭ и снижают их АЭ у здоровых лиц.
3. В повышение ВК и снижение ее ТПК, у лиц с АГ, существенный вклад вносят негативно измененные ДЭ и АЭ. При этом доноры ГТ и субстраты их синтеза восстанавливают МСЭ до уровня здоровых лиц.
4. Гемореологический профиль лиц с ИзбМТ характеризуется относительно высокой ВК, ВП, вязкостью суспензии эритроцитов (ВС) и АЭ при достоверно сниженной ДЭ и выраженным проявлением неньютоновских свойств крови, которые отрицательно коррелируют с показателем ТПК. В этих условиях доноры ГТ и субстраты их синтеза восстанавливают МСЭ до уровня здоровых лиц.
5. Доноры NO, H<sub>2</sub>S и субстраты их эндогенного синтеза оказывают прямое воздействие на деформируемость, текучесть эритроцитов и их агрегацию. В качестве клеточной молекулярной мишени для NO и H<sub>2</sub>S, действие которых ассоциировано с положительными изменениями МСЭ, рассмотрены растворимая гуанилатциклаза (p-ГЦ) и NO-синтаза и для H<sub>2</sub>S – кальций-зависимые калиевые каналы средней проводимости (Гардош-каналы).

**Степень достоверности и апробации результатов исследования.** Достоверность результатов исследования подтверждается достаточным объемом статистических выборок данных исследования, применением современных методов исследования макро- и микрореологических характеристик крови и эритроцитов, адекватных экспериментальных моделей и корректным статистическим анализом данных.

Результаты исследования были представлены на Международной конференции «Гемореология и микроциркуляция (от функциональных механизмов в клинику)», Ярославль, 2009; Международной конференции «Системное кровообращение, микроциркуляция и гемореология», Ярославль, 2011; Международном интернет-симпозиуме (в рамках ежегодной научно-практической конференции ЯГПУ им. К.Д. Ушинского «Чтения Ушинского») «Роль микрореологии и микроциркуляции при разных вариантах обеспечения организма кислородом», Гродно, Беларусь – Ярославль, 2021; Международном интернет-симпозиуме «Микроциркуляция, реология крови и кислородный гомеостаз» Ярославль – Гродно, 2022; VI Международной междисциплинарной конференции «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций», посвященной 90-летию со дня рождения академика К.В. Судакова, Москва, 2022; XIV Международной научной конференции по микроциркуляции и гемореологии. Ярославль, 2023; 78-й Международной научно-практической конференции «Чтения Ушинского». Ярославль, 2024; Российском форуме по тромбозу и гемостазу, Москва, 2024; IV Международной научно-практической конференции «Экспериментальные и клинические аспекты микроциркуляции и функции эндотелия», Смоленск, 2024; VIII Всероссийской Школе-конференции по физиологии и патологии кровообращения, Москва, 2025; XV Международной научной конференции по микроциркуляции и гемореологии. Ярославль, 2025.

#### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 23 печатных работы, в том числе 7 статей в научных изданиях из которых 3, индексируются в Scopus, 2 статьи, в журналах, рекомендованных ВАК России, 2 статьи в журналах медико-биологического профиля, индексируются в РИНЦ. Опубликовано 16 тезисов в сборниках материалов конференций.

**Личный вклад автора в проведенное исследование.** Автор лично принимала участие во всех этапах работы: анализе литературных данных, определении цели и задач

исследования, разработке его дизайна, наборе участников, планировании и проведении экспериментов, статистической обработке и интерпретации полученных данных, подготовке публикаций, представлении результатов работы на различных конференциях.

**Внедрение.** Результаты исследования внедрены в практическую работу лаборатории микроциркуляции и гемореологии, а также в учебный процесс университета, при реализации магистерских программ. Методы анализа параметров гемореологических профилей используются на некоторых клинических кафедрах Ярославского государственного медицинского университета и учитываются в диагностике и прогнозе текучести крови у больных артериальной гипертонией, сосудистой патологией в соответствующих отделениях клиник. Разработанные и апробированные в диссертации модели микрореологических ответов эритроцитов на биологически активные соединения, эффективное применение микрофлюидных камер активно используются в лаборатории биомедицинской фотоники кафедры общей физики и волновых процессов физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова при проведении исследований, поддержанных грантами РФФИ.

**Соответствие паспорта научной специальности.** Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.5 – физиология человека и животных согласно п. 2, 3, 6, 11.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 161 страницах печатного текста, состоит из оглавления, перечня условных обозначений, обзора литературы, организации и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения результатов исследования, выводов и списка литературы, включающего 45 отечественных и 209 иностранных источников. Диссертация иллюстрирована 29 таблицами и 56 рисунками.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

#### *Экспериментальные группы*

В исследование были включены добровольцы обоего пола ( $n=126$ ,  $n=61$  - женщины и  $n=65$  - мужчины) в возрасте от 32 до 55 лет. На основании оценки индекса массы тела (ИМТ), показателей АД были сформированы 3 экспериментальные группы: группа 1, группа сравнительного контроля,  $n = 48$  (здоровые лица, с нормальными показателями АД и ИМТ, без хронических заболеваний), группа 2, лица с артериальной гипертензией или группа АГ, ( $n=40$ ). Критерием включения в эту группу было превышение систолического АД (САД) показателя верхней границы нормы – 140 мм рт. ст. и диастолического АД (ДАД)  $> 90$  мм рт. ст. (Кобалава с соавт., 2024) Группа 3 – это лица с избыточной массой тела, ИзбМТ ( $n=38$ ). Критерием включения в эту группу было превышение верхней границы нормы ИМТ ( $ИМТ > 30,0$ ) (Дедов с соавт., 2021).

Величины ключевых показателей (ИМТ и АД) отличались в группах 2 и 3 от данных группы 1 на величину более  $2 \sigma$ .

Расчет ИМТ производили по формуле:  $ИМТ = m/h^2$ , где  $m$  – масса тела, кг;  $h$  – рост, м.

Измеряли систолическое (САД) и диастолическое артериальное давление (ДАД) и рассчитывали среднее АД (АД<sub>ср</sub>) по формуле (Савицкий, 1956):

$$АД_{ср} = (САД - ДАД - 1/3) + ДАД \text{ (мм рт. ст.)}$$

### *Регистрация параметров гемореологического профиля*

Образцы цельной крови (9 мл) получали венопункцией в вакуумные пробирки (вакутайнеры с EDTA). Исследование было одобрено местным этическим комитетом университета и было получено информированное согласие всех субъектов в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации (Хельсинкская декларация WMA об этике. Принципы медицинских исследований с участием людей, с поправками, внесенными 64-й Генеральной Ассамблеей WMA, Форталеза, Бразилия, октябрь 2013 г.).

Регистрировали основные параметры гемореологического профиля: ВК при высоких ( $\gamma > 100 \text{ с}^{-1}$ , ВК<sub>1</sub>) и низких скоростях сдвига ( $\gamma < 20 \text{ с}^{-1}$ , ВК<sub>2</sub>), ВП, ВС при стандартизованном Нст – 40% и вязкости суспензионной среды – растворе Рингера (1,10 мПа·с) с помощью ротационного вискозиметра Брукфилда (модель DV2TLV) и параллельно пробы крови и суспензии эритроцитов регистрировали на полуавтоматическом капиллярном вискозиметре (Муравьев с соавт., 2005), при 5 напряжениях сдвига (от 0,36 до 1,80 Па). Гематокрит определяли с помощью гематокритной центрифуги (Elmi CM-70). Реологическую эффективность транспорта кислорода кровью оценивали отношением гематокрита/вязкость (Нст/ВК<sub>1</sub>) (Stoltz et al., 1991).

АЭ регистрировали с помощью агрегометра Мугенне М1 (Германия). На рисунках и в таблицах ее обозначали как показатель агрегации эритроцитов (ПАЭ). Кроме того, процесс агрегации и форму клеток контролировали методом прямой микроскопии.

Для оценки деформируемости эритроцитов и их восстановленных теней с достаточно высокой точностью определяли индексы удлинения в проточной микрокамере, где создавали постоянное течение суспензии эритроцитов (Нст = 0,5%, вязкость среды – 1,10 мПа·с). В микрокамеру подавали давление, которое создавало напряжение сдвига 0,36 Па и вытягивало клетки, прикрепленные ко дну камеры. Адгезия клеток происходила спонтанно. На основе измерения длины ( $L$ ) и ширины ( $W$ ), вытянутых потоком клеток, рассчитывали индекс их удлинения (ИУЭ, выраженный в отн. ед.) как показатель ДЭ:  $\text{ИУЭ} = L/W$  (Artmann, 1995). Вторым методом оценки ДЭ была регистрация вязкости их суспензии (ВС) с постоянным Нст=40% и стабильной вязкостью суспензионной среды (без агрегации клеток). На основе данных ВС и вязкости суспензионной среды рассчитывали индекс ригидности эритроцитов, Тк (Муравьев, Чепоров, 2009).

Для регистрации микрореологических характеристик эритроциты отделяли от плазмы центрифугированием (15 мин, 3000 об/мин), трижды отмывали в изотоническом растворе NaCl и ресуспендировали в растворе Рингера (рН – 7,4, осмолярность – 300 мОсм/л; ее определяли на осмометре Fogel OM-801, Германия) для последующей их инкубации с препаратами и регистрации МСЭ. В опытах с исследованием АЭ, для ее стимулирования, добавляли к буферному раствору относительно высокомолекулярный декстран-130 (10% ХАЕС-стерил, *Fresenius Kabi*, Германия) в соотношении объемов 7:3. Суспензию эритроцитов делили на несколько аликвот и клетки инкубировали при 37°C в течение 30 мин с каждым из перечисленных ниже соединений:

- донор оксида азота (NO), нитропруссид натрия (НПН, 100 мкМ);
- донор сульфида водорода (H<sub>2</sub>S), гидросульфид натрия (NaHS, 100 мкМ);
- L-аргинин – субстрат эндогенного синтеза NO (в концентрации 50 мкМ);
- L-цистеин – субстрат эндогенного синтеза H<sub>2</sub>S (в концентрации 500 мкМ).

Для исследования молекулярных механизмов изменения МСЭ применяли:

- ингибитор активности растворимой гуанилатциклазы – 1Н-[1,2,4]-oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ, в концентрации 0,5 мкМ);
- ингибитор активности NO-синтазы, N-Nitroarginine methyl ester (L-NAME; 200 мкМ);
- блокатор АТФ-чувствительных ( $K_{ATP}$ ) калиевых каналов – глибенкламид (ГЛК; 10 мкМ).
- блокатор кальций-зависимых калиевых каналов средней проводимости (KCa3.1 или Гардош-каналы), клотримазол (50 мкМ);
- ингибитор активности циклического ГМФ, метиленовый синий (50 мкМ);
- агонист альфа-1-адренорецепторов, фенилэфрин (агонист  $\alpha$ -1AR, 10 мкМ).

В каждом опыте в качестве контрольной пробы использовали суспензию эритроцитов, инкубируемых в течение 30 мин при 37°C в буферном растворе без добавления указанных выше препаратов. Все препараты и соединения были получены от фирмы Sigma-Aldrich (США). Выбор концентрации применяемых соединений, осуществляли на основе данных литературы и при сравнительном анализе их клеточных эффектов в предварительных *in vitro* опытах, при использовании разных концентраций препаратов.

Поскольку биологическим мембранам принадлежит важная роль в регуляции физиологической активности клеток (Nash et al., 1986), то для более точного анализа воздействия доноров ГТ на структуры мембраны, их добавляли к суспензии восстановленных тений эритроцитов. Их готовили по методу Доджа (Dodge et al., 1963). Эритроциты разрушали осмотическим шоком. Для этого к 1 мл клеток добавляли 7 мл охлажденной дистиллированной воды (при температуре 40С<sup>0</sup>) с последующей двукратной отмывкой в изотоническом растворе NaCl. Затем концентрат тений инкубировали в растворе Рингера добавлением 30% декстран-130 (соотношение и декстрана как: 7:3, по объему). Суспензию восстановленных тений делили на несколько аликвот, добавляли соответствующие препараты (указанные выше), и после инкубирования с ними (30 мин при 37°C), регистрировали деформируемость в проточной микрокамере.

#### Статистическая обработка данных

Цифровые данные исследования были обработаны статистически с определением средней величины (M) и стандартного отклонения ( $\sigma$ ). Статистический анализ выполнялся с помощью программ Statistica 10.0 («StatSoft Inc.», США). Проверку выборочного распределения проводили с помощью теста Шапиро – Уилка. Если выборка подчинялась закону нормального распределения, достоверность различий в исследуемых группах определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. В случаях отклонения выборки от нормального распределения данных, значимость различий между двумя независимыми группами устанавливалась с помощью критерия Вилкоксона. За уровень статистически значимых принимали различия при  $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ . Гипотеза о взаимосвязи данных проверялась по коэффициентам параметрической корреляции Пирсона. На основе коэффициентов корреляции ( $r$ ) рассчитывали коэффициенты детерминации ( $D = r^2 \times 100\%$ ). Регрессионный анализ и построение графических моделей деформации и течения цельной крови и суспензий эритроцитов выполняли с помощью MS Excel.

## Результаты исследования и их обсуждение

*Анализ параметров гемореологических профилей и их изменений при действии доноров газотрансмиттеров и субстратов их синтеза у здоровых людей, лиц с артериальной гипертензией и лиц с избыточной массой тела*

Полученные результаты исследования показали, что в реологических характеристиках крови женщин и мужчин существенных, статистически достоверных различий нет (Табл.1), что позволило сформировать смешанную группу здоровых лиц для анализа микрореологических ответов эритроцитов и их восстановленных теней на действие доноров ГТ и субстратов их синтеза в клетках.

Таблица 1. Различия характеристик гемореологического профиля и микрореологических характеристик эритроцитов в группе здоровых женщин и мужчин ( $M \pm \sigma$ )

| Показатели                     | Женщины (n=24) | Мужчины (n=24) | Смешанная группа (сравнительный контроль, группа 1) |
|--------------------------------|----------------|----------------|---|
| ВК <sub>1</sub> , мПа·с        | 5,58±0,51      | 5,77±0,73      | 5,58±0,35   |
| ВК <sub>2</sub> , мПа·с        | 19,81±2,72     | 20,64±3,05     | 19,80±4,72  |
| ВП, мПа·с                      | 2,02±0,12      | 2,08±0,14      | 2,02±0,13   |
| Нсг, %                         | 43,12±1,22     | 45,09±1,38*    | 44,25±1,48  |
| Нсг/ВК <sub>1</sub> , отн. ед. | 9,16±0,86      | 9,64±0,61      | 7,93±0,14   |
| ИУЭ, отн. ед.                  | 2,07±0,06      | 2,02±0,05      | 2,04±0,05   |
| ПАЭ, отн. ед.                  | 7,96±0,76      | 8,15±0,92      | 8,04±2,26   |

*Примечания:* ВК<sub>1</sub> – вязкость крови при высоких скоростях сдвига ( $>100 \text{ с}^{-1}$ ); ВК<sub>2</sub> – при низких скоростях сдвига ( $<20 \text{ с}^{-1}$ ); ВП – вязкость плазмы; ВС – вязкость суспензии эритроцитов; Нсг – гематокрит; Нсг/ВК<sub>1</sub> – показатель эффективности транспорта кислорода кровью; ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов, как показатель их деформируемости; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов. \* – различия достоверны при  $p < 0,05$ .

Корреляционный анализ между ВК и определяющими ее факторами (Рис. 1а) показал, что в группе 1, ВК заметно коррелировала с ВП ( $r = 0,52$ ,  $p < 0,05$ ), с Нсг ( $r = 0,53$ ,  $p < 0,05$ ), с ДЭ ( $r = -0,52$ ,  $p < 0,05$ ) и с АЭ ( $r = 0,41$ ).

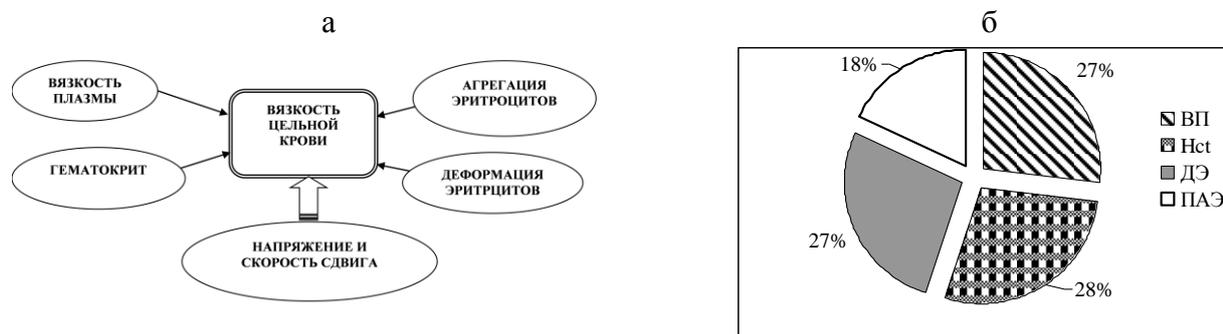


Рисунок 1 – Факторы, определяющие вязкость цельной крови (а); Диаграмма распределения вклада в вязкость цельной крови основных реологических факторов, определенных на основе расчета коэффициентов детерминации.

*Обозначения:* ВП – вязкость плазмы; Нсг – гематокрит; ДЭ – деформируемость эритроцитов; АЭ – агрегация эритроцитов.

Расчеты коэффициентов детерминации позволили представить примерное соотношение вклада отдельных реологических характеристик в вязкость (и текучесть) цельной крови (Рис. 16).

На основе анализа вклада разных характеристик общего гемореологического профиля в ВК можно полагать, что ДЭ, почти на треть (27%) определяет текучесть крови. А вместе с агрегацией микрореология эритроцитов может вносить до 45% вклада в изменение ВК и ее транспортную эффективность. При этом только МСЭ могут изменяться под действием биологически активных соединений (Brunati et al., 1996; Minetti et al., 2004), в том числе эндогенно синтезируемых газовых медиаторов, таких как NO и H<sub>2</sub>S (Diederich et al., 2018; Kobayashi et al., 2022).

Анализ изменения вязкости крови при градуальном уменьшении приложенного напряжения сдвига показал, что наблюдается нелинейный прирост вязкости, который хорошо описывается реологической моделью неньютоновской жидкости степенного закона вида (Уилкинсон, 1964):  $y = kx^{-n}$  (Рис. 2).

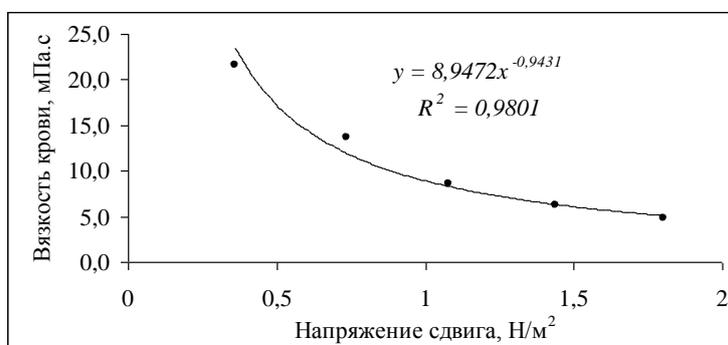


Рисунок 2 – Кривая вязкого течения крови здоровых лиц группы контроля (группа 1), как неньютоновской жидкости степенного закона.

При анализе полученного регрессионного уравнения «напряжение сдвига – вязкость крови»,  $y = kx^{-n}$  следует выделить два показателя, которые служат маркерами неньютоновского поведения жидкости. Это коэффициент консистенции «к» и показатель степени «n» (Уилкинсон, 1964). Данные исследования и корреляционный анализ показали, что индекс консистенции является весьма «чувствительным» биомаркером проявления кровью ее неньютоновских свойств. При этом он существенно связан с ее кислородтранспортным потенциалом. Об этом свидетельствовала достоверная отрицательная корреляция между показателями транспортной функции крови ( $Hct/VK_1$ ) и индексом  $k$  ( $r = -0,53$ ,  $p < 0,05$ ).

#### *Гемореологические профили у лиц с артериальной гипертензией и повышенной массой тела*

Показатели гемореологических профилей лиц с АГ и ИзбМТ существенно и статистически достоверно отличались от данных здоровых лиц (Рис. 3). Так  $VK_1$  в обеих группах была повышена на сходные величины: на 30% ( $p < 0,01$ ) у лиц группы 2 и на 28% – в группе 3. Тогда как  $VK_2$  была заметно более высокой в группе 2, и отличалась от контроля на 41%. Различие в группе 3 с контролем составило только 32%. Повышенная ВП на 25 и 18% ( $p < 0,01$ ) в группах 2 и 3, соответственно и наличие достоверной корреляции ( $r = 0,50$ ,  $p < 0,01$ ) между показателями ВК и ВП могут объяснить одну из причин прироста ВК у лиц с повышенным АД и ИзбМТ (Ахапкина, 2016; Kesmarky et al., 2008). Гематокрит, хотя

положительно и коррелировал с ВК, однако он существенно не отличался от средней величины контрольной группы. Вероятно, больший вклад в изменения вязкости цельной крови у лиц групп 2 и 3 вносили микрореологические характеристики эритроцитов. Так ДЭ была на 10% ( $p<0,01$ ) ниже в обеих группах по сравнению с данными контрольной группы, а АЭ превышала уровень контроля на 35% ( $p<0,01$ ) у лиц группы 2 и на 29% ( $p<0,01$ ) в группе 3 (Рис. 3).

Негативные изменения были отмечены и среди показателей МСЭ (Рис.2). Так ВС была повышена в обеих группах по сравнению с контролем на 10% ( $p<0,01$ ), ИУЭ был меньше, чем у здоровых лиц на 9-10% ( $p<0,01$ ), наблюдалось также значительное увеличение АЭ (29-35%) и индекса ригидности в пределах 13-18% ( $p<0,01$ ). Эти изменения сочетались с более выраженной неньютоновостью крови. На это указывала большая величина  $k$  у лиц группы 2 – на 60% ( $p<0,01$ ), а в группе 3 – на 35% ( $p<0,05$ ), по сравнению с данными группы 1.

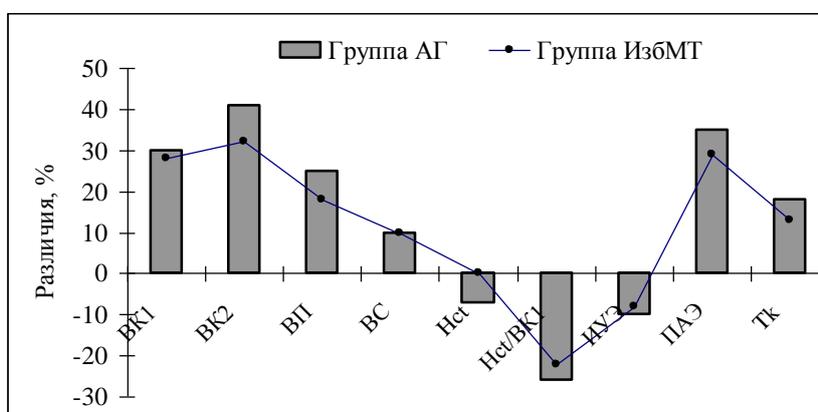


Рисунок 3 – Параметры типичных гемореологических профилей средних данных у лиц группы АГ и ИзбМТ.

*Обозначения:* ВК<sub>1</sub> – вязкость крови при высоких скоростях сдвига ( $>100 \text{ c}^{-1}$ ); ВК<sub>2</sub> – вязкость крови при низких скоростях сдвига ( $<20 \text{ c}^{-1}$ ); ВП – вязкость плазмы; ВС – вязкость суспензии эритроцитов; Нст – гематокрит; Нст/ВК<sub>1</sub> – индекс эффективности транспорта кровью кислорода; ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов, как показатель их деформируемости; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов; Тк – индекс ригидности эритроцитов.

#### *Микрореологические ответы эритроцитов на доноры газотрансммиттеров*

При инкубации эритроцитов и их восстановленных теней здоровых лиц с донорами ГТ, NaHS и НПН по отдельности, а также при их одновременном применении выявлено, что эритроциты положительно изменяют свои микрореологические характеристики (Рис. 4). Было найдено, что ДЭ и деформируемость теней эритроцитов (ИУтЭ) была достоверно повышена, в группе 1 после применения доноров ГТ, на 7% (NaHS) ( $p<0,01$ ), на 6% (НПН) ( $p<0,01$ ), а также на 10% ( $p<0,01$ ) при совместном применении этих соединений (NaHS+НПН).

В группах 2 и 3 наблюдались схожие эффекты. Так NaHS в группах 2 и 3 повышал ДЭ на 6-9% ( $p<0,01$ ), а НПН на 4-8% ( $p<0,05$ ). Совместное действие доноров ГТ (NaHS+НПН) привело к приросту ДЭ на 10-11% ( $p<0,01$ ). Примерно на такие же величины повышался ИУтЭ, под влиянием доноров ГТ (Рис. 4б и 4в).

Важно заметить, что при совместном применении двух доноров ГТ микрореологические ответы эритроцитов были статистически достоверно большими, чем на их отдельное применение для кондиционирования МСЭ. На моделях микрореологических ответов

эритроцитов лиц групп 2 и 3 было показано, что под воздействием доноров ГТ ДЭ восстанавливается до уровня здоровых лиц и даже превышала его. Так если в группе 1 среднее значение ИУЭ составляло  $2,02 \pm 0,04$  отн. ед., то в группах 2 и 3, после воздействия НПН, показатель ДЭ достиг  $2,03 \pm 0,06$  отн. ед., а под влиянием NaHS он стал равен  $2,05 \pm 0,05$  отн. ед.

Следовательно, можно заключить, что доноры ГТ восстанавливают нарушенную ДЭ, что критически важно для эффективных капиллярных транзитов (Rogers, Lew, 2021). Как видно из данных, приведенных на Рис. 4а, АЭ уменьшалась под влиянием доноров ГТ: под воздействием NaHS на 31% ( $p < 0,01$ ), а НПН – на 25% ( $p < 0,05$ ). Совместный эффект двух ГТ (NaHS+НПН) составил в этой группе 39% снижения АЭ ( $p < 0,01$ ).

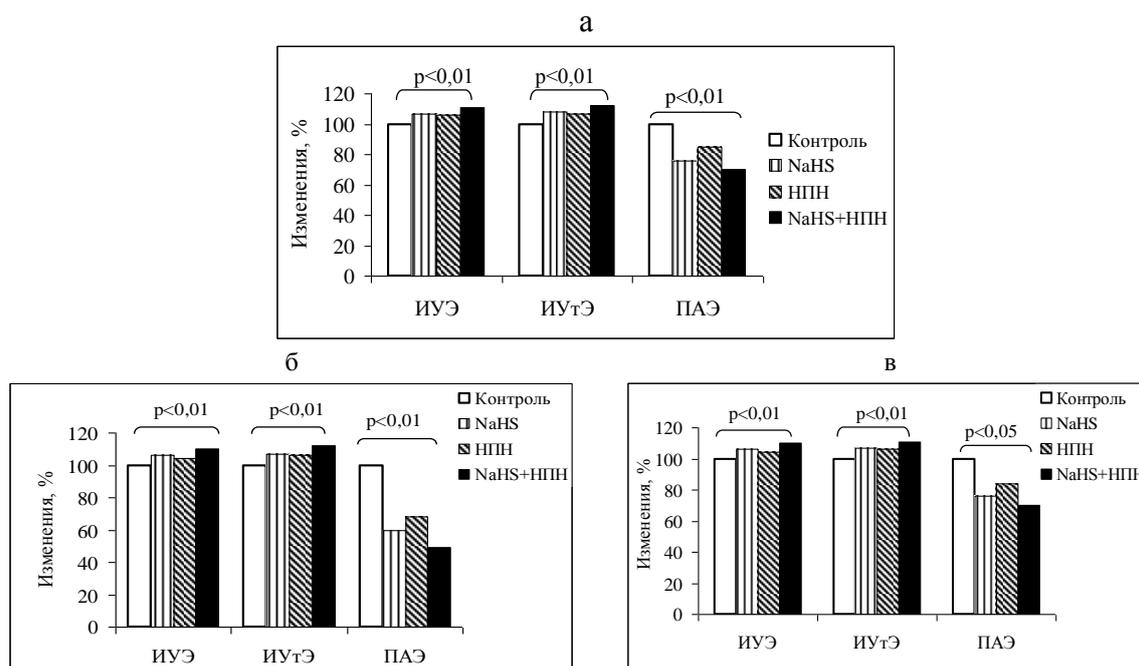


Рисунок 4 – Изменение микрореологических характеристик под влиянием инкубации эритроцитов и их восстановленных теней с NaHS, с НПН, а также при их совместном применении (NaHS+НПН) в группе 1 (а), в группе 2 (б), в группе 3 (в).

*Обозначения:* ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов; ИУтЭ – индекс удлинения теней эритроцитов; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов; «Контроль» – здесь это проба суспензии эритроцитов без добавления биологически активных соединений.

В группах 2 и 3 также наблюдали снижение АЭ (Рис. 4б и 4в). Оно было более выраженным, чем в группе 1 (Рис. 4 а) и достигало от 15 до 51% ( $p < 0,01$ ). При этом снижение этой микрореологической характеристики у лиц с АГ и ИзбМТ привело к ее практической нормализации. В этом случае средняя величина АЭ лиц групп 2 и 3 составила  $8,44 \pm 2,01$  отн. ед. и  $7,48 \pm 1,64$  отн. ед. и статистически достоверно не отличалась от показателя группы 1 ( $8,05 \pm 0,92$  отн. ед.). Следует также обратить внимание на то, что совместное действие двух доноров на ДЭ и АЭ сопровождалось более выраженным эффектом, чем их отдельное действие.

Были исследованы микрореологические ответы эритроцитов и их восстановленных теней при инкубации L-аргинином (L-А) и L-цистеином (L-Ц). (Рис. 5а и 5б). Во всех трех группах наблюдали типичные изменения МСЭ: повышение ИУЭ на 8-9% ( $p < 0,01$ ) под влиянием отдельно L-А, и на 11-14% ( $p < 0,01$ ) при сочетании NaHS и L-А (Рис. 5а).

Примерно также отвечали восстановленные тени эритроцитов на действие данных соединений: ИУтЭ повышался на 10% под влиянием NaHS, на 8% – в ответ на L-A и на 13% ( $p<0,01$ ) при их совместном воздействии на клетки.

Что касается АЭ, в этих условиях, то NaHS снижал ее на 24% ( $p<0,05$ ), L-A – на 22% ( $p<0,05$ ). Совместное применение этих двух соединений (NaHS+L-A) уменьшало ПАЭ сразу на 44% ( $p<0,01$ , Рис. 5а).

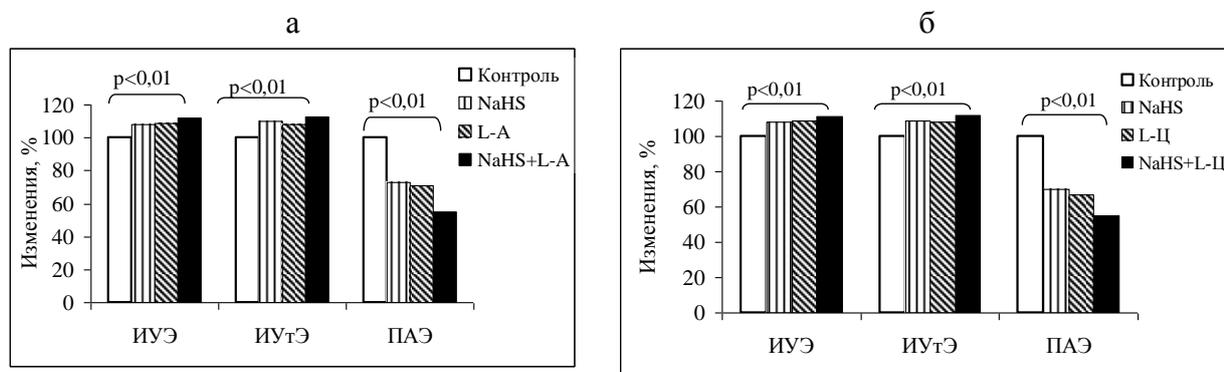


Рисунок 5 – (а) Изменение микрореологических характеристик под влиянием инкубации эритроцитов и их восстановленных теней с донором  $H_2S$  (NaHS), стимулятором NOS L-аргинином (L-A) и их сочетанием (NaHS+L-A) в группе 1; (б) Изменение ДЭ и их восстановленных теней под влиянием донора  $H_2S$  (NaHS), L - цистеина (L-Ц) и их сочетания (NaHS+L-Ц) (средние данные группы 1).

Обозначения: ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов; ИУтЭ – индекс удлинения теней эритроцитов; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов.

Обобщенные сравнительные данные по микрореологическим ответам эффектам L-аргинина и NaHS сгруппированы в Табл. 2.

Таблица 2. Микрореологические ответы эритроцитов и их восстановленных теней у лиц групп 2 ( $n=40$ ) и 3 ( $n=38$ ) при инкубации клеток с NaHS, L-аргинином (L-A) и при их совместном применении (NaHS+L-A) ( $M\pm\sigma$ )

| Показатели     | Группы | Контроль#  | NaHS        | L-A         | NaHS+ L-A  |
|----------------|--------|------------|-------------|-------------|------------|
| ИУЭ, отн. ед.  | 2      | 1,87±0,05  | 2,00±0,07** | 2,03±0,05** | 2,07±0,06* |
|                | 3      | 1,86±0,05  | 1,97±0,04** | 1,99±0,05** | 2,06±0,04* |
| ИУтЭ, отн. ед. | 2      | 1,74±0,05  | 1,89±0,06*  | 1,94±0,07** | 1,98±0,06* |
|                | 3      | 1,79±0,04  | 1,93±0,05*  | 1,92±0,07** | 2,01±0,04* |
| ПАЭ, отн. ед.  | 2      | 11,08±2,60 | 7,72±1,44*  | 7,20±1,38*  | 5,96±1,34* |
|                | 3      | 13,84±2,08 | 8,44±2,01*  | 9,05±1,58*  | 7,08±1,64* |

Примечания: группа 2 – лица с АГ; группа 3 -лица с ИзбМТ; ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов, как показатель ДЭ; ИУтЭ – индекс удлинения теней эритроцитов; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов; \*различия с контролем достоверны при  $p<0,05$ ; \*\* при  $p<0,01$ ; #«Контроль» – здесь это проба суспензии эритроцитов без добавления биологически активных соединений.

Как было показано выше, доноры ГТ НПП и NaHS не просто повышают ДЭ и снижают АЭ, но и эффективно восстанавливают (кондиционируют) МСЭ, что обеспечивает более эффективную микрососудистую перфузию тканей (Kobayashi et al., 2022). Таким же эффектом обладает и субстрат синтеза NO, стимулятор активности NOS, L-аргинин (Bor-Kucukatay et al., 2003).

Так у лиц группы 2, ИУЭ возрстал, под влиянием L-A до  $2,03 \pm 0,05$  отн. ед., что сопоставимо с величиной этой характеристики у лиц группы 1 ( $2,02 \pm 0,05$  отн. ед.), а ПАЭ снизился до  $7,20 \pm 1,38$  отн. ед., что даже меньше данных контрольной группы здоровых лиц ( $8,05 \pm 0,92$  отн. ед.). Что касается данных микрореологии эритроцитов лиц группы 3, то под влиянием L-A они тоже положительно изменились и статистически достоверно не отличались от средних данных группы 1.

После инкубации клеток с L-цистеином наблюдали достоверное увеличение ИУЭ у интактных эритроцитов, как у здоровых лиц, так и в группах 2 и 3, разница составила 6-9% ( $p < 0,05$ ). Было показано, что L-цистеин эффективно повышает ДЭ и достоверно снижает АЭ. При инкубации эритроцитов с L-Ц, их ДЭ увеличилась на 6% ( $p < 0,01$ ), а при добавлении к этому NaHS прирост ДЭ составил 11%, что достоверно больше, чем действие этих соединений по отдельности (Табл. 3). Восстановленные тени эритроцитов демонстрировали такой же характер изменений их индекса удлинения, хотя ответы были несколько более выраженными (Табл. 3). Типичным было и изменение АЭ. Она снижалась как на NaHS, так и в ответ на L-Ц, а при совместном действии двух соединений (NaHS+L-Ц) уменьшение АЭ превысило 46% ( $p < 0,01$ ).

Таблица 3. Микрореологические ответы эритроцитов и их восстановленных теней у лиц групп 2 (n=40) и 3 (n=38) при инкубации клеток с NaHS, L-цистеином (L-Ц) и при их совместном применении (NaHS+L-Ц) (M±σ)

| Показатели     | Группы | Контроль#        | NaHS                 | L-Ц                  | NaHS+ L-Ц            |
|----------------|--------|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| ИУЭ, отн. ед.  | 2      | $1,85 \pm 0,05$  | $2,00 \pm 0,06^{**}$ | $2,02 \pm 0,04^{**}$ | $2,10 \pm 0,07^{**}$ |
|                | 3      | $1,84 \pm 0,04$  | $1,97 \pm 0,05^{**}$ | $1,99 \pm 0,03^{**}$ | $2,04 \pm 0,06^{**}$ |
| ИУтЭ, отн. ед. | 2      | $1,74 \pm 0,04$  | $1,89 \pm 0,05^*$    | $1,91 \pm 0,04^{**}$ | $1,97 \pm 0,05^{**}$ |
|                | 3      | $1,75 \pm 0,05$  | $1,86 \pm 0,05^*$    | $1,89 \pm 0,04^{**}$ | $1,93 \pm 0,05^{**}$ |
| ПАЭ, отн. ед.  | 2      | $10,94 \pm 1,24$ | $7,52 \pm 1,36^*$    | $7,33 \pm 1,32^{**}$ | $5,24 \pm 0,82^{**}$ |
|                | 3      | $11,18 \pm 1,32$ | $7,74 \pm 1,48^*$    | $7,79 \pm 1,52^*$    | $7,16 \pm 0,94^{**}$ |

*Примечания:* группа 2 – лица с АГ; группа 3 -лица с ИзбМТ; ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов, как показатель ДЭ; ИУтЭ – индекс удлинения теней эритроцитов; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов; \*различия с контролем достоверны при  $p < 0,05$ ; \*\* при  $p < 0,01$ ; #«Контроль» – здесь это проба суспензии эритроцитов без добавления биологически активных соединений.

У лиц группы 3 изменение ДЭ эритроцитов и их теней под влиянием L-Ц было практически таким же, как в группе 2. Различия составили 8-9%. При этом прирост ДЭ и снижение АЭ (33%) были статистически достоверными (Табл. 3).

Сравнительный анализ полученных изменений МСЭ показал, что L-Ц полностью восстанавливает ДЭ и АЭ в группах 2 и 3 до уровня средних значений группы 1, а при добавлении в среду инкубации донора  $H_2S$  наблюдали еще больший прирост ДЭ (11-14%,  $p < 0,01$ ) и снижение АЭ (36-51%,  $p < 0,05$ , Табл. 3).

Таким образом, доноры ГТ НПП и NaHS, а также субстраты их синтеза L-A и L-Ц, положительно влияют на МСЭ. Это заставляет думать о том, что существенный вклад в

общую ДЭ вносят мембраны клеток, о чем свидетельствуют данные ряда авторов (Baskurt, Meiselman, 2003; Starzyk et al., 2013; Kobayashi et al., 2022; Cilek et al., 2024). Они статистически достоверно повышали ДЭ, снижали АЭ как у здоровых лиц, так и у пациентов с АГ и ИзбМТ. Эффект был более выраженным при совместном применении указанных выше соединений. Последнее может свидетельствовать об их кросс-общении (Wu et al., 2018; Montanaro et al., 2023). Совместное действие двух ГТ на увеличение и поддержание внутриклеточного цГМФ имеет важное значение для активации PKG, фосфорилирования  $\alpha$ - и  $\beta$ -спектринов мембран эритроцитов и повышения их деформируемости в целом (Coletta et al., 2012; Grau et al., 2016).

*Механизмы и сигнальные молекулярные пути, ассоциированные с изменениями микрореологических характеристик эритроцитов под действием доноров газотрансмиттеров*

Анализ литературных данных о механизмах сигнальной передачи с участием молекул ГТ показал, что в эритроцитах, вероятно, имеется несколько молекулярных сигнальных путей, ассоциированных с изменениями МСЭ. Так, например, р-ГЦ считается внутриклеточным рецептором для NO и соединений, высвобождающих этот ГТ, в сигнальных путях клеток системы кровообращения (Wobst et al., 2015).

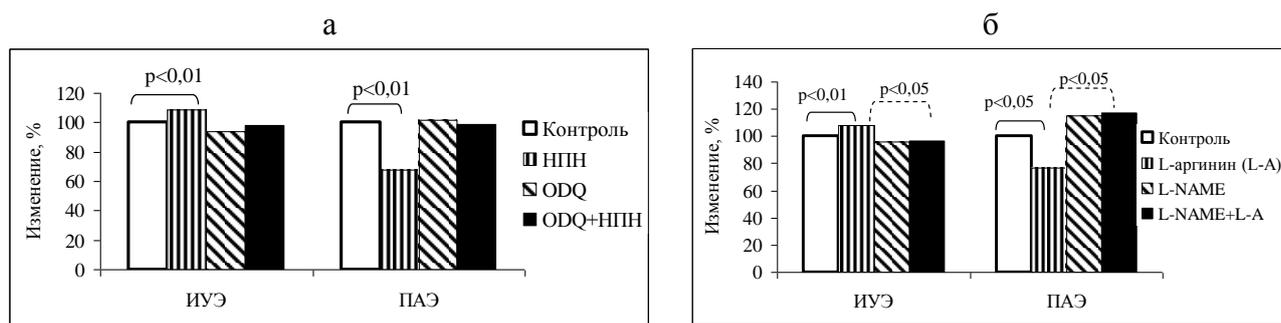


Рисунок 6 – Изменение деформируемости эритроцитов и их агрегации после инкубации с нитропруссидом натрия, ODQ и их сочетанием (ODQ+НПН) у здоровых лиц (а); Изменение деформируемости эритроцитов и их агрегации под влиянием L-аргинина (L-A) и при ингибировании активности NOS с помощью L-NAME у здоровых лиц (б).  
Обозначения: ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов.

Основными элементами данного пути являются: eNOS, NO, р-ГЦ, цГМФ, PKG (Miraglia et al., 2011; Kuck et al., 2019). Ингибирование ключевых элементов NO-сигнального каскада, например, NOS с помощью L-NAME (Рис. 6 б) или р-ГЦ с помощью ODQ (Рис. 6 а), привело к устранению положительного микрореологического эффекта, который до этого проявлялся при стимулировании синтеза NO, L-аргинином или НПН.

Метиленовый синий (МТС), как ингибитор активности циклического ГМФ (Yam et al., 2018), минимизировал эффект НПН, оказываемый на ДЭ (Рис. 7). Предварительная инкубация клеток с МТС не препятствовала статистически значимому приросту ДЭ при введении в среду донор NO. Что касается АЭ, то прединкубация клеток с МТС заметно уменьшала эффект нитропруссид натрия, однако изменения ПАЭ не были статистически достоверными (Рис. 7).

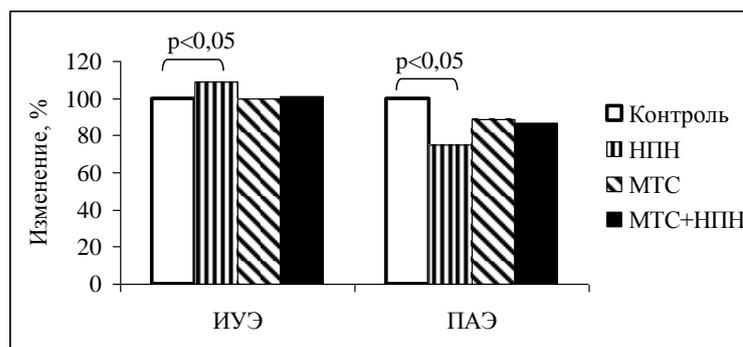


Рисунок 7 - Изменение деформируемости и агрегации эритроцитов после их инкубации с НПН, метиленовым синим (МТС) и их сочетанием (МТС+НПН) в группе контроля  
 Обозначения: ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов.

Имеются данные, свидетельствующие о том, что сульфид водорода может активировать р-ГЦ и цГМФ как один из элементов сигнального пути (King et al., 2014). Результаты нашего исследования показали, что ингибитор активности цГМФ, МТС, как и в опытах с НПН умеренно снизил ДЭ. Важно, что на фоне действия МТС, NaHS почти не оказал влияния на величину этой микрореологической характеристики (Рис.8). Вместе с тем АЭ хотя и снизилась под влиянием NaHS на фоне прединкубации клеток с МТС, однако это изменение не было статистически достоверным.

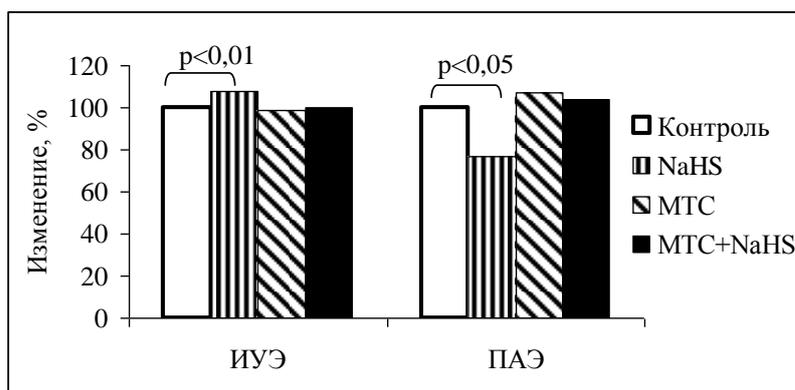


Рисунок 8 – Изменение деформируемости и агрегации эритроцитов после их инкубации с гидросульфидом натрия (NaHS), метиленовым синим (МТС) и их комбинацией (МТС+NaHS) в группе контроля.

Обозначения: ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов.

Эти данные свидетельствуют о том, что  $H_2S$  может использовать NO-опосредованный сигнальный каскад для позитивных изменений МСЭ.

#### *Роль ионных каналов эритроцитов как молекулярных мишеней для газотрансмиттеров*

В качестве молекулярной клеточной мишени для  $H_2S$  в основном рассматривают АТР-зависимые калиевые каналы ( $K_{АТР}$ ) (Yam et al., 2018). Для проверки данной гипотезы проводили блокирование этих каналов глибенкламидом (ГлК). Действие NaHS приводило к увеличению ДЭ на 11% ( $p < 0,01$ ) и снижению АЭ на 30% ( $p < 0,05$ ). При этом эффект не устранялся блокированием  $K_{АТР}$ -каналов (Рис. 9).

Следовательно,  $K_{ATP}$  каналы мембран эритроцитов не являются молекулярной клеточной мишенью для сульфида водорода. Можно полагать, что зрелые эритроциты сохранили всего лишь реликты катионных каналов этого типа (Petkova-Kirova et al., 2024).

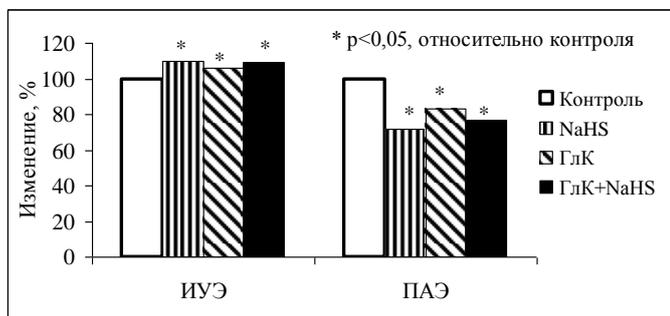


Рисунок 9 – Изменение деформируемости эритроцитов и их агрегации после их инкубации с NaHS, глибенкламидом (ГЛК) и их сочетанием (NaHS+ГЛК) у здоровых лиц.

Обозначение: ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов.

В естественных условиях кровотока эритроциты испытывают сразу комплекс стимулирующих воздействий, включая механические (Nagarajan et al., 2016). Имеются предположения, что какие-то воздействия могут оказывать влияние на внутриклеточную сигнализацию, ассоциированную с ГТ. Так механическое воздействие на мембрану эритроцитов активирует Piezo1 каналы, и инициирует вход ионов  $Ca^{2+}$  внутрь клетки (Ugurel et al., 2020; Rogers, Lew, 2021).  $Ca^{2+}$  стимулирует eNOS и активирует весь NO-ассоциированный сигнальный каскад (Cilek et al., 2024). Полагают, что  $Ca^{2+}$  может воздействовать на Гардош-каналы эритроцитов (Kaestner et al., 2020). Это приводит к выходу ионов  $K^+$  и воды из клетки, изменению ее объема и облегчению ее транзита через обменные капилляры. В наших опытах блокирование Гардош-каналов с помощью клотримазола привело к небольшому снижению ДЭ, на 2% ( $p < 0,05$ ). Тогда как NaHS повышал ИУЭ, на 8% ( $p < 0,01$ ). Однако прединкубация с клотримазолом устраняла эффект прироста ДЭ под влиянием NaHS (Рис. 10).

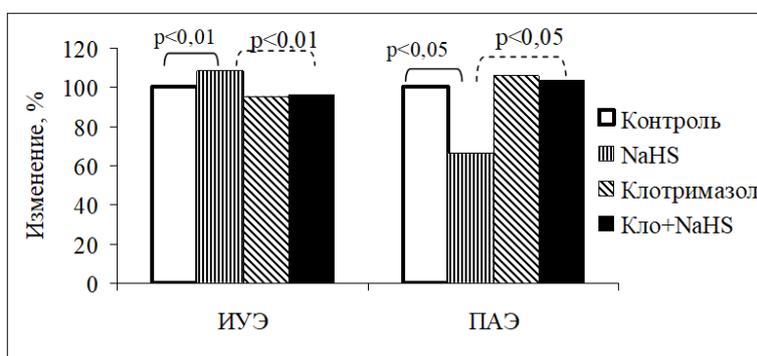


Рисунок 10 – Изменение деформируемости и агрегации эритроцитов после их инкубации с гидросульфидом натрия (NaHS), клотримазолом (Кло) и при их совместном применении («Кло+NaHS»)

Обозначения: ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов.

В ответ на донор  $H_2S$  наблюдали достоверное снижение АЭ на 43%, ( $p < 0,01$ ), тогда как при преинкубации эритроцитов с клотримазолом, снижение ПАЭ практически отсутствовало. Прирост ПАЭ на 4% был статистически недостоверным (Рис.10).

*Влияние НПН и NaHS на микрореологические свойства эритроцитов на фоне стимулирования альфа-1-адренорецепторов фенилэфрином: модель симпатоактивации*

Известно, что у больных АГ повышена активность симпатoadреналовой системы (Simon et al., 2001). Эффекты этой активации передаются через  $\alpha$ -1AR, которые представлены на мембранах эритроцитов (Sundquist et al., 1992). Следовательно, их стимулирование с помощью фенилэфрина (ФЭ) - агониста этих рецепторов может создать модель симпатоактивации эритроцитов. При инкубации эритроцитов с ФЭ наблюдалось небольшое снижение ДЭ с  $2,01 \pm 0,04$  до  $1,93 \pm 0,03$  отн. ед., на 4% ( $p < 0,05$ ). Тогда как на фоне действия ФЭ, добавление в среду инкубации НПН или NaHS приводило к достоверному приросту ДЭ (Рис. 11). Следовательно, предварительная обработка эритроцитов фенилэфрином не устраняла повышающего деформируемость эффекта обоих доноров ГТ. С другой стороны, ФЭ повышал АЭ на 45% ( $p < 0,05$ ) с  $10,20 \pm 1,14$  до  $10,78 \pm 2,12$  отн. ед. Однако, преинкубация эритроцитов с данным соединением не препятствовала снижению агрегации под действием НПН, который добавляли в суспензию клеток (Рис. 11б). При этом уменьшение АЭ составило 26 и 33% ( $p < 0,01$ ) под влиянием НПН и NaHS, соответственно (Рис. 11б).

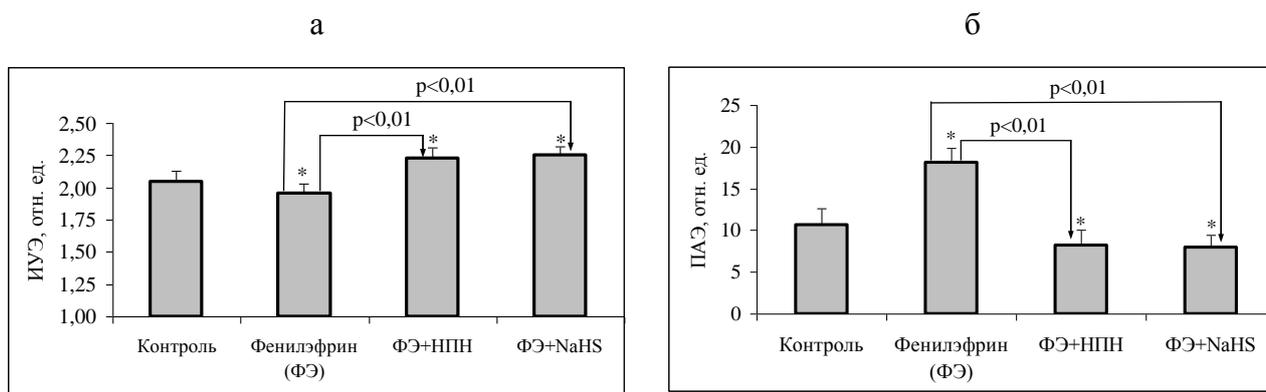


Рисунок 11 – Изменение деформируемости эритроцитов (а) и их агрегации (б) под влиянием НПН, NaHS, в условиях стимулирования альфа-1-адренорецепторов эритроцитов фенилэфрином (ФЭ, 10 мкМ).

Обозначения: \*  $p < 0,01$ , относительно данных группы «контроль»; ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов.

Таким образом, на модели стимуляции альфа-1- адренорецепторов их агонистом, ФЭ микрореологические ответы эритроцитов свидетельствовали о небольшом, но достоверном снижении ДЭ и выраженном приросте их агрегации. Вместе с тем доноры NO и  $H_2S$  практически полностью устраняли этот эффект агониста альфа-1-адренорецепторной стимуляции эритроцитов, тем самым проявляя эффект посткондиционирования микрореологии клеток (Kuck et al., 2019).

### **Заключение**

Данное исследование показывает, что негативно измененные характеристики гемореологического профиля при АГ и ИзбМТ увеличивают неньютоновость крови и приводят к снижению ее транспортного потенциала. Способность эритроцитов реагировать на молекулярные стимулы, в том числе на молекулы ГТ может рассматриваться как инструмент восстановления негативно измененных свойств клеток. Об этом свидетельствуют факты, указывающие на умеренное, статистически достоверное положительное влияние доноров NO и H<sub>2</sub>S и субстратов их синтеза на ДЭ, АЭ и их восстановленных теней. Получены данные, подтверждающие взаимодействие (кросс-общение) NO и H<sub>2</sub>S при реализации их сигнальных путей. Вместе с тем в проведенном исследовании сделана попытка изучить вероятные внутриклеточные сигнальные механизмы, связанные с изменениями микрореологии эритроцитов, ассоциированные с ГТ. Проведены серии опытов, определяющие значение основных элементов гуанилатциклазной системы и выяснение роли ионных каналов (K<sub>ATP</sub>, Гардош-каналов) при реализации NO- и H<sub>2</sub>S-сигнальных путей.

### **Выводы**

1. Методами корреляционного анализа было показано, что у здоровых лиц макрореологические (вязкость плазмы и гематокрит) и микрореологические (деформируемость и агрегация эритроцитов) характеристики, оказывают сходный по величине вклад в текучесть цельной крови. При этом транспортный потенциал крови существенно больше зависит от ее текучести (на 63%), чем от концентрации эритроцитов (Hct, на 10%).
2. Доноры газотрансмиттеров (NO и H<sub>2</sub>S), такие как нитропруссид натрия и гидросульфид водорода, а также субстраты их синтеза L-аргинин и L-цистеин, положительно влияют на микрореологические свойства эритроцитов и на их восстановленные тени. Они статистически достоверно повышают деформируемость на 5-10% и снижают агрегацию эритроцитов более чем на 30%. На модели микрореологических ответов эритроцитов было выявлено, что два донора ГТ при их совместном действии проявляли достоверно больший положительный эффект. Кроме того, на моделях симпативации, с помощью фенилэфрина, было найдено, что негативные изменения их микрореологических характеристик практически полностью восстанавливаются под влиянием доноров газотрансмиттеров и L-аргинина и L-цистеина.
3. У лиц с повышенным АД выявлено увеличение ВК за счет прироста ВП, АЭ и снижения их деформируемости. Это сочеталось с существенным повышением степени неньютоновости крови и уменьшением ее транспортного потенциала. Корреляционный анализ показал достоверную отрицательную связь деформируемости эритроцитов с показателем неньютоновости крови и положительную с индексом эффективности транспорта кислорода кровью. Установленное у лиц с повышенным АД снижение деформируемости эритроцитов и существенное влияние этой микрореологической характеристики на текучесть крови, успешно корректировалось с помощью доноров ГТ и субстратов их синтеза.
4. У лиц с ИзбМТ, также как в группе лиц с артериальной гипертонией, установлено повышение ВК за счет прироста ВП, агрегации эритроцитов и снижение их деформируемости. Это сочеталось с существенным повышением степени неньютоновости крови и уменьшением ее транспортного потенциала. Корреляционный анализ показал

достоверную отрицательную связь деформируемости эритроцитов с показателем неньютоновости крови и положительную, с индексом эффективности транспорта кислорода кровью. С помощью доноров ГТ и субстратов их синтеза негативные изменения микрореологических характеристик эритроцитов были успешно скорректированы до показателей здоровых лиц.

5. Опыты с ингибированием р-ГЦ и NOS показали, что положительные микрореологические ответы на оксид азота и L-аргинин в основном связаны с активацией гуанилатциклазного сигнального каскада. Что касается сероводорода, то в эритроцитах этот ГТ может использовать, для своих микрореологических эффектов, как ГЦ - цГМФ сигнальный путь, так и кальций-зависимые калиевые каналы (Гардош-каналы).

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Статьи, входящие в перечень международной базы цитирования Scopus и Web of Science:**

1. **Volkova E.L.**, Mykhailov P.V., Muravyov A.V., Tikhomirova I.A., Osetrov I.A. The relationship between the non-Newtonian properties of blood, its fluidity and transport potential in patients with arterial hypertension // Series on Biomechanics. - 2023 - Vol. 37. - №3. - P.11-18 - DOI: 10.7546/SB.02.03.2023. (Скопус).
2. **Volkova E.**, Zamyshlyayev A., Tikhomirova A.I., Kolobanov A., Gerasenkov V., Muravyov A., Antonova N., Velcheva I. The contribution of red blood cell microrheological characteristics to impaired blood fluidity in peripheral arterial occlusive disease (PAOD) and their correction with gasotransmitters // Series on Biomechanics. - 2024. - Vol.38.- №2. - P. 3. - DOI: 10.7546/SB.01.02.2024 0 (Скопус).
3. **Volkova E.**, Muravyov A., Tikhomirova I., Priezzhev A., Mikhailov P. Microrheological responses of red blood cells to hydrogen sulfide in normotensive and hypertensive individuals: analysis of intracellular signaling pathways // Journal of Cellular Biotechnology. – 2025. - DOI:10.1177/23523689251386234 - ID CEB-25-0034/ (Скопус).

**Статьи, входящие в перечень научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК:**

1. **Волкова Е.Л.**, Муравьев А.В., Тихомирова И.А., Чепоров С.В., Кислов Н.В., Маймистова А.А., Круглова Е.В. Анализ изменений деформируемости эритроцитов в норме и при патологии // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. - 2008. - Т. 7. № 4 (28). - С. 47-52.
2. Муравьев А.В., Осетров И.А., Тихомирова И.А., Михайлов П.В., Замышляев А.В., **Волкова Е.Л.** Оценка расчетного способа определения вязкости крови: корреляция с ее измеренной величиной // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2025. - № 1. – С. 91-97.

**Статьи в других профессиональных журналах:**

1. **Волкова Е.Л.**, Маймистова А.А., Муравьев А.В., Булаева С.В. Сравнительный анализ изменений гемореологического профиля мужчин и женщин с нарушениями церебрального кровообращения // Ярославский педагогический вестник. - 2010 - №4- Том III (Естественные науки). - С. 67-72.
2. Михайлов П.В., Замышляев А.В., Волкова Е.Л., Кузнецова Е.А. Постокклюзионная реактивная гиперемия у лиц, перенесших COVID-19 // Смоленский медицинский альманах. Смоленск. – 2024. - № 4. – С. 104-106.

**Тезисы докладов научных конференциях и другие научные публикации:**

1. **Волкова Е.Л.**, Маймистова А.А., Тихомирова И.А., Муравьев А.В., Булаева С.В., Викторова Е.А., Кислов Н.В. Сравнительный анализ роли  $Ca^{2+}$  и циклического АМФ в изменениях деформируемости эритроцитов // Материалы VI Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы функционирования висцеральных систем». — СПб., 2008. — С. 122–123. Волкова Е.Л. Анализ роли гематокрита в изменении текучести крови и ее транспортногшо потенциала / Е.А. Викторова, **Е.Л. Волкова**, Е.В. Круглова, А.В. Муравьев // Материалы IV Всероссийской с международным участием школы-конференции по физиологии кровообращения. – М. – 2008. - С. 20-21.
2. **Волкова Е.Л.**, Кислов Н.В., Чепоров С.В., Муравьев А.В. Оценка гемореологических изменений в клинической практике // Материалы IV Всероссийской конференции (с международным участием) «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии». — М., 2009. — С. 205–206
3. **Волкова Е.Л.**, Маймистова А.А., Замышляев А.В., Булаева С.В., Комлев В.Л. Деформируемость эритроцитов и её взаимосвязь с агрегацией // Материалы III Евразийского конгресса по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика». — М., 2010. — Т. 1. — С. 290–291.
4. **Волкова Е.Л.**, Левин В.Н., Кислов Н.В., Чепоров С.В. Роль кальция в изменениях микрореологических свойств эритроцитов в норме и при патологии // Материалы международной конференции «Системное кровообращение, микроциркуляция и гемореология». — Ярославль, 2011. — С. 5.
5. **Волкова Е.Л.**, Муравьев А.В., Кислов Н.В., Комлев В.Л. Сравнительный анализ эффективности разных сигнальных каскадов на модели микрореологических ответов эритроцитов // Материалы Международного симпозиума Роль микрореологии и микроциркуляции при разных вариантах обеспечения организма кислородом: / под науч. ред. А.В. Муравьева. - Ярославль: РИО ЯГПУ; В.В. Зинчука - Гродно. - 2021. - С.75-82. ISBN 978-5-00089-467-5.
6. Булаева С.В., **Волкова Е.Л.**, Михайлов П.В. Исследование механизмов влияния газотрансмиттеров на микрореологию эритроцитов и тромбоцитов // Материалы международного симпозиума Роль микрореологии и микроциркуляции при разных вариантах обеспечения организма кислородом: / под науч. ред. А.В. Муравьева. – Ярославль: РИО ЯГПУ; В.В. Зинчука – Гродно. - 2021. – С. 153-158. ISBN 978-5-00089-467-5.
7. Муравьев А.В., Тихомирова И.А., Петроченко Е.П., Булаева С.В., Замышляев А.В., **Волкова Е.Л.** Коррекция микрореологических характеристик эритроцитов донорами газотрансмиттеров // Материалы Международного интернет-симпозиума Микроциркуляция, реология крови и кислородный гомеостаз: под науч. ред. А.В. Муравьева. – Ярославль: РИО ЯГПУ; В.В. Зинчука – Гродно. - 2022. – С. 137. ISBN 978-5-00089-540-5.
8. Михайлов П.В., Остроумов Р.С., Кузнецова Е.А., **Волкова Е.Л.**, Булаева С.В., Муравьев А.В. Роль микрореологии эритроцитов в микроциркуляции // Материалы Международного интернет-симпозиума Микроциркуляция, реология крови и кислородный гомеостаз: под науч. ред. А.В. Муравьева. – Ярославль: РИО ЯГПУ; В.В. Зинчука - Гродно. - 2022. – С.130. ISBN 978-5-00089-540-5.
9. Муравьев А.В., Зинчук В.В., Михайлов П.В., Остроумов Р.С., Тихомирова И.А., Петроченко Е.П., **Волкова Е.Л.** Влияние газотрансмиттеров на микрореологию эритроцитов

и кислородтранспортный потенциал крови // Материалы Республиканской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 85-летию со дня рождения профессора Борисюка М.В.: - Гродно.- 2022.- С. 179-181.

10. **Волкова Е.Л.**, Муравьев А.А., Михайлов П.В., Приезжев А.В., Муравьев А.В. Анализ сигнальных механизмов, связанных с изменениями микрореологических свойств эритроцитов // Современные Проблемы системной регуляции физиологических функций: сборник материалов VI междисциплинарной конференции с международным участием – Москва. - 2022. – С.127.

11. Муравьев А.В., Тихомирова И.А., Петроченко Е.П., Булаева С.В., **Волкова Е.Л.**, Замышляев А.В. Коррекция микрореологических характеристик эритроцитов донорами газотрансмиттеров // Микроциркуляция, реология крови и кислородный гомеостаз. Сборник материалов Международного симпозиума в рамках ежегодной научно-практической конференции "Чтения Ушинского". Под научной редакцией А.В. Муравьева, В.В. Зинчука. Ярославль. - 2022.- С. 137-142.

12. **Волкова Е.Л.** Влияние фенилэфрина и газотрансмиттеров на микрореологические свойства эритроцитов // Микроциркуляция и гемореология. Материалы XIV Международной научной конференции по микроциркуляции и гемореологии. Ярославль, -2023.- С. 14.

13. **Волкова Е.Л.**, Приезжев А.В., Луговцов А.Е., Тихомирова И.А., Муравьев А.В. Течение крови как неньютоновской жидкости: влияние микрореологических характеристик эритроцитов // Сборник материалов Российского форума по тромбозу и гемостазу. - Москва. - 2024.

14. Муравьев А.В., Тихомирова И.А., **Волкова Е.Л.**, Замышляев А.В., Приезжев А.В., Луговцов А.Е. Транспортный потенциал крови при восстановлении деформируемости эритроцитов с помощью газотрансмиттеров у больных артериальной гипертензией и сахарным диабетом // Сборник материалов Республиканской научно-практической конференции с международным участием «Кислород и свободные радикалы». Гродно. – 2024. – С. 89-92.

15. **Волкова Е.Л.** Роль газовых медиаторов как сигнальных молекул в механизмах микрореологической адаптации эритроцитов в норме и при патологии // Сборник материалов VIII Всероссийской школы-конференции, посвящённой 270-летию Московского университета. Физиология и патология кровообращения. Москва. – 2025. – С. 42.

16. **Волкова Е.Л.** Влияние сероводорода на изменение микрореологического поведения эритроцитов в норме и при патологии: вероятные сигнальные пути // Сборник Материалов XV Международной научной конференции по микроциркуляции и гемореологии. Ярославль, – 2025. – С. 22.