

ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ФИЗИОЛОГИИ
И ПАТОЛОГИИ ДЫХАНИЯ

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ
В ЭРИТРОИДНЫХ ЭЛЕМЕНТАХ В НОРМЕ
И ПРИ ПАТОЛОГИИ**

**Михаил Тимофеевич Луценко
Ирина Анатольевна Андриевская**

Благовещенск
2015

THE FAR EASTERN SCIENTIFIC CENTER OF PHYSIOLOGY
AND PATHOLOGY OF RESPIRATION

**MORPHOFUNCTIONAL CHANGES IN
ERYTHROID ELEMENTS IN NORM
AND PATHOLOGY**

**MICHAEL LUCENKO
IRINA ANDRIEVSKAYA**

Blagoveshchensk
2015

ББК 57.16

УДК 618

Л87

ISBN 978-5-905864-08-7

Луценко М.Т., Андриевская И.А. Морфофункциональные изменения в эритроидных элементах в норме и при патологии. – Благовещенск, 2015. – 144 с. Ил. 65, табл. 17, библи. 230.

Монография посвящена истории изучения формирования клеточных элементов эритроидного ряда: ангиобластический период, печеночное кроветворение и костномозговой период эритропоэза. Подробно рассматривается строение эритроцита: белковый и фосфолипидный состав клеточной мембраны, изменение морфофункционального характера клеточной мембраны эритроцита при воздействии внешних факторов: микровязкость, строение белково-липидных комплексов, процессы перекисного окисления в мембранах. Подробно изучены этапы пентозного цикла в эритроцитах и разработаны методы, позволяющие гистохимически изучать содержание глутатиона и гистидина, оказывающих большое влияние на процессы оксигенации гемоглобина. Отдельным разделом в книге излагается морфофункциональная характеристика эритроцитов при общем охлаждении организма и при обострении герпесной инфекции в период беременности, что позволяет оценить механизм формирования гипоксии плода при обострении этой инфекции.

Для акушеров-гинекологов, неонатологов, педиатров и врачей других специальностей.

Рецензенты: Перельман Ю.М., профессор, д.м.н.

Быстрицкая Т.С., профессор, д.м.н.

Утверждено к печати решением Ученого совета Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» (№2 от 02.04.2015 г.)

© Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания, 2015

© Луценко М.Т., Андриевская И.А., 2015

© Int. Med. Res. and Development Corp., New York, 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений	4
ВВЕДЕНИЕ	5
РАЗДЕЛ I	
Глава 1. История формирования взглядов на кроветворение у млекопитающих	6
Глава 2. Печеночный период кроветворения	18
Глава 3. Костномозговое кроветворение	23
3.1. Морфологическая характеристика клеток эритро- кариоцитарного ряда красного костного мозга интактных кроликов	30
3.2. Механизм созревания нормобластов	33
3.3. Ретикулоциты	36
3.4. Эритропоэтин	42
3.5. Эритрон	43
3.6. Гемоглобин	50
3.7. Взаимодействие гемоглобина с CO ₂	57
3.8. Нарушение функции гемоглобина	59
3.9. Метгемоглобин	62
Глава 4. Биохимия эритроцитов	65
4.1. Реакция глутатиона	67
4.2. Обменные процессы в эритроцитах	69
4.3. Обмен липидов в эритроцитах	71
4.4. Гликолипиды мембран эритроцитов	76
4.5. Измененные формы эритроцитов	80
4.6. Регуляция эритропоэза	87
РАЗДЕЛ II	
Глава 1. Морфофункциональная характеристика эритроцита при различных на него воздействиях	92
Глава 2. Кислородсвязывающие свойства крови при наруше- нии структурно-функционального состояния и мета- болического статуса эритроцитов крови рожениц с герпес-вирусной инфекцией	108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	128
Литература	131

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

СК	- стволовые клетки
КОЕ _к	- колониеобразующая единица культуры
КОФ	- колониестимулирующий фактор
2,3-ДФГ	- 2,3-дифосфоглицериновая кислота
АТФ	- аденозинтрифосфат
НбF	- гемоглобин фетальный
НбA	- гемоглобин взрослых
НАД	- дифосфопиридиннуклеотид
НАДФ	- никотинамидадениндинуклеотидфосфат
АМФ	- аденозинмонофосфат
АДФ	- аденозиндифосфат
IFN γ	- γ -интерферон
TNF α	- опухоленекротический фактор
IL-6	- интерлейкин-6
ВПГ-1	- вирус простого герпеса-1
МДА	- малоновый диальдегид
ТБК	- тиобарбиуровая кислота
АФК	- активные формы кислорода
NF-KB	- ядерный фактор транскрипции
ПОЛ	- перекисное окисление липидов
АОА	- антиоксидантная активность

ВВЕДЕНИЕ

Эритроциты периферической крови являются одним из ведущих элементов животного организма. Несмотря на отсутствие в этих элементах ядра, они выполняют ряд весьма необходимых функциональных отправлений в жизнедеятельности периферической крови. Отмечено, что эритроциты тесно связаны с функциональной деятельностью иммунной системы и снабжены мощным рецепторным аппаратом - белком гликофорином. В силу этих обстоятельств антигенная система вступает во взаимодействие, как с белками мембран эритроцитов, так и может оказать влияние на основные процессы, выполняемые эритроцитами – формирование оксигемоглобина и транспорт кислорода к тканевым системам организма.

Действуя на фосфолипиды мембран эритроцитов, антигены различных инфекционных возбудителей могут резко изменить структуру мембран и вызвать в них перекисное окисление липидов, что изменяет проницаемость, микровязкость и их деформирующую способность.

В настоящей книге мы попытались осветить роль пентозного цикла в эритроцитах, сосредоточив внимание на ведущей роли в этом процессе глутамин и гистидина, оказывающих огромное влияние на оксигенацию гемоглобина. Изучена помощью программного комплекса Bio Vision структура липидно-белковых комплексов мембран эритроцитов в норме и патологии.

Наконец, подробно описаны изменения, возникающие в эритроцитах при общем охлаждении организма и при обострении герпесной инфекции в период беременности. Эта книга будет полезна работающим в области изучения морфофункционального состояния клеточных мембран при различных воздействиях на организм человека, а также лицам, работающим в области изучения газотранспортной функции организма, как в норме, так и патологии.

*Глава 1***ИСТОРИЯ ФОРМИРОВАНИЯ ВЗГЛЯДОВ
НА КРОВЕТВОРЕНИЕ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

В прошлом столетии Биццоцери (1869) и Нейман (1868) впервые устанавливают, что красный костный мозг является кроветворным органом. Они же определяют приблизительный клеточный состав костного мозга. Выявить родоначальную клетку кроветворного ряда этим авторам не удастся. Однако, уже в 1879 году [147, 175], постулируют, что источником образования эритроцитов в красном костном мозгу являются особые клетки – гемоцитобласты, в которых происходит постепенное уменьшение, а затем и исчезновение ядра путем растворения его в протоплазме. Эти авторы считали, что растворяющееся ядро идет на построение гемоглобина в эритроците.

Мюллер [186] приходит к выводу, что как красные, так и белые кровяные клетки происходят из одной и той же клетки, которая находится в костном мозгу, селезенке и лимфатических узлах и размножаются непрямым путем. Таким образом, впервые появляются высказывания, которые подводят нас к мысли об унитарной теории кроветворения.

Анализ не только клеточных элементов костного мозга, но и тканей делает Асканази [104]. Он различает в костном мозге взрослого человека следующие составные элементы:

- 1) эндост,
- 2) сосудистый аппарат с соединительнотканными перекладинами вокруг артерий и нервов,
- 3) жировую ткань,
- 4) ретикулум,
- 5) миелоидную паренхиму,
- 6) лимфатическую ткань.

Одновременно выходит серия замечательных работ А.А. Максимова [176, 177, 178, 179], в которых он пишет: «Сетчатая основа, строма и миелоидная ткань красного костного мозга представляют собой

систему очень рыхло переплетающихся тонких соединительнотканых волоконцев, на которых разбросаны отростчатые ретикулярные клетки по своему характеру, по-видимому, сходные с такими же элементами «лимфоидной ткани». Все пространства, остающиеся между только что перечисленными элементами стромы, выполнены свободными клетками, которые имеют самый разнообразный характер».

Переходя к характеристике этих разнообразных клеточных элементов, А.А. Максимов различает среди них такие как:

1. зрелые формы кровяных клеток, то есть, эритроциты и зернистые лейкоциты трех видов;
2. молодые формы красных кровяных телец и зернистых лейкоцитов, находящихся на различных стадиях своего развития, что еще больше разнообразит их внешний вид и структуру (эти элементы составляют, по его мнению, главную массу миелоидной ткани);
3. большие и малые лимфоциты, которые собраны группами по ходу мелких артерий;
4. совершенно особые элементы миелоидной ткани – мегакариоциты.

Кроме того А.А. Максимов выделяет плазматические клетки, макрофаги, а для молодого растущего организма и особенно для зародыша – поликариоциты, то есть остеокласты.

Созревание клеток крови в красном костном мозгу А.А. Максимов рассматривал как процесс смены клеточных поколений в результате дифференцирующих митозов. После таких митозов в дочерних клетках появляются признаки дифференцировки.

Возникновение из родоначальной клетки в одних случаях эритробластов, в других – миелоцитов А.А. Максимов истолковывал как результат нарушения равновесия, которое определяет будущий путь развития клетки и соответствующий обмен веществ. Эти факторы приводят к различным направлениям развития, определяющимся ядерно-цитоплазматической конституцией исходной клетки. Наконец, очень важно напомнить, что работы русских гематологов на заре ее становления ближе всех были к истине признания лимфоцитоподобной клетки за источник формирования кроветворных рядов и элементов соединительной ткани. Пионерские работы П.П. Авророва и А.Д. Тимофеевско-

го (1913, 1915), выполненные в Томске по культивированию «бесцветных кровяных телец вне организма» привели к мысли, что округлые мооядерные клетки крови способны к митозу и превращению в иные формы: гипертрофированные гигантские и отростчатые элементы.

А.А. Максимов (1923, 1925) [178, 179] культивируя лимфоциты из лимфатических узлов кролика, убедился в их способности превращаться в элементы других рядов кроветворения, это и заставило его считать, что лимфоцитоподобная клетка является родоначальницей кроветворения в организме. Клеточные элементы в костномозговой полости имеют не хаотичное расположение, а размножаются гнездами, состоящими из элементов либо эритробластического, либо лейкобластического ряда.

Эмбриональное развитие эритроидной ткани

У млекопитающих очаги кроветворения появляются очень рано на 3 неделе, с момента дифференцировки мезенхимы в стенке желточного мешка в сторону формирования капиллярной сети. В силу этих обстоятельств этот этап кроветворения получил название **ангиобластического**. Классическая схема формирования первых очагов кроветворения показывает, что в этот период происходит обособление местами в мезенхимальном поле желточного мешка островков, в которых часть элементов, располагающихся на периферии островка, вытягивается и уплощается, продолжая сохранять связь, друг с другом. Таким образом, образуется эндотелиальная стенка первых сосудов – **капилляров**. Мезенхима, оказавшаяся в центре этого островка, перестраивается таким образом, что синцитиальные связи между ними теряются, и они превращаются в округлые клетки – первичные кровяные элементы. Весь период внутрисосудистого кроветворения продолжается до 7-9 недели, после чего наблюдается атрофия желточного мешка, а кроветворение перемещается в печень.

Чем же характеризуется ангиобластический период кроветворения? Первичные гемопоэтические клетки, дифференцирующиеся из мезенхимальных элементов кровяных островков Вольфа-Максимова, обладают неограниченной потенцией к дифференцировке (рис. 1, 2).

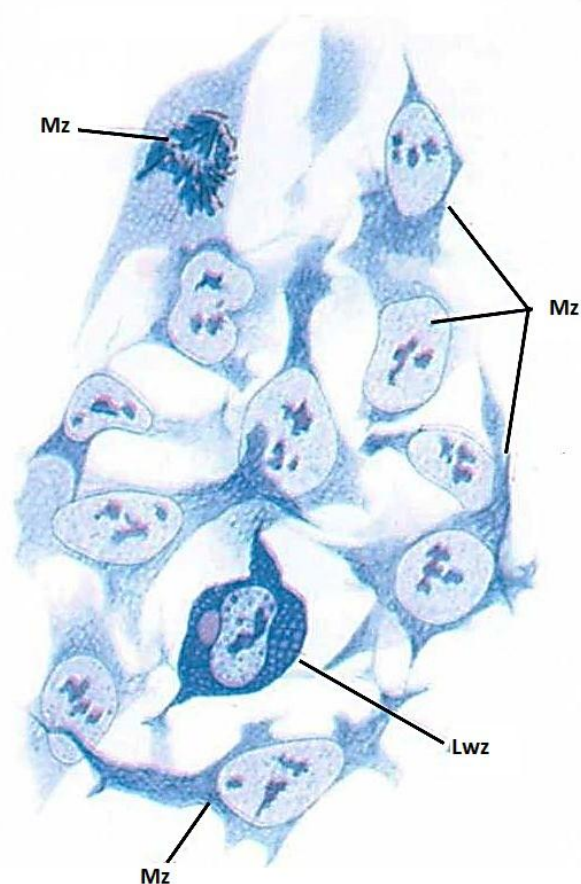


Рис. 1. Зародыш кролика 9 дней. Формирование лимфоцитоподобной клетки (Lwz) из мезенхимальных элементов (Mz) Максимов А., Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Berlin, 1927.

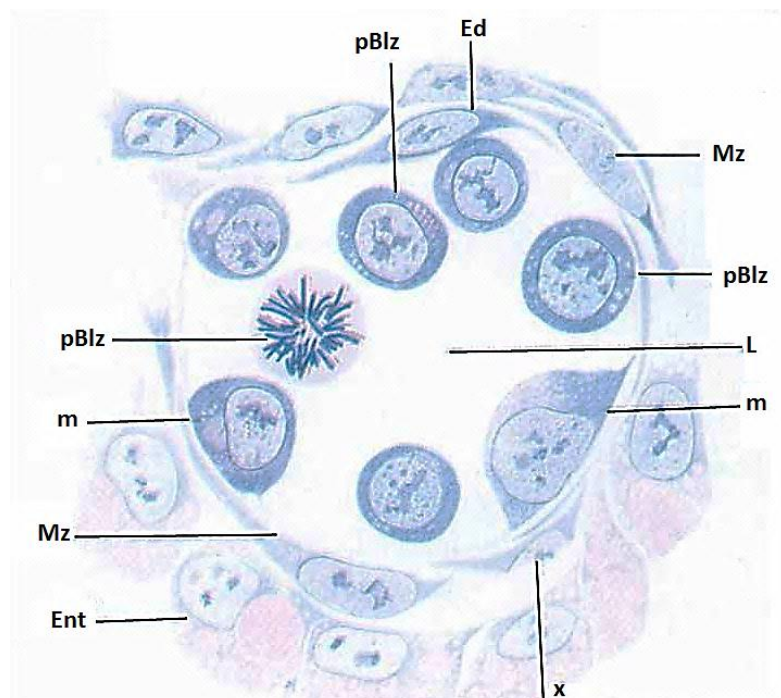


Рис. 2. Эмбрион кролика на 8 1/2 день развития. Ed – эндотелиальная клетка; pBlz – примитивная кровяная клетка; Mz – мезенхимальная клетка; x – прилежащая мезенхимальная клетка; L – просвет сосуда; Ent – эндодермальный эпителий; m – отшнуровка эндотелиальной клетки и превращение ее в первичную кровяную клетку. Максимов А., Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Berlin, 1927.

Полипотентные клетки получили название стволовых кроветворных клеток (СК); они дифференцируются во все ростки кроветворения, способны к самоподдержанию в течение всей жизни организма. Ство-

ловые клетки, вероятно, функционируют по принципу обратной связи, пролиферируя при ситуации необходимости активного пополнения создающегося в них дефицита. Уже на ранних этапах гемопоэза интенсивность и характер дифференцировки определяются в основном клеточной системой окружающей стволовые клетки и гемогуморальной средой организма.

Первые недели внутриутробного гистогенеза зародыша проходят под знаком высокой метаболической активности, требующей обеспечения пула внутриклеточного дыхания. Вероятно, поэтому доминирующим ростком в кроветворении на ранних этапах развития зародыша становится эритроидный росток с ускоренной дифференцировкой этого ряда и более примитивным гемоглобиновым составом. Стволовые клетки, образующиеся в мезенхиме желточного мешка, обладают рядом характерных морфологических и функциональных свойств. Прежде всего, они хорошо переносят ионизирующую радиацию и воздействие многих токсических продуктов метаболизма, хорошо приспособлены к действию низких температур. Внешне они очень сходны с малыми лимфоцитами [146]. Авторам удалось доказать, что на фоне меченных H^3 -тимидином кроветворных клеток в ходе репарации кроветворения индексы метки уменьшаются только у лимфоцитоподобных клеток при параллельном нарастании эритроидных и миелоидных предшественников.

Стволовая клетка, на уровне сегодняшних знаний о ней, выглядит как лимфоцит с диаметром 7-10 мкм, узким ободком цитоплазмы, округлым ядром, содержащим 1-2 ядрышка [112]. Хроматин в ядре распределен равномерно. На ультрамикроскопическом уровне в плазме отсутствует эндоплазматический ретикулум, комплекс Гольджи, лизосомы и поливезикулярные тельца. Однако при этом хорошо выступают малые митохондрии, свободные рибосомы, полисомы и мелкие пузырьки. Лимфоциты в сравнении с такими клетками имеют довольно четкие отличительные морфологические признаки: ядро лимфоцитов, как правило, имеет глубокое вдавление, ядрышки в ядре отсутствуют, хроматин распределяется в ядре неравномерно – глыбками. На ультрамикроскопическом уровне в цитоплазме малых лимфоцитов обнаруживают эндоплазматический ретикулум, лизосомы, поливезикулярные тельца, отчетливо видны митохондрии.

По мере развития зародыша СК мигрируют через кровяное русло в новые места обитания: эмбриональную печень, селезенку, а с 8-10 недели и в формирующийся красный костный мозг. Весьма интересны данные, полученные в последующие годы, свидетельствующие, что после удаления участка зародыша, из которого впоследствии образуется желточный мешок и СК не обрывает потенциальные возможности зародыша формировать эритроидные элементы. Они могут на ранних этапах эмбриогенеза развиваться во многих других участках мезенхимы, параллельно с закладкой и без закладки капиллярной сети (рис. 3, 4). Клон химерных эритроидных клеток, развивающихся вне желточного мешка, продуцирует исключительно фетальный гемоглобин (HbF), в то время как СК, возникающие в желточном мешке дают эритроидные элементы синтезирующие гемоглобин взрослых.

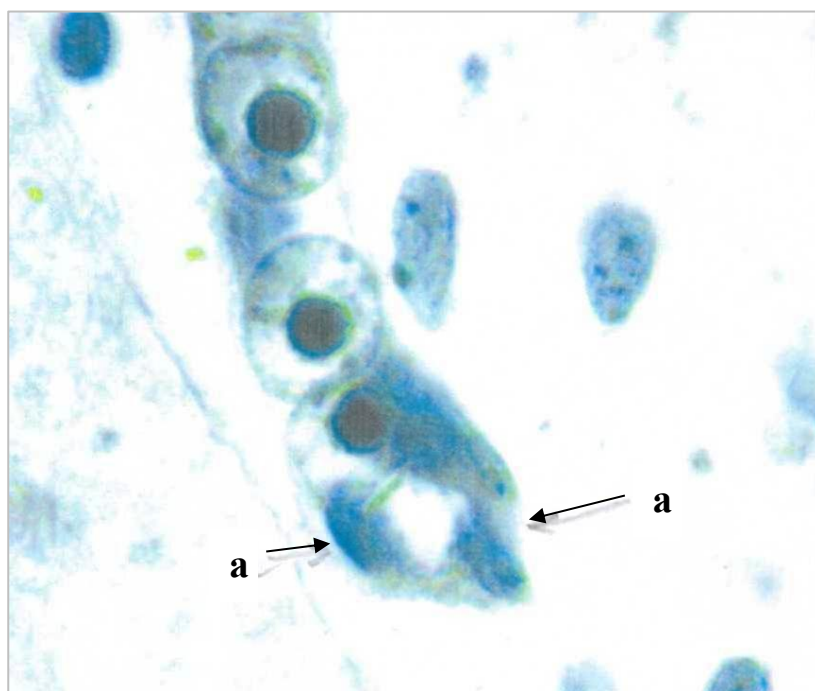


Рис. 3. Формирование кровеносного сосуда в мезенхиме зародыша человека на 8 неделе развития. От клеток, формирующих капилляр отшнуровываются округлые элементы, дифференцирующиеся в мегалобласты (а).

Вероятно, что на ранних этапах эмбриогенеза источником образования СК в сторону эритропоэза может быть вся энтодерма, а затем гемопоэз СК смещается в желточный мешок и получая «индуцирующее образование» окружающей их мезенхимальной стромы, закрепляет ге-

мопоэтические признаки, характерные для последующих этапов внутриутробного и постнатального эритропоэза: печеночного и костномозгового. Стволовая клетка на ранних этапах эмбриогенеза обладает высоким пролиферативным потенциалом. В печеночный период она способна делиться до 84 раз и обеспечить потомство в $1,9 \times 10^{25}$ клеток. У новорожденных число возможных делений сокращается до 56 и количество потомков – до $7,2 \times 10^{16}$ клеток. Наконец, у взрослого организма наблюдается число делений не более 28, при которых общее число возникающих при этом клеток составляет не более $2,7 \times 10^8$ [184].

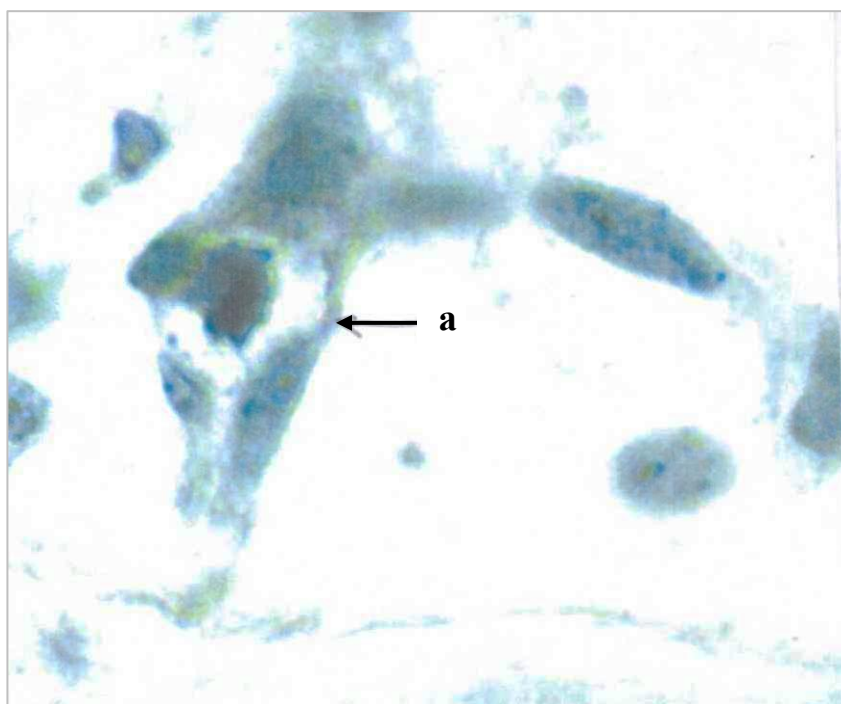


Рис. 4. Формирование кровеносного сосуда из сети мезенхимальных элементов. Расположенные внутри капилляра мегалобласты размножаются митозом (а). Сосуд разветвляется путем удлинения и роста, соединенных друг с другом мезенхимальных элементов.

Эмбриональные стволовые клетки на различных этапах кроветворения существенно отличаются по своим морфофункциональным свойствам. Так, стволовые клетки желточного мешка не отвечают усилением синтеза гемоглобина в ответ на стимуляцию их эритропоэтином. Сами же мегалоциты, образовавшиеся в процессе дифференцировки из стволовых клеток желточного мешка по своим размерам меньше, чем таковые в эмбриональной печени, да и количество гемоглобина пече-

ночных мегалоцитов иное, так как они больше синтезируют HbA [200] на начальном этапе кроветворения, а затем полностью вытесняют образование HbF. Это можно объяснить тем, что в процессе эмбриогенеза СК либо меняет свои свойства в зависимости от стромального окружения, в которое они попадают, либо в каждом новом очаге: желточный мешок, тканевые очаги образования сосудов и кроветворных клеток, печень, красный костный мозг образуется новая популяция стволовых клеток, отличающаяся по своим качествам от предыдущей. В противном случае очень трудно объяснить такие явления как высокую радиоактивную устойчивость СК желточного мешка и печени по сравнению со стволовыми клетками костного мозга.

Общее число стволовых клеток регулируется в организме. Темп восстановления кроветворения обусловлен дифференцировкой одинакового количества СК. После массовой гибели стволовых клеток пролиферация их восстанавливается только после достижения пороговой величины их популяции. Время же достижения этого порога зависит от числа сохранившихся СК и эффективности влияния на них окружающей стромы. Если пороговая величина СК снижена, дифференцировка их прекращается. Число стволовых клеток, темп их пролиферации и дифференцировки находятся под строгим контролем нейрогуморальной системы организма и стромального микроокружения. Расшифровка механизмов взаимодействия кроветворных клеток и их микроокружения станет решающим шагом в понимании управления гистогенезом гемопоэза. Образующиеся при этом клетки становятся мультипотенциальными кровяными элементами или стволовыми клетками, способными делиться, быть способными к длительному самоподдержанию и дифференцироваться в нескольких направлениях [93]. Переход стволовой клетки образующейся из мезенхимального синцития (рис. 3, 4) в последовательные этапы качественной перестройки мегалобластического ряда являются яркой иллюстрацией проявления основного из законов биологического развития клеточной дифференцировки. Как бы не выражался ход событий этого процесса во времени, в конечном итоге мы видим один и тот же финал – родоначальная клетка дает семейство клеток различных типов. Из СК мезенхимального поля начинается выстраиваться в ходе эмбриогенеза несколько рядов гемопоэза.

Дифференцировка – процесс весьма сложный и имеет несколько аспектов. Прежде всего, нужно знать природу внешних сил, под действием которых в недифференцированной родительской клетке начинается цепь событий, приводящих к появлению двух дочерних клеток с разной конституцией [226]. Необходимо учитывать, что у дифференцированных клеток появляются существенные различия на молекулярном уровне. Наконец, нужно знать, почему имеет место необратимость разнообразных изменений, ведущих к дифференцировке, и какие молекулярные механизмы это обеспечивают. Что заставляет стволовую клетку на уровне ангиобластического этапа кроветворения синтезировать разные белки и вынуждает продолжать синтез белков только одной определенной группы. Вероятно, на хромосомном уровне путем регуляции синтеза специфической м-РНК осуществляется переход метаболизма СК на путь специализации к выработке белка гемоглобинового характера [88, 225].

Прежде всего, нужно знать внешний фактор (эмбриональный индуктор) обуславливающий направленную дифференцировку. Между репрессорами и индукторами должна существовать определенная зависимость, поэтому в случае комплементарного взаимодействия репрессора и индуктора репрессоры не способны блокировать синтез специфической м-РНК и тем самым открывается путь к синтезу соответствующего белка.

Основными элементами кроветворения, образующимися в ангиобластический период, становятся клетки эритроидного типа. Схема ангиобластического кроветворения просматривается так: часть стволовых клеток в пределах просвета сосудов начинает дифференцироваться в клетки мегалобласты, которые по уровню их созревания можно разделить на мегалобласты первой и второй генерации.

Мегалобласты первой генерации характеризуются крупными размерами – 15-20 мкм, с округлым ядром, довольно нежным по строению, содержит ядрышко. Цитоплазма – базофильная клетка; сохраняет способность к размножению. Постепенно происходят сложные внутриклеточные перестройки в системе ядерно-цитоплазматического управления процессами синтеза белка. Репрессируются локусы синтеза гемоглобина, и цитоплазма первичных базофильных мегалобластов приобретает

постепенно полихроматофильный характер, который вскоре в силу интенсификации синтеза гемоглобина переходит в оксифильный тон. С этими признаками клетка обретает свойства оксифильного мегалобласта – мегалобласт второй генерации (рис. 5,6).

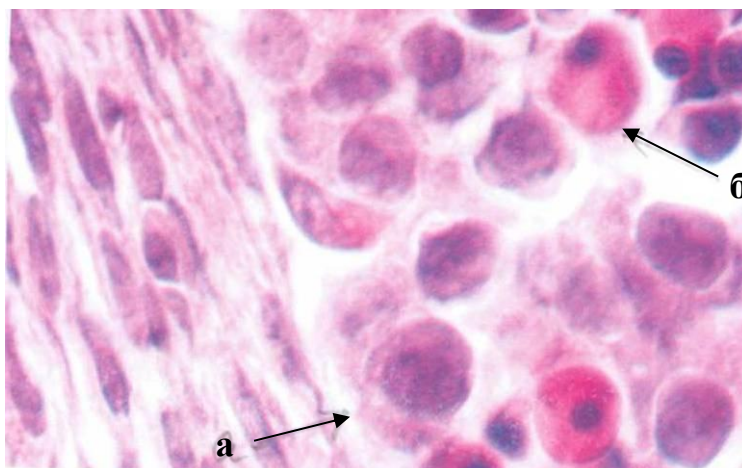


Рис. 5. Формирующиеся клетки эритроидного ряда. а – мегалобласты первой генерации. б – мегалобласты второй генерации.

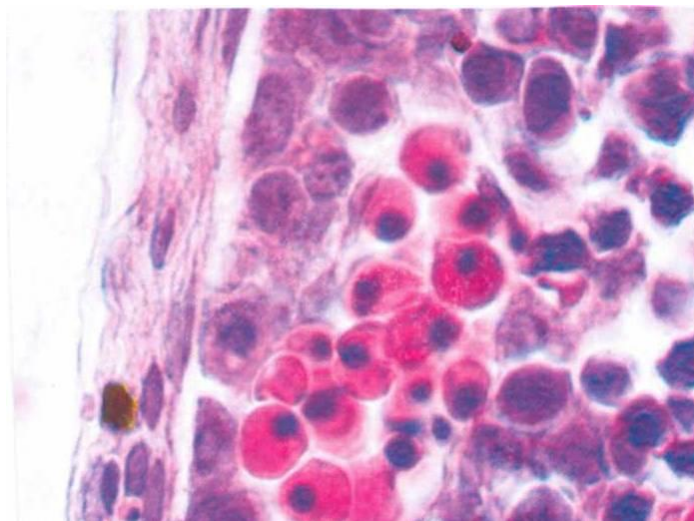


Рис. 6. Число мегалобластов второй генерации нарастает, многие из них освобождаются от ядра путем выталкивания его за пределы клетки. Мегалобласты дифференцируются в мегалоциты.

Существенным морфологическим признаком мегалобласта второй генерации наряду с насыщением цитоплазмы гемоглобином является перестройка ядра. Начальными признаками перестройки ядра является его уплотнение с приобретением свойств гиперхромии (рис. 7).

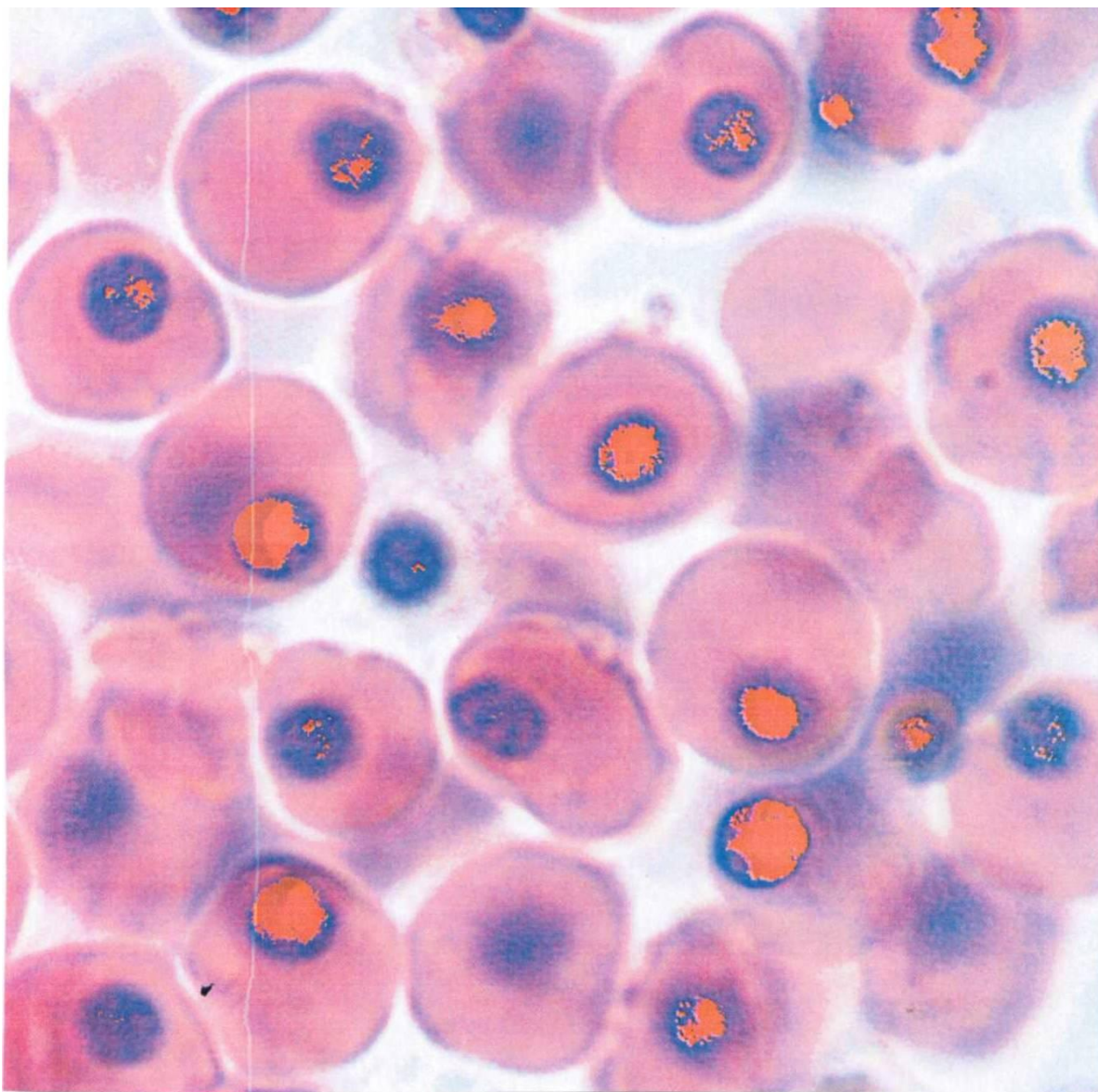


Рис. 7. Процесс созревания мегалобластов второй генерации в мегалоциты. Видны различные стадии уплотнения ядра перед процессом денуклеации мегалобластов. Клетки обработаны цитофотометрически по программе Bio Vision в пределах разрешения 60 пикселей.

Пикнотические изменения ядерного вещества приводят в конечном итоге к нескольким исходам:

1. Уплотненное ядро может целиком покинуть клетку – *экструзия ядра*.
2. Предварительно ядро подвергается распаду на несколько крупных частей величиной до 2-3 мкм (*кариорексис*), с последующим выталкивания этих частиц за пределы мегалобласта.

3. Ядро разбивается на мельчайшие частицы – *тельца Жолли* диаметром 1-2 мкм. Нужно отметить, что тельца Жолли выталкивающиеся за пределы клетки, образуются только у эмбрионов и в крови новорожденных. У взрослых они могут быть только при пернициозной анемии. Тельца Жолли выталкиваются за пределы созревающего мегалоцита.
4. Возможен и такой исход, когда ядерное вещество постепенно рассасывается – лизируется. Свидетелями этого процесса являются остающаяся на некоторое время оболочка ядра. Такое образование получило название *кольца Кэбота*. И этот структурный остаток ядра в конце - концов, покидает пределы оксифильного мегалобласта. Опять-таки такие явления характерны, как правило, для пернициозной анемии.
5. Ядерные *пылинки Вейденрейха* [228] – мелкая азурофильная, иногда голубая, зернистость, возникающая при глубоком множественном распаде ядра.

Оксифильный мегалобласт, освободившись от ядерного присутствия, получает название мегалоцита. Мегалоциты отличаются крупными размерами (10-12 мкм) и несколько эллиптической формой. Они сильно насыщены гемоглобином. Мегалоцитарный тип гемоглобинсодержащих элементов, продуцирующих HbF, находится под коррегирующим влиянием гемопоэтического фактора, вырабатываемого слизистой пилорического отдела желудка и 12-перстной кишки, в основе которого содержится витамин В₁₂. Под влиянием витамина В₁₂ мегалобластический тип созревания эритропоэтинчувствительных клеток переходит на нормобластическую волну считывания генетического кода гемоглобинового синтеза, которая реализуется при кроветворении в печени развивающегося плода.

*Глава 2***ПЕЧЕНОЧНЫЙ ПЕРИОД КРОВЕТВОРЕНИЯ**

С 3-4 недели эмбрионального развития у человека закладывается печень путем врастания эпителия 12-перстной кишки в подлежащую мезенхиму. С этого момента у развивающегося эмбриона начинается новый период кроветворения – печеночный, заменяющий ангиобластическое кроветворение. Печень представлена в это время тяжами эпителиальных клеток и мезенхимы без какого-либо четкого топографического расположения их по отношению друг к другу. Однако уже у 5-6-недельного эмбриона печень начинает выполнять основную кроветворную функцию в организме. В этот период начинается формирование долек печени. Лакуны (будущие центральные вены) свободны от форменных элементов. Кроветворение в этот период идет особенно бурно и носит исключительно эритроидный характер (рис. 8).

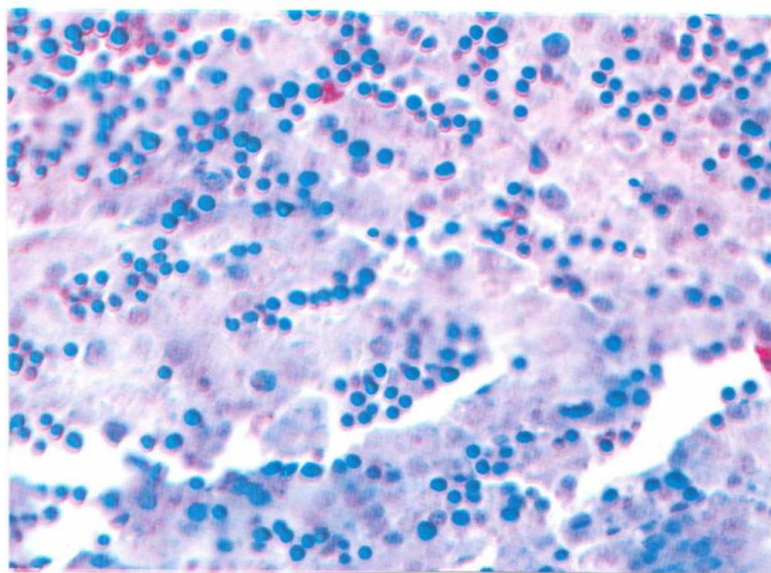


Рис. 8. Печень человека. 10 неделя развития зародыша. Отчетливо выступают печеночные клетки, располагающиеся в виде пластин, а между ними большое количество клеток эритроидного типа на различных этапах созревания.

Мезенхимальные элементы, располагающиеся между эпителиальными тяжами, начинают накапливать в протоплазме гемоглобин, находясь еще в синцитиальной связи, друг с другом. Это доказывается гистохимической реакцией Лепене на гемоглобин. Ядра мезенхимальных элементов уплотняются и начинают более интенсивно окрашиваться

базофильными красителями. Участки мезенхимального синцития в связи с начавшимся процессом синтеза гемоглобина образуют как бы островки, распадающиеся вскоре на самостоятельные клетки промегаглобласты (рис. 9). Цитоплазма промегаглобластов иногда даже сохраняет тонкие выросты, соединяющие эти клетки друг с другом.

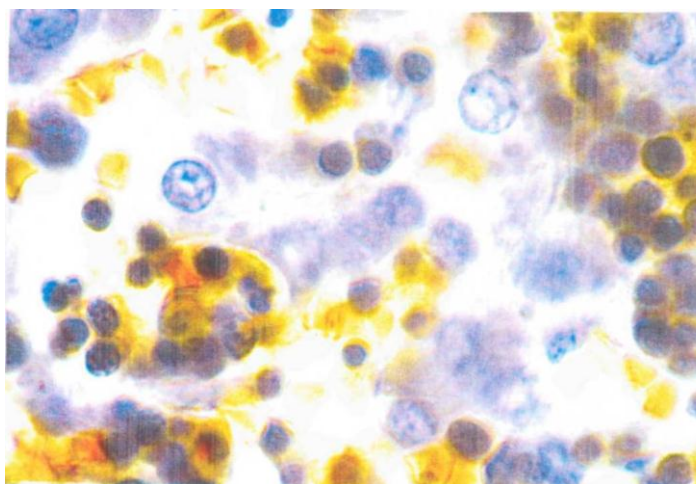


Рис. 9. Печень человека. 11 неделя развития. Окраска по Лепене на выявление гемоглобина. Эритроидные элементы располагаются гнездами между печеночными клетками. В нормобластах отмечается активный процесс накопления гемоглобина.

Мезенхимальные элементы, окружающие эти островки формируют выстилку вдоль эпителиальных тяжей, образуя тем самым первые кровеносные сосуды. Оказавшиеся в просвете сосудов мегалобласты продолжают накапливать гемоглобин при нарастающем процессе уплотнения ядра и приобретают типичный вид оксифильных мегалобластов. У 5-6-недельного эмбриона такой способ образования эритроидных элементов является доминирующим. На 7-8 неделях развития отчетливее выявляются кровеносные сосуды, заполненные оксифильными мегалобластами. К 9-11 неделям развития уменьшается количество мезенхимальных островков, а у 11-14-недельных эмбрионов хорошо выделяются многочисленные гнезда первичных кровяных клеток лимфоцитоподобного вида, из которых начинается процесс образования эритробластов, которые далее дифференцируются в нормобласты и эритроциты (рис. 10, 11, 12).

К 16-20 неделе развития печень как орган уже вполне сформирована. Очаги кроветворения располагаются вдоль капилляров печени. У 6-7 месячных плодов кроветворение в печени постепенно затухает. Однако оно имеет место вплоть до самого рождения. Например, у 8-месячного плода довольно четко видны очаги нормобластического кроветворения вдоль желчных капилляров. Созревающие нормобласты прорываются через стенку капилляра и попадают в общий кровоток.

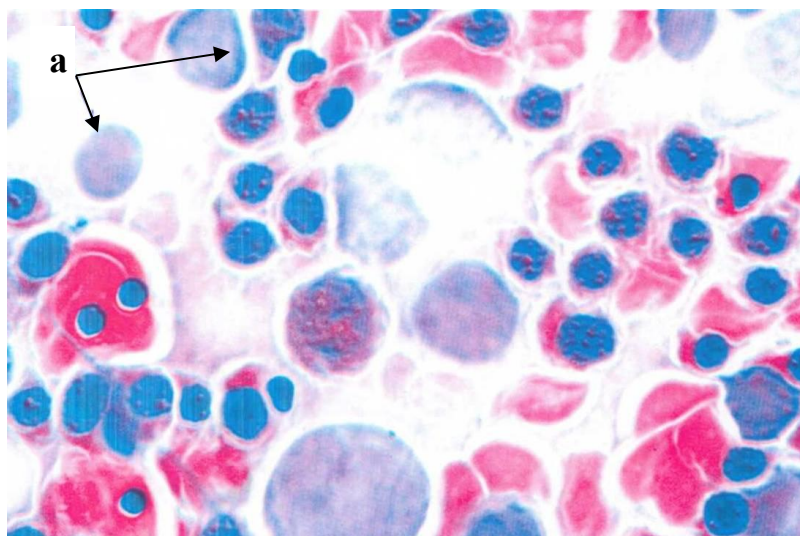


Рис. 10. Печень человека. 10 неделя развития. Среди эритроидных клеток отчетливо видны эритробласты (а) и нормобласты на различных этапах созревания.

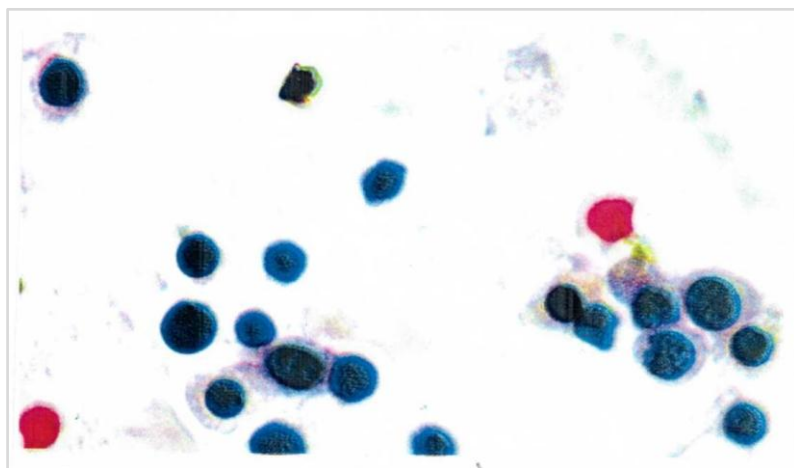


Рис. 11. Участок печени человека. 12 неделя развития. Выступают отчетливо базофильные, полихроматофильные и оксифильные нормобласты. Окраска азу-

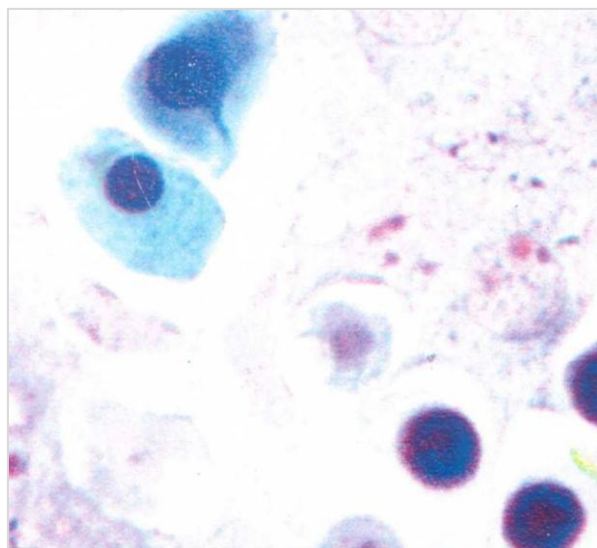


Рис. 12а. Печень человека. 11 неделя развития. Базофильные и оксифильные нормобласты. Окраска азуром II-эозином.



Рис. 12б. Неравномерное накопление гемоглобина в цитоплазме мегалоцита.

Динамика количественного состава кровяных элементов печени

В первые недели эмбрионального развития человека в печени преобладает эритропоэз. Число стволовых элементов (лимфоцитоподобных клеток) составляет 1-3% от всех гемопоэтических элементов. На долю клеток, имеющих вид проэритробластов, приходится 20-22% остальные элементы нужно отнести к группе мегалобластов базофильного и оксифильного типа.

К 7-8 неделям развития эмбриона картина в печени практически не меняется. Однако в последующем отчетливо начинает нарастать количество клеток типа про- и эритробластов составляя на 10-14 неделях развития свыше 30%; мегалобластов – 30-35%. Появляется промиелоциты и миелоциты – 1-3%.

Мегалобласты, доминирующие среди клеточных элементов гемопоэза в печени, характеризуются размером до 8-10 мкм, с ядерно-цитоплазматическим соотношением 0,6-0,7, они составляют до 32-33% всей мегалобластической группы. Около 7-7,5% приходится на оксифильные макромегалобласты, у которых резко увеличивается удельный вес цитоплазмы. Ядро у них уплотняется, уменьшается до 2-3 микронов. Средний диаметр макромегалобластов – 13,0-13,5 микронов.

Вследствие неравномерного накопления гемоглобина цитоплазма мегалобластов носит либо зернистый, либо вакуолистый характер (рис. 12б). По мере нарастания сроков развития происходит существенные изменения со стороны мегалобластического ростка – к 10-12 неделям уменьшается процентное содержание макромегалобластов.

Так, если на 6-7 неделях развития число их составило 7-7,5%, то на восьмой-девятой число их снижается до 4%, а к 12-14 неделям они практически исчезают, при этом прогрессивно нарастает процентное содержание при этом проэритробластов и нормобластов.

К 14-20 неделям процентное содержание гемопоэтических элементов в печени можно представить следующим образом: первичные кровяные клетки – 1-3%; проэритробласты и эритробласты – 18-20%; нормобласты – 63-65%; мегалоциты – 1-2%; миелоциты 3-4%; сегментоядерные – 2%.

Для плодов 5-6 месячного возраста процентное содержание кроветворных клеток в печени становится таковым:

Первичные лимфоцитоподобные клетки	– 1-2%
Эритробласты	– 8-10%
Нормобласты	– 79%
Миэлоциты	– 3-4%
Сегментоядерные	– 3-5%

Таблица 1

**Гемограмма печеночного периода кроветворения у человека
(получена на препаратах – отпечатках печени)**

Наименование клеток	Процентное содержание кровяных клеток на различных этапах внутриутробного развития в печени				
	4-5 неделя	7-9 неделя	10-14 неделя	14-20 неделя	20-24 неделя
Первичные лимфоцитоподобные кроветворная клетки	3-4%	3%	1-3%	1-3%	1-3%
Мегалобласты базофильные	25-30%	23-25%	15%	1-2%	
Мегалобласты оксифильные, в том числе макромега- лобласты оксифильные	47 10-12%	30-32 7-8	20-21 4-5	2 1-2	1 -
Проэритробласты	20-22	25	30-32	18-20	8-10
Нормобласты		13-15%	25%	63-65%	79-80%
Промиеоциты			3	4	4
Сегментоядерные лейкоциты			2	2	3-5

Глава 3

КОСТНОМОЗГОВОЕ КРОВЕТВОРЕНИЕ

С восьмой недели внутриутробного развития человека на базе хрящевой модели длинных костей скелета начинается формирование костной ткани (рис. 13,14). Одновременно с формированием костного скелета повсеместно в полостях трубчатых и в ячейках плоских костей идет закладка стромы костного мозга и образование очагов миелопоэза.

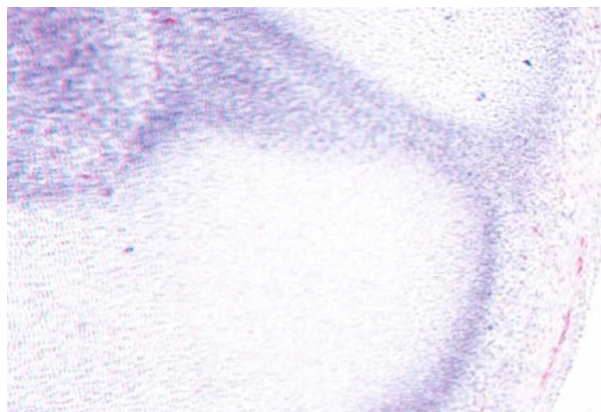


Рис. 13. Зародыш человека 12 недель. Хрящевая модель развития костей нижних конечностей – коленный сустав.

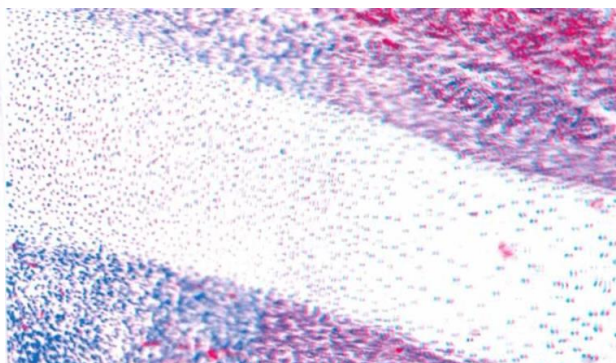


Рис. 14. Хрящевая модель бедренной кости – диафиз.

У семинедельного зародыша человека в области диафиза бедренной кости отмечаются сложные процессы взаимоиндукции между элементами мезенхимальной ткани, окружающей хрящевую модель скелетогенного характера и элементами, вступившими на путь дифференцировки в сторону хрящевого зачатка (рис. 15, 16).

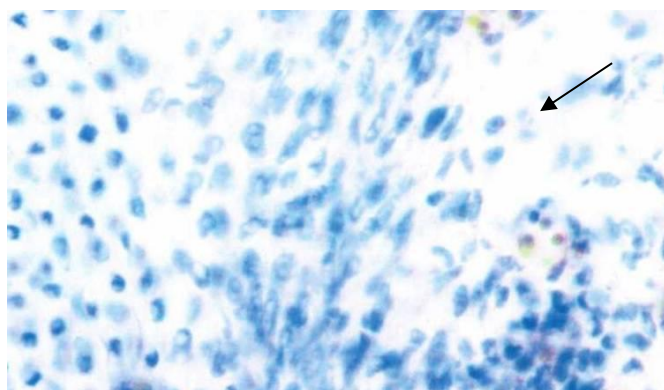


Рис. 15. Участок хрящевой болванки диафиза большеберцовой кости человека. Участок мезенхимы, сближающийся с перихондриальной тканью.

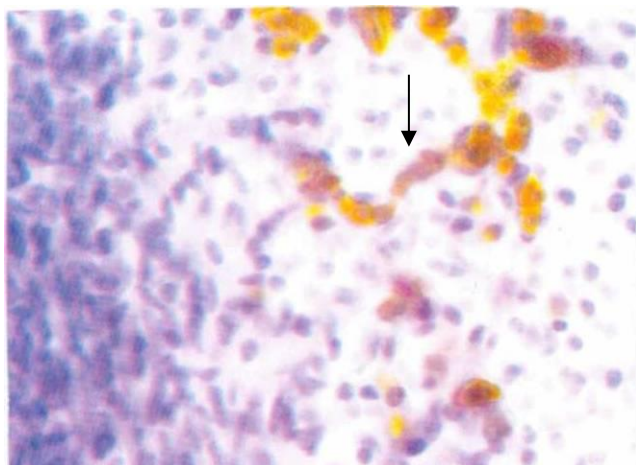


Рис. 16. В мезенхимальной ткани, вступающей в контакт с надхрящницей, много вновь сформировавшихся капилляров. Реакция по Лепене на выявление гемоглобина.

Отчетливо выступают участки надхрящницы, которые под влиянием стимула прилежащей к ней извне мезенхимы начинают прогибаться во внутрь хрящевой структуры (рис. 17).

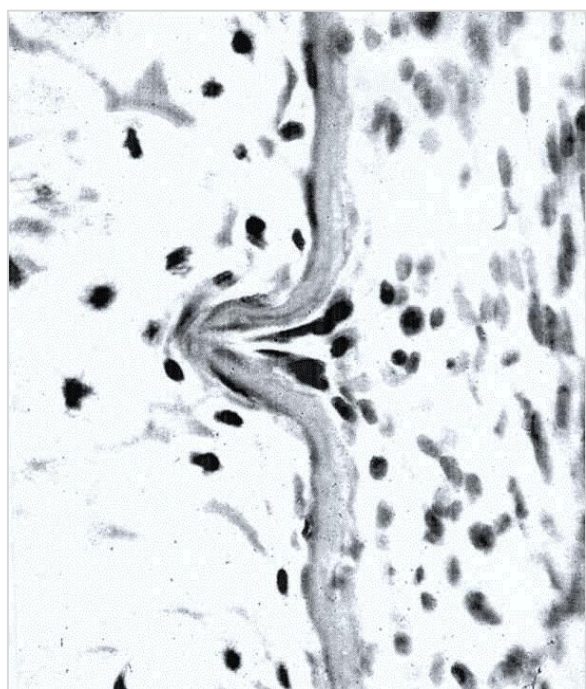


Рис. 17. Мезенхимальные элементы, примыкающие к надхрящнице прогибают ее во внутрь хрящевой ткани, 10-12 недели развития.

Вскоре надхрящница в этом участке подвергается ферментивному разрушению и во внутрь хрящевой болванки будущей кости устремляется поток мезенхимальных элементов дифференцирующихся на вновь образующие мелкие кровеносные сосуды, сопровождаемые лавиной появившихся тут же из мезенхимы остеобластических элементов, остеокластов и стволовых кроветворных клеток, расселяющихся в лакунах энхондральных полостей формируя строму будущего костного мозга (рис. 18).

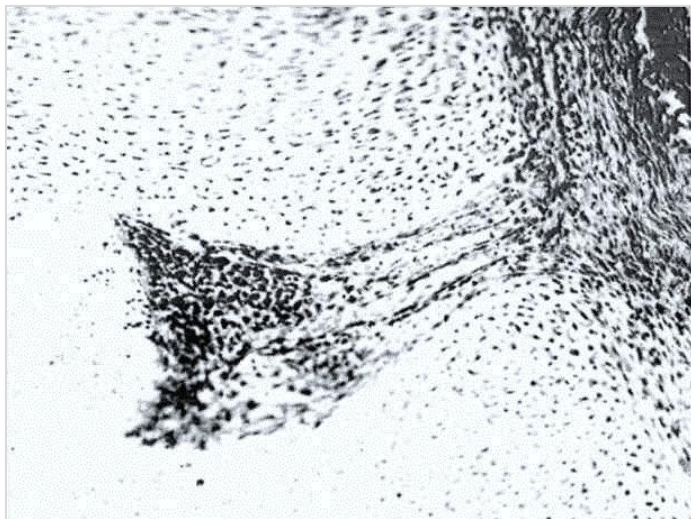


Рис. 18. Мезенхимальная ткань, кровеносные сосуды с формирующимися остеобластами и кровяными элементами в виде остеобластической почки проникают во внутрь диафиза хрящевой болванки большеберцовой кости. Зародыш человека 14 неделя развития.

Очень трудно найти такие участки гистогенеза в период эмбрионального развития, в которых закодированные локусы полипотентного родоначального элемента (мезенхимальные клетки) столь богато одновременно дифференцировались в различных направлениях: эндотелий капилляров, гладкомышечные клетки капилляров, стволовые клетки гемопоэза, стромальные элементы костного мозга, остеобласты, остеокласты, элементы соединительной ткани.

На 10-12 неделе внутриутробного развития 65-70% ядродержащих клеток костномозговой полости составляют остеобласты, 18-20% - элементы эритроидного ряда, 5-6% - поликариоциты и 3-4% - лимфоцитоподобные клетки. Число гранулоцитов в этот период не превышает 0-1% от общего числа ядродержащих клеток костного мозга.

Начиная с 12-14 недели, количество остеобластов начинает уменьшаться до 15-20%, и к концу эмбрионального периода число их составляет 0,5-1% от всех ядродержащих клеток красного костного мозга. Зато неуклонно начинает нарастать число эритроидных и гранулобластических клеток.

Если на 2 месяц развития эритроидные элементы составляли 20-25% ядродержащих клеток, то к 8-9 месяцу число их возросло до 50-55% (рис. 19, 20, 21).

Мигрирующие стволовые клетки у взрослых обладают сниженной способностью к самоподдержанию. Дифференцировка СК в различных направлениях определяется, по-видимому, специфическими гуморальными индукторами, действующими по принципу обратной связи на ге-

нетически детерминированные локусы информационной системы этих родоначальных клеток.

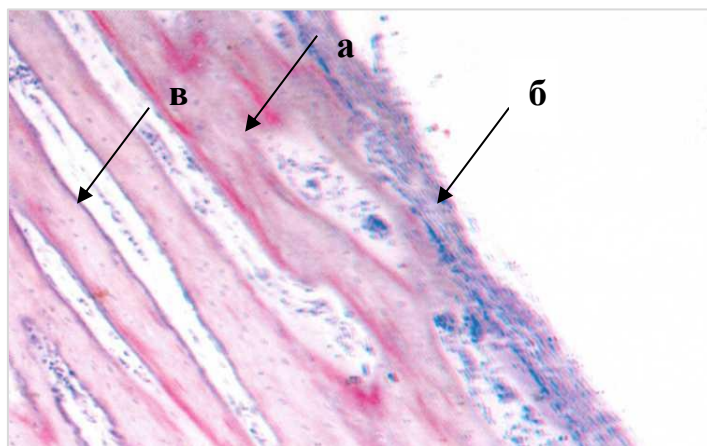


Рис. 19. Из элементов остеобластической почки формируются пластинки губчатой костной ткани, между ними формируется:

- а) паренхима костного мозга.
- б) надкостница.
- в) пластинки губчатой костной ткани.

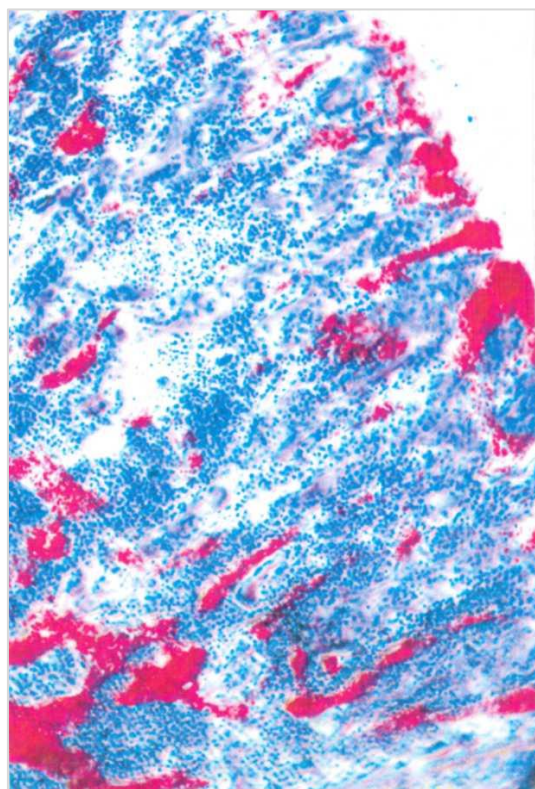


Рис. 20. Диафиз большеберцовой кости. Костные пластинки перестраиваются в пластинчатую костную ткань. Паренхима красного костного мозга сформировалась и заполняет пространства между костными пластинками. 20 неделя развития плода человека.

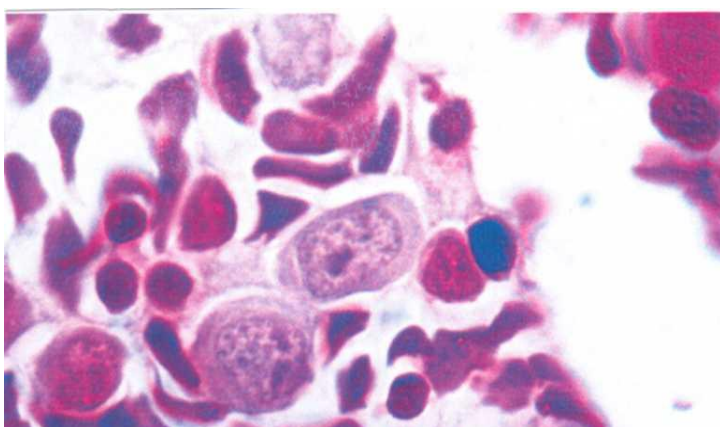


Рис. 21. Участок паренхимы вновь сформировавшегося костного мозга. Эритробласты, нормобласты, эритроциты. 16 неделя развития.

Поэтому СК формируют колонии с определенным типом их состава:

- эритроидных – 42%;
- лейкоцитарных – 21%;
- мегакариоцитарных – 21%;
- смешанных – 16%.

Часто лимфоидные колонии не формируются (Lewis, Trobaugh, 1964).

Можно выделить общую стволовую клетку – предшественника миелопоэза, которая в условиях *in vitro* дает начало развитию грануло-, эритро – тромбоцитопоэза.

Установлено существование единой стволовой клетки-предшественника, дающей начало грануло- и моноцитопоэзу (КОЕ_К – колониеобразующая единица культуры), а также единой клетки-предшественника эритро- и тромбоцитопоэза (КОЕ_{ЭТР}). Возможно, имеется единый предшественник грануло и эритропоэза (КОЕ_{ГЭ}).

Регуляция пролиферативной активности и скорости дифференцировки КОЕ_К осуществляется многими локальными и дистантными регуляторами. Ведущее место среди них отводится колониестимулирующему фактору (КСФ), который продуцирует антиген и митогенстимулированные клетки крови [139, 140].

Клетки периферической крови при инкубации в среде, не содержащей сыворотки, активно вырабатывают вещества, необходимые для роста эритроидных колоний. В то же время в нормальной сыворотке присутствуют вещества, подавляющие продукцию ростковых факторов.

У больных с апластической анемией имеется дефицит ингибиторов факторов роста колоний; при полицитемии наблюдается их гиперпродукция. Основными продуцентами КСФ (колониестимулирующих факторов) считается клетки макрофагальной системы. Зрелые гранулоциты КСФ не производят [138]. Способность моноцитов к выработке КСФ возрастает по мере их созревания. Макрофаги продуцируют КСФ после воздействия на них эндотоксина. В выработке КСФ макрофагами активное участие принимают Т и В лимфоциты [198], особенно после обработки их митогенами (фитогемагглютинин, конкавалин А). Стро-

мальные клетки (фибробласты) костного мозга вырабатывают вещества (КСФ), причастные к регуляции функциональной активности КОЕ_к.

КСФ представляют собой гликопротеин молекулярной массой 14700-93000 дальтон. Выделен КСФ молекулярной массой 1330 дальтон [206]. В регуляции КОЕ_к принимают участие простогландины и лактоферрин [184, 185].

Лактоферрин – специфический переносчик железа – выделен из молока. Его находят в клетках эпителия и гранулах зрелых нейтрофилов, где он вырабатывается. Молекулярный вес 60000-80000 дальтон. Аполактоферрин, не содержащий железа, является мощным бактериостатическим агентом. Насыщенный железом аполлактоферрин (лактоферрин) подавляет продукцию КСФ моноцитами и макрофагами, воздействуя на 1а-рецепторы клеток. Аполлактоферрин обладает антивирусной активностью, связывает антигены таких вирусов как вирус простого герпеса, ЦМВ, тем самым защищает моноциты и макрофаги от повреждения, сохраняя их свойство вырабатывать КСФ [76, 134, 136]. Гидрокортизон и преднизолон усиливают воздействие лактоферрина на моноциты через рецепторы, и тем самым вызывает продукцию КСФ и гранулопоэз. Эстрадиол, тестостерон и микробные полисахариды взаимодействуют с насыщенным лактоферрином и блокируют его влияние на моноциты.

Развитие СК в сторону формирования эритроидных элементов осуществляется в присутствии дистантных гуморальных регуляторов – эритропоэтинов, которые побуждают развертывание в них генетической информации синтеза гемоглобина.

Стимулирующий эффект на пролиферативную активность эритроидных предшественников оказывают андрогены. Полностью проявляет себя стволовая клетка только после подготовки стромальной среды, на фоне которой она располагается. При трансплантации костного мозга в другие, неспецифические для него места организма, стволовые клетки не проявляют своих пролиферативных свойств и вскоре погибают. В костном же мозге строма создает адекватное для стволовых клеток окружение, при котором возникают очаги кроветворения.

Стволовые клетки в норме находятся в самом конце периода G и весьма близки к периоду S. Поэтому факторы усиливающие пролифе-

рацию стволовых клеток (радиация, кровопотери) в течение нескольких минут вызывают вступление значительной части стволовых клеток в синтетический период. Стволовые клетки поддерживаются не неограниченно. Им присущи явления старения. Это доказывается еще и тем, что клетки эмбриональной печени дают более крупные колонии, чем клетки взрослого костного мозга [181]. Исходя, из этого при пересадке облученным мышам кроветворных клеток костного мозга быстрее происходит замещение митозов донора костного мозга на митозы донора эмбриональной печени.

Процесс созревания эритробластов зависит от степени зрелости его ядра. Динамика и качество ядерного вещества приобретает особое значение для характеристики костномозгового эритропоэза внутриутробного периода. При этом важно проводить коррелятивные связи между кариометрическими показателями и интенсивностью размножения в эритробластическом ростке.

По степени созревания ядра в эритробластах костного мозга внутриутробного периода можно выделить 6 групп:

- I – 2-3 микрона
- II – 4-5 микронов
- III – 6 микронов
- IV – 7,5 микронов
- V – 9 микронов
- VI – 10,5-12 микронов.

В нормальной кариометрической кривой пик располагается в зоне III категории, что соответствует 62% всех эритробластов; 10% приходится на эритробласты с ядром, диаметр которого равен 4-5 микронам. Небольшой процент эритробластов этой категории объясняется тем, что в этой зоне осуществляется освобождение эритробластов от ядра.

Анализ эритробластической кариограммы в эмбриональный период у человека показывает, что данные всей кариометрической кривой можно сдвинуть влево за счет эритроидных элементов с ядром от 2 до 3 микронов, что редко наблюдается в костном мозгу взрослого человека.

Эритроидные элементы с ядром от 2 до 3 микронов характерны для такого периода, когда они образуются чаще всего в кровяном островке напрямую из округляющихся мезенхимальных клеток. Как пока-

зали исследования, наиболее активно эритропоэз протекает в зоне эндоства. Неудивительно поэтому, что на первых порах кроветворения (8-14 неделя) эритробласты I категории (размеры ядра – 2-3 микрона) составляют 50-60% по кариометрической кривой, а на долю эритробластов V-VI категорий (размеры ядра 9-10,5 микронов) приходится 6-8%. С 16 недели число эритробластов I категории начинает постепенно уменьшаться (16 неделя – 29%, 20 неделя – 10%, 24 неделя – 5%) и к концу внутриутробного периода не превышает 5-10%. Зато с этого момента (16 неделя) начинает увеличиваться число эритробластов II категории, составляя к 9 месяцу внутриутробного развития 60-70% элементов эритроидного ряда. Это явление можно объяснить переходом развивающегося организма начиная с 14 недели, к нормобластическому кроветворению. Основным источником образования эритроидных элементов становятся эритробласты, которые претерпевают ряд последовательных этапов дифференцировки. Именно поэтому митотические фигуры среди элементов эритроидного ряда, встречаются чаще, начиная с 14-16 недели составляя в среднем 1-2%.

3.1. Морфологическая характеристика клеток эритрокариоцитарного ряда красного костного мозга интактных кроликов

Первоначальной клеткой эритроидного ряда следует считать эритробласт. На стадии эритробласта проявляется влияние эритропоэтина, способствующего его дифференцировке в сторону эритропоэза. Эритробласт имеет размеры 20-25мкм, округлой формы. Цитоплазма при окраске по Романовскому-Гимза имеет интенсивно базофильный цвет и лишена зернистости. Ядро – округлое состоит из хроматина с пониженной плотностью (рис 22,б). Электронномикроскопический анализ этой клетки не позволяет выделить какие-либо особенности строения ядра эритробласта. Ядерная оболочка образована внутренней и наружной мембранами, которые сливаются в области ядерных пор и ограничивают щель, называемую перинуклеарным пространством. Цитоплазма содержит много свободных рибосом и полисом, а также 20-50митохондрий. В ходе дифференцировки структура ядра подвергается

инволютивным изменениям. Это выражается нарастающими явлениями конденсации хроматина, в силу чего в ядре начинает доминировать гетерохроматин. Ядрышко уменьшается, становится более компактным, а затем оно заменяется на зернистые нуклеомеры. Число ядерных пор заметно уменьшается.

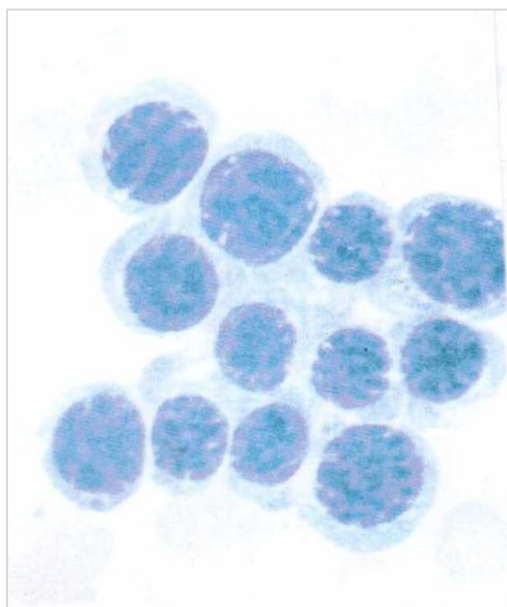
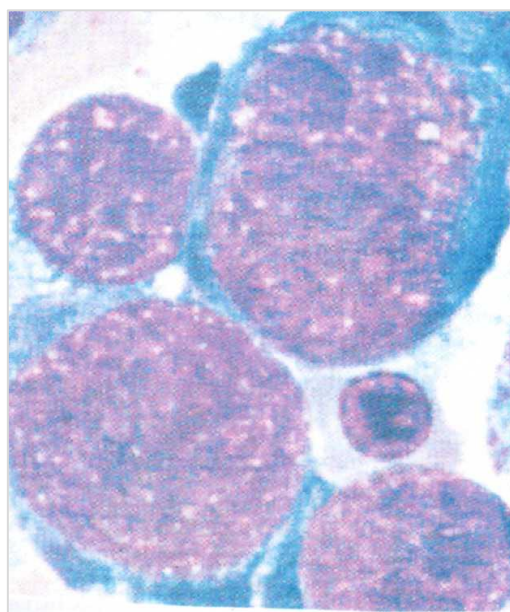
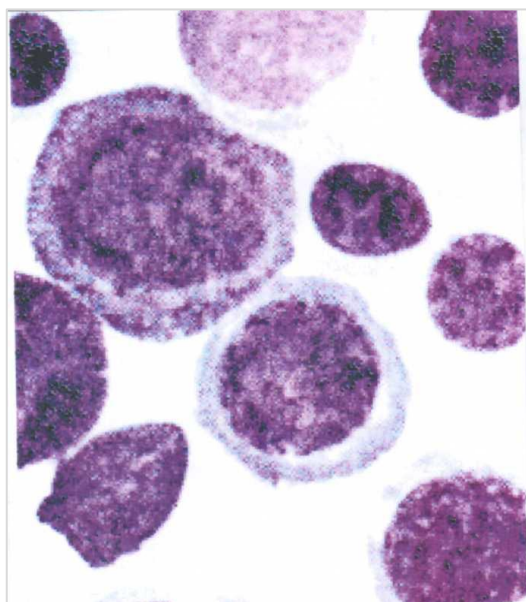
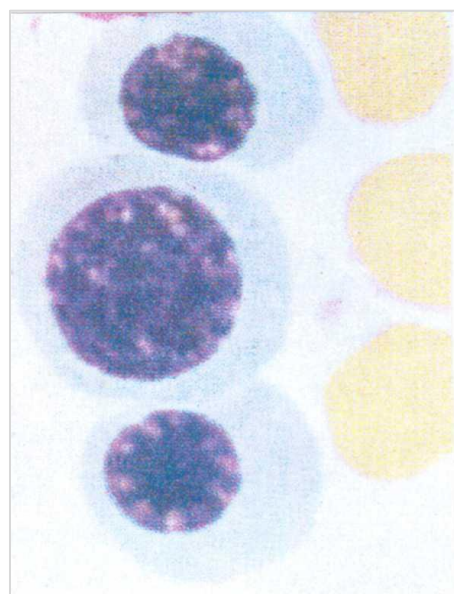
**а****б****в****г**

Рис. 22. Красный костный мозг. Элементы эритроидного ряда.

а – стволовые клетки.

б – проэритробласты

в – пронормобласты

г – пронормобласты и базофильные нормобласты

Пронормобласт

При световой микроскопии базофильный нормобласт имеет размеры от 18 до 15мкм. Ядро округлое, четко очерченное, характеризуется грубым сплетением хроматиновых нитей. Протоплазма голубого цвета. Вокруг ядра располагается узкий светлый ободок – перинуклеарная зона, (рис 22,в).

Базофильный нормобласт

Ядро – грубое с тенденцией к колесовидному расположению глыбок хроматина, цитоплазма слабо базифильная. (рис. 22,г). Гетерохроматин расположен ближе к ядерной мембране. Ядрышки не всегда обнаруживаются. В структуре эндоцитоплазматического ретикулула существенных изменений не отмечается. По прежнему содержится большое количество рибосом. Матрикс митохондрий чаще электронноплотный.

Полихроматофильный нормобласт

Ядро резко уплотняется, часто расположено эксцентрично. В нуклеоплазме преобладают крупные массы гетерохроматина, часто разделяющиеся на фрагменты. Ультрамикроскопические исследования показывают, что иногда хроматин как бы выходит за пределы ядерной оболочки в цитоплазму в виде отростков. В цитоплазме много рибосом. Количество митохондрий в цитоплазме заметно убывает (рис. 23,а).

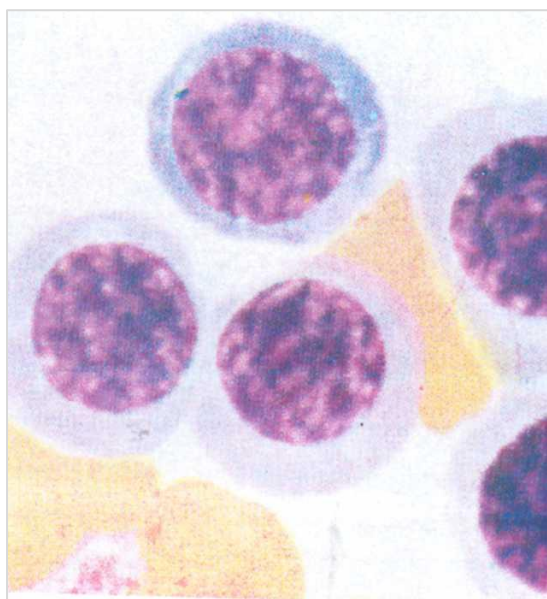
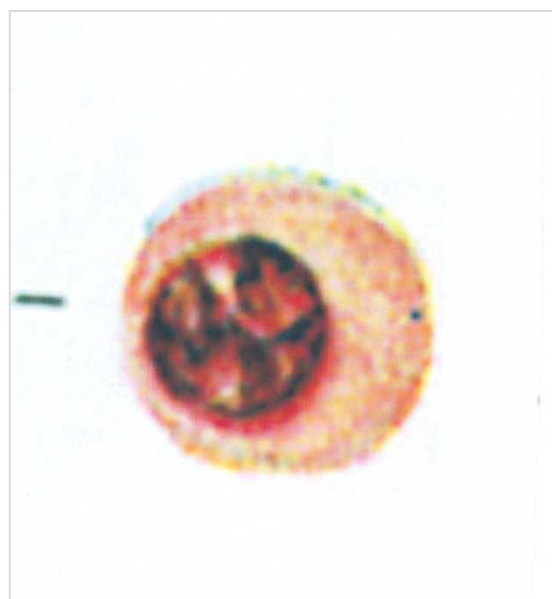
**а****б**

Рис. 23. Элемент красного костного мозга: а – нормобласт полихроматофильный; б – оксифильный нормобласт

Оксифильные нормобласты

Размеры клетки уменьшаются до 11-12 мкм. Ядро уплотняется и содержит в основном гетерохроматин в виде пикнотических глыбок. Ядрышко отсутствует. Ядро часто делится амитотически на 2-3 фрагмента, тесно связанные друг с другом (рис 23,б). Цитоплазма оксифильная. Вакуолизированные митохондрии отличаются прозрачным матриксом, отсутствием крист, либо перестройкой в ламеллярные тельца. Подвергается деструкции сеть эндоплазматического ретикулума.

3.2. Механизм созревания нормобластов

По вопросу созревания нормобластов и перехода их в зрелые нормоциты до сих пор нет единой точки зрения. Негели [189], Папенгейм [197] считали, что ядро нормобласта у млекопитающих растворяется в его цитоплазме и идет на построение гемоглобина. На рисунке 24 – изображения форм эритроцитов, появляющихся в периферической крови при патологических состояниях, которые выделял Негели.

Жолли [159], Максимов А.А. [177], Winqvist Q. [227], Weidenreich F. [228] Кассирский И.А. [52] полагали, что ядро выталкивается целиком, как «косточка при надавливании на вишню» (рис. 24; 3,4).

Максимов А.А. указывал, что в некоторых случаях ядро предварительно может распадаться на отдельные частицы, которые затем выталкиваются из нормобласта одна за другой (рис. 24; 1, 2). При этом в процессе созревания нормобласта ядро может подвергаться пикнозу, кариорексису или лизису.

При этом остатки ядра остаются в созревающем эритроците в виде телец Жолли [159] (рис. 24; 10-12), колец Кебота (рис. 24; 13-16), либо хроматиновыми зернами (рис. 24; 13,14,17-23).

Таким образом, единой точки зрения по вопросу механизмов созревания нормобластов и их перехода в эритроциты нет. При подсчете нормобластов с различными видами денуклеации отмечается, что выталкивание ядра целиком в норме составляет наибольший процент. Кариорексис и кариолизис встречается чрезвычайно редко: не более 1:2000-1:4000, то есть 0,05-0,025% у числа всех нормобластов.

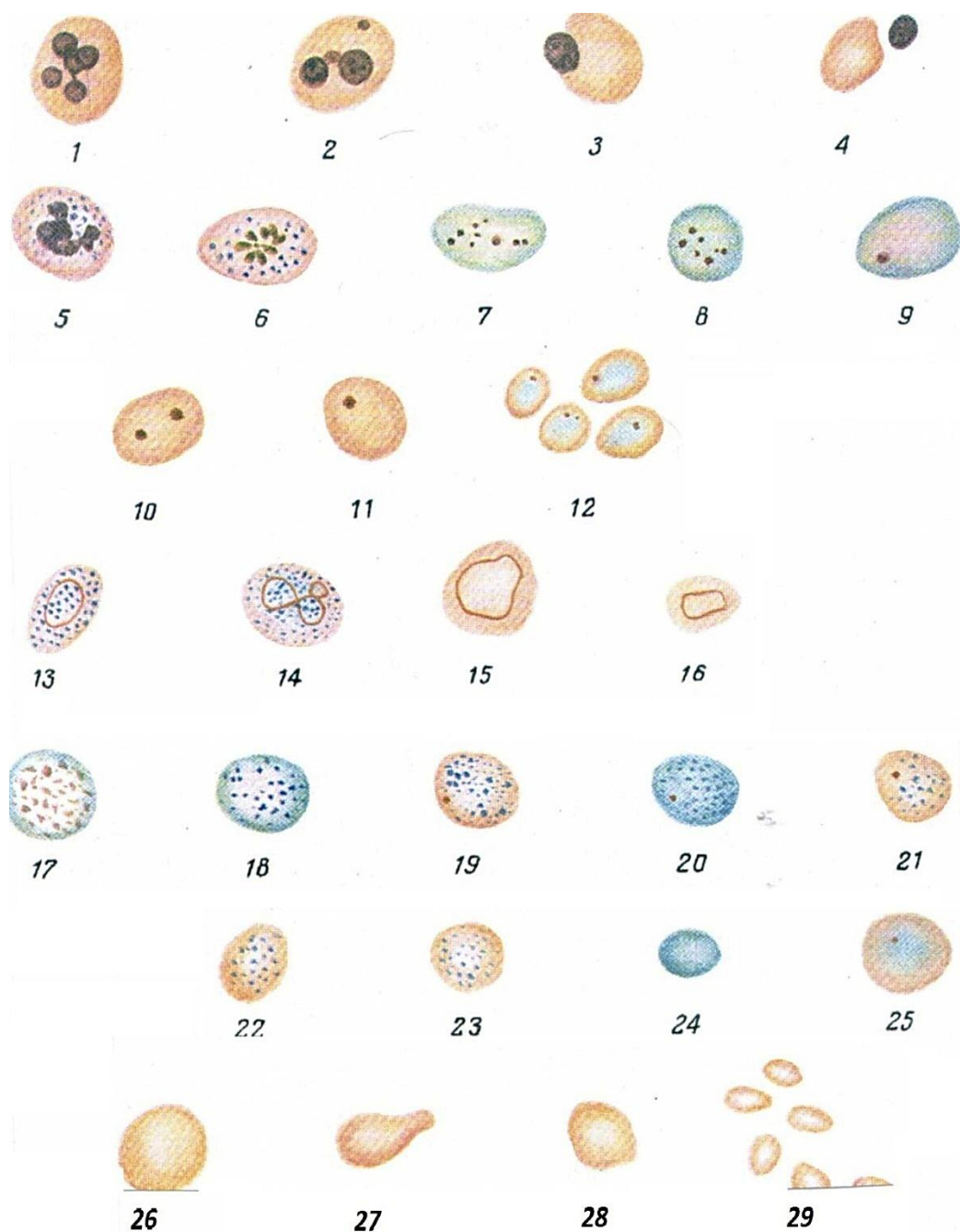


Рис. 24. Различные формы эритроцитов, появляющиеся в периферической крови при патологических состояниях (по Негели), 1, 2 – нормобласты в стадии кариорексиса; 3, 4 – энуклеация нормобластов путем выталкивания ядра; 5-9 – распад ядра с образованием телец Жолли в базофильно пунктированных эритроцитах (5, 6) и полихроматофильных эритроцитах (7, 9); 10, 11 – тельца Жолли в ортохромных эритроцитах у больного после спленэктомии; 12 – хроматиновые пылинки в эритроцитах; 13-16 – кольца Кебота в базофильно пунктированных и ортохромных эритроцитах (при пернициозной анемии в стадии регенерации); 17-23 – базофильно пунктированные эритроциты; 24, 25 – полихроматофильные эритроциты (микроцит и макроцит); 26 – мегалоцит при пернициозной анемии; 27 – пойкилоцит при пернициозной анемии; 28 – нормоцит; 29 – микроциты. (Рисунок выполнен И.А. Кассирским и Г.А. Алексеевым 1970).

В ходе исследования этого явления нельзя не отметить, что существует еще одна разновидность денуклеации: частичное выталкивание ядра. При этом ядро перешнуровывается на две, три и даже четыре части. Однако полное разделение на части при этом не наступает, продукты деления связаны между собой ядерными мостиками. Процент нормобластов с амитотически делящимся ядром бывает очень высок – 4,8- %.

Амитотическое деление ядра нормобластов не связано с их размножением и целиком отражает процесс их созревания. Иногда можно видеть, что часть сегментов амитотически поделившегося ядра выталкивается за пределы клетки, в то время как другая его часть находится в теле клетки.

Как правило, выталкивается в таких случаях большая часть поделившегося ядра (рис. 25 а, б).

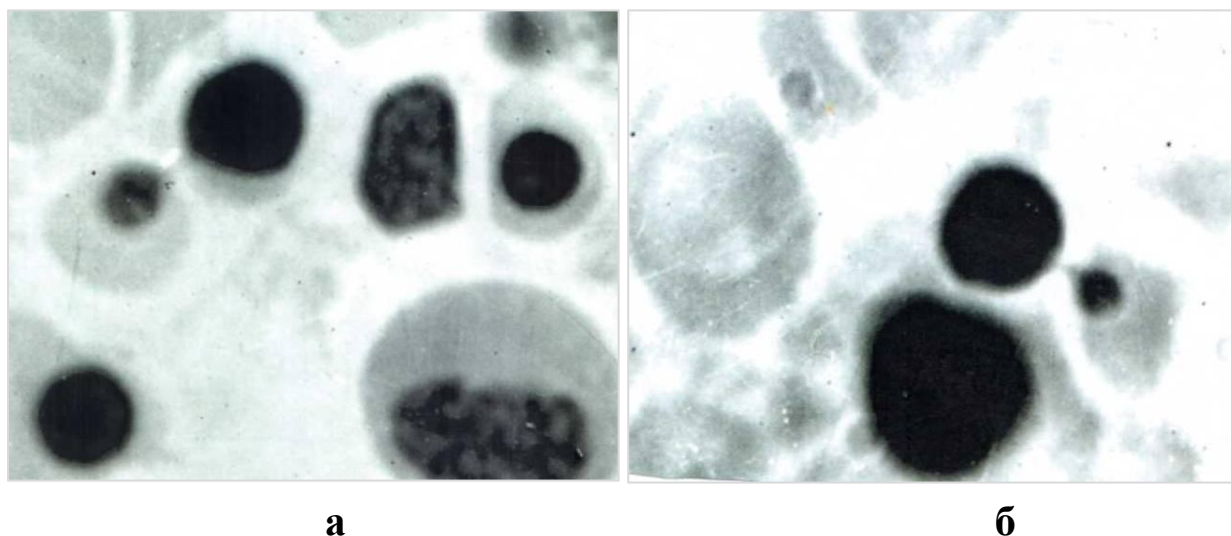


Рис. 25. Красный костный мозг кролика. Этапы созревания нормобласта. Выталкивается большая часть ядра, которая еще не теряет связи с оставшейся в теле нормобласта меньшей его частью.

В дальнейшем часть ядерного вещества, покинувшего пределы нормобласта, все больше удаляется от него, что видно по ядерному мостику, соединяющему выброшенную часть ядра с той частью, которая остается в теле клетки. Число таких нормобластов составляет 0,3-1%. При повышенных требованиях к гемопоэзу – массивное кровопотери – на 7-10 день после кровопускания число таких нормобластов увеличи-

вается до 10-13%, возвращалась к исходному содержанию (3-4%) через 30 дней после кровопускания. Несмотря на значительный удельный вес этого способа денуклеации, трудно оценить его целесообразность. Вероятно, для окончательного созревания нормобласта и перехода его на высокий уровень синтеза гемоглобина необходимо присутствие ядерного вещества. По мере накопления гемоглобина остатки ядерного вещества в клетки лизируются (рис. 26, 27).

Анализируя процесс денуклеации нормобластов с помощью программы Bio Vision, позволяющей оценивать плотность структуры мы можем видеть, как процесс созревания нормобласта зависит от состояния ядра. На рисунке 26 (а, б, в) в поле зрения видны этапы постепенного уплотнения ядра нормобласта для его полного созревания.

Важно отметить, что если процесс формирования гемоглобина не закончился, то процесс денуклеации может задержаться вплоть до его полного выполнения функциональной необходимости (рис. 26, г).

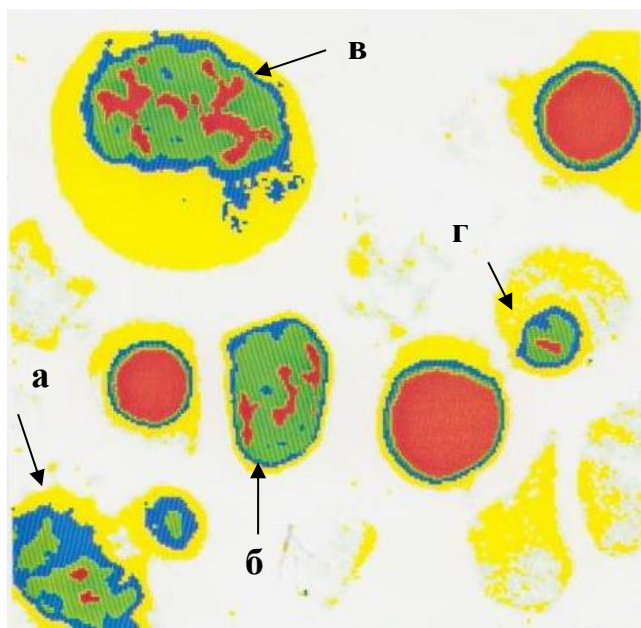


Рис. 26. Процесс денуклеации ядра нормобласта. Компьютерный метод по программе Bio Vision. Последовательные этапы созревания нормобластов адекватные степени нарастания пикнотизации ядра (а, б, в). На рисунке 26 г (крупным планом) показано, что даже небольшое количество оставшегося ядра выполняет свои метаболические функции по формированию гемоглобина.

3.3. Ретикулоциты

Окончательно оксифильные нормобласты превращаются в ретикулоциты, из которых 1-3% попадают в периферическую кровь. Введение в гематологическую практику понятия «ретикулоцит» относится к двадцатым годам двадцатого столетия. Хотя они были описаны уже

Эрлихом (1881). Более обстоятельно их описал Паппенгейм [197]. Природа ретикулоцитов, тем не менее, остается не совсем ясной. Некоторые исследователи считали, что ретикулоциты представляют собой старые эритроциты, перед гибелью окрашивающиеся суправитально. Другие считали, что ретикулоциты – это элементы крови с пониженным сроком жизни. И только в середине двадцатого столетия было установлено, что ретикулоциты являются начальной стадией формирования дискоцитов. Количество ретикулоцитов, находящихся в любой момент в крови, очевидно равно суточной продукции ретикулоцитов, умноженной на среднюю длительность их жизни, выраженную в сутках [70].

Средняя длительность жизни ретикулоцита представляет собой среднее время созревания, то есть время, необходимое для превращения его в зрелый эритроцит. Следовательно, суточная продукция ретикулоцитов в периферической крови равна отношению количества ретикулоцитов к среднему времени их созревания, выраженному в сутках. Так как зрелые эритроциты возникают в результате созревания ретикулоцитов в периферической крови, то суточная продукция эритроцитов должна быть равна суточному количеству поступающих в кровь ретикулоцитов. Следовательно, количественно эритропоэз определяется отношением числа ретикулоцитов к средней продолжительности их созревания.

Несколько о морфофункциональной характеристике ретикулоцитов, как мы их представляем на сегодняшний день. Таким образом, *ретикулоцитами* называют эритроциты, характеризующиеся наличием в них базофильного вещества, выявляемого при суправитальной окраске в виде сеточки [135, 137]. По размерам ретикулоциты приближаются к размерам эритроцита. Прежде чем ретикулоциты появятся в периферической крови, они задерживаются в стромах костного мозга от 2 до 4 дней. Полное развитие эритроцита занимает приблизительно 80-82 часа, при этом на долю ретикулоцита приходится 40-42 часа. За это время они полностью теряют ретикулум и превращаются в зрелые эритроциты.

В периферической крови в норме насчитывается около 1,0-1,5% ретикулоцитов. В зависимости от группировки зернистости различают 5 групп ретикулоцитов.

Группа I: базофильное вещество занимает вид венчика – это чаще всего ядросодержащие ретикулоциты (нормобласты).

Группа II: базофильное вещество имеет вид клубка или глыбки – это глыбкообразные ретикулоциты (рис. 27,а).

Группа III: базофильное вещество располагается в виде сеточки – полносетчатые ретикулоциты (рис. 27, б).

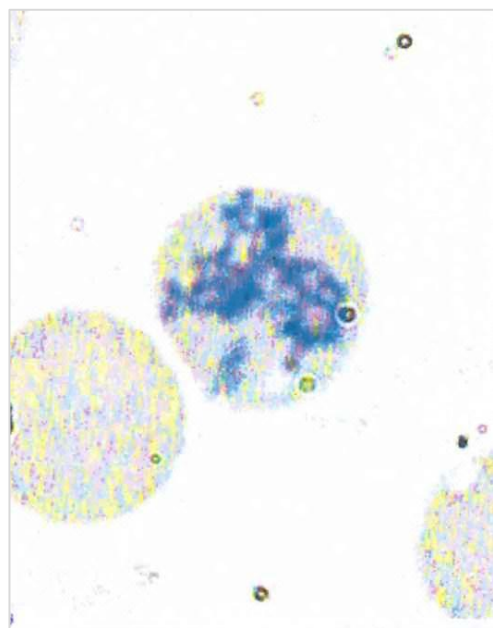
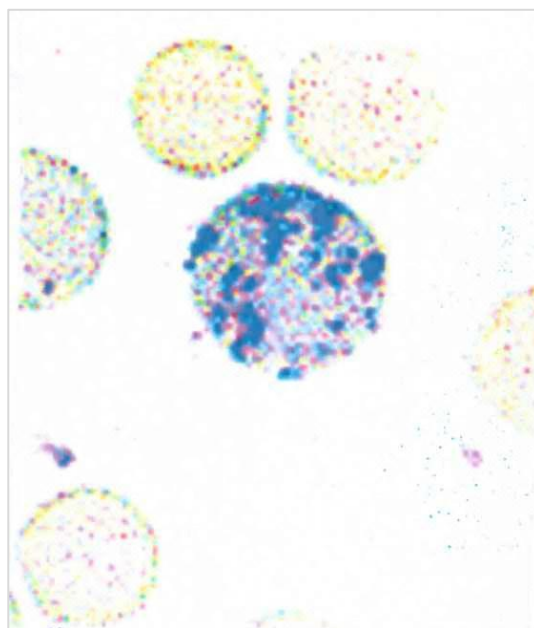
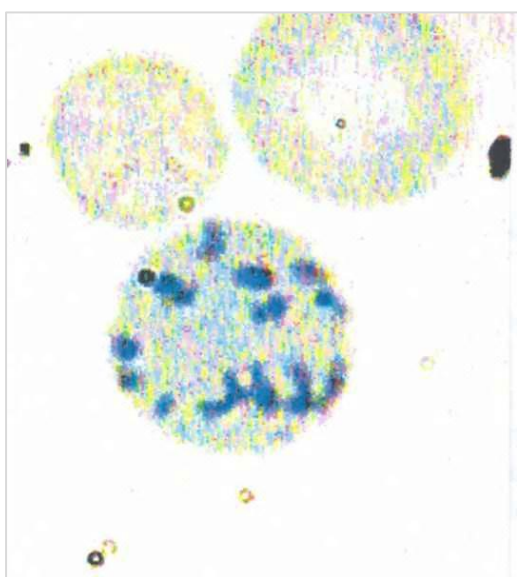
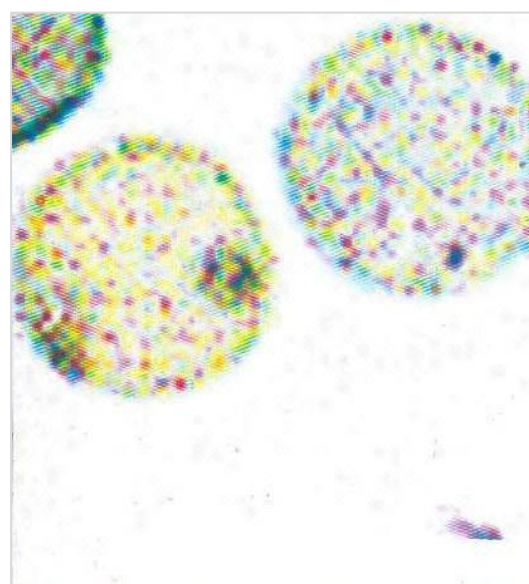
**а****б****в****г**

Рис. 27. Морфологические формы ретикулоцитов периферической крови: а – глыбчатая форма; б – полносетчатая форма; в – неполносетчатая форма; г – пылевидные ретикулоциты.

Группа IV: базофильное вещество имеет вид отделенных нитей – это неполносетчатые ретикулоциты (рис. 27, в).

Группа V: базофильное вещество расположено в виде отдельных мелких зернышек – пылевидные ретикулоциты (рис. 27, г).

Количественно эритропоэз определяется отношением числа ретикулоцитов к средней продолжительности их созревания. Если обозначить относительное количество ретикулоцитов, выраженное в тысячных долях, через r , количество эритроцитов в кубическом миллиметре через N , общий объем крови в организме через V мм³ и среднее время созревания ретикулоцитов через T_r часов, то можно получить представление, отражающее интенсивность эритропоэза по формуле общей суточной продукции эритроцитов $P_{об}$:

$$P_{об} = \frac{V \cdot N_r \cdot 24}{T_r \cdot 1000} \cdot \frac{эр}{сутки} \quad \text{или}$$

$$P_{1000} = \frac{r \cdot 24}{T_r} \cdot \frac{эр}{1000 эрсутки} \quad (\text{Мосягина Е.Н., 1962})$$

Все приведенное касается тех случаев, когда соблюдается постоянство общего объема крови в организме и количество эритроцитов в 1 мм³. Поэтому при изучении эритропоэза необходимо учитывать действительное количество эритроцитов и вести расчет не на 1000 эритроцитов, а на 1 мм³. В физиологических условиях число вновь генерируемых эритроцитов равно числу разрушающихся, благодаря чему сохраняется постоянное нормальное их количество. Разнообразные динамические процессы регуляции и изменения количества эритроцитов и содержание гемоглобина объединяются понятием «эритрокинетика». Для изучения эритрокинетики необходимо учитывать, чем обуславливается гибель эритроцитов и как регулируется образование эритроцитов. Разрушение эритроцитов может быть вызвано двумя причинами: старение и постепенное истощение необходимых для их жизнедеятельности жизненных ресурсов, приводящих к гибели клеток. Помимо этого причиной разрушения эритроцитов являются различные случайные факторы, связанные с их движением и физико-химическими свойствами окружающей среды.

Выход эритроцитов в циркулирующую кровь представляет собой конечный этап сложного процесса эритропоэза, при котором эритроидные клетки проходят долгий путь развития от стволовой клетки до зрелого эритроцита. По мере созревания клетки эритроидного ряда формируют свою клеточную поверхность, представленную мембраной. Все клеточные мембраны, в том числе и мембраны клеток эритроидного ряда представляют собой сложную смесь белков и липидов.

Липиды в мембранах полярны и образуют двойной слой, хорошо контактирующий снаружи с водой и непроницаемый для большинства растворенных в ней веществ. Белки мембран связаны с липидным слоем своими гидрофобными участками, часто они проходят через липидный слой насквозь. Белки с липидами создают непрерывную структуру мембраны. В целом мембрана находится в жидком состоянии – липиды и большинство белков способны свободно перемещаться в ней. Многие белки тесно связаны с другими белками, входящими в состав мембраны. На наружной поверхности мембраны находится ряд специализированных молекул – *рецепторов*. Они выполняют роль для узнавания других клеток или находящихся в крови иммунных элементов. Большинство рецепторов являются по своему строению гликопротеидами. Белковая часть их погружена в липидный бислой, а углеводная часть выступает наружу. Так в мембранах зреющих эритроцитов наружу выступает углеводом часть гликофорина, которая может легко контактировать с находящимися в плазме крови антигенами или вступить в связь с белками других клеточных мембран (рис. 28.).

В процесс созревания эритроидных клеток в красном костном мозгу последние на стадии зрелого ретикулоцита или дискоцита вступают в соприкосновение с внутренней стороны мембраны кровеносной лакуны костного мозга (рис. 29).

Вероятнее всего мембрана эритроцита через гликофорин вступает в контакт с мембраной кровеносной лакуны, что и становится сигналом ее перестройки. Увеличивается содержание среди фосфолипидов лизофосфатидилхолина, что снижает микровязкость мембраны, и она становится более текучей или просто раздвигается, пропуская зрелую клетку во внешнее кровеносное русло, забирающее кровяные элементы из костного мозга (рис. 30).

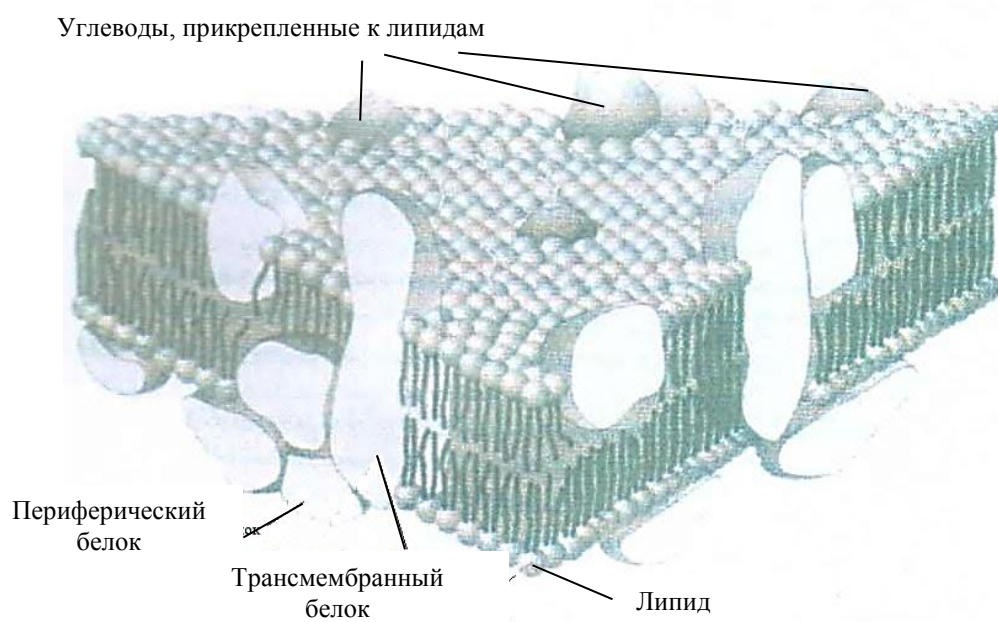


Рис. 28. Схема строения мембраны эритроцита (Д. Фаллер, Д.Шилдс, 2006) [132].

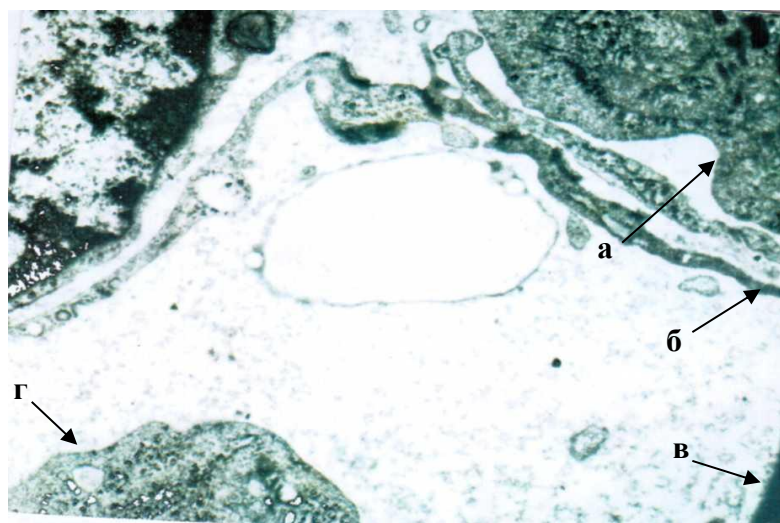


Рис. 29. Электронная микроскопия.

а – контакт созревшего нормобласта с мембраной лакуны костного мозга; б – мембрана кровеносной лакуны костного мозга; в – синус, через который собирается кровь из костного мозга; г – зрелый эритроцит.

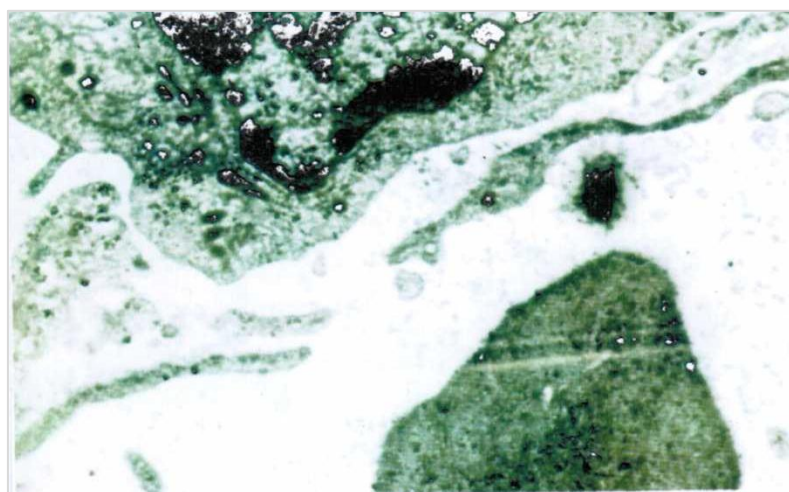


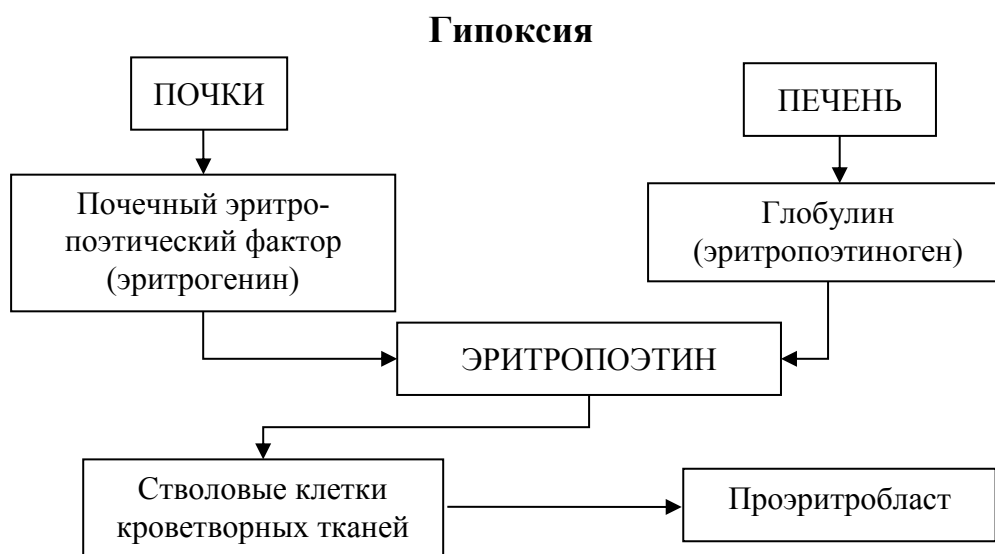
Рис. 30. Из кровеносной лакуны через образовавшееся пространство в мембране внедряется в кровяное русло зрелый элемент костного мозга. Электронная микроскопия.

Эритрон является четко саморегулирующейся системой. В чем поддерживается ритмичность и автоматичность и что позволяет количеству эритроцитов оставаться неизменным. Саморегуляция эритропоэтической системы обеспечивается за счет обратных связей, реализующихся посредством нервных, гуморальных, биохимических и других механизмов. Наиболее мощным регулятором эритропоэза следует признать влияние O_2 , доставляемого эритроцитами к различным тканям организма [77, 187, 188]. Главным компонентом при этом следует считать гемоглобин во всех эритроцитах при нормальном цветовом показателе. При уменьшении числа клеток эритропоэз должен усиливаться, а при увеличении их числа – снижаться. Подобный механизм регулирования способен обеспечить необходимую стабильность количества эритроцитов в норме и в значительной мере компенсировать нарушения нормального эритроцитарного баланса при эритропатиях.

3.4. Эритропоэтин

В регуляции эритропоэза принимает участие гормон эритропоэтин, воздействующий на стволовые клетки. Наличие эритропоэтина в плазме здоровых людей не вызывает сомнения [144, 157, 158]. Эритропоэтин является постоянно действующим физиологическим фактором и регулятором эритропоэза. В крови новорожденного эритропоэтина значительно больше, чем у взрослых лиц [42, 43]. Количество эритропоэтина в моче идентично его плазменному содержанию. Эритропоэтин был обнаружен в слюне и желудочном соке [90]. И также активность его в этих жидкостях соответствовала эритропоэтину в плазме крови. Образование эритропоэтина стимулируется при гипоксиях различного происхождения. Повышение уровня эритропоэтина отмечается после однократного кровопускания или при гемолитической анемии, а также при содержании животных в барокамере при пониженном атмосферном давлении.

Практически никто не сомневался, что эритропоэтин вырабатывается в почках [154]. Острая почечная недостаточность неизбежно приводит к глубокому нарушению гемопоэза в целом с преимущественным поражением эритропоэза. В последние годы установлено, что эритропоэтин может вырабатываться клетками костного мозга (Дыгай А.М.).

Схема образования эритропоэтина (Gordon, 1970)**3.5. Эритрон**

Эритроном называют общую массу эритроидных клеток, которые заселяют как красный костный мозг, где идет их процесс созревания, так и циркулирующих в кровеносных сосудах, выполняя газо-транспортную функцию. Незрелые клетки эритроидного ростка красного костного мозга способны длительное время поддерживать необходимый уровень эритроидных элементов [107, 108].

При повышенной потребности организма в эритроцитах стимулируется продукция стволовых клеток, обладающих высокой самоподдерживающей способностью. Деструкция эритроцитов лежит вне пределов эритрона и тесно связана с ретикулоэндотелиальной системой. Поэтому складывается целая система крови, в составе которой имеет место – возобновление, аппарат регуляции состава эритроидных элементов, а также разрушение их [62].

В периферической крови взрослого человека в норме содержится $25 \cdot 10^{12}$ эритроцитов. Средняя продолжительность их жизни – 120-150 дней [77]. Из красного костного мозга ежедневно выходит в циркулирующую кровь до $2 \cdot 10^{11}$ эритроцитов и столько же этих клеток разрушается ретикулоэндотелиальной системой главным образом в селезенке.

Следует заметить, что продукты распада эритроцитов (железо и протеины) поступают вновь в циркулирующую кровь, используясь вновь в гемопоэзе. Количественно эритрон может находиться в состоянии гиперплазии (полицетимия) или гипоплазии (апластическая анемия).

Первый этап оценки эритрона связан с оценкой состояния ядродержащих клеток эритропоэза в красном костном мозге. Наиболее объемныеместилища красного костного мозга – в длинных трубчатых костях, в позвоночнике и костях таза. У здорового человека в возрасте 40-50 лет, общий объем красного костного мозга, составляет приблизительно 1500-1800 мл, из которого 1000-1200 мл приходится на долю активной массы.

Общее количество ядерных эритроидных клеток во взрослом организме насчитывается в пределах $2,7-8,7 \cdot 10^9$ [128, 169, 196, 199, 218]. Оценка их состояния: нарастание числа и соотношение различных групп ядродержащих клеток проводится либо путем вычисления митотических индексов» либо изучением величины поглощения введенного в организм радиоактивного железа эритроидными клетками.

Общая количественная характеристика эритрона дает лишь приближенное представление о некоторых сторонах его состояния. Эритроидный росток костного мозга сам по себе – гетерогенная клеточная популяция, состоящая из предшественников различной зрелости и потенции к пролиферации и дифференцировке.

По мнению авторов эритрон можно разделить на несколько функциональных групп [77]. Начало этой цепи занимает плюрипотентная стволовая клетка, которая с какого-то момента теряет свои примитивнее свойства и переходит в серию эритроидных предшественников. Затем в процессе дифференцировки ядерные элементы некоторое время сохраняют способность к размножению, затем созревают, после чего выходят в циркулирующую кровь в виде ретикулоцитов и в основном эритроцитов.

В красном костном мозгу находятся все ядерные предшественники эритроцитов, из которых можно составить ряд процесса созревания гемоглобинсодержащих элементов: эритроидный ряд. Родоначальником этого ряда признано считать стволовую клетку (Stem cells), которая

дает начало дифференцирующим клеткам всей эритроидной цепи [219]. Стволовые клетки (СК) в обычных условиях митотически мало активны, хорошо переносят воздействие ионизирующей радиации, а также целого ряда токсических веществ. Хорошо переносят СК и действие низкой температуры вплоть до $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ [195]. На 100 тысяч ядерных клеток костного мозга приходится 10-20 стволовых клеток, то есть 0,01-0,02% [107].

По-видимому, стволовые клетки формируются первоначально в желточном мешке, а затем мигрируют в кровеносное русло в закладку печени, которая у млекопитающих становится крупным очагом гемопоэза на первом этапе эмбриогенеза [184]. Следует заметить, что морфологическая идентификация СК и до сегодняшнего дня испытывает затруднения. Считают, что СК цитологически сходна с малым лимфоцитом [143, 146]. Так, Haas R.I. [146] после введения тимидиновой радиоактивной метки отметил, что в костном мозгу происходило заметное уменьшение меченных малых лимфоцитов, но наряду с этим появлялись вновь образовавшиеся эритроидные клетки, индексы метки лимфоцитов при этом снижались. По снижению метки стволовые клетки в условиях после лучевого восстановления размножаются со скоростью 2 делений в сутки [146, 170].

По мнению Osgood F. [196] при делении стволовых клеток появляются две дочерние (a-2a), которые сохраняют свойства стволовых. Если размножение идет по типу «a-ап», создается ситуация, при которой одна из клеток остаётся стволовой, а другая начинает дифференцироваться и после серии последующих делений начинает дифференцироваться и через несколько поколений окончательно утрачивает способность к размножению.

Превращение клеточных элементов «a» в тип «п» происходит только в период разделения. Варианты симметричного (a-2a) и несимметричного размножения (a-ап) поддерживают постоянный состав стволовых клеток и пополняют убывающее отделение дифференцирующихся клеток.

По мнению в процессе деления одной стволовой клетки через 6 последующих делений образуется 2 стволовые и 7 дифференцирую-

щихся клеток. При этом нужно заметить, что в деление запускается такое количество СК, после разделения, которых восстанавливаются стандартные нормы отделения стволовой популяции. Должны существовать регуляторные механизмы, позволяющие поддерживать постоянство состава, как примитивных, так и дифференцирующихся форменных элементов кроветворения. Неограниченная способность стволовых клеток к росту постоянно подавляется специфическим ингибитором делений, циркулирующим в пределах костного мозга [196]. В условиях физиологического регулирования снижение концентрации ингибитора приводит к нарастанию числа делений стволовых клеток. Репрессор делений гемопоэза был назван кейлоном по аналогии с гормоном подобного механизма действия, обнаруженным в эпидермальной ткани. Скорость дифференциации полипотентных элементов в ядерные клетки эритроидных предшественников определяется эритропоэтином, который не оказывает влияния на СК, поскольку регуляция их деления осуществляется кейлоном [170, 196]. Эритропоэтин воздействует на более поздние стадии развития примитивных форменных элементов, индуцирует в них синтез гемоглобина и побуждает их переходить в ядерные эритроидные элементы.

Было доказано, с помощью автордиографии с радиоактивным железом способность молодых ядерных эритроидных клеток включать железо. Эта клетка довольно крупного диаметра, не содержит гемоглобина, имеет узкий ободочек цитоплазмы синего цвета. В цитоплазме имеется светлая перинуклеарная зона. В ядре различается несколько ядрышек. Такую клетку эритроидного ряда принято называть эритробластом [52].

Далее идет серия нормобластов [52]. Нормобласты в зависимости от окраски цитоплазмы подразделяются на базофильные, полихроматофильные и оксифильные. Провести четкую грань между этими стадиями очень трудно, так как, это быстро протекающий процесс созревания, сопряженный с накоплением в цитоплазме базофильного нормобласта белка гемоглобина. Поэтому неудивительно, что некоторые авторы пытаются ввести промежуточные стадии. Так, учитывая размеры ядра, содержание гемоглобина выделяли два типа базофильных и 3 ти-

па полихроматофильных нормобластов на основании включения Fe^{59} в ядерные предшественники, разделил нормобласты всех стадий зрелости по величине ядра на большие, средние и малые [162].

По мере гемоглобинизации цитоплазмы, независимо от величины ядра, скорость включения H^3 -тимидина прогрессивно падает. Захват клетками S^{35} -метионина и Fe^{59} зависит не только от степени дифференциации цитоплазмы, но и от величины ядра. Базофильные нормобласты со средним ядром включают изотопы менее активно, чем полихроматофильные нормобласты с большим ядром. Базофильные и полихроматофильные нормобласты со средним ядром, имеющие одинаковые размеры ядер утилизируют метионин и железо в различной степени [77].

Обновление клеток эритроидного ряда

Эритроцит находится в динамическом гомеостазе, обеспечивая это состояние скоростью появления новых клеток и темпом их отмирания. Под временем обменивания подразумевается временный отрезок в течение, которого все форменные элементы системы полностью замещаются новыми. Константа обмена даёт ответ на вопрос, какая часть популяции обновляется в единицу времени. Скорость же пролиферации (обновление) есть величина, которая определяется количеством клеток ткани, обменивающихся в единицу времени. Над всеми этими показателями главствует еще один: число профилирующих клеток в ткани.

Исследователи прибегают к изучению косвенных показателей пролиферации, среди которых широкое распространение получил метод определения митотических индексов. Митотические индексы стали определять как показатель величины пролиферативной способности ткани. Митотический индекс выражает отношение числа клеток в митозе к общему количеству клеток. Он зависит от продолжительности митоза (t_M) и среднего времени пребывания клетки в популяции (t).

$$\frac{N_M}{N} = J_M = \frac{t_M}{t}, \text{ где}$$

N — общее число клеток в популяции

N_M — число клеток в митозе

J_M — митотический индекс

t_M – продолжительность митоза

t – среднее время нахождения клетки в популяции.

Митотические индексы рассчитываются для клеток одинаковой стадии зрелости. Переход ядерной эритроидной клетки в более зрелый статус осуществляется не сразу после митоза, а на разных этапах интерфазы [162]. Поэтому время обращения клеточной популяции (T) через митотические индексы будет неточным. Предлагают применять поправочный коэффициент, который отражал бы экспотенциальный характер убыли клеток из пролиферирующего отделения эритроидных предшественников в связи с дифференциацией. Этот коэффициент равен – $C = 0,693$ [150]. Поэтому митотический индекс следует вычислять по формуле:

$$J_M = C \cdot \frac{t_M}{T}$$

В среднем у здорового человека продолжительность митоза для ядерных эритроидных клеток варьирует в пределах 0,5-1,5 часов. Более дифференцировано эти показатели выглядят по мнению [209] так:

- | | | |
|------|--------------------------------|--------------------|
| I. | Эритробласты | – 77 ± 4 мин |
| II. | Базофильные нормобласты | – 91 ± 3 мин |
| III. | Полихроматофильные нормобласты | – 106 ± 2 мин. |

Частота митозов также имеет большое значение в оценке интенсивности возобновления той, или иной популяционной группы эритроидного ряда.

По мнению ряда авторов, эти показатели можно представить в следующем виде:

- | | |
|--------------------------------|----------------------------------|
| Все элементы эритропоза: | – 3,3% (Jara J., 1942) [156] |
| | – 2,0% (Горизонтов М.Н., 1966) |
| | – 1,8% (Алексеев Г.И., 1965) [1] |
| Базофильные нормобласты | – 3,1% (Astaldi J., 1960) [105] |
| Полихроматофильные нормобласты | – 2,0% (Astaldi J., 1964) [106] |
| Базофильные нормобласты | – 4,9 (Kilmann S.A., 1964) |
- [162]
- | | |
|--------------------------------|----------------------------|
| Полихроматофильные нормобласты | – 5,6 (Kilmann S.A., 1964) |
|--------------------------------|----------------------------|
- [162]

Дифференциация клеток эритроидного ряда

Под дифференциацией эритроидного ряда следует понимать скорость перемещения молодых эритроидных клеток в сторону созревания эритроцита. Параметры дифференциации - цитологический вид клетки [169]. Темп созревания нормобластов неразрывно связан с их пролиферативной способностью. Пролиферация и дифференциация, по мнению Seno S. [214] являются взаимно исключаящими процессами жизнедеятельности клеток эритроидного ряда. Замедление скорости созревания влечет за собой увеличение темпа пролиферации и наоборот.

Вероятно, на этой основе базируется явление, получившее наименование микроцитоза и макроцитоза. При усиленной дифференциации ядерных эритроидных клеток сопровождающейся ранней денуклеацией, число делений в нормобластах уменьшается. Такой ускоренный переход в процессе созревания клеток эритроидного ряда приводит к образованию макроцитов. Наоборот, при замедлении скорости дифференциации ядерных клеток, они успевают разделиться на большее число раз, что ведет к образованию большего числа микроцитов [213].

Вероятно так, прямолинейно этот процесс оценить трудно, ибо при постгеморрагической анемии пролиферация резко возрастает, а при хронической снижается. Наверное, созревание и деление эритроидных предшественников подчиняется общему регуляторному механизму, контролирующему состав не только клеток в периферической крови, но и в костном мозге [77]. В таком случае ускорение дифференциации клеток должно неизбежно вести к повышению пролиферативной активности их, а её замедление к снижению темпа деления.

Отрезок перехода от эритроблеста до ретикулоцита исчисляется в среднем 6-8 днями. Это подтверждается методом радиоактивной метки ядродержащих клеток костного мозга и массовым появлением в периферической крови меченных ретикулоцитов или эритроцитов [170]. Дифференциации ядерных элементов эритропоэза, по данным этих же авторов, длится от 100 до 140 часов. По их мнению, большая часть эритроидных клеток обезъядеривается на стадии полихроматофильных нормобластов. Около 20% проходит стадию денуклеации на стадии оксифильных нормобластов. Таким образом, по мнению вышеуказанных

авторов, в пул созревания ядерных элементов эритропоэза входят средние и малые полихроматофильные и ортохромные нормобласты, теряющие, как они считают способность к делению, но продолжающие активно синтезировать РНК и гемоглобин. Только 10% полихроматофильных нормобластов включает H^3 -тимидин, а среди ортохромных нормобластов не обнаружено клеток, накапливающих H^3 -тимидин [220]. У ретикулоцитов синтез РНК значительно ниже, чем её потери [214]. А такие авторы как [174] вообще отрицают возможности синтеза РНК в ретикулоцитах.

Ядро эритроидного предшественника содержит генетический материал, который контролирует все разнообразные процессы, происходящие в клетке. По мнению Seno S. у базофильных нормобластов преобладают процессы анаэробного гликолиза, обеспечивающие деление клеток [214]. При переходе в стадию полихроматофильной зрелости эритроидная клетка начинает активно накапливать гистоны и переходить на окислительное фосфорилирование. Разворачиваются процессы синтеза стромальных белков и в первую очередь гемоглобина. В таких условиях процессы пролиферации начинают снижаться и становятся затем, по мнению автора невозможными. В последовательной смене направленности ферментативного профиля нормобластов можно усмотреть поступательное развертывание наследственной информации, происходит последовательное включение и функционирование генов, код которых закладывается еще на уровне стволовой клетки.

Этапы освобождения оксифильных нормобластов от исчерпавших кодовую систему управления останков ядра подробно еще не изучили. Имеются лишь внешнеморфологические описания этих процессов, позволяющие представить денуклеацию в виде цельного выталкивания ядра, либо после кариорексиса или после кариолизиса.

3.6. Гемоглобин

Гемоглобин – дыхательный белок, осуществляющий перенос кислорода от легких к тканям. Гемоглобин участвует в переносе также и CO_2 . Он содержится в эритроцитах всех позвоночных и некоторых беспозвоночных животных. В каждом эритроците насчитывается более 250

млн. молекул гемоглобина, содержащих 4 атома железа. Составные части гемоглобина, представленные белком глобином и его простетической частью гемом. Именно простетическая часть и является носителем железа, которое составляет 4% от массы молекулы гема ($C_{34}H_{32}O_4N_4Fe$).

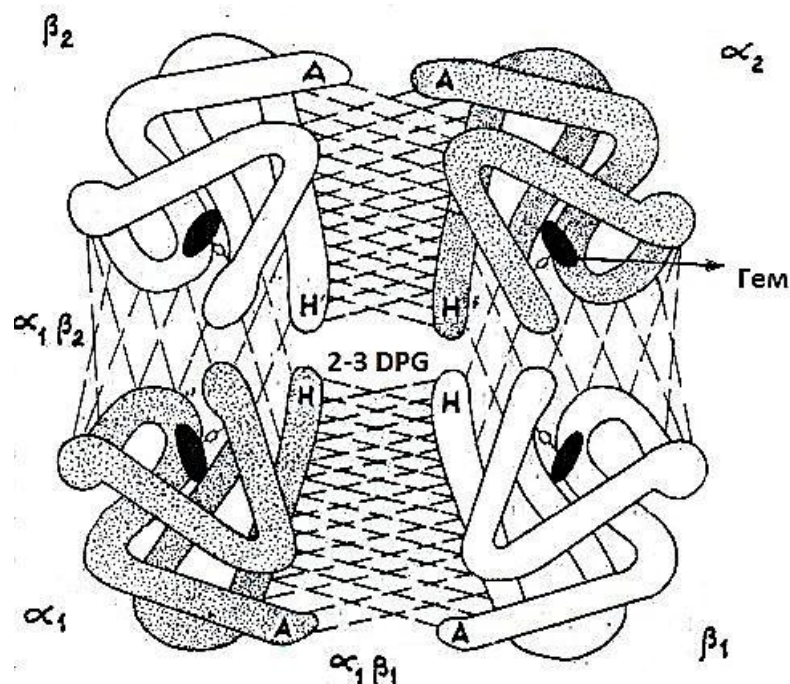


Рис. 31. Структура гемоглобина.

Гем – это комплексное соединение протопорфирина IX и состоит из 4 пирроловых колец, соединенных СН-мостиками. В гемме железо находится в центре протопорфиринового ядра и связано с 4 атомами азота пирроловых колец двумя главными (с замещением H^+ у атомов азота) и двумя дополнительными связями. Поскольку координационное число железа равно 6, остаются 2 неиспользованные координационные связи, которые располагаются в направлении, перпендикулярном плоскости гема. Одна из них реализуется при связи гема с глобином, а к другой присоединяется O_2 . Гем неустойчив и легко превращается либо в гематин с окислением Fe^{2+} до Fe^{3+} и присоединением к последнему OH^- , либо в гемин, содержащий вместо OH^- ионизированный хлор. Гемин образует устойчивые кристаллы. Гем одинаков для гемоглобина всех видов животных. Различия в свойствах гемоглобина зависят от глобина.

Белковая часть гемоглобина – глобин является тетрамером, в ее состав входят 4 попарно одинаковые полипептидные цепи, составляя

белковую часть молекулы. N – концевые остатки в обоих цепях образованы валином; C – концевые α цепей – аргинином, а β – цепей – гистидином. Как в α , так и в β – цепях последнее положение с C-конца занимает тирозин [141].

Взаимодействие гема и глобина обусловлено многоточечными контактами, возникающими между ними. Внутри каждой полипептидной цепи глобина недалеко от поверхности находится гидрофобная впадина (рис. 32), в которой располагается гем, образуя 3 типа связей с глобином. Чем ориентируется так, что его неполярные метильные группы направляются во внутреннюю часть впадины и входят в состав уже сформированного гидрофобного ядра белковой глобулы. В результате образуется 60 неполярных контактов гема с цепью глобина.

В результате такого жесткого контакта гема с глобином создается возможность образования химической связи между железом и гистидином F-8. Большое значение, как показали исследования, имеют неполярные связи гема с глобином.

Нарушение неполярных контактов приводит к меньшей устойчивости гемоглобинов и изменению их функциональных свойств. Самое главное, что при этом возникает – ослабление гем-гем взаимодействия и увеличение сродства к O_2 с практическим сохранением эффекта Бора [59].

Связь гистидина F-8 с железом гема имеет важное значение для осуществления процесса оксигенации Hb. F-8 является инвариантной аминокислотой в молекуле Hb. Инвариантные аминокислоты это те, которые одинаковы для различных видов животных и существуют для выполнения функции переноса O_2 . Связь с гистидином F-8 (проксимальным) влияет на присоединение O_2 к Fe^{2+} гема. Находясь в неполярной среде, гем неспособен реагировать с O_2 . Он приобретает эти свойства только в присутствии F-8 гистидина. Гистидин как сильный донатор фиксирует гем в глобине, повышает основность Fe^{+2} гема и тем самым способствует образованию связи с акцептором, которым и является молекула O_2 . Снижение гистидина под влиянием внешних факторов снижает весь процесс оксигенации гемоглобина в эритроците. Так, обострение цитомегаловирусной инфекции оказывает сильное воздей-

ствие на уровень содержания гистидина в эритроцитах (рис. 32). В этих условиях гистохимическим методом регистрируется на фоне снижения содержания гистидина нарушение процессов оксигенации гемоглобина.

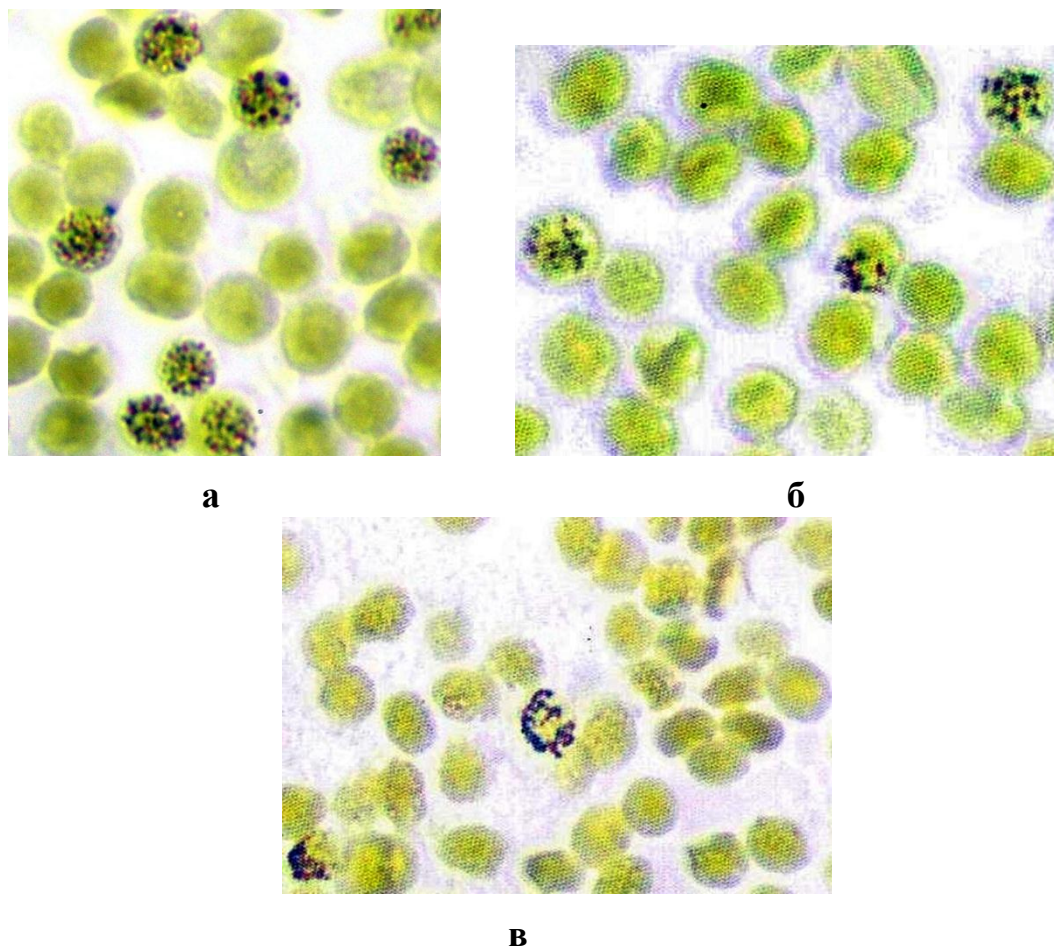


Рис. 32. Активность гистидина в эритроцитах периферической крови беременных при обострении цитомегаловирусной инфекции: а – контроль; б – ЦМВИ с титром антител 1:800; в – ЦМВИ с титром антител 1:1600.

Производные гемоглобина

Гемоглобин может находиться в нескольких формах в зависимости от валентности гема и наличия в молекуле лиганда. Так, деокси-Нб (восстановленный) имеет свободную валентность при Fe^{2+} . При присоединении к нему O_2 образуется оксигенированная форма Нб (феррогемоглобин). Деокси-Нб может также реагировать с CO или NO с образованием соответственно карбоксигемоглобина и нитрозогемоглобина. При действии на Нб ряда окислителей (феррицианид калия, нитриты, хиноны) происходит окисление от Fe^{2+} до Fe^{3+} с образованием мет-Нб (ферригемоглобина), не способного к переносу O_2 .

При присоединении к гему первой α -цепи O_2 занимает 6-е координационное положение Fe^{2+} , что заставляет электроны железа перейти на более высокие орбиты. Теперь все 6 электронов на внешней орбите спарены. Fe^{2+} переходит в низкоспиновое состояние. Диаметр иона железа уменьшается до 0,055 нм и Fe^{2+} перемещается на плоскости порфиринового ядра. Результатом этого является передвижение порфиринового кольца относительно глобина на 0,1 нм, которое и является сигналом для начала оксигенации. В результате этих конформационных перестроек облегчается присоединение O_2 ко второй α -цепи, что вновь сопровождается разрывом 2 солевых мостиков между $\alpha_1 - \alpha_2$ субъединицами с выделением протонов.

Оксигенация β -цепей также сопровождается последовательным разрывом оставшихся солевых мостиков между α - β и β - β -цепями с выделением протонов и переходом всей молекулы в оксиконформацию. Предполагают, что деоксигенация идет в обратном порядке. При выполнении основной биологической функции молекула Hb изменяет свои размеры подобно тому, как изменяется во время дыхания грудная клетка. Поэтому Hb образно называют «дышащей» молекулой. Как показали, исследования стереохимической моделью оксигенирующего Hb является тетрамер. Функция солевых мостиков в деокси-Hb двоякая. Во-первых, они понижают сродство к O_2 индивидуальных цепей в деокси-тетрамере, так как присоединению молекулы O_2 должен предшествовать разрыв солевых связей. Во-вторых, солевые мостики стабилизируют четвертичную структуру молекулы деокси-Hb.

Разрыв нескольких мостиков при оксигенации нескольких субъединиц способствует переходу к структуре, в которой все солевые мостики разорваны и все субъединицы обладают высоким сродством к O_2 .

Помимо указанных выше солевых мостиков четвертичная структура молекулы деокси-Hb и третичная структура β -цепей стабилизированы 2,3-дифосфоглицератом, который специфически соединяется с деокси-Hb входя во внутреннюю впадину молекулы и образуя солевые связи, в которые включены N-концевые остатки β -цепей и ряд положительно заряженных аминокислотных остатков.

Увеличение сродства к O_2 и уменьшение «гем-гем» - взаимодействия в молекуле Hb обусловлены нарушением в образовании окси-

структуры, хотя деокси-структура не изменена [20]. Замена гистидина на тирозин приводит к тому, что молекула этого белка находится всегда в замороженном состоянии. Это объясняется его низким сродством к O_2 .

Функциональная деятельность Hb осуществляется в эритроцитах, где гемоглобин находится в растворенном состоянии. В какой мере структурные различия деокси и окси-Hb, обнаруженные на их кристаллах, соответствуют таковым в растворе?

Реактивность SH-групп в Hb используют как индикатор конформационных изменений белковой части молекулы в процессе оксигенации. В молекуле белка содержится 6 SH-групп, 2 из которых находятся на α -цепях и 4 на β -цепях. Только 2 группы из перечисленных реакционноспособны и могут быть модифицированы различными реагентами. Реактивность SH молекул окси и деокси-Hb различна.

В отличие от неорганических солей присутствие 2,3 ДФГ в разбавленных растворах Hb увеличивают эффект Бора, который при соотношении $2,3\text{ДФГ}/\text{Hb}=3$ достигает максимума. Дальнейшее увеличение концентрации 2,3ДФГ снижает эффект Бора до первоначальной величины, измеренной в отсутствии 2,3 ДФГ (2,3-дифосфоглицерат) [114]. 2,3ДФГ, образуя солевую связь с N-конечными аминными группами β -цепей в деокси-Hb увеличивает сродство этих групп к H^+ . В окси-Hb, где солевая связь разрушена, амидные группы вновь уменьшают сродство к H^+ и дополнительное количество H^+ (помимо «боровских» протонов) поступают в среду. Сродство Hb к O_2 уменьшается при его взаимодействии с 2,3ДФГ и АТФ [114, 124].

Таким образом, установлена прямая связь между наличием в крови оксигемоглобина и содержанием в эритроцитах 2,3ДФГ. Специфический эффект на сродство гемоглобина к кислороду связан с присоединением к гемоглобину в деоксиформе 2,3ДФГ. Константы равновесия для присоединения 2,3ДФГ первых трех молекул кислорода уменьшаются в присутствии 2,3ДФГ. Также 2,3ДФГ увеличивает константу скорости отщепления кислорода и уменьшает константу скорости его присоединения к гемоглобину. При этом неспецифический эффект 2,3ДФГ на сродство гемоглобина к кислороду в случае увеличения 2,3ДФГ выше физиологического уровня (5 ммоль/мл) в эритроцитах приводит к уменьшению присоединения кислорода к гемоглобину и

увеличивает константу скорости отщепления кислорода, связанного с гемоглобином. Это послужило началом большого числа исследований в области регуляции переноса O_2 гемоглобином в организме в норме и патологии [109, 110]. Роль регулятора в большей степени принадлежит 2,3ДФГ поскольку АТФ в эритроците в 4-5 раз меньше чем 2,3ДФГ и кроме того он в большей степени чем 2,3ДФГ связан с Mg^{2+} 2,3 ДФГ способен уменьшить сродство Нб с O_2 при увеличении его концентрации выше физиологического уровня. Это явление не наблюдается в случае разбавленных растворов Нб.

В условиях приближенных к физиологическому уровню сродство Нб к O_2 в растворах гемолизированных эритроцитов может уменьшаться и достигать предела ($P_{50}=32$ мм рт. ст.) при концентрации равной 8 ммоль/л. В интактных эритроцитах увеличение концентрации 2,3ДФГ выше физиологического уровня может еще в большей степени уменьшить сродство Нб к O_2 . Пируват, фосфаты могут увеличить рост 2,3ДФГ, что приводит к увеличению P_{50} до 40-50 мм рт. ст. Специфический эффект вызван присоединением 2,3ДФГ к деокси-Нб. Неспецифический эффект зависит от накопления большого количества электроотрицательных анионов недиффундирующих через мембрану эритроцитов [210, 211]. С помощью радиоактивной метки доказано, что пиродоксаль-фосфат, который является конкурентом 2,3ДФГ в образовании комплекса с Нб образует связь с деокси-Нб посредством N-конечных α аминных групп β -цепей [114]. Блокирование N-концевых групп γ -цепей фетального Нб приводит к потере влияние 2,3ДФГ на сродство Нб к O_2 [123]. На образование связи 2,3ДФГ с Нб могут повлиять ионы H^+ , CO_2 , температура. С уменьшением рН образование комплекса 2,3ДФГ с Нб увеличивается. Этот эффект можно получить и при увеличении органических фосфатов.

Неспецифический эффект 2,3ДФГ и АТФ на сродство Нб к O_2 наблюдаемый в случае увеличения концентрации 2,3ДФГ и АТФ выше физиологического уровня в интактных эритроцитах связан с уменьшением внутриэритроцитарного рН вследствие накопления в клетках большого количества недиффундирующих через мембрану электроотрицательных ионов 2,3ДФГ и АТФ [130, 131]. Уменьшение внутриэритроцитарного рН (при постоянном его состоянии в плазме) приводит к снижению сродства Нб к O_2 (эффект Бора).

3.7. Взаимодействие гемоглобина с CO_2

Была установлена обратная связь CO_2 с Hb при постоянном $p\text{CO}_2$ в газовой фазе. В газовой фазе восстановленная кровь содержит большее количество CO_2 , чем кровь насыщенная O_2 . Вскоре стало понятно, что наблюдаемое явление в значительной мере обусловлено различным сродством Hb к ионам H^+ в окси и деокси-формах.

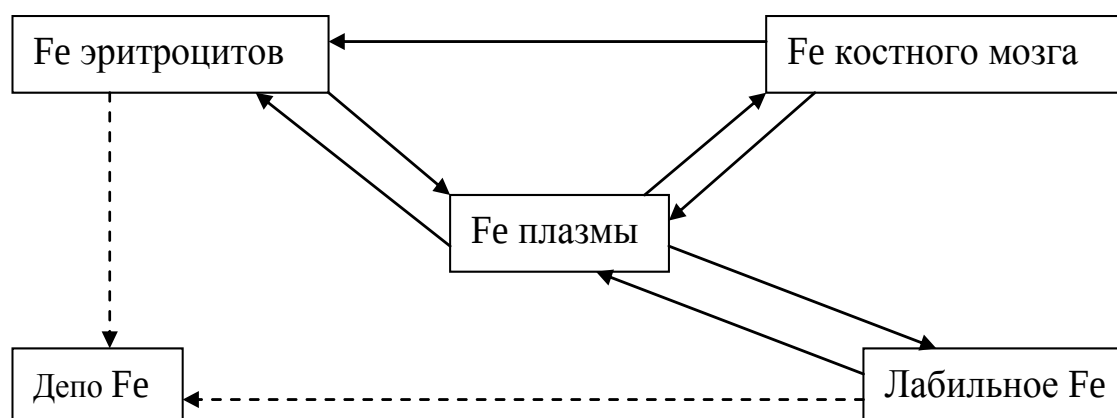
Влияние CO_2 на сродство Hb к O_2 вызвано образованием химической связи CO_2 с Hb, а также электростатическим взаимодействием Hb с ионами HCO_3^- . При увеличении HCO_3^- в случае дыхательного ацидоза эта связь может повлиять на количество CO_2 , связанное с Hb, а также на общий эффект действия CO_2 на сродство Hb к O_2 .

Следует заметить, что эффект CO_2 на сродство Hb к O_2 становится максимальным в щелочной зоне pH, в то время как эффект 2,3ДФГ увеличивается в сторону кислых pH. Несколько о регуляции синтеза гемоглобина. Очевидно, дифференцировка эритроидных элементов и синтез Hb находится под влиянием ДНК.

ДНК в свою очередь стимулируется через эритропоэтин, что и приводит к запуску формирования Hb в эритроидных предшественниках. В период развития эмбриона происходит, последовательная смена мест эритропоэза и преобладающего типа синтезируемого Hb.

Так, при развитии эмбриона мыши четко выступают изменения в типе синтеза Hb от раннего эмбрионального периода к взрослому. Клеточной популяции, происходящей из желточного мешка, соответствуют три эмбриональных Hb с X-, Y-, и Z-цепями. В период печеночного кроветворения они сменяются взрослым Hb с β -полипептидной цепью, а в крови эмбриона на поздних стадиях развития впервые появляются и неядерные красные клетки. Некоторые авторы считают, что в желточном мешке больше синтезируется гемоглобина I(ϵ_4) и II($\alpha_2 \epsilon_2$). Они считают эти белки эмбриональными. В печеночный период преобладает HbF ($\alpha_2 \gamma_2$), HbA обнаруживается только лишь к концу 4 месяца развития плода. При переходе к костномозговому кроветворению, на более поздних стадиях эмбриогенеза главным компонентом Hb, становится HbF и HbA. Можно предполагать, что это связано со сменой клеточной популяции.

Механизм переключения синтеза на новые типы гемоглобина точно указать пока трудно, но вероятнее всего происходит включение нового генетического этапа общей дифференцировки организма. Синтез HbF специфичен для внутриутробной жизни, характерной уменьшенным снабжением тканей организма O_2 [77]. Исследования показали, что HbF распределен гетерогенно и многие молодые эритроциты синтезируют одновременно с HbF и HbA. Только после рождения ребенка при угасании синтеза HbF в крови начинает увеличиваться число эритроцитов полностью, заполненные HbA. Не исключено, что на процесс переключения синтеза HbF на HbA оказывает большое влияние гормональная перестройка фетоплацентарной системы.



(Федорова Н.А., 1976) [90]

Выполнение транспорта O_2 эритроцитами целиком зависит от присутствия в составе гемоглобина железа. Атом Fe, попавший в организм, включается в кругооборот. Из плазмы Fe попадает в развивающиеся эритробласты, где включается в молекулу Hb и становится основной функциональной единицей газообмена в периферической крови в составе эритроцитов на протяжении 4 месяцев.

Разрушающиеся эритроциты фагоцитируются клетками ретикуло-эндотелиальной системы (главным образом селезенки). Там Fe отделяется от Hb и выходит в плазму, из которой включается в повторный цикл. Доставка Fe к эритробластам осуществляется с помощью трансферрина. Вероятно, перед тем как войти в эритробласт Fe отделяется от белкового носителя трансферрина.

3.8. Нарушение функции гемоглобина

Нарушение функции гемоглобина связывали с изменениями в простетической группе белков – в геме. Однако, как показали современные исследования нарушения функции гемоглобина связанная с появлением метгемоглобинемии зависит незначительных химических эффектов в структуре глобина.

С расшифровкой последовательности чередования аминокислотных остатков в молекуле гемоглобина круг вопросов в области патологии гемоглобина расширяется. Было установлено, что некоторые врожденные семейные гемолитические анемии связаны с наличием в эритроцитах гемоглобинов структурных изменений в глобиновой его части. В настоящее время изучено большое число врожденных аномалий кроветворения, которые связаны с присутствием аномалий гемоглобина.

Генетические исследования показали, что формы гемоглобинозов зависят от того по какому типу наследуются аномальные гемоглобины. Если наследование аномального гемоглобина происходит по гетерозиготному типу, то есть от одного из родителей, то гемоглобиноз протекает по типу аномалии. Если наследование идет от обоих родителей (по гомозиготному типу), то развивается тяжелая картина заболевания, приводящая к смерти. Чаще всего аномалии гемоглобина встречаются в виде серповидноклеточной анемии. Гомозиготная форма серповидноклеточной анемии проявляется в виде повышенной ломкости эритроцитов, появляются тромбозы. Геморрагии, инфаркты, а также морфологические изменения в почках, печени и селезенке.

Гемоглобиноз М является наследственной метгемоглобинемией. При этом одна из разновидностей ее связана с отсутствием ферментной системы, превращающей метгемоглобин в гемоглобин, а другая – с химически измененным гемоглобином, который очень устойчив в действии метгемоглобин-редуктазы и существует в эритроцитах в виде метгемоглобина. Этот гемоглобин М и вызывает стойкий цианоз и явления удушья. Кислородная емкость гемоглобина, то есть количество, которое может быть связано 1 г гемоглобина, составляет 1,34 мл газообразного кислорода. Это соответствует одной молекуле кислорода на один атом железа.

Эффективность гемоглобина как дыхательного белка определяется не только тем, сколько он способен связать кислорода, но и тем, какое количество кислорода он может передать тканям.

В легких, где отмечается высокое парциальное давление кислорода, гемоглобин связывает значительное количество кислорода, а в капиллярах, где парциальное давление кислорода невелико, гемоглобин отдает кислород, насыщая клетки, в которые он диффундирует из кровеносной системы. Эритроциты должны обладать максимальной способностью, проникать в самые узкие капилляры, то есть обладать способностью к выраженной деформации тела клетки. При присоединении кислорода и его отдаче валентность гемаинового железа не изменяется.

Степень насыщения гемоглобина кислородом при его низких парциальных давлениях мала. При увеличении давления до 20-40 мм рт. ст. степень насыщения резко возрастает и кривая диссоциации круто поднимается вверх. Полное насыщение достигается при давлении кислорода 100 мм рт. ст. S-образная форма кривой диссоциации оксигемоглобина является выражением приспособительных механизмов, связанных с транспортом кислорода.

Снижение парциального давления кислорода от 110 до 70 мм рт. ст. приводит к снижению степени насыщения крови кислородом только на 5%. На отрезке кривой, соответствующей низкому парциальному давлению кислорода, то есть снижению парциального давления от 50 до 10 мм рт. ст. изменение степени насыщения крови кислородом уже составляет около 70%, а не 5% как это измеряется при парциальном давлении в 70 мм рт. ст. При сложившейся ситуации гемоглобин в капиллярах почти отдает тканям весь связанный кислород.

На диссоциацию оксигемоглобина влияет реакция среды. В кислой среде при тех же парциальных давлениях гемоглобин интенсивнее отдает кислород. Это очень важно, поскольку концентрация углекислого газа в тканях выше, чем в легких, а это значит, что закисление среды в тканях углекислотой способствует большей отдаче кислорода при том же парциальном давлении. При физиологических значениях рН крови оксигемоглобин является более сильной кислотой, чем гемоглобин. Их рН различаются на 1-2 десятых. Смысл этой разницы в том, что более

кислый оксигемоглобин артериальной крови компенсирует потерю углекислоты, выделившейся в легких из венозной крови. При этом сохраняется постоянство pH.

Роль гемоглобина в транспорте углекислоты из ткани невелика. Если кислород связывается простетической группой гемоглобина, то углекислота связывается белковой частью его молекулы – свободными аминными группами в виде карбоминовых соединений. Присоединение и отщепление углекислоты происходит быстро без участия ферментных систем и без промежуточного образования углекислоты. Исследования хроматографическим методом позволит установить, что подавляющее количество в гемоглобине взрослого человека приходится на гемоглобин А. Около 1,5% от общего гемоглобина в эритроцитах приходится на долю эмбрионального гемоглобина F. Кровь новорожденного ребенка содержит 80% этого гемоглобина. Можно накануне родов видеть мегалоциты, в цитоплазме которых происходит замена одного вида гемоглобина на другой (рис. 31).

У взрослых людей выделена еще одна разновидность гемоглобина – гемоглобин A₂ [129]. Кровь плода и новорожденного ребенка его не содержит. Этот гемоглобин появляется в эритроцитах спустя несколько недель после рождения. На его долю приходится 2,5% от общего количества гемоглобинов в эритроцитах [5].

Эмбриональный гемоглобин F отличается от гемоглобина А взрослого человека рядом свойств: устойчивостью к щелочной денатурации, содержанием сульфгидрильных групп [149]. Имеется ряд патологических гемоглобинов, гетерогенность которых нельзя выявить электрофоретически, так как их молекулы несут одинаковый заряд [89]. Несмотря на физико-химические и структурные различия все виды гемоглобинов не отличаются по своим антигенным свойствам. Конфигурация белковой молекулы гемоглобина может быть подразделена на несколько порядков.

Первичной структурой называют вытянутую полипептидную цепочку с определенным порядком для данного белка порядком чередования аминокислотных остатков полипептидной цепи.

Вторичная структура определяется геометрическим построением вытянутой полипептидной цепи. Она характеризуется кривозакру-

ченной α -спиралью. Жесткая конфигурация ее поддерживается водородными связями между NH- и CO группами соседних витков.

Третичная структура – это пространственное взаиморасположение соседних сегментов полипептидной цепи, которая создает архитектуру белковой глобулы.

Четвертичная структура представляет собой объединение разнородных субъединиц в белковую молекулу.

При насыщении молекул гемоглобина кислородом первый из четырех атомов железа очень медленно его присоединяет, то и по мере течения этого процесса сродство остальных атомов железа к кислороду увеличиваются. Вероятно, объединению четырех субъединиц гемоглобина в молекулу препятствуют какие-то стерические факторы, и кислород не может сразу войти в контакт со всеми четырьмя группами гемоглобина. Получены данные, которые позволяют предполагать, что присоединению кислорода во многом препятствуют конформационные изменения, происходящие, прежде всего в четвертичной структуре [130]. Отмечено, что после присоединения кислорода к первой группе начинает нарастать в эритроците кислая среда, что увеличивает благоприятные условия к присоединению кислорода к остальным молекулам железа. В последующем работами Perutz'а было доказано, что в процессах оксигенации гемоглобина активное участие принимает 2,3-ДФГ [201, 202].

3.9. Метгемоглобин

Одной из причин, которая приводит к аномалиям транспорта O_2 – это увеличенное содержание в эритроцитах метгемоглобина. В этих случаях происходит замещение гистидина, связанного с гемом [153], что приводит к образованию стабильной связи между ионизированной замещенной аминокислотой и Fe^{3+} . У метгемоглобина сродство гема к O_2 снижено, а эффект Бора резко уменьшен. Причины, вызывающие это состояние в эритроцитах крови – окисление эндогенного железа гемоглобина. Среди окислителей гемоглобина на первое место следует поставить кислород воздуха. Проникая в эритроциты и вступая в обратимую реакцию оксигенирования гемоглобина молекулярный кислород способен окислять гемоглобин в метгемоглобин. Чаще это происходит при низком парциальном давлении кислорода.

Таким образом, основной механизм нарастания метгемоглобина в эритроцитах – это окисление молекулярным кислородом Fe^{2+} в Fe^{3+} . Одновременно в это время происходит окисление и глобина, что приводит к образованию телец Гейнца и разрушению эритроцитов. Помимо действия кислорода метгемоглобин может увеличиваться при действии на гемоглобин, нитритов, нитратов, нитробензола и оксиазота. Это приводит к снижению отдачи кислорода тканям. Проявления метгемоглобинемии характеризуется гипоксией и усилением анаэробного метаболизма.

Обратное превращение метгемоглобина в гемоглобин происходит под влиянием восстанавливающих ферментов: НАДН–метгемоглобинредуктазы, которая в норме восстанавливает 95% метгемоглобина. Резко повышает активность НАДФН–метгемоглобинредуктазу метиловая синь (рис. 33). Но следует учесть, что последняя реакция будет неэффективной при недостаточности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

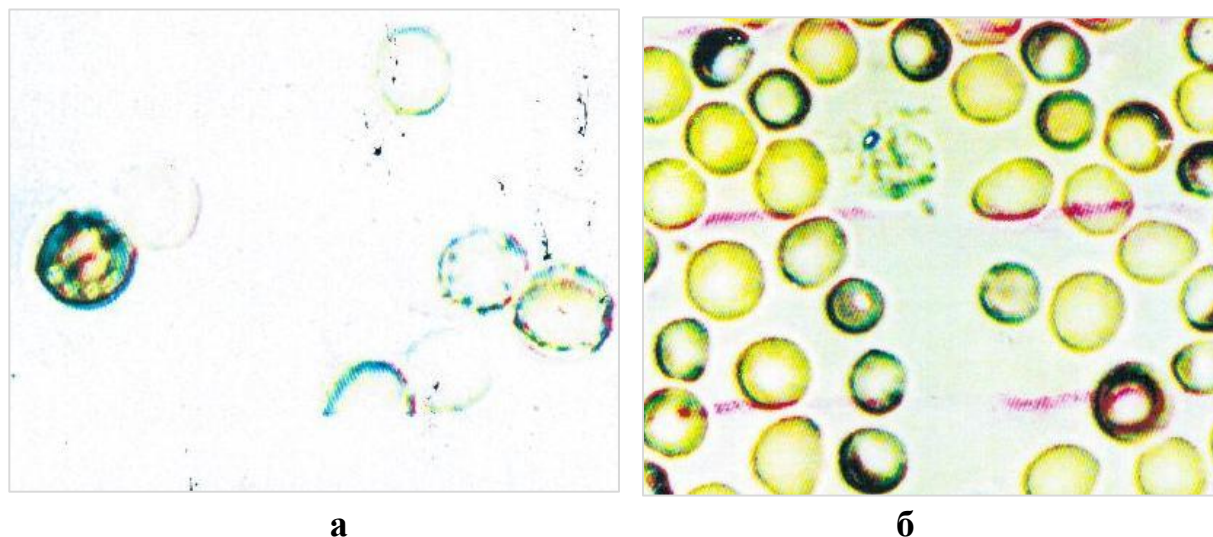


Рис. 33. Эритроциты периферической крови при обострении цитомегаловирусной инфекции во время гестации.

а – эритроциты периферической крови здоровых беременных. Через 40 мин происходит обесцвечивание метиленовой синьки.

б – эритроциты периферической крови беременных, перенесших обострение цитомегаловирусной инфекции. Через 40 мин. инкубации в 0,1% растворе метиленовой синьки более 15% эритроцитов остаются окрашенными. Это свидетельствует о подавлении активности НАДФН.

Повышенное содержание метгемоглобина в крови (выше 1,5%) приводит к развитию гемической гипоксии сопровождающегося дегенерацией эритроцитов, нарушением их осмотической резистентности, вторичным внутрисосудистым гемолизом и развитием гемолитической анемии.

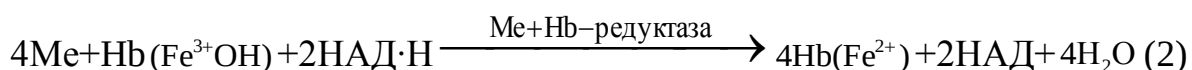
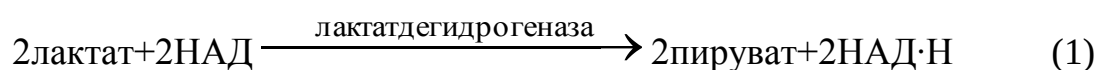
Механизмы восстановления метгемоглобина в эритроцитах

Гликолиз в эритроцитах и связь его с восстановлением метгемоглобина широко разрабатывалась многими авторами [81, 98-100, 102, 127]. Согласно этим исследованиям в восстановлении метгемоглобина прямое участие принимают системы НАД·Н и НАДФ·Н.

Во время гликолиза на 10 этапе его происходит восстановление пировиноградной кислоты в L-молочную кислоту. При этом НАД·Н окисляется в НАД. Реакция катализируется лактатдегидрогеназой. Обратимая реакция – окисление L-молочной кислоты в пировиноградную, сопровождается восстановлением НАД и происходит благодаря каталитическому воздействию той же лактатдегидрогеназы. Она протекает с высокой скоростью, если концентрация молочной кислоты высокая или очень низкая концентрация НАД·Н.

Таким образом, если лактат слежит источником энергии для восстановления НАД, то это может происходить лишь при условии быстрого удаления НАД·Н. Такие условия возникают при накоплении метгемоглобина в эритроцитах.

Схему восстановления метгемоглобина молочной кислотой можно изобразить так [61]:



Все эти факторы позволили Шапоту В.С. прийти к заключению, что в безядерных эритроцитах дегидрирование молочной кислоты в пировиноградную является основной реакцией, за счет которой происходит восстановление метгемоглобина. «Глюкоза восстанавливает метгемоглобин лишь постольку, поскольку она в результате гликолиза превращается в молочную кислоту» [98].

Глава 4

БИОХИМИЯ ЭРИТРОЦИТОВ

Эритроцит является сложной клеточной системой в организме. У многих животных эритроцит лишен ядра, но он способен синтезировать белок: нуклеиновые кислоты, порфирины, пурины. Очень специфической функцией эритроцита в организме животного организма является участие в транспорте O_2 .

Основной путь обмена энергии в эритроцитах – гликолиз. Крайне специфичным для эритроцитов является наличие 2,3-дифосфоглицериновой кислоты (2,3-ДФГ), которая во многом определяет сродство гемоглобина к кислороду. В процессе гликолиза происходит образование в эритроцитах АТФ и НАД·Н, которые используются эритроцитом в поддержании функционального состояния гемоглобина.

Глюкоза в эритроцитах расщепляется путем прямого окисления с образованием НАДФ для восстановления глутатиона с участием глутатионредуктазы. Основная же масса глюкозы перерабатывается в эритроцитах анаэробным путем [122].

В реакциях пентозного цикла происходит образование двух молекул НАДФ·Н, которые в различных клетках могут участвовать в синтезе холестерина, жирных кислот, фолиевой кислоты. Рибоза используется для синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот. В зрелых эритроцитах пентозный цикл единственный источник образования НАДФ·Н. В различных тканях пируват может быть окислен O_2 с образованием НАД·Н и НАДФ·Н при участии ферментов цикла Кребса. Поскольку в эритроцитах этого явления нет, образование НАДФ·Н при пентозном цикле приобретает особое значение. НАДФ·Н необходим в эритроцитах для ряда реакций, способствующих поддержанию их функциональной активности и целостности. К этим реакциям можно отнести восстановление метгемоглобина в гемоглобин и восстановление окисленного

глутатиона. Рибозо-5-фосфат необходим как составная часть таких соединений как АТФ, АДФ, пиридин, нуклеотиды.

Аэробный цикл в эритроцитах занимает особое место. Пентозно-фосфатный цикл, начинается реакцией окисления глюкозо-6-фосфата, которая катализируется глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой. При этом происходит восстановление кофермента НАДФ, а активный водород используется для восстановления глутатиона [155].

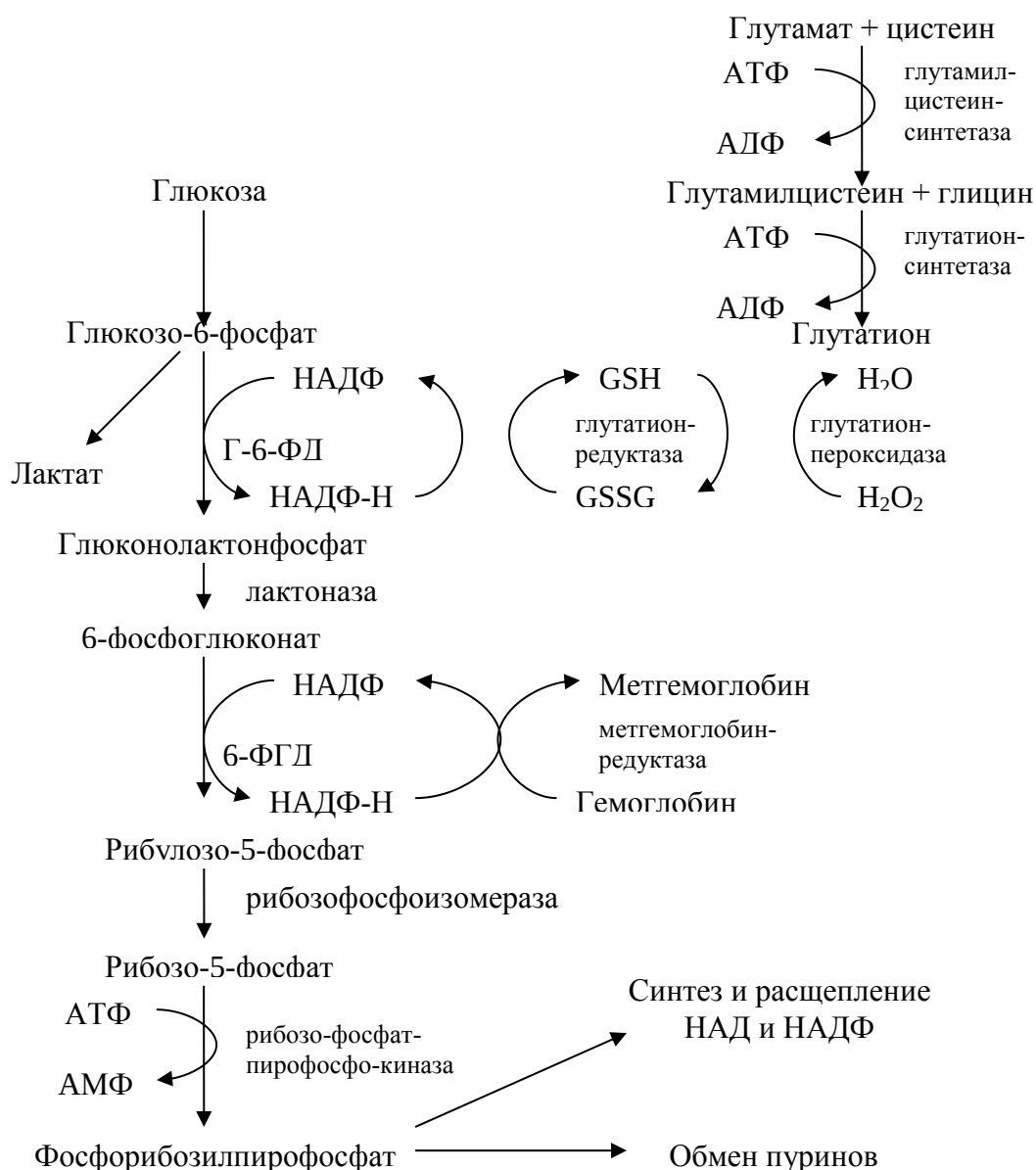


Рис. 34. Схема пентозо-фосфатного цикла и системы глутатиона. GSH – восстановленный глутатион; GSSG – окисленный глутатион.

4.1. Реакция глутатиона

Синтез глутатиона происходит из глутамата, цистеина и глицина в эритроците в анаэробных условиях. Восстановление окисленной формы глутатиона происходит при помощи фермента глутатионредуктазы. Донорами активного водорода при этом являются НАДФ и НАД. Активный водород сульфгидрильной группы глутатиона используется глутатион-пероксидазой для нейтрализации перекисей. В эритроцитах содержится большое количество глутатиона, который присутствует почти всегда в восстановленной форме. Его сульфгидрильная группа высокореактивна, окисляясь сам, глутатион предохраняет важные компоненты клетки от денатурации окислителями, перекисями, ионами тяжелых металлов (рис. 35).

Глутатион способен соединяться с гемоглобином, и образовывать комплекс, способствующей удлинению и смещению вправо кривой диссоциации оксигемоглобина.

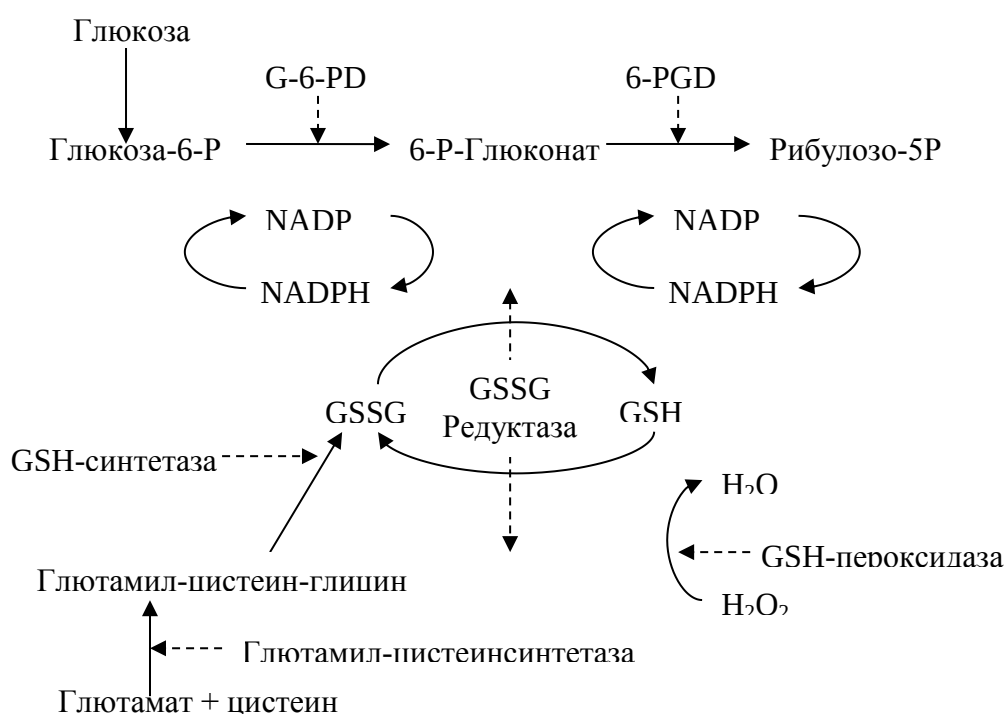


Рис. 35. Метаболизм глутатиона в эритроците.

NADP - никотинадениндинуклеотидфосфат (TPN). NADPH - восстановленная форма NADP. G-6-PD - Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа. 6-PGD = 6-фосфоглюконат-дегидрогеназа. GSH - восстановленный глутатион. GSSG - окисленный глутатион.

Восстановленный глутатион (GSH) составляет в эритроцитах 96% от его общего количества. При недостатке доноров активного водорода восстановленный глутатион превращается в дисульфидную группу. Сохранение глутатиона в восстановленном состоянии необходимо для предохранения ряда ферментов от инактивирования, защиты клеточной мембраны от разрушительного действия перекисей и необходимого денатурирования гемоглобина.

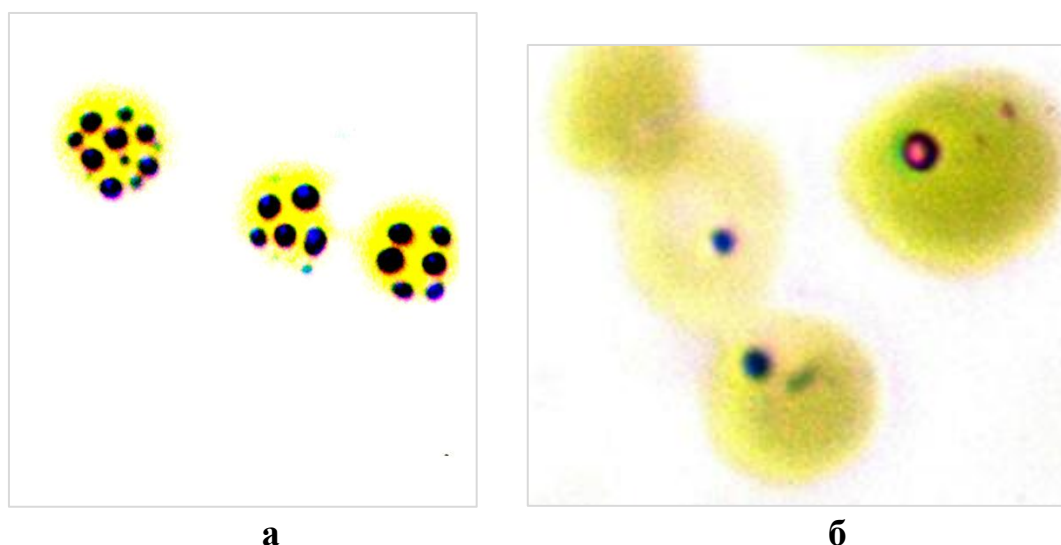
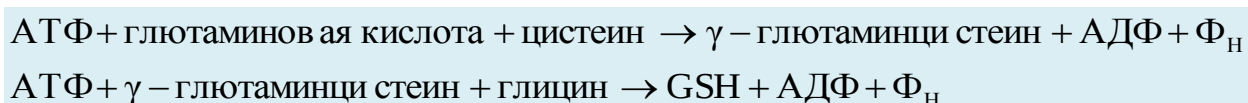
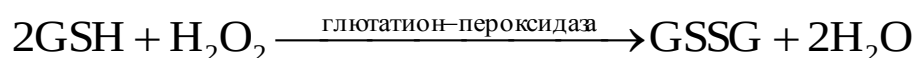


Рис. 36. Эритроциты периферической крови. Глутатион. а – кровь здорового человека; б – эритроциты человека, перенесшего обострение цитомегаловирусной инфекции. Количество восстановленного глутатиона резко снижено.

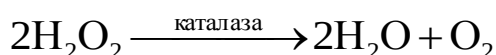
Биосинтез глутатиона в эритроцитах протекает в 2 стадии:



В эритроцитах содержится 5-7 мкмоль восстановленного глутатиона на 1 г Нв. Восстановленный глутатион является кофактором глиоксалазной реакции и субстратом для глутатион-пероксидазы.



Перекись водорода разрушается также каталазой:



В эритроцитах каталазы мало, поэтому для разрушения H_2O_2 более эффективна глутатион-пероксидаза. Удаление H_2O_2 из эритроцитов чрезвычайно важно в связи с тем, что это соединение может окислять составные части клетки (в том числе элементы, входящие в состав мембран).

При расщеплении H_2O_2 из эритроцитов без участия глутатион-пероксидазы и каталазы образуется $\cdot\text{OH}$ и в результате отщепления иона H^+ от ненасыщенных жирных кислот образуются перекиси липидов, что в конечном итоге разрушает клеточные мембраны эритроцитов. Глутатион в процессе предотвращения окисления тиоловых групп глобина становится причиной необратимого повреждения Hb с образованием метгемоглобина, что нарушает транспорт O_2 .

4.2. Обменные процессы в эритроцитах

Ядросодержащие клетки эритроидного ряда обладают всеми функциями, присущими остальным клеткам организма. Для них характерен высокий белковый метаболизм. В последующем эритрон теряет ядро и продолжает работать за счет ранее накопленных запасов ферментов в течение 120-150 дней.

В нормобластах, прежде всего, синтезируется специфический белок – глобин. В последующем происходит синтез стромальных белков и белков, принимающих участие в обмене железа. В нормобластах синтезируется белковая часть всех ферментов, используемых для поддержания нормального метаболизма на протяжении всего периода существования эритрона. В нормобластах и эритроцитах гистохимически можно выявить такие аминокислоты как тирозин, триптофан, гистидин, SH групп и др. [3].

Углеводный обмен

В нормобластах еще возможна утилизация углеводов и белков, так как в них остается в действии весь цикл Кребса. К тому же в них дополняется сжигание образовавшихся веществ молекулярным кислородом путем прямого окисления.

**Метаболическая характеристика клеток эритроидного ряда
(С.И. Рябов, Г.Д. Шостка)**

	нормобласт	ретикулоцит	эритроцит
Цикл Эмбдена-Мейергофа	+	+	+
Гексозо-монофосфатный шунт	+	+	±
Цикл Кребса	+	+	-
Цитохромная система	+	+	-

Как видно в нормобластах и ретикулоцитах преобладает окислительное фосфорилирование (аэробный гексозомонофосфатный путь). В зрелых эритроцитах превалирует анаэробный гликолиз (цикл Эмбдена-Мейергофа).

Ретикулоциты 75% глюкозы расщепляют окислительным путем и только 25% – гликолитическим путем Эмбдена-Мейергофа. В зрелых же эритроцитах 11% глюкозы расщепляется через гексозо-монофосфатный шунт, а 89% путем анаэробного гликолиза [208].

Цикл Кребса в эритроцитах, в связи с отсутствием ферментов не возможен. В эритроцитах работает только яблочная дегидрогеназа. Для гликолиза в эритроцитах имеются все условия; поскольку мембрана эритроцитов проницаема для глюкозы. Конечный продукт гликолиза – молочная кислота. Начинается гликолиз с расщепления глюкозы до глюкозо-6-фосфата с использованием АТФ. В этом процессе принимает участие гексокиназа. Снижение активности гексокиназы нарушает захват глюкозы, вследствие чего подавляется весь путь анаэробного расщепления глюкозы и наступает старение эритроцитов. Если первый этап проходит в эритроците успешно, дальнейший путь гликолиза выполняется беспрепятственно. На протяжении цикла образуется две молекулы АТФ, которые крайне необходимы для сохранения целостности эритроцита. Разрушение эритроцитов является результатом нарушения метаболических процессов, связанных с постепенным истощением находящихся в клетке ферментов и прежде всего энзимов гликолиза. При целом ряде заболеваний содержание этих ферментов может меняться [174]. У лиц с анемией наблюдается снижение содержания сульфгидрильных групп.

4.3. Обмен липидов в эритроцитах

Эритроциты окружены полупроницаемой мембраной. Основной составной частью оболочки и стромы являются липиды и белки [16, 74].

Предполагается, что оболочка эритроцитов является высокоизбирательным фильтром и отвечает за транспорт, с ее помощью регулируется поступление внутрь эритроцита углеводов, липидов, газов крови. Мембрана представляет ансамбль липидных и белковых молекул, удерживаемых вместе с помощью нековалентных взаимодействий, благодаря этому поддерживается ее структурная целостность. Однако сама по себе клеточная мембрана эритроцитов является подвижной, текучей структурой, а большинство входящих в нее элементов способны перемещаться в плоскости мембраны.

Липидные молекулы образуют в мембране непрерывный двойной слой толщиной около 5 нм. Этот слой относительно непроницаемый барьер для большинства водорастворимых молекул. Белковые молекулы как бы растворены в липидном бислое. С их помощью выполняются разнообразные функции мембраны. Липиды составляют 60% массы мембраны. Основу липидов составляют фосфолипиды и холестерин.

В структурном отношении липиды представлены фосфоглицеридами из числа, которых 28-30% фосфолипидов приходится на фосфатидилхолин; 27-28% составляет фосфатидилэтаноламин; 25% - сфингомиэлин; 12% - фосфатидилсерин; 5-7% приходится на фосфатидилинозитол, около 4-5% содержится лизофосфатидилхолина и 1-3% глицерофосфатида. Холестерин находится в свободной форме, он гидрофобен, необходим для обеспечения текучести мембраны.

Липиды располагаются в виде двойного слоя, однако, распределение фосфолипидов в этих слоях ассиметричное. Фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин располагаются преимущественно во внутреннем слое, тогда как сфингомиэлин и фосфатидилхолин находятся в наружном слое. В процессе жизнедеятельности эритроцитов происходит обмен между жирными кислотами и фосфоглицеридами. Клеточная мембрана эритроцитов, таким образом, представляет белково-

липидную мозаику, в которой в среднем 50% приходится на белки. Между белковыми молекулами и липидными в клеточной мембране устанавливается тесное взаимодействие. Полипептидные цепи мембран свертываются в трехмерные структуры, подчиняясь термодинамическим законам, которые управляют функциональной трехмерной конформацией белков. Свертывание линейного полимера аминокислот в крупную трехмерную структуру обусловлено энергией, в результате чего происходит размещение гидрофобных групп в гидрофильной среде.

Липиды и белковые молекулы мембран изучаются разными методами: гель-электрофорезом, тонкослойной хроматографией и т.д. Однако получить визуальное представление о конформационном состоянии белково-липидного комплекса биофизически, т.е. в условиях, когда мембрана частично или полностью теряет свое морфофункциональное активное состояние и эти участки уплотняются, до настоящего времени не удавалось. Так, эритроциты периферической крови, истощая свое жизненно активное состояние, начинают приобретать различные переходные формы. Дискоциты могут принимать форму эхиноцитов, мишенеобразную и форму дегенератов и других переходящих форм [65].

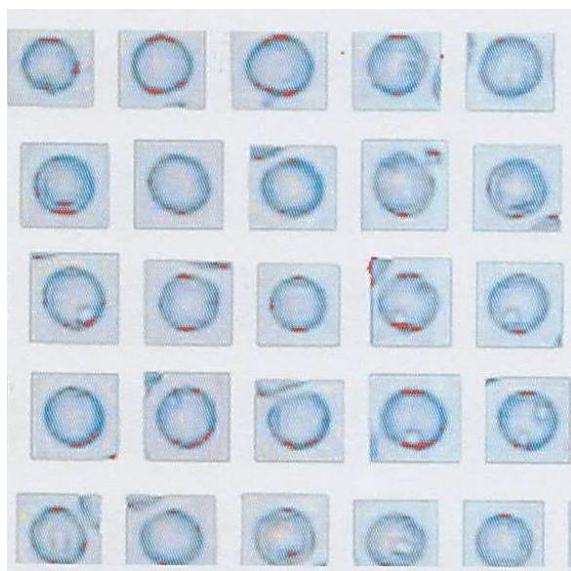


Рис. 37

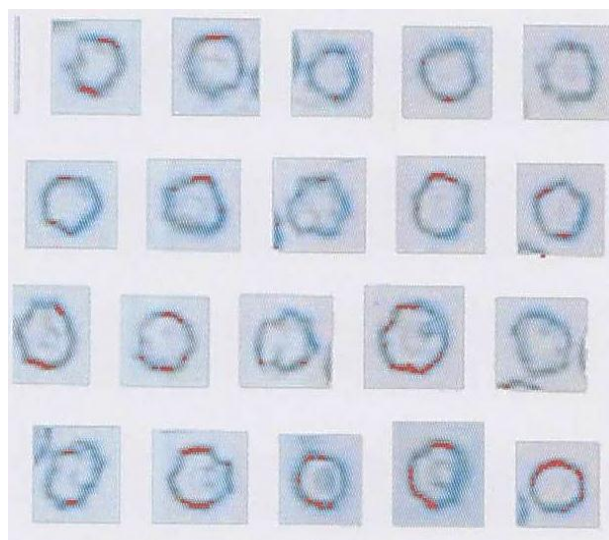


Рис. 38

Выявить увеличение уплотненных белково-липидных комплексов удастся после рассмотрения мембран компьютерным методом по программе BioVision (USA). В мембранах дискоцитов здоровых лиц уплотненные участки - единичные и занимают площадь $10,351 \pm 0,15$ усл.ед.,

что составляет по отношению к площади всей мембраны $1,403 \pm 0,004\%$ (рис. 37). В эхиноцитах площадь - $19,252 \pm 0,2$ усл.ед., процент $2,826 \pm 0,03\%$ (рис. 38); в мишеневидных площадь уплотненных белково-липидных комплексов составляет $31,959 \pm 0,3$ усл.ед., процент - $4,476 \pm 0,008\%$ (рис. 39). В дегенеративных эритроцитах уплотненные участки составляют площадь $91,965 \pm 1,1$ усл.ед., процент - $14,852 \pm 0,82\%$ (рис. 40).

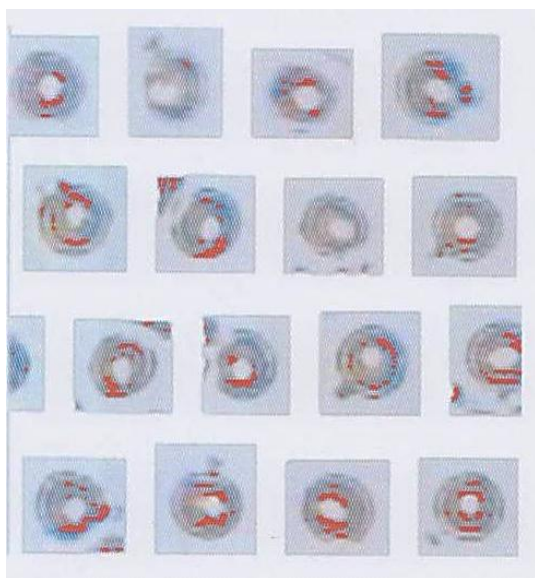


Рис. 39

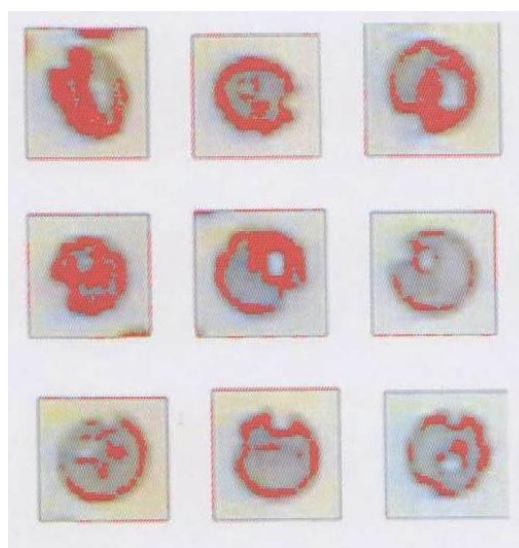


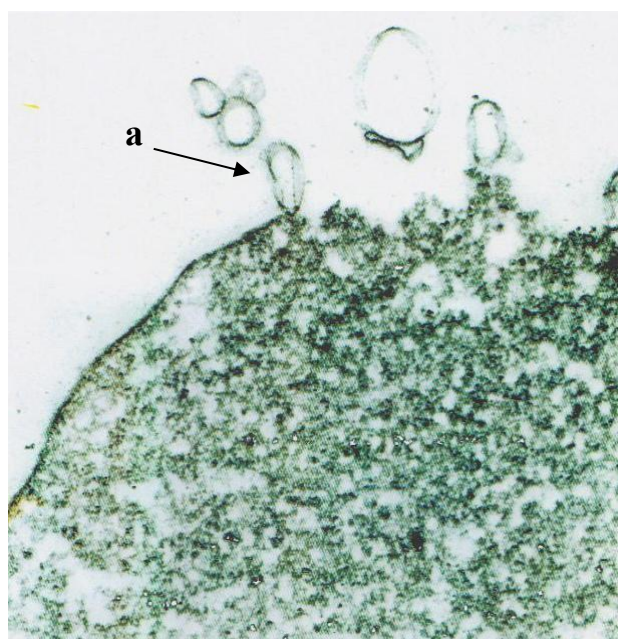
Рис. 40

Таким образом, предлагаемый способ может с помощью морфобиофизического компьютерного анализа дать оценку степени уплотнения («старения») мембраны в зависимости от структурных изменений эритроцита, позволяющий различать дискоциты от эхиноцитов, мишеневидных и дегенеративных форм. Мембрана эритроцитов обладает способностью к текучести. Фактором, влияющим на текучесть мембраны, служит холестерол. Плазматическая мембрана содержит довольно большое количество холестерола – приблизительно одну молекулу на каждую молекулу фосфолипида. Молекула холестерола ориентируется в бислой таким образом, что бы гидроксильные группы примыкали к полярным головкам фосфолипидных молекул. При этом их жесткие, плоские стероидные кольца частично иммобилизуют участки углеводородных цепей, непосредственно примыкающих к полярным головкам. Остальные части углеводородных цепей не утрачивают своей гибкости.

Хотя холестерол делает липидный бислой менее текучим, при высоких концентрациях, он предотвращает слипание и кристаллизацию углеводородных цепей. Холестерол также ингибирует фазовые переходы. Уменьшая текучесть липидного бислоя, холестерол влияет на его проницаемость для малых водорастворимых молекул. Кроме того, холестерол увеличивает упругость и механическую прочность бислоя благодаря холестеролу, который может менять свою форму в ответ на приложенную к ней силу. Дело в том, что в отличие от фосфолипидов, холестерол может быстро перераспределяться между монослоями. Объясняется это тем, что маленькая полярная головка холестерола (гидроксильная группа) легко проходит через центр бислоя, энергетический барьер для флип-флоп молекул холестерола оказывается низким и, следовательно, его перераспределение осуществляется быстро.

Текучесть плазматической мембраны эритроцита имеет важное биологическое значение. Некоторые процессы мембранного транспорта приостанавливаются, а ферментативные реакции подавляются, как только вязкость бислоя превышает пороговое значение. На текучесть мембран могут повлиять многие факторы: температура, наличие в организме инфекционного процесса. Так, при содержании животных длительное время в климатоканере при низкой температуре 30 дней по 3 часа ежедневно в периферической крови животных (крыс) появляется много эритроцитов с нарушенной текучестью плазматической мембраны (рис. 41).

Рис. 41. Эритроциты крыс, подвергавшихся охлаждению при температуре -30° по 3 часа ежедневно в течение 30 дней. а – выраженная текучесть мембраны, часть которой отшнуровывается от эритроцита. Электронная микроскопия.



Цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ) при ее обострении характеризуется нарастанием титра антител к ЦМВ в периферической крови беременных. Антитела вступают в тесный контакт с гликопротеиновыми рецепторами мембран эритроцитов, то есть с гликофорином.

Нами отмечено, что количество гликофорины в мембранах эритроцитов в этот период резко увеличивается: при титре антител к ЦМВ 1:400 до $7,25 \pm 0,85\%$; при титре антител к ЦМВ 1:800 – до $7,90 \pm 0,65\%$ и при титре антител к ЦМВ 1:1600 – до $8,5 \pm 1,3\%$ (контроль – $7,0 \pm 0,85\%$). Контакт антигена с мембраной эритроцитов вызывает изменение ее фосфолипидного состава. При титре антител 1:1600 содержание фосфатидилэтаноламина снижалось до $20,3 \pm 0,80\%$ (контроль – $24,5 \pm 1,1\%$). Перестройка фосфолипидного слоя в мембранах эритроцитов приводит к нарастанию в них продуктов перекисного окисления, количество МДА в мембранах эритроцитов увеличивается до $37,50 \pm 2,61$ мкмоль/л (контроль – $22,50 \pm 1,70$ мкмоль/л). В мембранах эритроцитов происходит структурная перестройка, меняется связь липидов с белками мембран. Появляются уплотненные липидно-белковые участки и тем в большем количестве, чем выше титр антител. Это отчетливо фиксируется методом компьютерного анализа плотности участков в программе BioVision. Чем больше этих участков, и теснее расположение их друг к другу, тем больше деформируется мембрана эритроцита. Так, при титре антител к ЦМВ 1:400 количество уплотненных участков, подсчитанных цитофотометрической установкой «Мекос» увеличивается до $2,82 \pm 0,8\%$ (контроль – $1,46 \pm 0,35\%$). При титре антител 1:800 процент уплотненных участков в мембране увеличивается до $4,47 \pm 0,90\%$, а при титре антител к ЦМВ 1:1600 – до $14,85 \pm 1,90\%$.

Таким образом, контакт антигена ЦМВИ изменяет структуру мембраны эритроцитов и индуцирует перекисное окисление липидов. Изучаемая на этом фоне микровязкость мембран эритроцитов подтверждает, что она зависит от состава фосфолипидного слоя и контактов между липидными и белковыми комплексами [19, 24, 28, 67].

Так, при титре антител к ЦМВ 1:800 отмечалось снижение микровязкости, так как коэффициент эксимеризации пирена в липидном бислое составлял $0,67 \pm 0,003 F_3/F_M$ (контроль – $1,11 \pm 0,002 F_3/F_M$; $p < 0,001$). Коэффициент эксимеризации пирена в белок-липидных кон-

тактах определялся как $0,71 \pm 0,004 F_{\text{Э}}/F_{\text{М}}$ (контроль – $0,90 \pm 0,004$; $p < 0,001$). Если титр антител к цитомегаловирусу поднимался до 1:1600 коэффициент эксимеризации пирена в липидном бислое составлял $0,55 \pm 0,04 F_{\text{Э}}/F_{\text{М}}$ (контроль – $0,90 \pm 0,06$). Коэффициент эксимеризации пирена в белок-липидных контактах определялся как $0,60 \pm 0,005 F_{\text{Э}}/F_{\text{М}}$ (контроль – $0,98 \pm 0,006$; $p < 0,001$).

Таким образом, беременность осложненная обострением цитомегаловирусной инфекции тяжело отражается на морфофункциональном состоянии мембран эритроцитов периферической крови, поскольку наблюдается перестройка белково-липидных контактов и состава фосфолипидов в мембранах эритроцитов, что приводит к нарастанию микровязкости и изменению морфологического строения самих эритроцитов, так как число дискоцитов при титре антител 1:1600 снижается до $68,7 \pm 1,7\%$ (контроль – $89,9 \pm 2,3\%$); количество эхиноцитов нарастает до $9,3 \pm 0,2\%$ (контроль – $3,1 \pm 0,03\%$), а процент дегенеративных форм повышается до $22,0 \pm 1,3\%$ (контроль – $7,0 \pm 0,09\%$).

4.4. Гликолипиды мембран эритроцитов

В плазматических мембранах наиболее ассиметрично распределены липидные молекулы, принадлежащие к классу олигосахаридосодержащих липидов, называемых гликолипидами. Они обнаруживаются только в наружной половине бислоя, а их углеводные группы ориентированы к поверхности эритроцита. Это свидетельствует, что гликолипиды принимают участие во взаимодействии с элементами, окружающими эритроцит. Гликолипиды составляют обычно около 5% липидных молекул наружного монослоя. В животных клетках гликолипиды построены на основе церамида, каковым например, является сфингомиэлин. Структура гликосфинголипидов имеет полярную голову и две гидрофобные цепи жирных кислот. Одна из цепей жирных кислот первоначально соединяется с серином, образуя аминокспирт сфингозин, с которым затем связывается вторая цепь жирной кислоты, образуя церамид. Самые сложные ганглиозиды содержат один или более остатков сиаловой кислоты (N-ацетилнейраминовой кислоты), которая придает молекулам ганглиозидов отрицательный заряд. По всей вероятности

ганглиозиды работают как поверхностный рецептор для бактериального токсина (рис. 42), а также как рецептор для определенных медиаторов, осуществляющих связь между клетками.

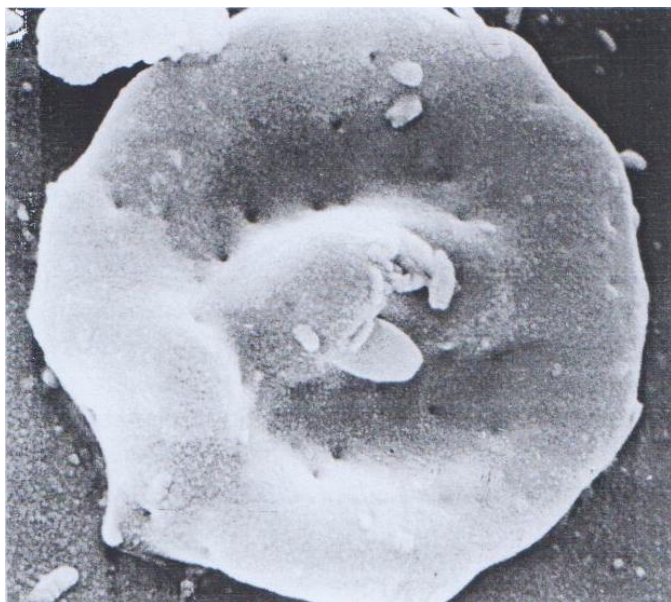


Рис. 42. Эритроцит периферической крови беременной с обострением цитомегаловирусной инфекции. На поверхность эритроцита прикрепляется большое количество белковых телец. Контуры эритроцита начинают изменяться, приобретая слегка угловатую форму. Растровая микроскопия.

При изучении белков плазматической мембраны эритроцитов человека методом электрофореза в полиакриламидном геле с 10% додецилсульфатом удастся идентифицировать около 15 главных белков с молекулярной массой от 15000 до 250000. Три из них – спектрин, гликофорин полоса-3 – составляют в сумме более 60% (по весу) всех мембранных белков [117, 121].

Большинство мембранных белков эритроцитов человека – это периферические мембранные белки, ассоциированные с бислоем на его плазматической стороне. Самый распространенный из них – это спектрин. Он представляет собой длинную тонкую нить длиной около 100 нм. Его масса составляет $2,5 \times 10^5$ копий на клетку. Спектрин является важным компонентом белковой сети. Он по-существу может быть назван цитоскелетным белком, который поддерживает структурную целостность и двояковогнутую форму эритроцитов. Если цитоскелет экстрагировать из теней эритроцитов растворами с низкой ионной силой, мембрана начинает фрагментироваться на мелкие пузырьки.

Молекула спектрина состоит из двух больших полипептидных цепей: α -спектрина и β -спектрина. Каждая из цепей построена из множества α -спиральных сегментов, объединенных в группы по три и свя-

занных между собой не спиральными участками. Такие спектриновые димеры агрегируют, образуя тетрамеры длиной около 200 нм. Концы тетрамеров соединяются активными филаментами с другими белками как полосой 4.1 в узловой комплекс. В результате образуется гибкая сетеподобная структура на цитоплазматической поверхности мембраны.

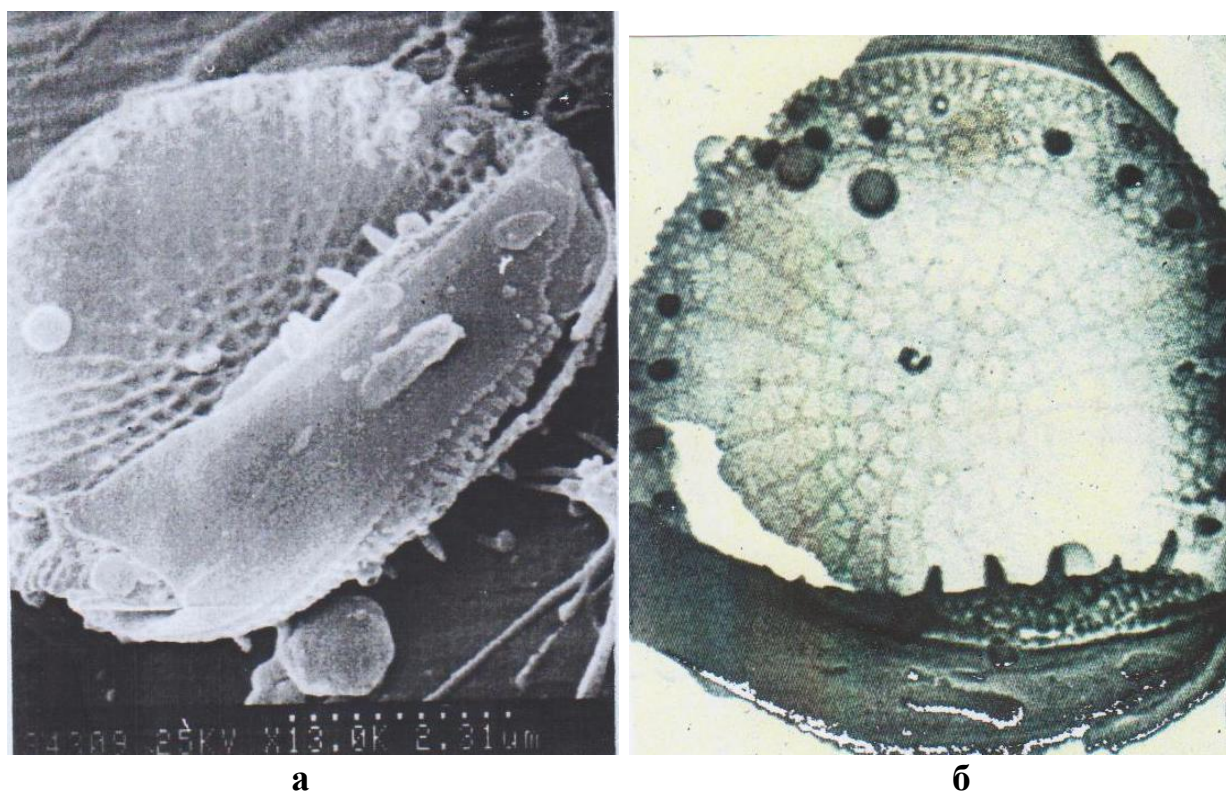


Рис. 43. Эритроцит человека. Внутренняя поверхность мембраны.
а – полувывернутый эритроцит;
б – цитоскелет мембраны. Растровая микроскопия.

Если вывернуть мембрану эритроцита наизнанку, можно с помощью растровой микроскопии увидеть построение цитоскелета в виде паутинообразной сети (рис. 43). Именно цитоскелет позволяет эритроцитам противостоять давлению на мембрану при прохождении через узкие капилляры. Было установлено, что соединение цитоскелета с плазматической мембраной выполняется внутриклеточным белком анкирином. Он связывает как β -спектрин, так и цитоплазматический домен полосы-3 со спектрином. Соединяя белок полосы-3 со спектрином, анкирин связывает сеть, образуемую спектрином с мембраной. Цитоскелет на основе спектрина соединяется с мембраной и по другому механизму. Было показано, что цитоскелетный белок полосы 4.1 связыва-

ет спектрин и актин, соединяется с цитоплазматическим доменом гликофорина в единую сеть. В составе эритроцитарной мембраны имеется белок 4.9. Предполагалось, что он принимает участие в регуляции созревания клеток эритроидного ряда [133, 142, 223].

Изучая содержание с помощью гель-электрофореза белков 4.9, мы нашли, что на фоне резкого обострения в организме беременной цитомегаловирусной или герпес-вирусной инфекции отмечается его снижение в мембранах эритроцитов периферической крови. При этом одновременно в периферическую кровь резко замедляется выброс ретикулоцитов. Возможно, что созревание клеток эритроидного ряда в костном мозгу зависит от содержания в мембранах эритроцитов белка полосы 4,9. Можно предположить, что в организме работает система по принципу обратной связи: белок мембран эритроцитов полосы 4.9 и созревание эритроцитов в костном мозгу.

Морфология зрелых эритроцитов

В кровеносном русле при нормальных физиологических условиях эритроцит имеет форму двояковогнутого диска с утолщением по краям. Диаметр эритроцитов (рис. 44) колеблется в норме в среднем от 7 до 7,5 мкм. При низком содержании кислорода в воздухе и нормально функционирующей системе эритрона увеличивается число циркулирующих эритроцитов. При этом размер их может увеличиваться [72].

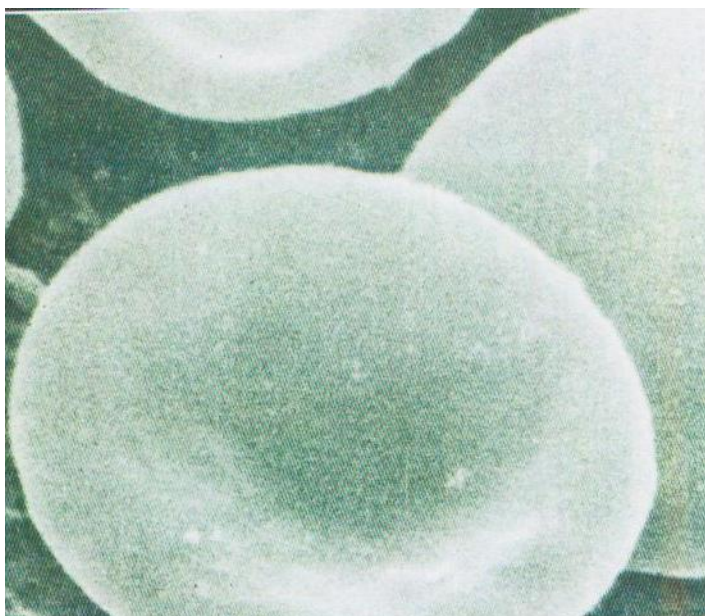


Рис. 44. Двояковогнутый (дисковидный) эритроцит. Растровая микроскопия.

Снижение количества эритроцитов и гемоглобина является признаками развития в организме анемии. При этом в составе эритроцитов периферической крови появляются существенные изменения. Появляются эритроциты с меньшим диаметром – микроциты. Диаметр таких эритроцитов доходит до 5-6 мкм. Этот признак наблюдается при наследственном сфероцитозе, железодефицитной анемии, талассемии.

Шизоциты – это очень мелкие дегенеративно измененные эритроциты диаметром около 3 мкм. Они встречаются в мазках крови при гемолитической анемии, васкулитах, гемоглобинопатиях.

Макроцитоз – это присутствие в мазках крови эритроцитов с увеличенным до 8-9 мкм диаметром. Их чаще можно увидеть в крови новорожденного или у взрослых при заболеваниях печени, анемии беременных. Наконец, в крови иногда появляются эритроциты диаметром 11-12 мкм овальной формы. Это можно наблюдать у лиц с глистной инвазией или при анемии беременных.

4.5. Измененные формы эритроцитов

Изменение формы эритроцитов (пойкилоцитоз) могут наблюдаться при различных формах анемии, либо при действии токсинов при инфекционных заболеваниях. Основная причина изменения формы эритроцитов – это нарушение их цитоскелета. Обострение таких персистирующих в человеческом организме инфекций как герпес или цитомегаловирус приводит к резкому нарушению структуры эритроцитов периферической крови беременной.

Причина этого явления находится в самом эритроците: подавляется активность таких ферментов как супероксиддисмутаза, что нарушает связь белка полосы 4.1 со спектрином и актином. Мембрана эритроцитов теряет свою упругость. В периферической крови появляются атипичные формы эритроцитов: эхиноциты до 10%, у которых мембрана приобретает отростчатый характер (рис. 45). Мишеневидные клетки (кодоциты) имеют увеличенную площадь поверхности за счет избыточного содержания холестерина. Они имеют окрашенную периферию и на фоне светлой центральной части небольшой более темный сферический участок (рис. 39, 46).

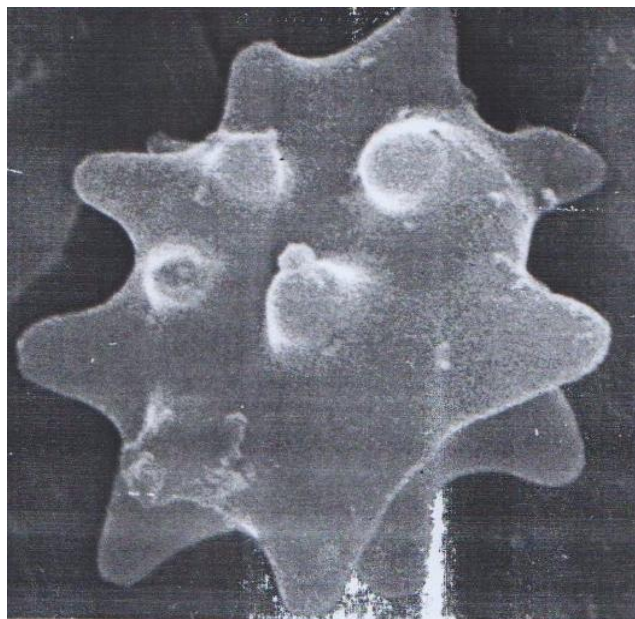


Рис. 45. Периферическая кровь беременной, с обострением цитомегаловирусной инфекции до титра 1:800. Эхиноцит. Растровая микроскопия.



Рис. 46. Периферическая кровь. Мишенивидный эритроцит. Растровая микроскопия.

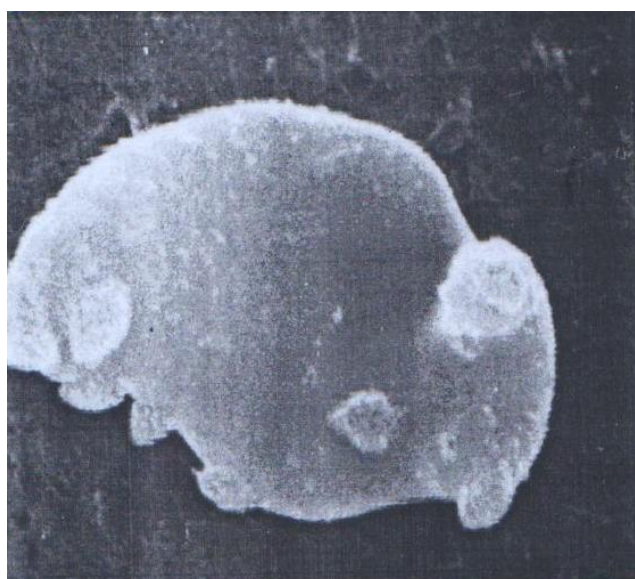


Рис. 47. Дегенеративная форма эритроцита. Растровая микроскопияю.

Нарастание белковых структур в мембране эритроцитов, приводит к дезинтеграции липидно-белковых комплексов. Происходит их слияние, мембрана эритроцитов резко уплотняется (рис. 40, 47). Эритроцит сморщивается и погибает – эту форму эритроцита можно назвать дегенеративной.

При цитомегаловирусной инфекции во время гестации в периферической крови беременной можно обнаружить до 14-15% дегенеративных форм эритроцитов, что становится причиной формирования анемии.

Форма эритроцитов и его размеры существенно влияют на проходимость их по кровеносному руслу, особенно через узкие капилляры. Выступает необходимость для эритроцитарных элементов менять свою форму для того, чтобы решить эти задачи [72]. На повестку выступает вопрос изучения деформабельности эритроцитов. Во время движения крови по сосудистому руслу эритроциты постоянно находятся в деформированном состоянии, при этом отмечается ротация мембраны относительно внутриэритроцитарного содержимого. Особенно большие изменения эритроцитов наблюдаются в микроциркуляторном русле. Некоторые капилляры имеют диаметр до 3 мкм и менее.

Прижизненная микроскопия показала, что эритроциты, движущиеся в капилляре, подвергаются значительным деформациям, приобретая при этом разнообразные формы [92, 96]. В соответствии с законом гемодинамики эритроциты располагаются в капилляре вдоль его оси, при этом его вращение прекращается, но деформация типа растяжения возрастает. Нормальные эритроциты способны значительно деформироваться, не меняя при этом своего объема и площади поверхности [97]. Эта особенность движения эритроцитов в потоке имеет важное значение для поддержания максимального процесса диффузии газов. При улучшении деформабельности эритроцитов повышается перенос к тканям кислорода [37, 38, 160], а при их ухудшении поступление кислорода в ткани снижается [53, 118, 129, 230].

В сосудистом русле эритроциты перемещаются в плазме не хаотично, а в постоянном вращательном движении, совершая вокруг своей оси до 90 об/сек. Такое движение присуще только безъядерным эритроцитам. Особенно важна деформабельность для эритроцитов при их

движении через сосуды, когда диаметр кровеносных сосудов меньше размеров эритроцитов. Прохождение эритроцитов через такие сосуды определяется их способностью к деформабельности.

Деформация эритроцитов повышает гидродинамическое перемещение его цитоплазмы. Это ведет к усилению внутриклеточной конвекции кислорода, дезокси – оксигемоглобинов, что способствует диффузии кислорода и является одним из механизмов внутриклеточного транспорта кислорода, способствуя высокому переносу кислорода при относительно низком коэффициенте диффузии [7, 8]. Улучшение деформабельности эритроцитов благоприятствует транспорту кислорода через эритроцитарную мембрану.

Нормальная деформабельность является важным фактором поддержания необходимой перфузии в микроциркуляторном русле. Степень ригидности мембран эритроцитов оказывает существенное влияние на реологические свойства крови. Деформабельность эритроцита является лимитирующим фактором продолжительности его жизни. Пластичные клетки эритроидного ряда легко проходят через отверстия в венозных синусах селезенки, старые жесткие эритроциты задерживаются и подвергаются деструкции. Деформируемые эритроциты легко выходят из синусоидов костного мозга в сосудистом русле.

Способность эритроцитов к деформации определяется внутренней вязко-эластических свойств мембраны. Упругие свойства мембраны определяют ее сопротивление к деформации. Основную роль в проявлении деформабельности эритроцитов играет их цитоскелет.

Вязко-эластические свойства мембраны эритроцитов определяются, прежде всего, состоянием спектрино-активного комплекса и его взаимодействием с другими элементами мембраны. Для поддержания состояния мембраны необходима АТФ, снижение которой на 20% изменяет характер взаимодействия спектрина, актина и других интегральных белков эритроцитарной мембраны. Снижение АТФ в эритроцитах ведет к изменениям метаболизма липидов мембраны увеличению уровня ацилглицеринов, что вызывает изменение формы и вязко-эластических свойств мембраны. В стабилизации мембраны большое участие принимает 2,3-дифосфоглицерат. В мембране эритроцитов он необратимо связан со спектрином, давая необходимую эластичность

мембранному комплексу. Увеличение концентрации 2,3-дифосфоглицерата в эритроците улучшает его деформабельные свойства [230].

Снижение деформабельности эритроцитов наблюдается при повышении в них несвязанных ионов Ca^{2+} . Это приводит к тому что кальций вступает во взаимодействие с белками мембраны и оказывает влияние на их фосфорилирование. Чем больше отношение площади поверхности эритроцита к его объему, тем выраженнее его деформируемые свойства.

Появление типов на мембране эритроцитов, как это имеют свойство эхиноциты, мешает эритроцитарной деформации. Деформируемость эритроцитов изменяется с возрастом. Старые эритроциты в сравнении с молодыми обладают пониженной деформабельностью. Вероятно, это связано с нарушением эластических свойств цитоскелетного аппарата эритроцитов, а также с уменьшением содержания АТФ. Средняя внутриклеточная концентрация гемоглобина составляет для молодых эритроцитов 317 г/л, а для старых 375 г/л. У старых эритроцитов отмечается модификация биохимических свойств мембран, что приводит к эритрофагоцитозу моноцитами. Деформируемость эритроцитов плода гораздо выше, чем материнского организма, что улучшает отдачу кислорода эритроцитами плода кислорода тканям. Показано, что деформабельность эритроцитов может измениться при воздействии на эритроциты инсулина, после чего она повышается. Арахидоновая кислота, простогландин E_2 повышают ригидность эритроцитов.

Выявлено ухудшение деформабельности эритроцитов при активизации процессов перекисного окисления липидов и снижении факторов антиоксидантной защиты при различных состояниях. Внутриклеточное накопление перекисей липидов, возникающее при аутоокислении полиненасыщенных жирных кислот мембран, снижает деформабельность эритроцитов. Активизация свободнорадикальных процессов обуславливает гемореологические нарушения. При этом возникает повышение жесткости билипидного слоя, агрегация липидных белков.

Деформируемость эритроцитов чувствительна к свободным кислородным радикалам. Супероксиддисмутаза вместе с другими компонентами антиоксидантной системы обеспечивает регуляцию проокси-

дантно-антиоксидантного состояния организма через стабилизацию мембранных структур клетки. Основным проявлением повреждающего действия радикалов на мембраны является деструкция ее липидного слоя. Окислительное повреждение эритроцитов сопровождается изменениями липидного и белкового компонентов. Таким образом, деформируемость эритроцитов обеспечивает поток крови на уровне микроциркуляторного русла и тем самым формирует насыщение тканей кислородом [37, 38, 53, 96].

Особенно существенные изменения формы эритроцитов наблюдаются в микроциркуляторном русле, некоторые капилляры которого имеют диаметр около 2 и менее мкм. Прижизненная микроскопия показала, что эритроциты, движущиеся в капиллярах, подвергаются значительным деформациям, приобретая при этом разнообразные формы [96].

Благоприятное отношение площади поверхности к объему эритроцита создает оптимальные условия для обеспечения оксигенации тканей разветвленной сетью мелких капилляров. Улучшение вязкостно-эластических свойств эритроцитов благоприятствует транспорту кислорода через эритроцитарную мембрану за счет увеличения его переноса, а их нарушение коррелирует с ухудшением оксигенации тканей, и как следствие, приводит к тканевой гипоксии [160]. Нормальная деформируемость эритроцитов является важным фактором поддержания необходимой перфузии в микроциркуляторном русле, особенно при низких градиентах артериального давления, а ухудшение этого свойства эритроцитов ведет к более выраженным нарушениям показателей гемодинамики [129].

Расчет состояния деформируемости эритроцитов в больших объемах крови проводить до настоящего времени крайне трудно. Одним из методов изучения деформируемости является закрепление эритроцита в поле зрения микроскопа и при различных вариантах действия на него сдвигового напряжения: вытягивание мембраны в микропипетку или растяжения эритроцита, закрепленного на несиликонированном стекле [230]. Этот метод позволяет решать вопросы деформируемости в объеме единичных эритроцитов.

Предлагается метод пропускания эритроцитарной суспензии через искусственный капилляр малого диаметра или продавливание заданно-

го объема суспензии через микропористый фильтр. Этот метод относится к косвенным методам. Регистрируемыми параметрами, определяющими деформируемость эритроцитов, в данном случае, является «скорость фильтрации» или «время полуфильтрации». Этот метод не позволяет оценивать каково общее состояние исследуемого количества эритроцитов и как это повлияет в конечном итоге на процессы транспортных свойств эритроцитарной массы, и не дает возможности предполагать о функциональных недостатках эритроцитов крови в кровяном русле.

Более совершенным методом оценки деформации единичных эритроцитов является метод лазерной дифрактометрии эритроцитов, благодаря которому, можно дать оценку геометрических и физических параметров биологических объектов [7, 8, 40, 87, 92, 204, 205]. Метод лазерной дифрактометрии – трудоемкий и его применение для большого объема измерений вызывает затруднения.

Поскольку индекс деформирования эритроцитов (ID) зависит от площади поверхности эритроцита и его объема, то для массовых изменений состояния деформируемости эритроцитов удобен математический метод расчета индекса деформируемости (ID), при котором он будет измеряться следующим образом:

$$ID = \frac{NS}{Nm \cdot (D_{cp})^3 \cdot (1 + 3k^2)}$$

N – количество исследуемых эритроцитов;

S – среднее значение площади в ммк^2 одного эритроцита;

m – стандартное отклонение;

D_{cp} – средний диаметр эритроцитов;

k – коэффициент вариации диаметра эритроцитов;

Все эти параметры можно получить, если прибегнуть к обработке мазка крови с помощью автоматизированной фотометрической установки «Mekos» (регистрационное удостоверение МЗ РФ 29/100101198/1282-01).

По программе «Mekos» происходит сканирование эритроцитов, и выдаются необходимые параметры. Автоматически аппарат выдает

следующие параметры: средний диаметр сканированных эритроцитов ($D_{ср}$), среднее отклонение (m), площадь поверхности исследованных эритроцитов (S).

Показатель k нужно определить по формуле:

$$k = \frac{m}{D_{ср}}$$

Таким образом, мы с помощью математических расчетов можем определить индекс деформируемости на отобранном аппаратом количестве эритроцитов, которые им регистрируются. Одновременно, можно проверить достоверность этих результатов, так как одновременно, аппарат выдает формулу морфологического состояния эритроцитов. При низком ID большая доля эритроцитов приходится на эхиноциты, мишеневидные и дегенеративные формы, что увеличивает в исследованном объеме эритроцитов количество клеток с ригидной клеточной мембраной, т.е. с низкой деформируемостью [66].

При обострении в период беременности герпес-вирусной инфекции отмечается снижение деформируемости эритроцитов периферической крови.

4.6. Регуляция эритропоэза

Объем эритроцитов в организме постоянен. Это свидетельствует, что число разрушающихся эритроцитов должно постоянно пополняться, при этом в физиологических условиях и даже с учетом половых различий число их остается в среднем постоянным. Основным вопросом в процессе пополнения разрушенных постаревших эритроцитов является проблема перехода стволовых клеток в эритроидные. Вероятно, в системе кроветворения должен быть ауторегуляторный механизм по мере их убывания и, что самое примечательное, этот процесс строго ограничивается до предела необходимого организму.

Вероятно, общая стволовая клетка имеет различные информационные участки в генетическом аппарате, которые строго реагируют только на продукцию (дифференцировку) в соответствующие элементы крови. И еще очень вероятно, что этот цикл как это наблюдается часто

в организме, работает по принципу обратной связи. Возникает вопрос, что же является репрессором и активатором определенного гена – регулятора в случае дифференциации клетки в сторону эритропоэза. Вероятно, продукты гибнущих эритроцитов сами оказывают стимулирующее действие на стволовые клетки – белки полосы 4,9 [68]. Эти элементы к тому же запускают выработку эритропоэтина, а также гормоны и витамины, способствующие продукции новых генераций эритроидных элементов [42, 43].

Наряду с этим на кроветворение огромное влияние оказывают нервно-гормональная система организма [23, 31] и иммунные факторы [25, 26, 44, 45, 94, 221]. Удаление полулунного узла солнечного сплетения и удаление симпатической цепочки у кошек приводило к нарушению метаболизма в клетках эритроидного ряда костного мозга костей денервированной конечности. У большого количества эритробластов и нормобластов длительное время отмечалось диффузное окрашивание цитоплазмы 0,05% раствором нейтрального красного.

Перерезая седалищный нерв с одной стороны туловища кролика, мы нашли [64], что уже через 10 дней резко снижается в костном мозге бедра денервированной конечности дифференцировка стволовых клеток в направлении образования элементов эритроидного ряда. Так, процент митотически делящихся эритробластов в норме составлял $5,7 \pm 0,3\%$, а в костном мозге денервированной конечности – $2,3 \pm 0,2\%$. Процент митотически делящихся нормобластов в костном мозге денервированной конечности кролика составлял $0,85 \pm 0,04\%$ (контроль – $2,2 \pm 0,08\%$). Таким образом, нарушение денервации костного мозга оказывает угнетающее действие на возобновление клеток эритроидного ряда. В условиях охлаждения организма кроликов до -30°C в течение 3 часов ежедневно до 15 дней приводит к изменению секреторной активности супраоптических ядер гипоталамуса (рис. 48), что отражается на состоянии формулы эритроцитов периферической крови (рис. 51-59, таблица 8). В этот период в периферической крови кроликов увеличивается содержание АКТГ, а также количество кортизола и норадреналина до $7,5 \pm 0,8$ мкг% (интактные – $3,2 \pm 0,24$ мкг%). Влияние АКТГ на эритропоэз подтверждается и другими исследователями [76].

Гормоны и витамины, по всей видимости, не являются прямыми регуляторами эритропоэзии, но косвенно в этом процессе принимают участие. Участие гормонов в регуляции эритропоэза чрезвычайно важно. Они оказывают влияние на синтез нуклеиновых кислот, влияют на пролиферацию и дифференцировку клеточных элементов [75].

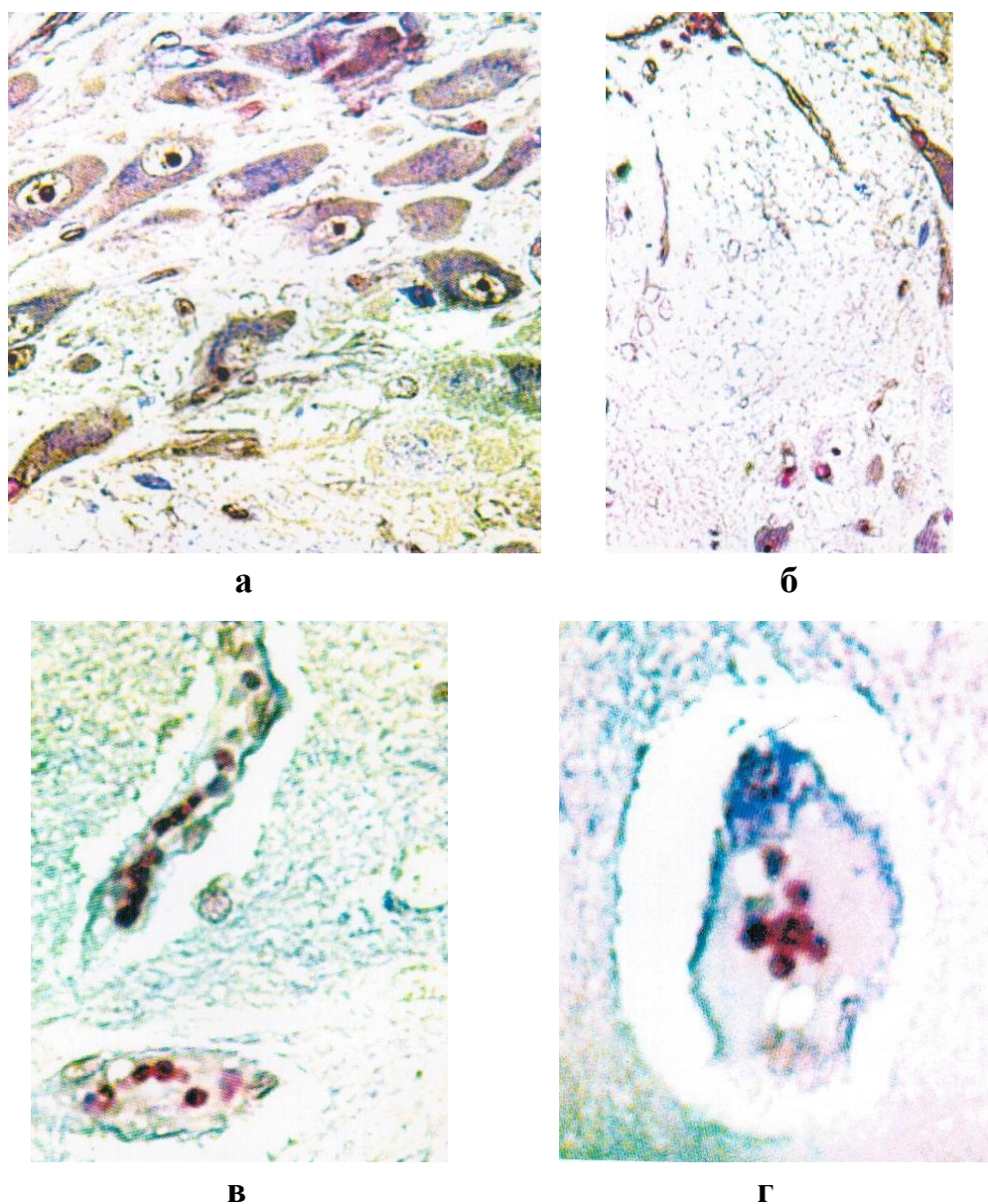


Рис. 48. Гипоталамическая область мозга кролика. Супраоптические ядра. Охлаждение организма при -30°C в течение 30 дней по 3 часа ежедневно.

а – до охлаждения

б – после 30-дневного охлаждения, разрастание кровеносных сосудов

в – охлаждение, проникновение секреторных гранул в кровеносные сосуды

г – охлаждение – нейрон с большим накоплением гранул нейросекрета

Окраска по Гомори

Применение АКТГ приводит к повышению количества ретикулоцитов и эритроцитов в периферической крови [76]. Аналогичным эффектом проявляют себя преднизолон и кортизол. При этом в среде эритроцитов при увеличении содержания преднизолона увеличивается в периферической крови количество молодых форм эритропоэза: базофильных и полихроматофильных нормобластов. Преднизолон оказывает более сильное влияние на процессы дифференциации нормобластов, нежели на процессы пролиферации.

Для выявления способности эстрогенов влиять на процессы дифференциации проведены исследования, в которых наблюдали за скоростью созревания ретикулоцитов после добавления животным эстрадиола [76]. После 6 часовой инкубации крови с эстрогенами отмечается более резкое уменьшение количества ретикулоцитов. Это свидетельствует, что эстрогены ускоряют процессы дифференцировки эритроидных элементов и их переход в эритроциты. Вероятно, эстрогены оказывают влияние на синтез гема. Особый интерес представляют витамины: В₁₄; В₆; В₂; фолиевая кислота и аскорбиновая кислота.

Витамин В₂ (рибофлавин) имеется в виде двух конформационных форм: рибофлавиннуклеотида и рибофлавинмононуклеотида. Оба кофермента являются катализаторами биологического окисления и входят в состав ферментативных систем обеспечения окислительно-восстановительных реакций. Рибофлавин принимает участие в усвоении Fe для синтеза гемоглобина. Проявляется процесс взаимодействия рибофлавина с пиридоксином и аскорбиновой кислотой. Наблюдается взаимосвязь рибофлавина с витамином В₁₂. Рибофлавин стимулирует превращение В₁₂ в активную коферментную форму, увеличивая содержание его в крови. Снижение рибофлавина в печени приводит к развитию гипохромной анемии. Витамин В₆ (пиридоксин) представляет сочетание трех витаминов: пиридоксалин, пиридоксил и пиридоксамин, каждый из которых обладает витаминной активностью после превращения в клетках в фосфорилированную форму – пиридоксаль-5-фосфат, что обеспечивается каталитической функцией пиридоксалькиназы.

Пиридоксальфосфат является простетической группой трансаминаз, осуществляющих реакции конденсации, замещения и расщепления,

играя важную роль в синтезе аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований, ряда кофакторов (НАД, НАДФ, КоА) в биогенезе физиологически активных веществ: норадреналина, серотонина, γ -аминомасляной кислоты. Роль пиридоксальфосфата как многофакторного биокатализатора и фактора интеграции обмена веществ на молекулярном уровне широко изучена и обоснована в работах Браунштейна А.Е. При обсуждении вопроса непосредственного участия витамина В₆ в кроветворении следует прежде всего вспомнить о пиридоксальзависимой анемии, характеризующийся анизопойкилоцитозом с выраженной гипохромией и микроцитозом [165-168].

Кроветворение в костном мозге контролируется через выделение различных цитокинов. В костном мозге формируются гемопоэтические островки (рис. 49). В эритроидном островке в центре находятся макрофаги, а их окружают несколькими слоями эритро-нормобласты [120, 126]. Кроветворные островки вероятно стимулируются ИЛ-1 и ИЛ-6 [31].

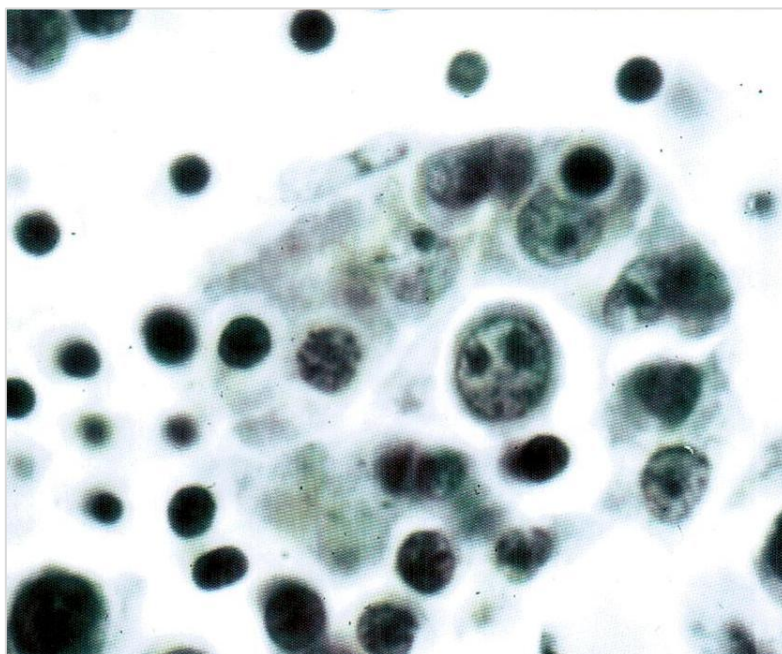


Рис. 49. Костный мозг кролика. Гемопоэтический островок.

*Глава 1***МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ЭРИТРОЦИТА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ
НА НЕГО ВОЗДЕЙСТВИЯХ****Морфофункциональная характеристика эритроцитов
периферической крови при общем охлаждении организма**

В условиях общего охлаждения организма на фоне увеличения количества адреналина и норадреналина в периферической крови происходит мобилизация синтеза и освобождение из депо общих липидов. Так, уже на 5 день охлаждения кроликов при температуре -30°C количество общих липидов увеличивается до $3,2 \pm 0,5$ г/л (интактные животные – $1,9 \pm 0,3$ г/л). В последующие дни эксперимента количество липидов в периферической крови продолжает нарастать: на 15 день – $5,2 \pm 0,9$ г/л и к 30 дню эксперимента количество липидов в крови остается высоким – $4,3 \pm 0,9$ г/л. У интактных животных процентное содержание фосфолипидов определяется в пределах $20,0 \pm 2,1\%$. Во время же охлаждения организма общее содержание фосфолипидов снижается после однократного охлаждения до $17,1 \pm 1,1\%$; к 5 дню эксперимента – до $16,0 \pm 0,8\%$ и затем остается в пределах $14,2 \pm 1,7$ до 30 дня ежедневного воздействия низких температур на организм животного.

Процентное содержание холестерина почти на всех этапах охлаждения постепенно увеличивается: однократное охлаждение – $13,2 \pm 0,2$ ммоль/л; через 5 дней – $1,5$ ммоль/л; к концу 30 дня эксперимента – $2,7 \pm 0,8$ ммоль/л (контроль – $1,25\%$).

Концентрация триглицеридов при остром охлаждении (3 часа при температуре -30°C) возрастает до $28,1 \pm 0,9\%$, а затем содержание их остается в пределах $23,5 \pm 1,8\%$ на 5 день охлаждения и $22,0 \pm 1,2\%$ – в конце эксперимента (интактные кролики – $21,0 \pm 1,6\%$). Свободные жирные кислоты при охлаждении организма начинают нарастать в силу повышения энергетических потребностей организма: через 3 часа после охлаждения – $5,5 \pm 1,2\%$; на 5 день – $6,6 \pm 1,3\%$; к 30 дню эксперимента –

4,1±0,9% (интактные животные – 3,5±0,5%). Характер изменения липидного обмена в плазме периферической крови у животных, подвергавшихся общему охлаждению, отражен в таблице 2.

Таблица 2

Липидный обмен в периферической крови кроликов, подвергавшихся общему охлаждению в климатокамере при температуре -30°C

Показатели	Охлаждение по 3 часа ежедневно в течение			
	интактные животные	5 дней	15 дней	30 дней
Общие липиды, г/л	1,9±0,3	3,2±0,5*	5,2±0,9*	4,3±0,9*
Общий холестерин, ммоль/л	1,25±0,02	1,5±0,3*	2,0±0,5*	2,7±0,8*
Фосфолипиды, %	19,0±2,1	17,1±1,1*	16,0±0,8*	14,2±1,7*
Свободные жирные кислоты, %	1,9±0,2	3,2±0,9*	5,2±1,1*	4,3±0,8*
Триглицериды, %	25,0±0,9	28,1±0,8*	22,0±1,6*	21,0±1,2*

Примечание: * - различия статистически значимы при $p(t)<0,05$, $p(F)<0,05$.

Одновременно в периферической крови определялись продукты липидного обмена, которые могли оказывать влияние на процессы метаболизма в других системах организма. Так в периферической крови, как в плазме, так и в эритроцитах по мере охлаждения организма увеличивалось содержание арахидоновой кислоты. В плазме крови уже после однократного охлаждения организма процентное содержание арахидоновой кислоты увеличилось почти втрое – 4,58±0,5% (интактные кролики – 1,9±0,08%). На 5 день охлаждения процентное содержание арахидоновой кислоты повысилось до 10,9±0,9%, оставаясь до конца эксперимента (табл. 3, 4) в пределах 8,0±0,8%.

Аналогичная закономерность выявлялась и при анализе жирнокислотного состава мембран эритроцитов. После однократного охлаждения организма в мембранах эритроцитов мы обнаружили 2,5±0,3% арахидоновой кислоты, содержание которой увеличивалось в последующем по мере охлаждения организма кролика в климатокамере при -30°C. На 5 день эксперимента процентное содержание арахидоновой кислоты увеличилось до 6,8±0,5%, а к 30 дню охлаждения оставалось в пределах 6,3±0,8% (табл. 5, 6).

Таблица 3

Содержание различных классов фосфолипидов в плазме периферической крови кроликов при общем охлаждении организма в климатокамере при температуре -30°C

Фосфолипиды	Интактные животные	После однократного охлаждения в течение 5 дней	После 15 дневного охлаждения в течение 3ч.	После 30 дневного охлаждения в течение 3 ч.
Фосфатидилхолин	24,0±4,0	28,3±3,6*	28,5±1,8*	29,0±2,1*
Фосфатидилэтаноламин	45,0±5,5	43,3±2,9*	40,0±3,1*	36,2±1,8*
Фосфатидилсерин	8,3±1,4	3,9±0,8*	6,6±0,9*	4,0±0,6*
Фосфатидилинозитол	4,6±1,8	3,0±0,5*	4,5±0,3	7,0±0,8*
Фосфатидные кислоты	3,2±0,5	3,5±0,3	-	-
Сфингомиелин	14,5±0,8	15,0±0,6	15,2±1,2*	16,8±1,1*
Лизофосфатидилхолин	0,4±0,05	3,0±0,2*	5,2±0,8*	7,0±0,8*

Примечание: * - различия статистически значимы при $p(t)<0,05$, $P(F)<0,05$.

Таблица 4

Спектр жирных кислот в плазме периферической крови кроликов при общем охлаждении организма в климатокамере при температуре -30°C

Жирные кислоты	Шифр ЖК	Интактные животные	После 5 дневного охлаждения при -30°C в течение 3ч.	После 15 дневного охлаждения при -30°C в течение 3ч.	После 30 дневного охлаждения при -30°C в течение 3ч.
Лауриновая	C 12:0	0,47±0,15	0,95±0,3*	0,2±0,05*	0,3±0,04*
Лауролеиновая	C 12:1	0,31±0,05	0,65±0,1*	0,2±0,02*	0,3±0,01*
Миристиновая	C 14:0	1,55±0,04	2,93±0,5*	1,4±0,4*	0,6±0,03*
Миристолеиновая	C 14:1	0,65±0,01	0,85±0,02*	0,6±0,01	0,2±0,02
Пентадеценная	C 15:0	0,3±0,08	0,27±0,07	0,4±0,01	0,3±0,01*
Пальмитиновая	C 16:0	26,9±2,7	24,4±2,5*	23,2±1,6*	20,3±1,4*
Пальмитолеиновая	C 16:1	1,3±0,7	8,7±1,2*	1,2±0,08*	0,6±0,1
Маргариновая	C 17:0	1,6±0,10	0,75±0,1*	1,4±0,02*	2,3±0,02
Гептадексовая	C 17:1	0,92±0,06	0,64±0,09*	0,5±0,01*	0,6±0,01*
Стеариновая	C 18:0	18,9±1,5	15,0±1,0*	17,8±1,0*	17,8±0,04*
Олеиновая	C 18:1	17,0±1,2	22,0±1,8*	14,0±0,6*	14,3±0,9*
Линолевая	C 18:2	26,3±2,0	16,2±1,3*	26,5±1,4*	30,0±2,0*
Линоленовая	C 18:3	0,9±0,04	1,0±0,09*	0,7±0,04*	1,6±0,09*
Эйкозодиеновая	C 20:2	0,5±0,04	0,54±0,04	0,5±0,01	1,5±0,01*
Эйкозатетраеновая	C 20:3	0,5±0,03	0,59±0,01	0,8±0,02*	1,1±0,02*
Арахидоновая	C 20:4	1,9±0,08	4,58±0,05*	10,9±0,9*	8,0±0,8*

Примечание: * – различия статистически значимы при $p(t)<0,05$, $p(F)<0,05$.

Таблица 5

**Спектр жирных кислот в мембранах эритроцитов
периферической крови кроликов при общем охлаждении организма
в климатокамере при температуре -30°C**

Жирные кислоты	Шифр ЖК	Интактные животные	После 5 дневного охлаждения в течение 3 ч.	После 15 дневного охлаждения в течение 3 ч.	После 30 дневного охлаждения в течение 3 ч.
Лауриновая	C 12:0	2,45±0,04	1,58±0,08*	1,7±0,06*	1,5±0,09
Лауролеиновая	C 12:1	0,96±0,037	0,84±0,01*	0,6±0,01*	0,5±0,02*
Миристиновая	C 14:0	1,6±0,2	1,02±0,3*	следы	следы
Миристолеиновая	C 14:1	0,93±0,03	0,68±0,02*	0,7±0,02*	0,8±0,3*
Пентадеценовая	C 15:0	0,96±0,3	0,68±0,03*	0,5±0,02*	0,7±0,06*
Пальмитиновая	C 16:0	24,3±1,4	36,0±1,5*	23,5±1,4*	25,0±1,5*
Пальмитолеиновая	C 16:1	0,7±0,04	7,2±1,2*	0,9±0,07	0,9±0,04*
Маргариновая	C 17:0	1,7±0,09	0,7±0,1*	1,2±0,08*	2,0±0,09*
Гептадекновая	C 17:1	1,0±0,2	0,46±0,09*	0,5±0,02*	0,7±0,07*
Стеариновая	C 18:0	15,0±0,8	6,8±0,8*	17,0±0,5*	14,0±1,1*
Олеиновая	C 18:1	20,3±1,1	20,4±1,4	16,0±0,7*	15,2±1,3*
Линолевая	C 18:2	25,2±1,6	18,6±2,3*	29,7±1,1*	30,0±1,9*
Линоленовая	C 18:3	1,0±0,09	0,7±0,05*	следы	следы
Эйкозодиеновая	C 20:2	0,5±0,03	0,95±0,01*	0,9±0,03*	0,9±0,07*
Эйкозатетраеновая	C 20:3	0,8±0,03	0,89±0,02	0,69±0,05*	1,5±0,03*
Арахидоновая	C 20:4	2,6±0,03	2,5±0,3	6,8±0,5*	6,3±0,8*

Примечание: * - различия статистически значимы при $p(t) < 0,05$, $P(F) < 0,05$.

Подобного рода ситуация заставила нас проанализировать состав фосфолипидов как в плазме, так и в мембранах эритроцитов. Повышенное содержание в плазме периферической крови и мембранах эритроцитов арахидоновой кислоты создают в этих условиях образование лизофосфатидилхолина и снижение уровня фосфатидилино-зитола. Нами отмечено, что уже после однократного охлаждения организма содержание лизофосфатидилхолина в плазме периферической крови увеличивается в несколько раз, с последующим еще большим увеличением по мере охлаждения организма.

Таблица 6

Содержание различных классов фосфолипидов в мембранах эритроцитов периферической крови кроликов при общем охлаждении организма в климатокамере при температуре -30°C по 3 часа ежедневно

Фосфолипиды	Интактные животные	После однократного охлаждения в течение 5 дней	После 15 дневного охлаждения в течение 3 ч.	После 30 дневного охлаждения в течение 3 ч.
Фосфатидилхолин	$38,0 \pm 6,4$	$18,0 \pm 1,3^*$	$32,8 \pm 4,6^*$	$26,3 \pm 2,5^*$
Фосфатидилэтаноламин	$23,5 \pm 7,7$	$45,0 \pm 2,9^*$	$29,9 \pm 6,3^*$	$27,8 \pm 1,8^*$
Фосфатидилсерин	$5,0 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,4^*$	$6,0 \pm 0,9^*$	$7,5 \pm 0,9^*$
Фосфатидилинозитол	$8,7 \pm 1,0$	$12,0 \pm 1,6^*$	$8,0 \pm 0,6$	$9,4 \pm 1,1^*$
Фосфатидные кислоты	-	$1,9 \pm 0,05^*$	-	-
Сфингомиелин	$24,1 \pm 6,5$	$18,0 \pm 1,5^*$	$17,3 \pm 0,8^*$	$20,5 \pm 1,8^*$
Лизофосфатидилхолин	$0,7 \pm 0,05$	$2,0 \pm 0,09^*$	$6,0 \pm 0,5^*$	$8,5 \pm 0,8^*$

Примечание: * - различия статистически значимы при $p(t) < 0,05$, $p(F) < 0,05$.

Через 3 часа после воздействия на организм кролика температуры -30°C содержание лизофосфатидилхолина увеличилось до $3,0 \pm 0,2\%$ (до охлаждения - $0,4 \pm 0,05\%$). На 5 день охлаждения процентное содержание лизофосфатидилхолина увеличилось до $5,2 \pm 0,8\%$, а к 30 дню до $7,0 \pm 0,8\%$. Еще отчетливее выглядело изменение состава фосфолипидов в клеточных мембранах. После однократного охлаждения процентное содержание лизофосфатидилхолина составило $2,0 \pm 0,09\%$, на 5 день – $6,0 \pm 0,5\%$, а к 30 дню – $8,5 \pm 0,8\%$. Это обстоятельство сильно отражается на содержании в мембранах эйкозаноидов.

Действие низких температур длительное время на организм, как мы видим из проведенного эксперимента, оказывает сильное влияние на липидный обмен. Исследования последних лет показывают, что в таких ситуациях ведущим фактором в превращении органических соединений в клетках животного организма является перекисное свободнорадикальное окисление липидов. При этом отмечается накопление липидных перекисей.

Вполне возможно, что различным организмам присущ определенный уровень перекисных соединений, являющихся следствием цепных процессов перекисного окисления в некоторых системах.

Реакции перекисного окисления липидов принимают активное участие в «разборке» биологических мембран, перестраивают синтез жирных кислот порой с образованием конечных продуктов токсично действующих на ферментатические процессы в клеточных структурах. Выше мы показали, что при длительном охлаждении организма животного при температуре -30°C арахидоновая кислота подвергается деградации в сторону повышенного образования эйкозаноидов.

Среди всего многообразия эффектов перекисного окисления наиболее существенны такие явления как деградация жирных кислот биомембран. Такие нарушения вызывают, прежде всего, изменения проницаемости мембранных структур. Это подтверждается на структуре мембран эритроцитов при охлаждении кроликов в течение 30 дней ежедневно по 3 часа при температуре -30°C (рис. 50).

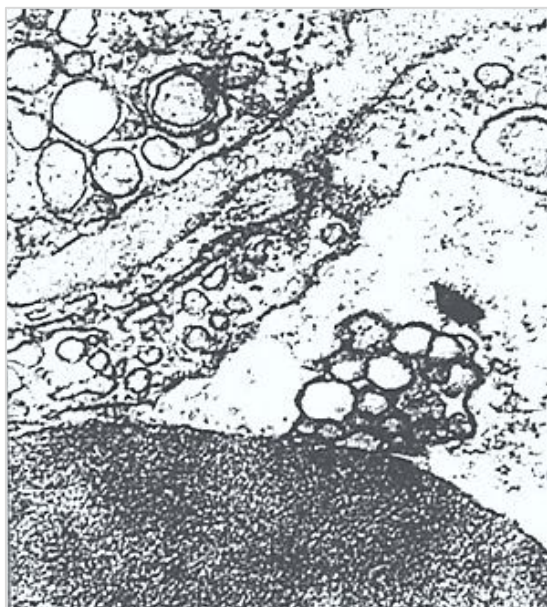


Рис. 50. Сосуд легкого кролика, подвергавшегося охлаждению при -30°C ежедневно в течение 14 дней. Мембраны эритроцитов сбрасывают в плазму периферической крови многочисленные пузырьковидные участки мембраны. Электронная микроскопия. Увеличение $\times 20000$.

Подтверждением этого положения является увеличение содержания продуктов перекисного окисления липидов в периферической крови и мембранах эритроцитов у экспериментальных животных. У интактных кроликов в периферической крови определяется не более $0,75$ мкмоль/мл перекисей жирных кислот (МДА). После охлаждения кро-

ликов в климатокамере в течение 5 дней по 3 часа ежедневно при температуре -30°C количество перекисей резко увеличивается и составляет $1,63 \pm 0,1$ мкмоль/мл. По мере дальнейшего охлаждения количество перекисей в плазме периферической крови увеличивается и достигает к 15 дню эксперимента до $1,85 \pm 0,3$ мкмоль/мл, а на 30 день охлаждения животных до $2,2 \pm 0,4$ мкмоль/мл.

Исследование мембран эритроцитов подтверждает, что при стрессовом состоянии, вызванном длительным воздействием низких температур на организм на протяжении длительного времени липиды клеточных мембран подвергаются липидному перекисному окислению. В норме в мембранах эритроцитов у кроликов мы не определяли перекисей жирных кислот выше $0,85-0,9 \pm 0,08$ мкмоль/мл. Однако уже 5-дневное охлаждение животных приводит к увеличению количества МДА в мембранах эритроцитов до $1,29 \pm 0,08$ мкмоль/мл. Дальнейшее воздействие на организм температуры -30°C в течение 30 дней увеличивает содержание перекисей в мембранах эритроцитов до $2,8 \pm 0,3$ мкмоль/мл. В мембранах эритроцитов после 30 дневного охлаждения животных определялось до $22,0 \pm 0,8$ нмоль МДА (контроль – $17,5 \pm 1,3$ нмоль).

Одновременно в периферической крови у этих животных нарастало по мере охлаждения организма содержание гистамина и серотонина. Так, на 5 день охлаждения в плазме периферической крови количество гистамина определялось $0,16 \pm 0,01$ мкг/мл (интактные животные – $0,02$ мкг/мл). По мере охлаждения организма содержание гистамина в периферической крови увеличилось до $0,185$ мкг/мл. Количество серотонина на 5 день охлаждения определялось в плазме периферической крови до $0,8 \pm 0,03$ мкг/мл, а к 30 дню эксперимента – $0,91 \pm 0,05$ мкг/мл (интактные животные – $0,20$ мкг/мл).

Таким образом, продолжительное время охлаждения организма при температуре -30°C приводит к активизации гипоталамо-надпочечниковой системы организма, что приводило к нарушению липидного обмена, сопровождавшегося увеличением выброса в кровь эйкозаноидов, и к увеличению синтеза лизофосфатидилхолина. Это, прежде всего, отражается на структуре мембран эритроцитов, а также

негативном влиянии на обменные процессы клеток во многих тканевых системах.

При общем охлаждении организма кроликов отмечали текучесть клеточной мембраны эритроцитов, особенно на 30 день эксперимента при температуре -30°C (рис. 50). Аналогичные изменения часто наблюдались и со стороны клеточных мембран эндотелиальных клеток мелких сосудов в зоне аэрогематического барьера легких кроликов, подвергавшихся охлаждению.

Кисотно-щелочное состояние

Процесс очищения внутри- и внеклеточной жидкости от продуктов метаболизма оказывается возможным благодаря наличию непрерывного потока внеклеточной жидкости в венозное русло и приход на ее место из сосудистого русла (артериальные капилляры) во внеклеточную жидкость очищенных порций для формирования обновленной тканевой среды.

Процессы «самоотравления», связанные с метаболизмом тканей и процессы восстановления, связанные с функцией выделительных систем и органов, находятся в тесной зависимости с метаболизмом кислот и оснований. При этом важную роль играют буферные системы организма, удерживающие активную реакцию жидкостей организма на уровне нормы. Если патологические процессы нарушают это равновесие, наступают в жизненноважных органах тяжелые метаболические отклонения. Кисотно-щелочное равновесие – это, прежде всего постоянство водородного показателя (рН) внутренней среды организма, обусловленное совместным действием буферных и некоторых физиологических систем, определяющих полноценность метаболических превращений в клетках организма.

Изменение показателя кислотно-щелочного равновесия свидетельствует о нарушениях газового обмена и метаболических процессов в организме и о степени их тяжести. Диапазон колебаний рН крови – от 7,37 до 7,44; средняя величина -7,4. Исходя из этого мы тщательно анализировали показатели, отражающие характер кислотно-щелочного равновесия организма кроликов, подвергавшихся общему охлаждению при температуре -30°C продолжительностью от 5 до 30 дней. Исследо-

вания показали, что после длительного воздействия низких температур на организм животных, у них отмечалась тенденция к неуклонному снижению рН периферической крови. Так, если в норме рН крови у кроликов определялся до охлаждения в среднем как $\text{pH}=7,42\pm0,006$, то через 15 дней эксперимента этот показатель составлял $\text{pH}=7,39\pm0,013$ ($p<0,05$), а через 30 дней охлаждения – $\text{pH}=7,34\pm0,0139$ ($p<0,05$). Такое состояние следует рассматривать как компенсированный метаболический ацидоз.

Продолжая анализировать другие показатели, характеризующие кислотно-щелочное равновесие в этих условиях, мы находим, что pO_2 при охлаждении организма снижается до 95 ± 42 мм рт. ст. (интактные животные), а после 15 дневного охлаждения – до $75,1\pm2,1$ мм рт. ст. и до $42,7$ мм рт. ст. при действии на организм -30°C в течение 30 дней по 3 часа ежедневно. Это свидетельствует, что в организме складываются условия тканевой гипоксии pCO_2 в норме – $38,0\pm1,5$ мм рт. ст. После 15 дневного охлаждения – $39,6\pm2,5$ мм рт. ст., а затем удерживается в пределах $42,7\pm2,9$ мм рт. ст. при 30 дневном воздействии на организм температуры -30°C . ВЕ в норме – $+0,34\pm0,02$; после охлаждения в течение 15 дней – $-1,74\pm0,03$, а после 30 дневного эксперимента – $-2,1\pm0,08$. Таким образом, нарушение липидного метаболизма при охлаждении организма приводит к явлению метаболического ацидоза в организме и служит плохим предвестником для нормальной работы всей сердечно-сосудистой системы.

Биоэнергетические процессы в эритроцитах периферической крови кроликов при общем охлаждении организма

По мере старения эритроцитов происходит уменьшение способности к восстановлению метгемоглобина в гемоглобин, что вероятно связано с понижением способности эритроцита к гликолизу и особенно к образованию НАД-Н. Наиболее важным моментом в обмене эритроцита является способность 2,3-дифосфоглицерата, образующегося в результате расщепления глюкозы регулировать сродство гемоглобина к кислороду.

По мере старения эритроцита содержание 2,3-дифосфоглицерата повышается. Содержание 2,3-ДФГ зависит от взаимоотношения ферментов, участвующих в реакциях образования и распада этого соединения. 2,3-ДФГ связан с мембраной эритроцита и участвует в переносе неорганического фосфора во внутрь клетки. Количество 2,3-ДФГ во многом зависит от уровня АДФ, из которого он формируется с одновременным образованием АТФ.

При накоплении 2,3-ДФГ увеличивается содержание метгемоглобина. Одновременно увеличивается и процесс окисления НАД·Н, поскольку НАД·Н-метгемоглобинредуктаза восстанавливает метгемоглобин. Таким образом, в регуляции уровня 2,3-ДФГ в эритроцитах принимает участие активность ферментов, концентрация метаболитов, рН эритроцитов. Оценивая старение и функцию эритроцитов периферической крови мы должны, прежде всего, обратить внимание на содержание в них таких ключевых веществ как АТФ, РН, 2,3-ДФГ, неорганического фосфора, определяющих не только строение, но и основную функцию - перенос газов крови.

Исследуя биоэнергетические свойства эритроцитов периферической крови кроликов в условиях общего охлаждения организма при -30°C , мы обнаружили, что по мере продолжительности опыта происходят существенные сдвиги в синтезе гемоглобина. Так, количество общего гемоглобина постепенно к 30 дню эксперимента снижается до $11,10 \pm 5$ г/л (интактные кролики $13,20 \pm 8,2$ г/л). Промежуточные этапы характеризовались следующими показателями: на 5 день охлаждения – $12,66 \pm 4,5$ г/л, к 15 дню эксперимента – $11,45 \pm 6,1$ г/л. Количество оксигемоглобина также снижалось по мере охлаждения организма животных: 5 день охлаждения – $98,5 \pm 2,5\%$; 15 день – $96,0 \pm 3,9\%$, а на 30 день эксперимента процентное содержание HbO_2 снижалось до $95,0 \pm 3,2\%$ (интактные животные – $99,5 \pm 3,0$). Наряду с этим в эритроцитах периферической крови при общем охлаждении организма отмечалось нарастание процентного содержания метгемоглобина: на 5 день охлаждения – $0,65 \pm 0,04\%$; на 15 день – $0,85 \pm 0,09\%$, а к 30 дню эксперимента содержание метгемоглобина увеличивалось до $1,35 \pm 0,2\%$ (интактные – $0,5 \pm 0,06\%$). Поскольку уровень оксигемоглобина при этом эксперимен-

те снижен (HbO_2 на 30 день охлаждения организма снижается до $95 \pm 3,2\%$) и наступает гипоксия, увеличение в эритроцитах метгемоглобина можно считать закономерным, так как нарушается работа метгемоглобинредуктазы.

На фоне общего охлаждения организма происходит снижение в эритроцитах содержания АТФ и АДФ при увеличении АМФ и неорганического фосфата. Увеличение АМФ является фактором, способствующим активизации гексокиназы, пускового фермента гликолиза – поставщика АТФ в эритроцитах.

На 30 день гипоксии, в процессе адаптации, у кроликов повышается содержание АМФ, приближался к нормальному уровню: 5 день – $0,89 \pm 0,01$; 15 день – $0,93 \pm 0,15$; 30 день эксперимента – $1,2 \pm 0,08$ мкмоль/мл; интактные кролики – $1,35 \pm 0,4$ мкмоль/мл. Количество же АДФ снижено: 5 день охлаждения – $1,0 \pm 0,07$ мкмоль/мл; 15 день – $0,8 \pm 0,06$ мкмоль/мл; 30 день – $0,6 \pm 0,05$ мкмоль/мл; интактные – $1,39 \pm 0,08$. Поступления в эритроциты неорганического фосфора увеличивается: 5 день – $0,064 \pm 0,003$; 15 день – $0,088 \pm 0,003$; 30 день – $0,090 \pm 0,007$ мкмоль/мл; интактные животные – $0,050 \pm 0,003$ мкмоль/мл. Можно предполагать, что это связано с реакцией гидролиза АДФ. При охлаждении организма основной энергетический продукт эритроцитов АТФ резко снижается: 5 день эксперимента – $0,6 \pm 0,004$ мкмоль/мл, 15 день охлаждения организма – $0,49 \pm 0,006$ мкмоль/мл; 30 день – $0,34 \pm 0,06$ мкмоль/мл; интактные кролики – $0,85 \pm 0,07$ мкмоль/мл.

Вероятно, эти энергетические изменения происходят за счет повышенного, в условиях общего охлаждения организма, содержания катехоламинов. Большую роль в метаболизме эритроцитов играет побочный путь расщепления глюкозы с образованием 2,3-дифосфоглицериновой кислоты (2,3-ДФГ). Основное значение этого соединения состоит в регуляции сродства гемоглобина к кислороду. Увеличение концентрации 2,3-ДФГ в эритроцитах ведет к снижению сродства гемоглобина к кислороду путем образования 2,3-ДФГ+Hb, этот процесс обеспечивает ткани кислородом в условиях начинающейся гипоксии. При исследовании эритроцитов периферической крови кро-

ликов в условиях длительного охлаждения, мы отметили, что процессы формирования 2,3-ДФГ в эритроцитах повышены.

У интактных кроликов в эритроцитах определяется $4,8 \pm 0,4$ мкмоль/мл 2,3-ДФГ. При охлаждении организма содержание 2,3-ДФГ постепенно увеличивается и составляет на 5 день эксперимента $5,8 \pm 0,3$ мкмоль/мл; на 15 день – $4,0 \pm 0,5$ мкмоль/мл, а к 30 дню охлаждения содержание 2,3-ДФГ увеличивается до $6,95 \pm 0,4$ мкмоль/мл. Отдача кислорода гемоглобином резко снижается, что и определяет формирование тканевой гипоксии (табл. 7).

Таблица 7

Показатели биоэнергетических процессов в эритроцитах периферической крови кроликов при общем охлаждении организма

Показатели	Интактные животные	Охлаждение в теч. 5 дней при -30°C по 3 ч. в день	Охлаждение в теч. 15 дней при -30°C по 3 ч. в день	Охлаждение в теч. 30 дней при -30°C по 3 ч. в день
Общий гемоглобин (г/л)	$13,20 \pm 8,2$	$12,66 \pm 4,5^*$	$11,45 \pm 6,1^*$	$11,10 \pm 5^*$
Оксигемоглобин (%)	$99,5 \pm 3,0$	$98,5 \pm 2,5^*$	$96,0 \pm 3,9^*$	$95,0 \pm 3,2^*$
Метгемоглобин (%)	$0,50 \pm 0,06$	$0,55 \pm 0,04$ ($p > 0,5$)	$0,85 \pm 0,09^*$	$1,35 \pm 0,2^*$
Фосфор неорганический (мкмоль/мл)	$0,050 \pm 0,003$	$0,064 \pm 0,003^*$	$0,088 \pm 0,003^*$	$0,090 \pm 0,007^*$
Фосфор органический (мкмоль/мл)	$0,099 \pm 0,002$	$0,097 \pm 0,003^*$	$0,62 \pm 0,003^*$	$0,056 \pm 0,004^*$
2,3-ДФГ (мкмоль/мл)	$4,8 \pm 0,4$	$5,8 \pm 0,3^*$	$6,0 \pm 0,5^*$	$6,95 \pm 0,4^*$
АМФ (мкмоль/мл)	$1,35 \pm 0,4$	$0,89 \pm 0,01^*$	$0,93 \pm 0,15^*$	$1,2 \pm 0,08^*$
АДФ (мкмоль/мл)	$1,39 \pm 0,08$	$1,0 \pm 0,07^*$	$0,8 \pm 0,06^*$	$0,6 \pm 0,15^*$
АТФ (мкмоль/мл)	$0,85 \pm 0,07$	$0,6 \pm 0,04$ ($p > 0,5$)	$0,49 \pm 0,06^*$	$0,34 \pm 0,06^*$

Примечание: * - различия статистически значимы при $p(t) < 0,05$; $p(F) < 0,05$.

Изучение кривой Прайс-Джонса показывает (рис. 51, 52, 53, 54) диаметр эритроцитов резко изменяется в условиях эксперимента со сдвигом в левую сторону, то есть увеличивается процент эритроцитов с меньшим диаметром. Одновременно на основании компьютерной обработки качества эритроцитарной фигуры, мы смогли показать, что все описанные ранее изменения эритроцитов (состав фосфолипидов, пере-

кисное окисление мембран эритроцитов, нарушение энергетического обмена) тяжело отражаются на общем строении этих элементов (табл.8-12). Увеличивается число эхиноцитов к 30 дню эксперимента по сравнению с интактными животными на 86,2%; почти вдвое увеличивается число дегенеративных форм эритроцитов.

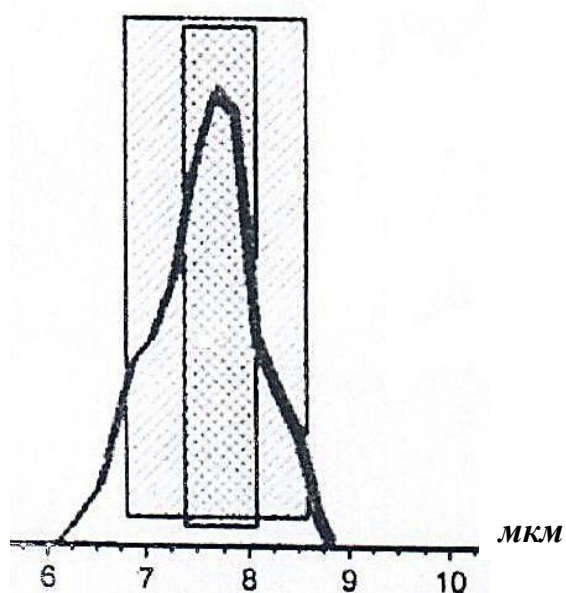


Рис. 51 Периферическая кровь интактного кролика. Кривая Прайс-Джонса.

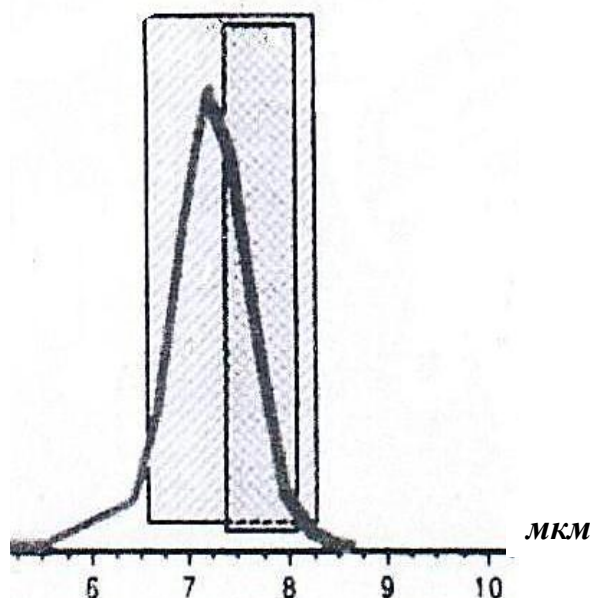


Рис. 52. Периферическая кровь кролика. Кривая Прайс-Джонса при охлаждении при температуре -30° по Цельсию в течение 5 дней по 3 часа ежедневно.

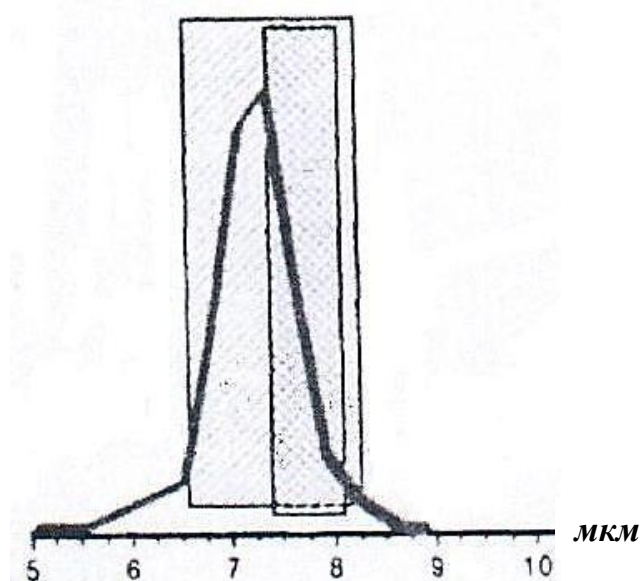


Рис. 53. Периферическая кровь кролика. Кривая Прайс-Джонса при охлаждении при температуре -30° по Цельсию в течение 15 дней по 3 часа ежедневно.

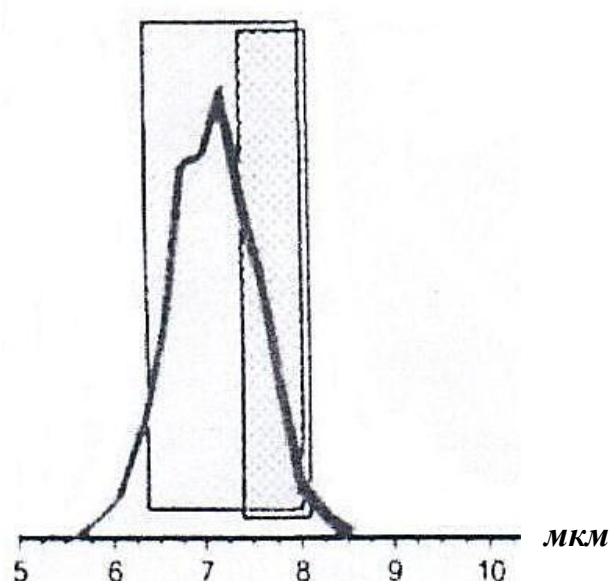


Рис. 54. Периферическая кровь кролика. Кривая Прайс-Джонса при охлаждении при температуре -30° по Цельсию в течение 30 дней по 3 часа ежедневно.

Таблица 8

Формула эритроцитов интактного кролика (%)

Тип эритроцита	Микро	Нормо	Макро	Всего
Дискоциты	4,3±0,02	81,4±1,9	0,0	85,7±1,7
Эхиноциты	1,0±0,001	1,9±0,03	0,0	2,9±0,03
Мишеневидные	0,0	0,5±0,01	0,0	0,5±0,01
Укушенные	0,0	1,4±0,008	0,0	1,4±0,008
Дегенераты	2,4±0,03	7,1±0,05	0,0	9,5±0,04
Всего	7,7	92,3	0,0	100

Примечание – здесь и в таблицах 9-11 различия статистически значимы при $p(t) < 0,05$; $p(F) < 0,05$

Таблица 9

Формула эритроцитов (%) кролика охлаждавшегося в течение 5 дней при температуре -30° по Цельсию по 3 часа ежедневно

Тип эритроцита	Микро	Нормо	Макро	Всего
Дискоциты	9,5±0,05	70,6±1,8	0,0	80,1±2,1
Эхиноциты	0,0	7,6±0,05	0,0	7,6±0,05
Мишеневидные	0,0	0,4±0,002	0,0	0,4±0,02
Укушенные	0,0	0,3±0,001	0,0	0,3±0,001
Дегенераты	1,5±0,02	10,1±0,02	0,0	11,6±0,02
Всего	11,0	89,0	0,0	100

Таблица 10

Формула эритроцитов (%) кролика, подвергавшегося охлаждению при температуре -30° в течение 15 дней по 3 часа ежедневно

Тип эритроцита	Микро	Нормо	Макро	Всего
Дискоциты	6,0±0,04*	69,5±1,9*	0,0	75,5±3,2*
Эхиноциты	2,5±0,02*	28,0±0,3*	0,0	10,5±0,08*
Мишеневидные	0,0	4,0±0,08*	0,0	4,0±0,05*
Дегенераты	4,0±0,008*	6,0±0,05*	0,0	10,0±0,9
Всего	12,5	87,5	0,0	100

Таблица 11

Формула эритроцитов (%). Периферическая кровь кролика, подвергавшегося охлаждению при -30° С в течение 30 дней по 3 часа ежедневно

Тип эритроцита	Микро	Нормо	Макро	Всего
Дискоциты	14,9*	53,1*	0,0	58,0±1,7*
Эхиноциты	8,9*	12,0*	0,0	20,9±1,2*
Мишеневидные	0,3*	2,6*	0,0	2,9±0,06*
Дегенераты	6,5*	11,7*	0,0	18,3±1,4*
Всего	30,6*	59,6*	0,0	100

Таблица 12

Процентное содержание различных типов эритроцитов кролика после охлаждения организма при температуре -30°C по 3 часа ежедневно

Сроки охлаждения	Типы эритроцитов в (%)				
	Дискоциты	Эхиноциты	Мишеневидные	Укушенные	Дегенеративные
Интактные	85,7 $\pm$ 1,7	2,9 $\pm$ 0,03	0,5 $\pm$ 0,001	1,4 $\pm$ 0,008	9,5 $\pm$ 0,04
5 дней охлаждения при -30°C по 3 часа ежедневно	80,0 $\pm$ 2,1	7,6 $\pm$ 0,05	0,4 $\pm$ 0,002	0,3 $\pm$ 0,001	11,6 $\pm$ 0,02
15 дней охлаждения при -30°C по 3 часа ежедневно	75,5 $\pm$ 3,2	10,5 $\pm$ 0,08	4,0 $\pm$ 0,05	0,0	10,0 $\pm$ 0,9
30 дней охлаждения при -30°C по 3 часа ежедневно	58,0 $\pm$ 1,7	20,9 $\pm$ 1,2	2,9 $\pm$ 0,06	0,0	18,3 $\pm$ 1,4

Примечание: * - различия статистически значимы при $p(t)<0,05$; $p(F)<0,05$.

В периферической крови на 30-й день эксперимента увеличивается число эритроцитарных конгломератов (рис. 55-59).

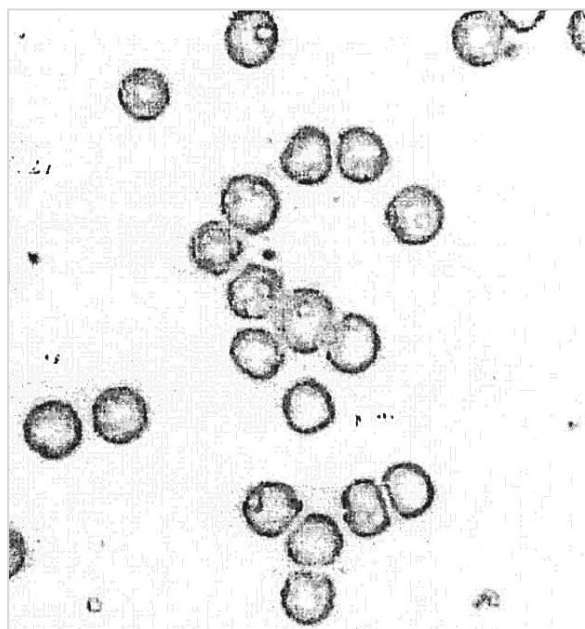


Рис. 55. Галерея эритроцитов из мазка периферической крови интактного кролика. Компьютерная видеосистема «Mekos».

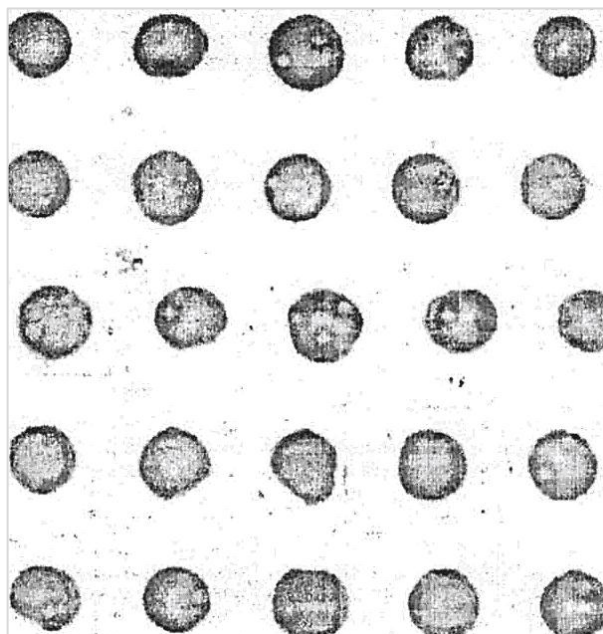


Рис. 56. Галерея эритроцитов из мазка периферической крови кролика, подвергавшегося охлаждению в течение 3 дней при температуре -30°C по 3 часа ежедневно.

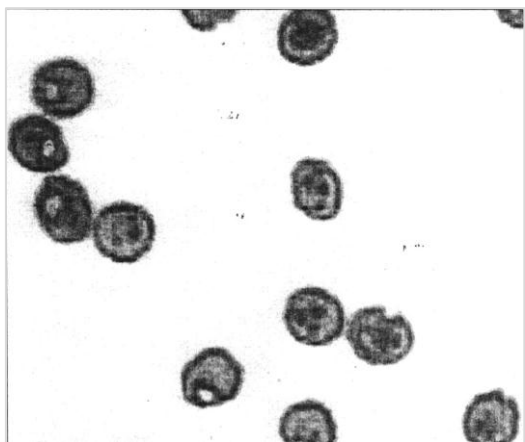


Рис. 57. Галерея составлена из группы «укушенных» эритроцитов. Мазок приготовлен от кролика, подвергавшегося охлаждению в течение 15 дней при температуре -30°C по 3 часа ежедневно.

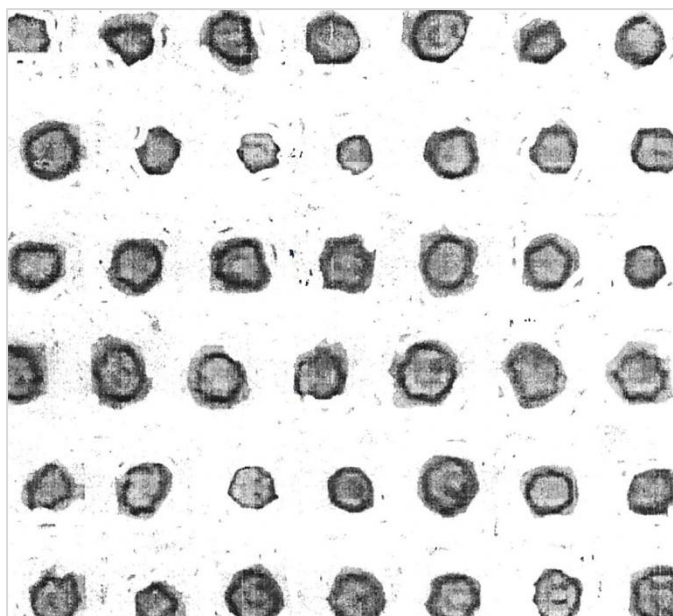


Рис. 58. Галерея составлена из группы эритроцитов периферической крови кролика, подвергавшегося охлаждению в течение 30 дней при температуре -30°C по 3 часа ежедневно.



Рис. 59. Галерея эритроцитов из мазка периферической крови на 30 день охлаждения при температуре -30°C по 3 часа ежедневно. Отчетливо видны многочисленные конгломераты, состоящие из дегенеративных эритроцитов. Мазок выполнен с помощью компьютерной видеосистемы «Mekos».

*Глава 2***КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА КРОВИ
ПРИ НАРУШЕНИИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО
СОСТОЯНИЯ И МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТАТУСА ЭРИТРОЦИТОВ
КРОВИ РОЖЕНИЦ С ГЕРПЕС-ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ**

Как известно, кислородный гомеостаз поддерживается эритропоэтином, выработка и функциональная активность которого находится в обратной зависимости от pO_2 крови и уровня таких цитокинов, как $TNF\alpha$, $IL-1$, 2 , 6 , 10 и $IFN\gamma$ [34, 39, 212]. При этом основным стимулом, активирующим выработку эритропоэтина клетками почек, является снижение содержания кислорода в них, что способствует формированию в этих клетках гипоксией индуцирующего фактора, состоящего из α и β субъединиц, ответственного за активацию транскрипции информационной РНК, синтеза фактора роста эндотелия сосудов, индуктора ангиогенеза, увеличивающего потребление кислорода тканями [35]. Известно, что гипоксическое состояние сопровождается генерацией АФК, индукцией гипоксией индуцирующего фактора и повышением экспрессии NF-kB [172]. Увеличение внутриклеточной экспрессии АФК вызывает разрушение гипоксией индуцирующего фактора-1 α , ингибирование синтеза эритропоэтина, а также индукцию провоспалительных цитокинов через NF-kB-зависимые механизмы [103]. Также обнаружены эффекты эритропоэтина не только на эритроидные клетки костного мозга, но и на гладкие мышцы стенок кровеносных сосудов, эндотелиальные клетки, нервные клетки головного и спинного мозга, кардиомиоциты, ткань яичников и матки, что объясняется наличием на мембранах их клеток рецепторов к нему и способностью их как к экспрессии эритропоэтинчувствительных рецепторов, так и синтезу эритропоэтина [36].

В исследованиях *in vitro* в культуре эритроцитов продемонстрирована роль эритропоэтина в защите мембраны клеток от окислительного стресса, в снижении активности процессов пероксидации липидов и

уменьшении мембранной микровязкости, повышении активности каталазы и глутатионпероксидазы в цитозоле.

Показан эффект эритропоэтина на снижение содержания цитокинов TNF α и IL-6 в плазме, что сохраняет целостность эндотелиальных клеток микроциркуляторного русла при развитии окислительного стресса. И, наоборот, высокий уровень TNF α в крови подавляет продукцию эритропоэтина [157, 158], либо приводит к ослаблению чувствительности эритроидных предшественников к данному гормону [125]. Наряду с этим, в эксперименте показана его роль в развитии анемии, обусловленной снижением образования эритроцитов и укорочением продолжительности жизни циркулирующих клеток красной крови [183].

Также имеются экспериментальные данные о эритропоэзингибиторном действии вируса простого герпеса [50, 51].

Результаты нашего исследования согласуются с этими данными и показывают, что высокий уровень антигенной нагрузки в третьем триместре гестации, регистрируемый по четырехкратному и более нарастанию титра антител IgG к ВПГ-1 до 1:12800 в динамике через 10 дней, инициирует увеличение экспрессии макрофагального TNF α , уменьшая, тем самым, выработку эритропоэтина у беременных. Низкий уровень эритропоэтина сохранялся до родов и в крови рожениц составил $8,95 \pm 0,47$ МЕ/мл (табл. 13).

Таблица 13

Показатели эритропоэтической функции периферической крови рожениц с герпес-вирусной инфекцией

Показатели	Титр антител IgG к ВПГ-1				Контроль
	1:12800	p	1:3200	p	
pO ₂ , мм рт.ст.	27,60 $\pm$ 0,70	<0,001	35,70 $\pm$ 0,40	<0,001	41,60 $\pm$ 0,90
эритропоэтин, МЕ/мл	8,95 $\pm$ 0,47	<0,001	17,01 $\pm$ 0,24	<0,001	28,09 $\pm$ 0,36
эритроциты, 10 ¹² /л	3,20 $\pm$ 0,15	<0,05	3,40 $\pm$ 0,09	<0,05	3,60 $\pm$ 0,12
ретикулоциты (%):	0,90 $\pm$ 0,07	<0,001	1,20 $\pm$ 0,09	<0,001	1,50 $\pm$ 0,07
полносетчатые	16,67 $\pm$ 0,47	<0,001	8,02 $\pm$ 0,15	<0,001	3,42 $\pm$ 0,16
неполносетчатые	41,67 $\pm$ 0,58	>0,05	50,31 $\pm$ 0,94	<0,001	41,56 $\pm$ 0,71
пылевидные	33,34 $\pm$ 0,72	<0,001	41,67 $\pm$ 0,94	<0,001	55,02 $\pm$ 0,73

Примечание: p – достоверность по сравнению с контролем.

Установленное нарушение эритропоэтической компенсации в ответ на снижение pO_2 уменьшало гемопоэтическую эффективность, что выражалось в снижении циркуляции в периферической крови рожениц морфофункционально зрелых эритроцитов и ретикулоцитов, составивших $3,20 \pm 0,15 \times 10^{12}/л$ и $0,90 \pm 0,1\%$, соответственно. На неэффективность эритропоэтической функции указывал и достоверный рост процентного содержания в периферической крови незрелых полносетчатых ретикулоцитов ($16,67 \pm 0,47\%$), тогда как число зрелых пылевидных их форм было сниженным ($33,34 \pm 0,72\%$).

Латентное течение герпес-вирусной инфекции (титр антител IgG к ВПГ-1 1:3200) характеризовалось более высокими показателями pO_2 в венозной крови рожениц ($35,70 \pm 0,40$ мм рт.ст.), уровня сывороточного эритропоэтина ($13,99 \pm 0,24$ МЕ/мл), общего числа эритроцитов ($3,40 \pm 0,09 \times 10^{12}/л$) и ретикулоцитов ($1,20 \pm 0,09\%$). Среди общего числа ретикулоцитов выявлялось увеличение количества пылевидных ($41,67 \pm 0,94\%$) и неполносетчатых их форм ($50,31 \pm 0,94\%$). Число полносетчатых форм ретикулоцитов, соответственно, уменьшалось ($8,02 \pm 0,15\%$).

Следовательно, по результатам нашего исследования, не исключается роль активной герпес-вирусной инфекции в угнетении функциональной активности эритропоэзиндуцирующих механизмов регуляции кислородного обмена в организме рожениц (подавление выработки эритропоэтина), продукции морфофункционально незрелых эритроидных форм со сниженной устойчивостью к повреждению, что способствует изменению формы и поверхности клеток.

Известно, что оптимальной формой эритроцита для участия клетки в обмене газов является двояковогнутый диск [216]. Однако по структуре поверхности эритроциты представляют собой довольно гетерогенную популяцию, как в норме, так и при патологических состояниях организма [63, 78]. Трансформация эритроцитов может происходить в двух направлениях: в сторону образования наружных выростов на мембране – кренаций (эхиноциты), либо в сторону образования инвагинированных клеток (стоматоциты). Процессы кренации и инвагинации сопровождаются образованием на поверхности или внутри эритроцитов

экзо- и эндовезикул [6], способных отшнуровываться с образованием предгемолитических сфероцитарных клеточных форм [47].

С точки зрения микроциркуляции, кислородтранспортной функции и способности к обратимой трансформации видоизмененные формы эритроцитов менее полноценны и стойки, чем дискоциты, в связи с чем, увеличение их количества в популяции клеток красной крови является неблагоприятным признаком. Необходимо указать и на то, что процесс старения эритроцитов морфологически выражается трансформацией дискоцита в сфероцит, который подвергается последующему гемолизу. В процессе старения эритроцита мембрана становится ригидной, теряет эластичность, формирует отростки, которые в дальнейшем истончаются и отделяются, образуя сферические формы. Такие формы эритроцитов являются менее устойчивыми к действию повреждающих факторов и разрушаются в процессе циркуляции. При этом не зависимо от причины, вызвавшей сфероцитоз, эритроцит утрачивает пластичность, теряет способность к изменению формы, необходимой для прохождения по микрососудам, что приводит к недостаточности снабжения кислородом тканей [9, 56].

Следовательно, изменение формы эритроцита ведет к изменению реологических свойств крови и микроциркуляторным расстройствам.

Проведенное нами цитофотометрическое исследование мазков периферической крови рожениц показало, что реактивация герпес-вирусной инфекции способствует снижению количества циркулирующих эритроцитов в форме двояковогнутого диска (дискоциты) и увеличению процента трансформированных (эхиноциты, каплевидные, мишеневидные) и дегенеративно измененных форм. При этом наиболее выраженное снижение процентного содержания дискоцитов отмечалось в группе рожениц с активной герпес-вирусной инфекцией в третьем триместре гестации (титр антител IgG к ВПГ-1 1:12800), что составило $68,20 \pm 1,70\%$ (контроль – $87,00 \pm 1,10\%$; $p < 0,001$). Число трансформированных форм, наоборот, увеличивалось и составило: эхиноциты – $6,60 \pm 0,08\%$ (контроль – $2,75 \pm 0,06\%$; $p < 0,001$); каплевидные формы – $2,27 \pm 0,04\%$ (контроль – $1,20 \pm 0,09\%$; $p < 0,05$); мишеневидные – $9,33 \pm 0,70\%$ (контроль – $4,30 \pm 0,60\%$; $p < 0,001$). Количество дегенератив-

но измененных форм эритроцитов увеличивалось до $13,60 \pm 0,90\%$ (контроль – $4,75 \pm 0,40\%$; $p < 0,001$).

При латентном течении герпес-вирусной инфекции (титр антител IgG к ВПГ-1 1:3200) процентное содержание дискоцитов в общем числе эритроцитов увеличивалось до $74,90 \pm 0,70\%$ ($p < 0,001$). Уровень видоизмененных форм эритроцитов, соответственно, снижался и составил: эхиноциты – $3,49 \pm 0,30\%$ ($p < 0,001$); каплевидные – $9,29 \pm 0,40\%$ ($p < 0,001$); мишеневидные – $2,48 \pm 0,10\%$ ($p < 0,05$); дегенеративные формы – $9,85 \pm 0,60\%$ ($p < 0,001$).

Таким образом, при активной герпес-вирусной инфекции формировались условия, усиливающие циркуляцию в периферической крови рожениц морфофункционально нестойких трансформированных (эхиноциты, каплевидные, мишеневидные) и дегенеративных эритроидных форм, имеющих отличные от дискоцитов кислородтранспортные свойства, что нарушало микроциркуляцию в маточно-плацентарной зоне.

Следует отметить, что природа таких процессов, как изменение формы и деформируемости мембран эритроцитов во многом зависит от характера взаимодействия белков цитоскелета между собой, а также с интегральными белками и липидами мембран [21]. Так, наследственно обусловленный дефицит различных мембранных белков эритроцитов приводит к сфероцитозу, овалоцитозу, эллиптоцитозу и стоматоцитозу [41, 68, 69, 116, 203]. Наряду с этим показано, что модификация белков цитоскелета различными патогенными агентами способствует не только трансформации клеток красной крови [22, 151], но и формированию трансмембранных дефектов, через которые происходит утечка ионов и метаболитов [18, 55]. По некоторым данным, разрыв нескольких связей в спектрин-актиновой сети приводит к образованию спикул на поверхности эритроцита [18]. В тоже время, образующиеся при активации перекисного окисления липидов в эритроцитах лизолецитины и свободные жирные кислоты, растворяясь в эритроцитарной мембране, разупорядочивают гексагональную конфигурацию липидов, нарушая взаимодействие полярных головок фосфолипидов со специфическими участками белка и разрывая нативные гидрофобные контакты, что приводит

к структурной перестройке и дестабилизации клеточной мембраны [10, 11, 32, 84, 85, 95, 101].

Механизм повреждающего действия свободных радикалов в ряде случаев может быть связан с их действием на полисахариды клеточной поверхности и с модификацией клеточных, в том числе, мембранных белков [15, 38, 145]. Нарушения белок-липидных контактов в мембране эритроцитов связывают с активацией эндогенных фосфолипаз, а также ингибированием ферментов антиоксидантной защиты [27, 30, 57, 60, 111]. Наряду с этим, повышенное содержание свободных радикалов и гидроперекисей в крови в условиях недостаточности антиоксидантной защиты при патологическом состоянии способно вызывать окислительную денатурацию белков мембраны, а также цитоскелета эритроцитов, главным образом, спектрина и белка полосы 3 [32, 82, 83, 217, 222]. В свою очередь, окислительная денатурация белковых компонентов мембран эритроцитов делает их доступными для действия эндогенных протеаз [85, 115]. Возможно, что повышенная протеолитическая деградация белков мембраны и цитоскелета эритроцитов вносит вклад в снижение содержания спектрина и белка полосы 3, а также возрастание доли белков низкомолекулярных фракций.

Следовательно, дезорганизация белковых компонентов мембран эритроцитов является основой для формирования трансмембранных дефектов, через которые происходит утечка ионов и метаболитов, что сопровождается разрушением молекулярной структуры, приводит к дестабилизации мембраны и клетки в целом, способствует нарушению процессов микроциркуляции и усилению явлений тканевой гипоксии.

Данное утверждение согласуется с результатами нашего исследования, когда в мембранах эритроцитов рожениц с герпес-вирусной инфекцией выявлялось нарушение соотношения основных структурных и мембранных белков, которое максимально проявлялось в группе рожениц с высокой активностью ВПГ-1 в третьем триместре гестации (титр антител IgG 1:12800) (табл. 14). Обращало внимание снижение процентного содержания высокомолекулярных белковых компонентов цитоскелета мембран эритроцитов периферической крови рожениц: α -спектрина ($6,93 \pm 0,18\%$), β -спектрина ($7,65 \pm 0,12\%$), анкирина

($2,55 \pm 0,35\%$), белка полосы 3 ($15,78 \pm 0,29\%$) и белка полосы 4.1 ($3,47 \pm 0,12\%$). Показатели актина ($9,60 \pm 0,21\%$), белка полосы 7 ($8,44 \pm 0,13\%$) и гликофорина ($7,62 \pm 0,38\%$) были повышены.

Таблица 14

**Процентное содержание белков мембран эритроцитов у рожениц
с герпес-вирусной инфекцией**

Показатели	Титр антител IgG к ВПГ-1				Контроль
	1:12800	p	1:3200	p	
α -спектрин	$6,93 \pm 0,18$	$<0,01$	$7,62 \pm 0,43$	$>0,05$	$7,89 \pm 0,24$
β -спектрин	$7,65 \pm 0,12$	$<0,01$	$8,47 \pm 0,31$	$>0,05$	$8,74 \pm 0,33$
анкирин	$2,55 \pm 0,15$	$<0,001$	$3,40 \pm 0,44$	$>0,05$	$4,02 \pm 0,09$
полоса 3	$15,78 \pm 0,29$	$<0,001$	$17,35 \pm 0,18$	$<0,05$	$18,34 \pm 0,19$
полоса 4.1	$3,47 \pm 0,12$	$<0,05$	$4,01 \pm 0,23$	$>0,05$	$4,38 \pm 0,18$
полоса 4.2	$8,15 \pm 0,41$	$>0,05$	$7,74 \pm 0,54$	$>0,05$	$7,25 \pm 0,12$
полоса 4.5	$10,60 \pm 0,33$	$>0,05$	$10,16 \pm 0,32$	$>0,05$	$10,34 \pm 0,12$
полоса 4.9	$9,60 \pm 0,18$	$>0,05$	$9,17 \pm 0,27$	$>0,05$	$9,19 \pm 0,10$
актин	$9,60 \pm 0,21$	$<0,05$	$9,00 \pm 0,26$	$>0,05$	$8,87 \pm 0,24$
полоса 6	$8,93 \pm 0,16$	$>0,05$	$8,53 \pm 0,19$	$>0,05$	$8,34 \pm 0,18$
полоса 7	$8,44 \pm 0,13$	$<0,01$	$7,64 \pm 0,11$	$>0,05$	$7,02 \pm 0,14$
гликофорин	$7,62 \pm 0,38$	$<0,01$	$6,91 \pm 0,21$	$<0,01$	$5,64 \pm 0,10$

Примечание: p – достоверность по сравнению с контролем.

При латентном течении герпес-вирусной инфекции (титр антител IgG к ВПГ-1 1:3200) мембрана эритроцитов периферической крови рожениц характеризовалась менее выраженными изменениями в содержании основных фракций белков. Оставались достоверно низкими по сравнению с контролем показатели белка полосы 3 ($17,35 \pm 0,18\%$), а значения гликофорина, наоборот, были повышенными ($6,91 \pm 0,21\%$).

Таким образом, реактивация герпес-вирусной инфекции, для которой характерно антигенопосредованное повреждение мембран эритроцитов периферической крови рожениц, приводит к усилению реакций протеолитической деградации ряда структурных полипептидов, прежде всего, α , β -спектрина, анкирина и белка полосы 4.1. На изменение морфофункциональных и метаболических свойств эритроцитов периферической крови рожениц указывал и низкий уровень транспортного белка полосы 3 и увеличение доли гликофорина, обладающего антигенпрезентирующими свойствами.

Основным проявлением указанных модификаций белков явилось снижение стабильности цитоскелета мембран, которое способствовало трансформации эритроцитов, нарушающей микроциркуляцию.

Липиды, как и белки, являются структурной единицей биомембран, одновременно обладая такими свойствами, как текучесть и конформационная упорядоченность [33], что позволяет поддерживать агрегационное состояние липидной части мембран в жидкокристаллическом состоянии, модифицируя тем самым упаковку и контролируя подвижность ее компонентов [33, 58]. При этом установлено, что текучесть и микровязкость мембран определяется фосфолипидами и входящими в их состав полиненасыщенными жирнокислотными остатками, а также холестерином, который влияет на подвижность углеводородных хвостов мембранных липидов [46, 80].

Имеются данные и о том, что патологические реакции, которые появляются и при вирусных инфекциях, сопровождаются развитием мембранной недостаточности [54], обусловленной активацией процессов пероксидации липидов, подавлением антиокислительной активности, накоплением высокополярных соединений (лизолецитины, свободные жирные кислоты), вызывающих изменение структуры и метаболизма клеток.

Следовательно, нарушение состава и свойств компонентов липидного слоя приводит к ограничению подвижности всей толщи мембраны, повышению диффузии фосфолипидов в поверхностный слой и переориентации их в водную фазу, что способствует трансформации и гемолизу дискоцитов.

При исследовании фосфолипидного спектра мембран эритроцитов у рожениц с герпес-вирусной инфекцией выявлены нарушения в соотношении отдельных фракций (табл. 15). Так, при активной герпес-вирусной инфекции в третьем триместре гестации (титр антител IgG к ВПГ-1 1:12800) в мембранах эритроцитов рожениц отмечалось снижение процентного содержания фосфатидилэтаноламина (Pe) ($21,13 \pm 0,18\%$) и фосфатидилхолина (Pc) ($23,31 \pm 0,18\%$). На фоне низких значений фосфатидилхолина выявлялся рост средних показателей лизофосфатидилхолина (Lpc) ($12,50 \pm 0,41\%$), что способствовало разрых-

лению липидного бислоя мембран, усиливая, тем самым, трансформацию эритроцитов. Кроме того, определяемое в ходе исследования снижение уровня фосфатидилэтаноламина в мембранах эритроцитов способствовало вероятному повышению экспрессии фосфатидилсерина (Ps), средние показатели которого достоверно увеличивались ($1,90 \pm 0,25\%$). На изменение физических свойств мембран эритроцитов рожениц данной группы указывало повышение уровня сфингомиелина ($24,97 \pm 0,36\%$) и снижение показателей фосфатидилинозитола (Pi) ($6,19 \pm 0,15\%$).

Таблица 15

**Фосфолипидный состав (%) и показатели микровязкости мембран
эритроцитов периферической крови рожениц
с герпес-вирусной инфекцией**

Показатели	Титр антител IgG к ВПГ-1				Контроль
	1:12800	p	1:3200	p	
Pe	$21,13 \pm 0,18$	$<0,001$	$24,84 \pm 0,24$	$<0,01$	$26,56 \pm 0,16$
Pc	$23,31 \pm 0,18$	$<0,001$	$28,46 \pm 0,21$	$<0,01$	$31,46 \pm 0,42$
Sph	$24,97 \pm 0,36$	$<0,001$	$20,93 \pm 0,25$	$<0,01$	$18,04 \pm 0,21$
Pi	$6,19 \pm 0,15$	$<0,01$	$7,90 \pm 0,20$	$<0,01$	$8,94 \pm 0,13$
Ps	$11,90 \pm 0,25$	$<0,01$	$9,50 \pm 0,11$	$>0,05$	$8,71 \pm 0,20$
Lpc	$12,50 \pm 0,41$	$<0,001$	$8,20 \pm 0,54$	$<0,001$	$6,20 \pm 0,12$
Fэ/Фм *	$0,61 \pm 0,02$	$<0,001$	$0,74 \pm 0,02$	$<0,001$	$0,82 \pm 0,01$
Fэ/Фм **	$0,86 \pm 0,03$	$<0,001$	$0,91 \pm 0,03$	$<0,001$	$1,21 \pm 0,03$

Примечание: Fэ/Фм* – отношение флюоресценции эксимеров и мономеров в зоне липидного бислоя; Fэ/Фм ** – отношение флюоресценции эксимеров и мономеров в зоне липид-белковых контактов; p – достоверность по сравнению с контролем.

Отмеченные в ходе исследования значительные изменения в соотношении нейтральных и кислых фосфолипидов в мембранах эритроцитов крови рожениц с активной ГВИ способствовали изменению компактности липидного бислоя, что явилось причиной снижения текучести и увеличения относительной микровязкости мембран. Данный факт подтверждался достоверно низкими значениями флюоресценции липотропного зонда – пирена ($0,61 \pm 0,02$), представленными в таблице 15 в виде соотношения интенсивностей флюоресценции эксимеров и мономеров (Fэ/Фм). Наряду с этим, выявлялось снижение параметров флюоресценции пирена белок-липидной фазы ($0,86 \pm 0,03$), что отражало во-

влечение в патологический процесс белкового компонента и могло быть связано с нарушением белок-липидных взаимодействий, усилением диффузии белковых молекул в липидном бислое мембран, вызванной активацией протеолитических процессов.

При латентном течении герпес-вирусной инфекции (титр антител IgG к ВПГ-1 1:3200) мембраны эритроцитов периферической крови рожениц характеризовались менее выраженным нарушением состава фосфолипидов. Отмечалось увеличение средних показателей фосфатидилэтаноламина ($24,84 \pm 0,24\%$), фосфатидилхолина ($28,46 \pm 0,21\%$) и фосфатидилинозитола ($7,90 \pm 0,20\%$). Содержание лизофосфатидилхолина и сфингомиелина составило, соответственно, $8,20 \pm 0,54\%$ и $20,93 \pm 0,25\%$. При таком соотношении фракций фосфолипидов значения флюоресценции липотропного слоя пирен оказались на уровне $0,74 \pm 0,02$, а показатели флюоресценции пирена белок-липидной фазы – $0,91 \pm 0,03$.

Следовательно, реактивация герпес-вирусной инфекции приводит к нарушению архитектоники липидного бислоя, увеличивающего микровязкость мембран, что способствует снижению деформируемости клеток и увеличению числа видоизмененных форм клеток красной крови, неэффективных в качестве транспорта кислорода.

Исследованиями ряда авторов [180] показано, что количественное соотношение морфологических форм эритроцитов в крови может зависеть от свойств гемоглобина. При этом диагностическим критерием эффективности гемоглобинообразовательных процессов в нормобластах костного мозга может служить его количественное выявление, а также электрофоретическое фракционирование. Это объясняется тем, что синтез гемоглобина заканчивается на ранних стадиях созревания ретикулоцитов и его содержание не изменяется до конца жизни эритроцитов.

В нашем исследовании установлена взаимосвязь между показателями общего гемоглобина крови, уровнями гемоглобинов A, A₂ и F в эритроцитах и активностью герпес-вирусной инфекции (табл. 16). Так, максимальное снижение концентрации общего гемоглобина в периферической крови рожениц до $105 \pm 1,9$ г/л выявлялось с активной герпес-

вирусной инфекции в третьем триместре гестации (титр антител IgG к ВПГ-1 1:12800). У этих же рожениц определялось достоверное снижение уровня гемоглобина А (HbA) ($88,20 \pm 0,71\%$) при одновременном росте показателей фетального гемоглобина (HbF) ($5,00 \pm 0,61\%$). Уровень гемоглобина A₂ (HbA₂) статистически значимо не изменялся.

Полученные нами данные позволяют утверждать, что реактивация герпес-вирусной инфекции сопровождается нарушениями гемоглобин-синтетических процессов у рожениц и поступлением в кровоток функционально неполноценных эритроцитов. Доказательством явилось, обнаруженное в ходе исследования гемолизатов эритроцитов крови рожениц данной группы, уменьшение показателей термостабильной формы гемоглобина ($74,14 \pm 0,96\%$) при увеличении термолабильной фракции ($25,86 \pm 0,78\%$).

Таблица 16

Показатели состава и свойств гемоглобина в эритроцитах периферической крови рожениц с герпес-вирусной инфекцией

Показатели	Титр антител IgG к ВПГ-1				Контроль
	1:12800	p	1:3200	p	
общий Hb, г/л	$105 \pm 1,9$	$<0,001$	$110 \pm 2,5$	$<0,001$	$120 \pm 3,5$
HbA, %	$88,20 \pm 0,71$	$<0,05$	$89,69 \pm 0,42$	$>0,05$	$90,83 \pm 0,93$
HbA ₂ , %	$6,80 \pm 0,75$	$>0,05$	$6,60 \pm 0,81$	$>0,05$	$5,93 \pm 0,54$
HbF, %	$5,00 \pm 0,61$	$<0,05$	$3,71 \pm 0,21$	$>0,05$	$3,24 \pm 0,28$
термостабильный Hb, %	$74,14 \pm 0,96$	$<0,001$	$84,54 \pm 2,19$	$<0,05$	$87,21 \pm 0,42$
термолабильный Hb, %	$25,86 \pm 0,78$	$<0,001$	$15,46 \pm 0,31$	$<0,01$	$12,78 \pm 0,23$

Примечание: p – достоверность по сравнению с контролем.

При латентном течении герпес-вирусной инфекции (титр антител IgG к ВПГ-1 1:3200) содержание общего гемоглобина в крови рожениц несколько увеличивалось ($110 \pm 2,5$ г/л). При этом статистически значимых изменений в соотношении основных фракций гемоглобина установлено не было. Показатели, отражающие конформационную стабильность молекул гемоглобина, улучшались за счет роста содержания термостабильной фракции ($84,54 \pm 2,19\%$) при уменьшении его термолабильной формы ($5,46 \pm 0,31\%$).

Следовательно, повышение антигенной нагрузки, наблюдаемое при реактивации герпес-вирусной инфекции, влияло на эффективность процессов гемоглинообразования, способствовало изменению структуры гемоглииновок молекул, их конформационной стабильности, что приводило к снижению отдачи кислорода гемоглииновок, вследствие чего возникал его дефицит, который усугублялся уменьшением общего числа дискоцитов в крови рожениц.

Установленное в ходе исследования нарушение гемоглиинообразовательных процессов и появление в крови рожениц с герпес-вирусной инфекцией гемоглииновок, имеющих пониженное сродство к кислороду (фетального гемоглиина, термолабильного гемоглиина), сопровождалось изменением процессов оксигенации гемоглиина и выражалось в снижении степени насыщения гемоглиина кислородом (O_2Sat), образования оксигенированной формы гемоглиина, росте показателей метгемоглиина (рис. 60). Максимальное отклонение данных показателей от контрольных значений наблюдалось в группе рожениц с активной герпес-вирусной инфекцией в третьем триместре гестации (титр антител IgG к ВПГ-1 1:12800). Степень насыщения гемоглиина кислородом в данной группе составила $30,20 \pm 0,90\%$ (контроль – $57,10 \pm 1,10\%$; $p < 0,001$), концентрация оксигемоглиина – $90,20 \pm 0,47\%$ (контроль – $95,20 \pm 0,51\%$), а показатели метгемоглиина – $1,05 \pm 0,03\%$ (контроль – $0,81 \pm 0,02\%$).

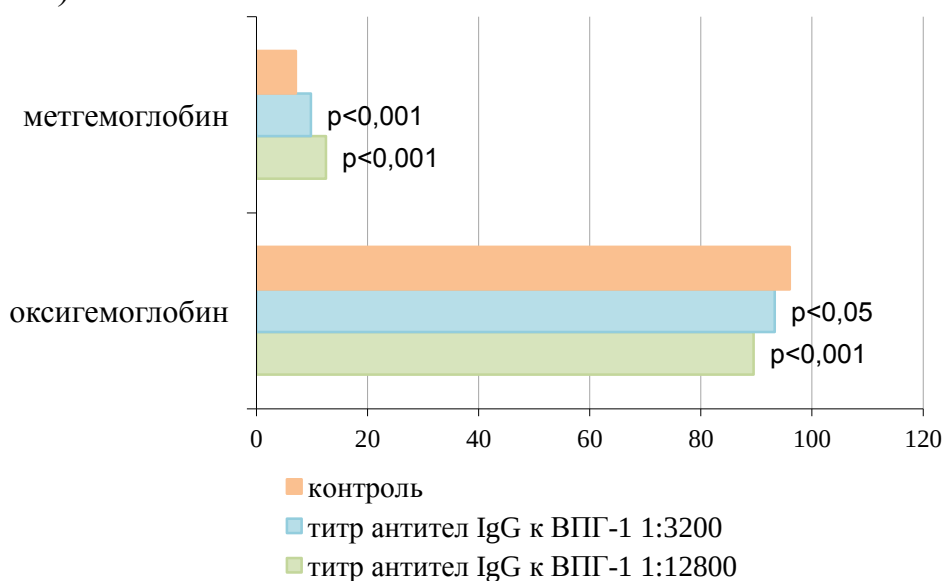


Рис. 60. Содержание окси- и метгемоглиина в эритроцитах периферической крови рожениц с герпес-вирусной инфекцией.

При латентном течении герпес-вирусной инфекции (титр антител IgG к ВПГ-1 1:3200) показатели эффективности кислородтранспортной функции крови рожениц были несколько выше и составили: степень насыщения гемоглобина кислородом – $37,10 \pm 1,00\%$; оксигемоглобин – $93,30 \pm 0,44\%$; метгемоглобин – $0,98 \pm 0,03\%$ [12, 13].

Таким образом, реактивация герпес-вирусной инфекции пролонгирует снижение скорости кислородного обмена в период беременности, что следует рассматривать, как неизбежный показатель гипоксии.

Важно отметить, что кислородтранспортная функция крови зависит от состояния кислотно-щелочного баланса, который поддерживается взаимным функционированием гемоглобиновой и бикарбонатной буферных систем [71]. Из представленных в таблице 17 данных видно, что реактивация герпес-вирусной инфекции в третьем триместре гестации (титр антител IgG к ВПГ-1 1:12800) приводила к снижению буферной емкости венозной крови рожениц, что выражалось в статистически достоверном росте средних показателей величины ВЕ до $-8,00 \pm 0,85$ ммоль/л и указывало на развитие ацидоза. На появление ацидотических сдвигов в периферической крови рожениц данной группы указывало повышение средних показателей лактата, составивших $0,59 \pm 0,03$ ммоль/л, что приводило к увеличению кислотности крови и снижению величины pH до $7,29 \pm 0,02$. К тому же, отмечалось уменьшение содержания стандартных ($\text{HCO}_3\text{-std}$) ($19,70 \pm 0,35$ ммоль/л) и истинных бикарбонатов ($\text{HCO}_3\text{-act}$) ($20,10 \pm 0,91$ ммоль/л), которые сочетались с низкими показателями общих бикарбонатов в венозной крови таких рожениц (tCO_2) ($21,20 \pm 0,53$ ммоль/л). Параллельно выявлялось снижение парциального напряжения углекислого газа в венозной крови рожениц (pCO_2) ($33,80 \pm 0,47$ ммрт.ст.), которое явилось следствием возможной гипервентиляции легких и способствовало формированию признаков гипоксии. Такое состояние кислотно-щелочного баланса в венозной крови рожениц с высокой активностью герпес-вирусной инфекции соответствует компенсированной форме метаболического ацидоза.

При латентном течении герпес-вирусной инфекции (титр антител IgG к ВПГ-1 1:3200) нарушения кислотно-щелочного баланса венозной крови носили компенсаторный характер. Величина ВЕ составила -

4,40±0,23 ммоль/л. Среднестатистические показатели лактата и pH в венозной крови у рожениц данной группы статистически значимо не изменялись. Наблюдаемое при этом увеличение буферной емкости крови сопровождалось ростом показателей HCO₃-act (22,30±0,2 ммоль/л), HCO₃-std (21,40±0,51 ммоль/л) и tCO₂ (24,30±0,4 ммоль/л). Статистически значимых изменений pCO₂ не отмечалось.

Таблица 17

**Показатели кислотно-щелочного состояния венозной крови
рожениц с герпес-вирусной инфекцией**

Показатели	Титр антител IgG к ВПГ-1				Контроль
	1:12800	p	1:3200	p	
pH	7,29±0,02	<0,05	7,34±0,03	>0,05	7,40±0,04
pCO ₂ , мм рт.ст.	33,00±0,47	<0,001	39,00±1,1	>0,05	40,00±0,90
BE, ммоль/л	-8,00±0,85	<0,001	-4,40±0,23	<0,001	-2,80±0,85
HCO ₃ -act, ммоль/л	20,10±0,91	<0,001	22,30±0,2	<0,001	25,80±0,56
HCO ₃ -std, ммоль/л	19,70±0,35	<0,001	21,40±0,5	<0,001	23,00±0,87
tCO ₂ , ммоль/л	21,20±0,53	<0,001	24,30±0,4	<0,001	26,40±0,54
лактат, ммоль/л	0,59±0,03	<0,001	0,42±0,02	>0,05	0,33±0,03

Примечание: p – достоверность по сравнению с контролем.

Таким образом, реактивация герпес-вирусной инфекции сопровождалась развитием метаболических нарушений кислотно-щелочного статуса венозной крови рожениц. Эти изменения носили ацидотический характер с признаками компенсаторной гипокапнии.

Необходимо отметить, что эффективность адаптивных механизмов регуляции кислородного метаболизма в значительной степени зависит, с одной стороны, от структурно-функциональных свойств гемоглобина, поддерживаемых кислотно-щелочным балансом, и, с другой, от содержания 2,3-ДФГ, как основного регулятора сродства гемоглобина к кислороду. Вместе с тем, известно, что между гемоглобином и каркасным белком спектрином происходит постоянный конкурентный обмен 2,3-ДФГ. По мере оксигенации в участках кровотока с повышенным напряжением кислорода 2,3-ДФГ вытесняется из карманов в β-цепях гемоглобина, размещаясь в которых, он приводит к снижению его оксигенации и связывается со спектрином, что способствует повышению эластичности мембраны и к латеральному перемещению глико-

протеидов [85]. Кроме того, необходимо отметить, что 2,3-ДФГ и гемоглобин в эритроците находятся в эквимольном соотношении, как 5:1. Нарушение баланса между метаболитом и гемоглобином приводит к снижению кислородтранспортных свойств последнего.

Анализ содержания 2,3-ДФГ в эритроцитах периферической крови рожениц с реактивацией герпес-вирусной инфекции в третьем триместре гестации (титр антител IgG к ВПГ-1 1:12800) показал увеличение среднестатистических показателей, как общего ($7,05 \pm 0,07$ мкмоль/мл (контроль – $5,37 \pm 0,16$ мкмоль/мл)), так и связанной с гемоглобином фракции ($6,40 \pm 0,10$ мкмоль/мл (контроль – $4,91 \pm 0,18$ мкмоль/мл)) (рис. 61).

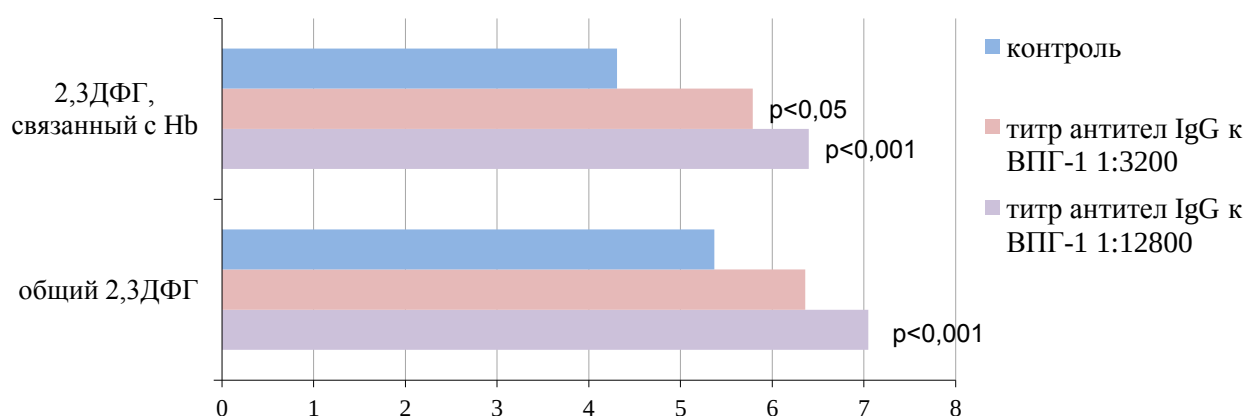


Рис. 61. Содержание 2,3-ДФГ в эритроцитах периферической крови рожениц с герпес-вирусной инфекцией.

Увеличение связанного с гемоглобином 2,3ДФГ будет отражать тяжесть инфекционного процесса, при котором дополнительный эффект 2,3-ДФГ на сродство гемоглобина к кислороду полностью нивелируется ацидотическим сдвигом. Отмечаемое при этом повышение кислотности при низком $p\text{CO}_2$ венозной крови способствовало изменению функциональной активности 2,3-ДФГ и, как следствие, снижению способности гемоглобина к присоединению и отдаче кислорода.

При латентном течении герпес-вирусной инфекции (титр антител IgG к ВПГ-1 1:3200) содержание, как общего, так и связанного с гемоглобином 2,3-ДФГ в эритроцитах периферической крови рожениц

уменьшалось ($6,36 \pm 0,09$ мкмоль/мл и $5,79 \pm 0,16$ мкмоль/мл, соответственно).

Таким образом, выявленное повышение концентрации общего и, особенно, связанного с гемоглобином 2,3-ДФГ в эритроцитах периферической крови рожениц с активной герпес-вирусной инфекцией в определенной степени дестабилизировало кислородный гомеостаз, что проявлялось в снижении оксигенации гемоглобина.

Известно, что морфофункциональная полноценность эритроцита (его кислородтранспортная функция) находится в прямой связи с метаболическими системами, регулирующими уровень восстановленного глутатиона, и представленными ферментами пентозофосфатного и глутатионредуктазного циклов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой (Г-6-ФДГ) и глутатионредуктазой (ГР). Кроме того, пентозофосфатный цикл является источником образования НАДФН, используемого в восстановлении глутатиона, необходимого для поддержания функциональной активности и целостности эритроцита. Снижение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы приводит к дефициту НАДФН и восстановленного глутатиона [29, 215, 229].

Учитывая имеющиеся сведения, была проведена оценка метаболической активности ключевых ферментов пентозофосфатного цикла глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и глутатионредуктазы в эритроцитах периферической крови рожениц с герпес-вирусной инфекцией (рис. 62). В ходе исследования установлено значительное снижение глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной и глутатионредуктазной активности эритроцитов рожениц с активной герпес-вирусной инфекцией в третьем триместре гестации (титр антител IgG к ВПГ-1 1:12800) до $35,97 \pm 1,97$ МЕ/л 10^9 эритроцитов (контроль – $57,64 \pm 1,58$ МЕ/л 10^9 эритроцитов) и $4,48 \pm 0,22$ Ед/г Hb (контроль – $10,82 \pm 0,18$ Ед/г Hb), соответственно [4].

При латентном течении герпес-вирусной инфекции (титр антител IgG к ВПГ-1 1:3200) функциональная активность ферментов пентозофосфатного и глутатионредуктазного циклов увеличивалась. Среднестатистические значения глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эритроцитах периферической крови рожениц данной группы достигали уровня

$50,48 \pm 0,90$ МЕ/л 10^9 эритроцитов, а показатели глутатионредуктазы составили $8,36 \pm 0,14$ Ед/г Нб.

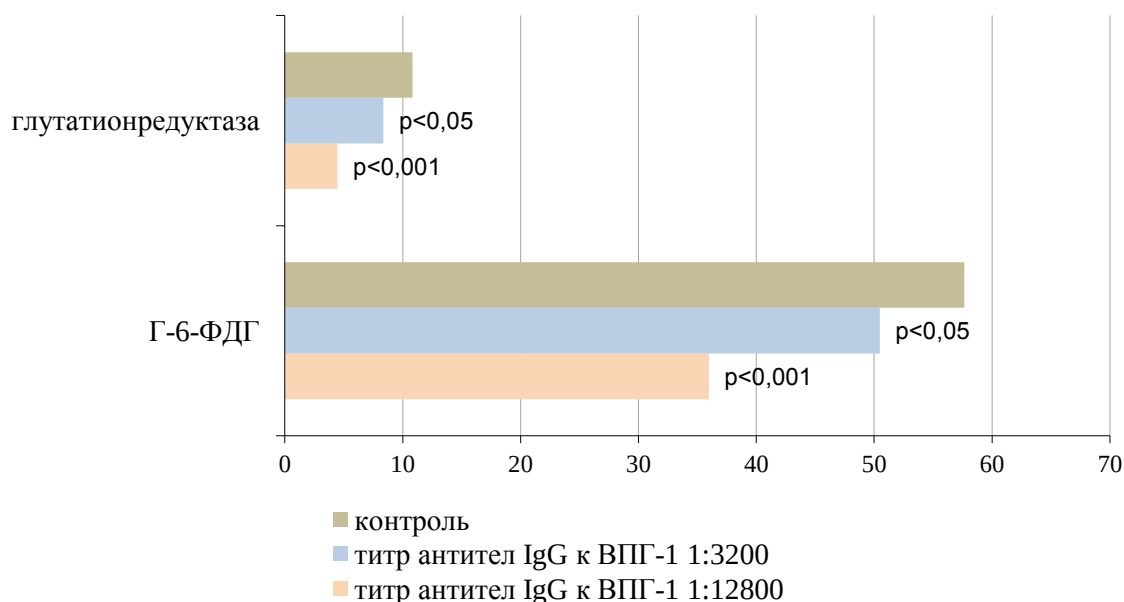


Рис. 62. Показатели активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и глутатионредуктазы в эритроцитах периферической крови рожениц с герпес-вирусной инфекцией.

Таким образом, реактивация герпес-вирусной инфекции приводит к развитию метаболической дезадаптации эритроцитов периферической крови рожениц, которая протекала с критическим снижением глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной и глутатионредуктазной активности, формирующей дефицит восстановленного глутатиона и нарушение ресинтеза АТФ, что свидетельствует об изменении морфофункциональной целостности клеток [48].

Известно, что АТФ и фосфаты участвуют в поддержании формы, объема и деформируемости эритроцитов, структурной организации протеолитических комплексов мембраны и их устойчивости [79, 182]. Снижение уровня макроэргов в эритроцитах приводит к блокированию ионных насосов и нарушению ионного баланса, что способствует снижению соотношения площади поверхности к объему клеток и превращению их в трудно деформируемые формы [17, 49, 216].

По результатам нашего исследования, в группе рожениц с активной герпес-вирусной инфекцией в третьем триместре гестации (титр

антител IgG к ВПГ-1 1:12800) наблюдалось значительное снижение, как общего ($0,50 \pm 0,01$ мкмоль/мл (контроль – $0,72 \pm 0,04$ мкмоль/мл)), так и связанного с гемоглобином АТФ – $4,43 \pm 0,07$ мкмоль/мл (контроль – $5,56 \pm 0,11$ мкмоль/мл) (рис. 63). Более того, изменению подвергался и уровень фосфатов, который выражался в росте показателей общего – $0,158 \pm 0,002$ мкмоль/мл (контроль – $0,145 \pm 0,002$ мкмоль/мл) и неорганического фосфора – $0,109 \pm 0,006$ мкмоль/мл (контроль – $0,089 \pm 0,005$ мкмоль/мл).

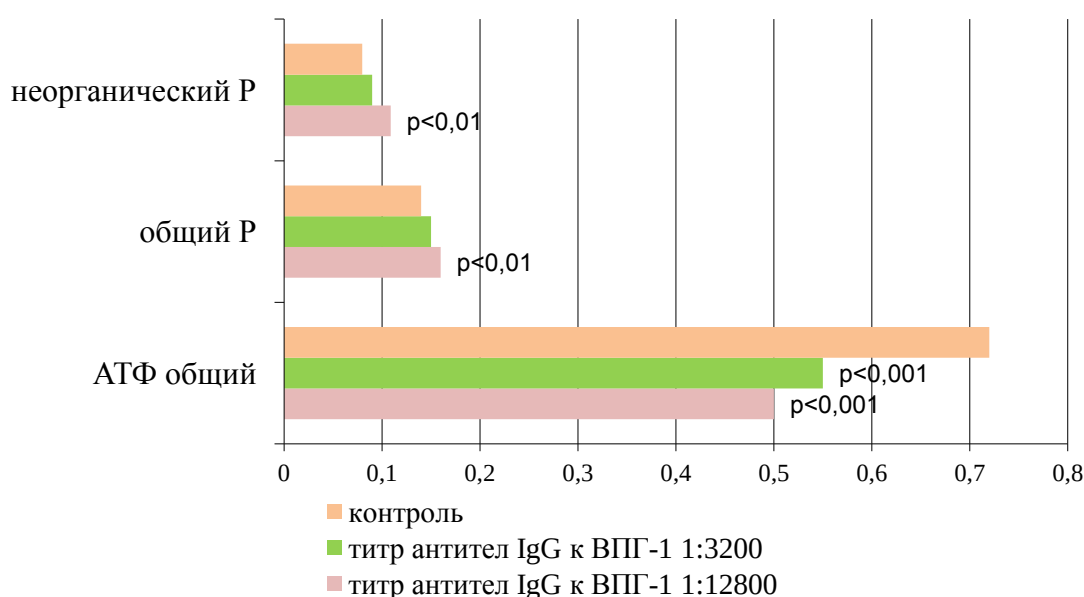


Рис. 63. Показатели АТФ, общего и неорганического фосфора в периферической крови рожениц с герпес-вирусной инфекцией.

Следует отметить, что увеличение концентрации общего фосфора в эритроцитах периферической крови рожениц, по-видимому, явилось следствием усиления внутриклеточной экспрессии 2,3-ДФГ. Тогда, как повышение уровня неорганического фосфора могло быть обусловлено гидролитическим окислением значительной части АТФ и других фосфорсодержащих продуктов гликолиза.

При латентном течении герпес-вирусной инфекции (титр антител IgG к ВПГ-1 1:3200) средние показатели общего и связанного с гемоглобином АТФ), соответственно, составили $0,55 \pm 0,02$ мкмоль/мл и $5,04 \pm 0,05$ мкмоль/мл. Содержание органического и неорганического фосфора в эритроцитах периферической крови рожениц данной группы

статистически значимо не изменялось и, соответственно, составило $0,150 \pm 0,002$ мкмоль/мл и $0,097 \pm 0,003$ мкмоль/мл.

Таким образом, реактивация герпес-вирусной инфекции и сопутствующее ей снижение кислородной емкости крови рожениц и ацидоз приводят к истощению пула АТФ и нарушению обмена фосфатов, что также способствует формированию расстройств клеточного метаболизма и дезорганизации клеточных мембран.

Среди причин повышенного разрушения эритроцитов, циркулирующих в крови рожениц с герпес-вирусной инфекцией, немаловажное значение приобретает усиление в них перекисного окисления липидов и подавление активности противорадикальной защиты клеток. При этом значительные изменения претерпевает система антиокислительных ферментов, выполняющих важную роль в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза клеток красной крови и представленных супероксиддисмутазой и глутатионпероксидазой.

В ходе исследования мембран эритроцитов периферической крови рожениц с герпес-вирусной инфекцией установлено повышение активности свободнорадикальных реакций (рис. 64). Так, максимальное содержание ТБК-активных продуктов (МДА) ($21,07 \pm 0,41$ ммоль/л (контроль – $11,09 \pm 0,34$ ммоль/л)) отмечалось в группе рожениц с активной герпес-вирусной инфекцией в третьем триместре гестации (титр антител IgG к ВПГ-1 1:12800).

Повышенное образование гидроперекисей жирных кислот вносило вклад в подавление антиокислительного потенциала эритроидных клеток, выраженного в ингибировании активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы, что выражалось в снижении их показателей ($230,37 \pm 2,51$ Ед/гНб (контроль – $402,73 \pm 5,87$ Ед/гНб) и $5,82 \pm 0,138$ Ед/г Нб (контроль – $15,68 \pm 0,16$ Ед/гНб), соответственно). Кроме этого, определялось достоверное снижение содержания в периферической крови рожениц данной группы экзогенного антиокислителя – α -токоферола ($1,63 \pm 0,11$ ммоль/л (контроль – $1,96 \pm 0,09$ ммоль/л)).

При латентном течении герпес-вирусной инфекции (титр антител IgG к ВПГ-1 1:3200) выраженность проявлений окислительных процессов в эритроцитах рожениц уменьшалась. Содержание ТБК-активных

продуктов (МДА) в эритроцитах не превышало значений $13,23 \pm 0,34$ ммоль/л. Концентрация эндогенных антиокислителей супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы [190, 191, 192] составила $289,51 \pm 3,12$ Ед/г Нб и $8,62 \pm 0,12$ Ед/г Нб, соответственно. Показатели α -токоферола были на уровне $1,72 \pm 0,10$ ммоль/л.

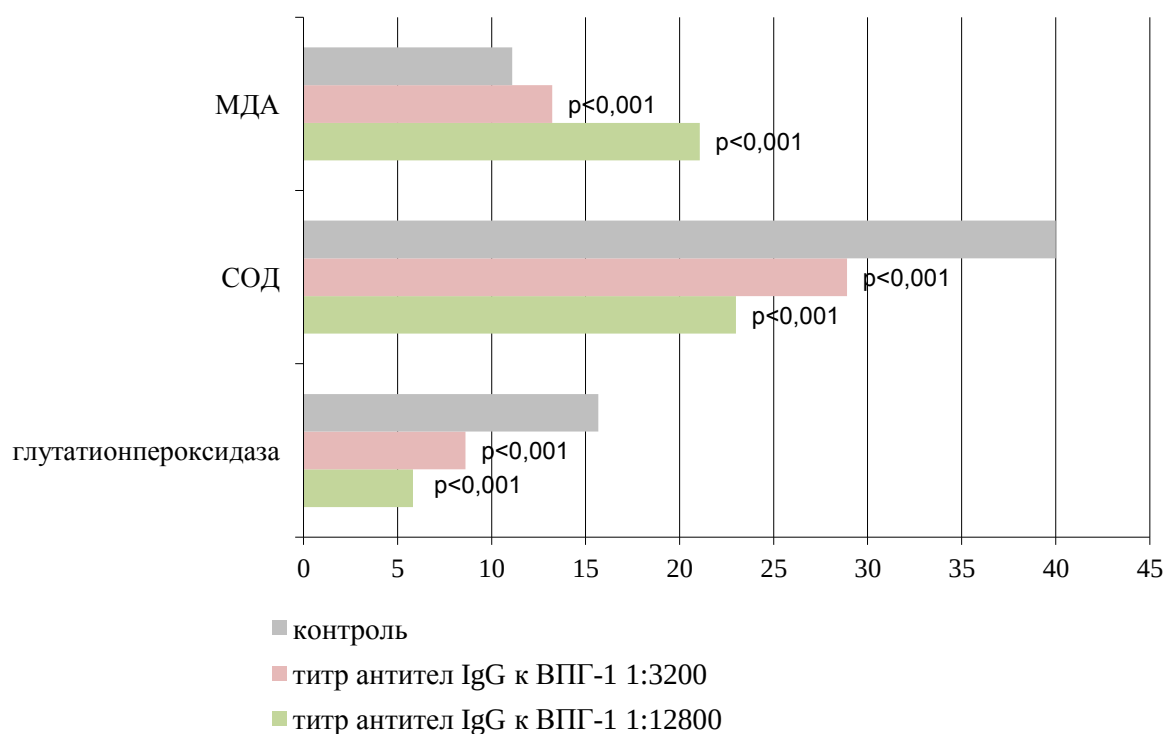


Рис. 64. Показатели активности системы ПОЛ-АОА в периферической крови рожениц с герпес-вирусной инфекцией.

Таким образом, активная герпес-вирусная инфекция способствует индукции свободнорадикальных процессов, угнетает антиокислительную активность, что приводит к повреждению мембран клеток красной крови в периферической крови рожениц и находит свое отражение в изменении их поверхности, формы и свойств, и, как следствие, нарушении эффективности кислородного метаболизма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенной комплексной оценки состояния периферического звена эритрона рожениц с герпес-вирусной инфекцией установлены значительные нарушения структурно-метаболического статуса и функцио-нальных свойств эритроцитов, которые выражались в следующих проявлениях (рис. 65):

- в серотонин- и цитокинопосредованном (TNF α , IL-1) угнетении функциональной активности эритропоэз индуцирующих механизмов регу-ляции кислородного обмена (подавление выработки эритропоэтина) и продукции морфофункционально незрелых форм эритроидных предшес-твенников (полносетчатых и неполносетчатых ретикулоцитов);
- в возрастании количества трансформированных (эхиноциты, мишеневидные, каплевидные) и дегенеративных форм эритроцитов;
- в нарушении белкового состава (снижение содержания α , β -спектрина, анкирина, белка полосы 3, 4.1 и повышение гликофорина) и липидного спектра мембран эритроцитов (повышение относительного содержания лизофосфатидилхолина, фосфатидилсерина, сфингомиелина при одновременном снижении фракций фосфатидилэтаноламина, фосфатидилхолина, фосфатидилинозитола);
- в увеличении микровязкости липидного бислоя мембраны, в том числе в области липид-белковых контактов;
- в изменении структуры гемоглобиновых молекул, их конформационной стабильности (повышение уровня фетального и термолabileного гемоглобинов);
- в снижении скорости кислородного обмена и нарушении функционирования механизмов его регуляции (повышение 2,3-ДФГ, ацидотический сдвиг в крови);
- в уменьшении метаболической активности пентозофосфатного и, связанного с ним, глутатионредуктазного циклов (снижение содержания глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и глутатионредуктазы);
- в дефиците энергопродукции (снижение АТФ);



Рис. 65. Концептуальная схема патогенеза гипоксии у рожениц с герпес-вирусной инфекцией.

– в индукции процессов липопероксидации (накопление ТБК-активных продуктов – малонового диальдегида) и подавлении противорадикальной защиты (супероксид-дисмутаза, глутатионпероксидаза, α -токоферола).

Разнонаправленный характер, обнаруженных в ходе исследования нарушений структурно-метаболического статуса и функциональных свойств эритроцитов периферической крови рожениц с герпес-вирусной инфекцией, позволяет рассматривать их, как патогенетически обоснованные неспецифические признаки вовлечения периферического звена эритрона в сложный комплекс изменений, сопутствующих развитию инфекционного процесса.

К тому же, нельзя не отметить, что степень выраженности выявленных различий по изученным показателям морфофункционального состояния эритроцитов периферической крови рожениц и механизмов компенсации гипоксии закономерно зависела от тяжести проявлений герпес-вирусной инфекции.

Следовательно, обнаруженный в периферической крови рожениц с активной герпес-вирусной инфекцией в третьем триместре комплекс нарушений (гиперсекреция серотонина, $\text{TNF}\alpha$, IL-1) становится патогенетически обоснованным фактором, инициирующим нарушение морфофункционального состояния мембран эритроцитов, изменение микрореологических свойств крови, что усиливает явления гипоксии, осложняя течение инфекционного процесса.

Установленные нарушения в эритроне рожениц при герпес-вирусной инфекции могут служить универсальной моделью для оценки интенсивности и объема мембранодестабилизирующих процессов в клеточных мембранах различных органов и тканей организма, производных мезенхимы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев Г.И. Показатели митотической активности костного мозга у здоровых людей. Проблемы гематол. и перел. крови, 1965. 34 с.
2. Алексеев Н.А. Гематология детского возраста. Спб.: Гиппократ, 1998. 543 с.
3. Алмазов В.А. Лейкоциты // Физиология системы крови. гл. 5. Л. 1968. 34 с.
4. Андриевская И.А. Дыхательная функция крови у беременных с герпес-вирусной инфекцией // Бюллетень СО РАМН. 2008. №3. С. 56-65.
5. Арипов А.А., Байниязова А.М. Информативность цитохимических показателей крови при оценке степени метаболических нарушений у недоношенных детей, перенесших гипоксию // Лабор. дело. 1977. №8. С. 462-464.
6. Бархина Т.Г., Никитина Г.М., Бархина М.М., Черных А.С. Патология мембран форменных элементов крови при заболевании и эксперименте // Успехи современного естествознания. 2006. №6. С.64-65.
7. Бессмельцев С.С., Кападзе Ю.Л. Изменение электрокоагулографических показателей и деформируемости эритроцитов у больных множественной миеломой на фоне различных программ полихимиотерапии // Клиническая медицина. 1991. №11. С. 69-73.
8. Бессмельцев С.С., Скворцова Ю.А. Исследование жесткости мембраны эритроцитов у больных с множественной миеломой на фоне терапии, включающей лечебный плазмаферез // Эфферентная терапия. 2000. Т.6, №1. С. 36-41.
9. Бойтлер Э. Нарушения метаболизма эритроцитов и гемолитическая анемия. М.: Медицина, 1981. 256 с.
10. Болдырев А.А. Биохимия мембран. М.: Высшая школа, 1986. 111 с.
11. Болдырев А.А. Введение в биомембранологию. М.: Изд-во МГУ, 1990. 208 с.
12. Веретенникова Е.Н. Функция внешнего дыхания и газотранспортная функция крови у беременных с бронхиальной астмой на фоне герпес-вирусной инфекции // Бюлл. физиологии и патологии дыхания. 2004. Вып. 17. С. 61-65.
13. Веретенникова Е.Н. Морфофункциональная характеристика фетоплацентарной системы у беременных с бронхиальной астмой: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Иркутск, 2005 174 с.
14. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. ПОЛ в биологических мембранах. М.. 1972. 252 с.
15. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // Сорский общеобразовательный журнал. 2000. Т.6, №12. С.13-19.
16. Воробьев А.И. Руководство по гематологии. М.: Изд. Ньюдиамед, 2007. 1275 с.
17. Габриелян Э.С., Акопов С.Э. Клетки крови и кровообращение. Ереван: Ай-стан, 1985. 400с.
18. Гасс Г.В., Марголис Л.Б., Черномордик Л.В. Локальные деформации мембран эритроцитов в переменном электрическом поле // Биологические мембраны. 1990. Т.7, №6. С. 647-658.

19. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / пер. с англ. яз. М.: Мир, 1969. 624 с.
20. Глебов А.Н., Шульга Е.В., Зинчук В.В. Роль кислородсвязывающих свойств крови в развитии окислительного стресса, индуцированного липополисахаридом / Под ред. Зинчука В.В. Гродно, 2011. 216 с.
21. Гончаров Е.И., Пинаев Г.П. Белки цитоскелета эритроцитов // Цитология. 1988. Т.30, №1. С. 5-18.
22. Горбунов Н.В. Влияние структурной модификации мембранных белков на липид-белковое взаимодействие в мембранах эритроцитов человека // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1993. Т.116, №11. С. 488-491.
23. Горизонтова М.Н. Некоторые показатели костного мозга при воздействии на организм ионизирующей радиации. Мед. радиол. 1966. №12. С. 55-60.
24. Горошинская И.А., Глотина Л.Ю. Изменение микровязкости мембран лимфоцитов и эритроцитов крови у онкологических больных // Вопр. мед. химии. 1999. Т. 45, №1. С. 53-67.
25. Девойно Л.В., Ильюченко Р.Ю. Нейромедиаторные системы в психоиммунотензии: дофамин, серотонин, ГАМК, нейропептиды. Новосибирск: Изд. ЦЭРИС, 1993. 240 с.
26. Девойно Л.В., Идова Г.В. Нейромедиаторные системы мозга в модуляции иммунной реакции (дофамин, серотонин, ГАМК) // Нейроиммунология. 2005. Т.3, №1. С. 11-18.
27. Демихова О.В., Серебряная Б.А., Шигелев Е.И. Нарушения свободно-радикального окисления и структурно-функционального состояния эритроцитов при хронической дыхательной недостаточности и способ их коррекции // Вестник РАМН. 1995. №7. С. 54-58.
28. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследованиях клеток мембран и липопропротеидов // Вопр. мед. химии. 1999. Т.45, №1. С. 53-57.
29. Доценко О.И., Драгущенко Е.О. Функционирование системы глутатиона эритроцитов в условиях окислительного стресса // Вісник донецького національного університету, Сер. А: Природничі, науки. 2009. Вип. 2. С.254-259.
30. Дубинина Е.Е., Софронова Л.Н., Раменская Н.П. [и др.] Состояние антиоксидантной системы эритроцитов у новорожденных детей при острой и хронической гипоксии // Вопросы медицинской химии. 1989. Т.35, №1. С. 56-59.
31. Дыгай А.М., Жданов В.В. Теория регуляции кроветворения. М.: Изд. РАМН. 2012. 139 с.
32. Заводник И.Б., Лапшина Е.А., Брышевская М. Эффект свободных жирных кислот на состояние липидного и белкового компонентов мембран // Биологические мембраны. 1995. Т.12, №5. С.516-523.
33. Захарова Н.Б., Хвостова Н.В., Шведова Р.Ф. Значение повреждения белкового и липидного состава эритроцитарных мембран в развитии снижения текучих свойств крови при экстремальных состояниях // Вопросы медицинской химии. 1991. Т.37, №1. С.53-56.

34. Захаров Ю.М. Молекулярные и клеточно-клеточные механизмы регуляции эритропоэза // Вестник Российской академии наук. 2000. №2. С.4-9.
35. Захаров Ю.М. Чувствительность клеток к кислороду и продукция эритропоэтина // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. 2005. Т.91, №9. С.993-1004.
36. Захаров Ю.М. Неэритропоэтические функции эритропоэтина // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. 2007. Т.93, №6. С.592-607.
37. Зверко В.Л., Ракуль В.С. Патогенетическое значение деформируемости эритроцитов в механизмах развития гестоза // Мед. новости. 1991 №7. С. 51-52.
38. Зинчук В.В. Методика измерения деформируемости эритроцитов // Здоровоохранение Белоруссии. 1989. №12. С. 97-98.
39. Зюзьков Г.Н. [и др.] Механизмы регуляции эритропоэза при гемолитической анемии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004. Т.138, №10. С. 378-381.
40. Иваницкий Г.Р., Куниский А.С. Исследование микроструктуры объектов методами когерентной оптики. М.: Энергия, 1981 68 с.
41. Иванов И.В., Савина Л.С. Изменение белков мембран эритроцитов при пароксизмальной ночной гемоглобинурии // Проблемы гематологии и переливания крови. 1981. Т.26, №1. С.34-38.
42. Идельсон Л.И. Эритропоэтическая активность мочи при эритремии и анемии // Пробл. Гематол. 1961. №12. с. 11.
43. Идельсон Л.И. и др. Гемолитические анемии. М.: Медицина, Ленинградское отделение. 1975. 287 с.
44. Идова Г.В. Клеточные механизмы иммуномодулирующего действия нейромедиаторных систем. Значение костного мозга // Бюл. СО РАМН. 1994. №4. С. 52-56.
45. Идова Г.В., Чейдо М.А. и др. Влияние агониста серотониновых рецепторов 1-А-типа 8ОН-ДПАТ на иммунный ответ // Бюл. эксп. биол. 2001. Т.132, №10. С. 432-433.
46. Кагава Я. Биомембраны. М.: Высшая школа, 1985. 304 с.
47. Казеннов А.М., Маслова М.Н. Структурно-биохимические свойства мембраны безъядерных эритроцитов // Физиологический журнал СССР им. Сеченова. 1987. № 12. С.1587-1596.
48. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Алеид Р. [и др.] Современные представления об антиоксидантной роли глутатиона глутатионзависимых ферментов // Вестник Российской АМН. 2010. №3. С.46-54.
49. Карабанов Г.Н., Инченко К.С. Деформируемость эритроцитов в клиническом аспекте // Вестник хирургии им. Грекова. 1986. Т.137, №2. С.99-103.
50. Карпова М.Р., Зверева И.Ф., Куделина О.В. [и др.] Влияние экспериментальной герпетической инфекции на кроветворение // Вирусология. 1999. Т.127, приложение 1. С.79-81.

51. Карпова М.Р. Влияние экспериментальной герпетической инфекции на кроветворение // Бюллетень эксп. биол. и мед. 1999. Т.127. Приложение1.
52. Кассирский И.А., Алексеев Г.А. Клиническая гематология. М.: Изд. Медицина, 1970. 799 с.
53. Катюхин Л.Н. Реологические свойства эритроцитов. Современные методы исследования // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 1995. Т.81, №6. С. 122-129.
54. Кицак В.Я. Вирусные инфекции беременных: патология плода и новорожденных. Кольцово, 2004. 84с.
55. Козлов М.М., Черномордик Л.В., Маркин В.Г. Механизм образования безбелковых участков мембраны эритроцита. Разрыв мембранного скелета // Биологические мембраны. 1989. Т.6, №6. С. 5-12.
56. Козинец Г.И., Симоварт Ю.А. Поверхностная архитектура клеток периферической крови в норме и при заболеваниях системы крови. Таллин: Валгус, 1984. 116 с.
57. Колб В.Г., Зубовская Е.Г., Камышников В.С. Изменения проницаемости, осмотической стойкости и липидного состава эритроцитов при заболеваниях легких // Здравоохранение Белоруссии. 1983. №8. С. 30-33.
58. Конев СВ. Структурная лабильность биологических мембран и регуляторные процессы. Минск: Наука и техника, 1987. 240с.
59. Коробов В.Н., Федорович И.П., Климишин Н.И. Физико-химические и функциональные свойства гемоглобина мышей, зараженных карциномой Эрлиха // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. 1992. Т.113, №6. С.640-642.
60. Кубышкин А.В. Значение свободнорадикального окисления в развитии бронхолегочных заболеваний // Советская медицина. 1989. №6. С. 26-30.
61. Кушаковский М.С. Клинические формы повреждения гемоглобина. Лен. отделение Медицина, 1968. 324 с.
62. Ланг Г.Ф. О некоторых проблемах и достижениях функциональной гематологии. Клини. мед. 1939. Т.17, №6. С. 3.
63. Леонова В.Г. Анализ эритроцитарных популяций в онтогенезе человека. Новосибирск: Наука, 1987. 241 с.
64. Луценко М.Т. Воздействие денервации и кровопускания на количество митозов в красном костном мозгу кролика. Ученые записки. В.1 Ставрополь. 1957. С. 5-10.
65. Луценко М.Т., Андриевская И.А. Способ определения уплотненных белково-липидных участков в мембранах эритроцитов различной степени зрелости с помощью компьютерной программы Bio Vision. Патент 2390020. Зарегистрирован 20.05.2010 г. в Госреестре изобретений РФ.
66. Луценко М.Т. Способ оценки нарушения деформируемости эритроцитов в периферической крови беременных при обострении в третьем триместре гестации герпес-вирусной инфекции. Патент 2463597. Зарегистрирован 27.04.2012 г. в Госреестре изобретений РФ.

67. Луценко М.Т., Ишутина Н.А. Способ оценки микровязкости мембран эритроцитов путем вычисления коэффициента эксимеризации пирена $K_{\text{экс}}$ у беременных, перенесших обострение герпес-вирусной инфекции в третьем триместре гестации с учетом определения процентного содержания олеиновой кислоты в мембранах эритроцитов. Патент 2467334. Зарегистрирован 20.11.2012 г. в Госреестре изобретений РФ.
68. Луценко М.Т., Андриевская И.А. Способ диагностики регуляции процесса созревания клеток эритроидного ряда при беременности, осложненной обострением герпес-вирусной инфекции путем определения в мембранах эритроцитов периферической крови в третьем триместре гестации белка полосы 4,9. Патент 2471194. Зарегистрирован в Госреестре изобретений РФ. Выдан 03.08.2012 г.
69. Молчанова Т.П. Основы молекулярной организации белков мембраны эритроцитов и их дефекты, приводящие к гемолитическим анемиям // Гематология и трансфузиология. 1989. Т.32, №7. С. 32-41.
70. Мосягина Е.Н. Эритроцитарное равновесие в норме и патологии. М.: Изд. Мед. литературы, 1962. 265 с.
71. Надточий Е.В. Морфофункциональная характеристика нарушений газообмена у больных бронхиальной астмой: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Благовещенск, 2007. 178 с.
72. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. [и др.] Ультраструктура эритроцитов в норме и при патологии: морфологические феномены, клинические аспекты // Морфология. 2004. Т.126, №5. С. 48-51.
73. Раушенбах М.О., Чертков И.Л. Патогенетическое обоснование гемомиелотерапии острой лучевой болезни. М.: Медицина, 1965.
74. Рубинштейн Д.Л., Рутберг Р.А. Биохимия. 1948. 13. 147.
75. Рябов С.И. Влияние половых гормонов на эритропоэз. Пробл. гематол. 1964. №10. С. 3.
76. Рябов С.И. Вопросы гормональной регуляции кроветворения: Автореф. дисс. Л. 1966.
77. Рябов С.И., Шостка Г.Д. Молекулярно-генетические аспекты эритропоэза. Лен. отд. Медицина, 1973. 279 с.
78. Самолов М.В., Наумов А.Г. Морфофункциональная характеристика эритроцитов, как критерий тяжести эндогенной интоксикации // Российский медицинский журнал. 2000. № 1. С.31-35.
79. Санников А.Г. Закономерности изменения уровня аденозинтрифосфата в эритроцитах в процессе их упругой деформации: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Тюмень, 1999. 24с.
80. Селищева А.А., Козлов Ю.П. Метаболизм фосфолипидов и биологических мембран. Иркутск, 1988. 88 с.
81. Сейц И.Ф., Луганова И.С. Взаимодействие гликолиза и дыхания в клетке. Ж.-А. Меогиз. 1961.

82. Сметанина Н.С., Ковригина Е.С, Токарев В.Н. Окислительное повреждение эритроцитов при талассемии // Гематология и трансфузиология. 1994. Т.39, №2. С.39-41.
83. Сороковой В.И., Никитина Г.М., Лапинский А.Г. [и др.] Изменения ультраструктуры эритроцитов человека и уровня свободных жирных кислот в них при инкубации с перекисью водорода и ионами кальция *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1994. Т.118, №8. С. 207-211.
84. Степура И.И., Заводник И.Б., Пилецкая Т.П. [и др.] Лизис эритроцитов человека, индуцируемый алифатическими альдегидами // Биология мембраны. 1990. Т.7, №7. С.742-749.
85. Сторожок С.А., Санников А.Г., Захаров Ю.М. Молекулярная структура мембран эритроцитов и их механические свойства. Тюмень, 1997. 140с.
86. Сторожок С.А., Санников А.Г., Белкин А.В. Зависимость стабильности деформабельности мембран эритроцитов от межмолекулярных взаимодействий белков цитоскелета // Научный вестник Тюменского Государственного университета. 2008. Т.3. С.123-132.
87. Тарлыков В.А., Бессмельцев С.С. Использование дифрактометрии мазков крови для диагностики реологических расстройств и оценки динамики течения заболеваний системы крови // Клин. лаб. диагностика. 1997. №4. С. 8-11.
88. Уоддингтон К. Морфогенез и генетика. М.: Изд. Мир, 1964. 259 с.
89. Федоров Н.А. Нормальное кроветворение и его регуляция // М.: Медицина, 1976. 543 с.
90. Федоров Н.А., Кахателидзе М.Г. Эритропоэтин. М.: Медицина, 1973.
91. Федорова З.Д., Котовщикова М.А., Бессмельцев С.С. Об определении индекса деформируемости эритроцитов // Лабор. дело 1986. №2. С. 732-735.
92. Франк Г.М., Лемажихин Б.К. Определение размеров эритроцитов методом дифракции света в связи с проблемой биологического
93. действия ионизирующей радиации. Труды института биологической физики. 1955. Вып. 1. С. 276-287.
94. Фриденштейн А.Я., Чертков И.Л. Клеточные основы иммунитета. М.: Медицина, 1969.
95. Чейдо М.А. Включение дофаминергического механизма в реализацию иммуностимулирующего влияния вещества Р и его аналога // Бюл. exper. биол. 1997. Т.123, №2. С. 135-137.
96. Черницкий Е.А., Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарных мембран. Минск. 1981. 260 с.
97. Чернух А.М., Александров П.Н. Микроциркуляция. М.: Медицина, 1984. 432 с.
98. Чижевский А.Л. Структурный анализ движущейся крови. М.: Изд. АН СССР. 1959. 473 с.
99. Шапот В.С. О некоторых вопросах биохимии опухолей // Вест. биол. наук. 1938. С. 3.

-
100. Шапот В.С. Свойства 6-фосфоглюконатдегидрогеназы печени: Автореф. дисс. 1938. 15 с.
 101. Шапот В.С. Биохимические аспекты опухолевого роста. М.: Медицина, 1975. 304 с.
 102. Шурхина Е.С., Нестеренко В.М., Цветаева Н.В. [и др.] Фильтрационный метод исследования кинетики закрытия гипоосмотических пор в эритроцитах // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. 2010. Т.149, №6. С. 713-716.
 103. Энгельгардт В.А., Саков Н.Е. О механизме пастеровского эффекта. Биохимия. 1943. Т.8. С. 8-12.
 104. D'Andgio C.T., Finkelstein J.N. Oxygen regulation of expression: a study in opposites // Mol. Genet. Metab. 2000. Vol.71, №1-2. P. 371-380.
 105. Askanazy M. Stromafunktionen. Münch med. Wechenschr. 1923. Bd. 70. S. 1107.
 106. Astaldi L., Meardi G. The iron content of jejuna mucosa obtained by crosby's biopsy in hemochromatosis and hemosiderosis // Blood. 1960. Vol.28. P. 70-75.
 107. Astaldi L., Listewiez J. Lymphocytes (structure, production, functions) Naples. 1964.
 108. Barnes D.W. Spleen colonies in mice. Nature. 1968. Vol.219. P. 518-521.
 109. Barnes D.W., Evans E. Local origine of fibroblasts deduced by implants of piabe disc // Nature. 1971. Vol.233. 267 p.
 110. Baner Ch. Antogonistic influence of CO₂ and 2,3- α -diphosphoglycerate on the Bohr effect of human haemoglobin // «Life Shi.». 1969. Vol.8. 1041 p.
 111. Batler E. Effect of flavin compounds of glutathione reductase activity in vivo and in vitro stuies // J. clin. Invest. 1969. Vol.48. P. 1957-1966.
 112. Bayes G.R., Quiles G.P., Neira A.B. [et.al.] Effect de la hypoxia prenatal sober la trigliceridemia y el cholesterol unido a lipoproteins de altadensidad // An. Esp. Pediatr. 1988. Vol.29, №1. P. 15-22.
 113. Bekkum D.W., Noord M.J. Attempts an identification of hemopoietic stem cell in mouse // Blood. 1971. Vol.38. P. 547-558.
 114. Bemnet V. The membrane skeleton of human erythrocyte implications for more complex cell // Annu. Rev. Biochem. 1985. Vol.54. P. 273-304.
 115. Benesch R., Benesch R.E. The effect of organic phosphate from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin // Biochem. biophys. Res. commun. 1967. Vol.26. P. 162-168.
 116. Beppu M., Takanashi M., Murokami K. Modification of glycophorin a during oxidation of erythrocyte membrane // Biochim. et Biophys. Acta: Biomembranes. 1990. Vol.1023, №3. P. 413-420.
 117. Bossi D., Russo M. Hemolytic anemias due to disorder of red cell membrane skeleton // Mol. Aspects Med. 1996. Vol.17, №2. P. 171-188.
 118. Bergstrand C.G., Crar B. Demonstration of a new protein fraction in serum from the human fetus // Scan. J. Clin. Lab. Invest. 1956. 8. P. 174-179.
 119. Bessis M., Mohandas N. Adiffractometric method for the measurement of cellular deformability // Blood cells. 1975. V.1, №2. P 307-313.

120. Bishop Ch. Overall red cell metabolism. In: The red blood cell Ed. Bishop Ch. And Springer D. New York, 1964. 147 p.
121. Blazsek I., Lu X.H., Anjo A. The hematoma a morphogenetic functional complex in mammalian bone marrow, involves erythroblastic island and granulocytic cobblestones // *Exp. Hematol.* 1995. Vol.23, №4. P. 309-319.
122. Branton D., Cohen C.M., Tyler J. Interaction of cytoskeletal on the human erythrocyte membrane // *Cell.* 1981. V. 24. P. 22-32.
123. Brewer G., Pewell R.D. hexokinase activity as a function of age of the human erythrocytes // *Nature (Lond).* 1963. Vol.199. 704 p.
124. Bunn H., Briehl R. The interaction of 2,3 diphosphoglycerate with various human hemoglobins // *J. clin. Invest.* 1970. Vol.49. 1088 p.
125. Chunutin A., Curnish E. Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes // *Arch. Biochem.* 1967. Vol.121. 96 p.
126. Clifton U., Bonewald L., Caro J. [et al] Erythropoietin fails to reverse the anemia in the mice continuously exposed to tumor necrosis factor-alpha in vivo // *Exp. Hematol.* 1990. Vol.15, №17. P. 7701-7709.
127. Crocker P.R., Gordon S. Isolation and characterization of resident stromal macrophages and hematopoietic cell clusters from mouse bone marrow // *J. Exp. Med.* 1985. Vol.162, №3. P. 993-1014.
128. Dische Z. The pentose phosphate metabolism in red cells. In: The red blood cell, Ed. Bishop Ch. And Surgenot D. New York, 1964. 189 p.
129. Donohue D.M., Garbie. Quantitative measurement of hematopoietic cells of the marrow // *J. clin. investing.* 1958. №37. P. 1564-1568.
130. Driessen G.K., Halest C. Effect of reduced red cell deformability on flow velocity in capillaries of rat mesentery // *Pflugers Arch.* 1980. Vol.388, №1. P. 75-78.
131. Duhm G., Deuticke B. Complete restoration of oxygen transport function and 2,3-diphosphoglycerate concentration in stored blood // *Transfusion.* 1971. Vol.11. 147 p.
132. Dunn C. The differentiation of haemopoietic stem cells // *Ser. Haematol.* 1971. Vol.4. P. 7-15.
133. Faller D., Schields D. Molecular basis of medical cell biology. New York Binom-Press, 1998. 255 p.
134. Forget B.G., Olivetti N.F. Hemoglobin synthesis and the thalassenias. Blood principles and practices of Hematology. Editors R. Hand in S.E. Lux, T.E. Stosseli. Chapter 48, 2 editions. Lippincott Williams and Wilkins. 2003. P. 1503-1596.
135. Fujihara T., Hayashi K. Lactoferrin inhibits herpes simplex virus type1 (HSV-1) infection to mouse cornea // *Arch. Virol.* 1995. Vol.140. P. 1469-1472.
136. Gallagher P.G., Forget B.G. The red cell membrane. Williams Hematology Edit. E. Beutler, M. Lichtman, B.S. Collier et. al. – Chapter 45, 6th edition. Mc. Grow Hill, International Edition. 2001. P. 333-343.
137. Giansanti F., Rossi P., Massucci M. Antiviral activity of ovotransferrin discloses an evolutionary strategy for the defensive activities of lactoferrin // *Biochem. Cell. Biol.* 2002. 80(1). P. 125-130.

-
138. Godin C., Kruh I., Dreyfus J. Reconstituted reticulocyte ribosomes active in haemoglobin synthesis // J. Biochem. Biophys. 1969. №182. P. 175-180.
 139. Golde D.W., Cline M.J. Identification of the colony-stimulating cell in human peripheral blood // J. Clin. Invest. 1972. Vol.51. P. 2981-2983.
 140. Gordon A.S. The current status of erythropoietin // Brit. J. Haematol. 1971. Vol.21. P. 611-616.
 141. Gordon M.Y., Blackett N.M. Colony formation by human haemopoietic precursor cells cultured in semi-solid agar in diffusion chambers // Brit. J. Haemat. 1975. Vol.31. P. 103-110.
 142. Greenough W.B., Peter T. An intracellular protein intermediate for hemoglobin formation // J. Clin. Invest. 1962. №41. P. 1116-1120.
 143. Greppi E. Ittero emolitico con aumento della resistenza dei globuli. Minerva med. 1928. №8. P 1-11.
 144. Gudkowicz G., Benett M. Pluripotential stem cell function of the marrow «lymphocyte». Science. 1964. №144. 866 p.
 145. Gurney C. Erythropoietin and Erythropoiesis. Vitamins and Hormones. 1968. Vol.26. 619 p.
 146. Gutterige J.M., Westermarck T., Halliwell B. Free radicals, aging and degenerative diseases. New York. 1986. P. 99-139.
 147. Haas R.I., Bohne F. Cytocinetic analysis of slowly proliferating bone marrow cells during recovery from radiation injury // Cell Tissue Kinetic. 1971. №4. P. 31-39.
 148. Hayem G. Rechercher sur l'évolution des hematies dans le sang de l'homme et des vertebres. Ach. de physiol. norm. et pathol. 1879. Ser.2. Bd.6. S. 201.
 149. Halvorsen S. Plasma erythropoietin levels following hypothalamic stimulation in the rabbit // Scand. J. Clin. Labor. Invest. 1961. Vol.13. P. 564-575.
 150. Halvorsen S. The central nervous system in regulation of embryopoiesis // Acta Haematol. 1966. Vol.35, №2. P. 65-79.
 151. Hanna I.R. The relationship between cell maturation and proliferation in the erythroid system of the rat // Cell. Tissue. Kinet. 1971. №4. P. 47-52.
 152. Harmsen M., Swart P., D Bethume M. Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro // J. Infect. Dis. 1995. Vol.172. P. 280-288.
 153. Hashimi A.N., Salemutdin M. Phenylhydrazine causes sulfhydryl oxidation and protein aggregation in hemoglobin-free human erythrocyte membranes // Biochem. Mol. Biol. Int. 1996. Vol.40, №3. P. 543-550.
 154. Heller P. Hemoglobinopathic dysfunction of the red cell // Amer. J. Med. 1966. Vol.41. 799 p.
 155. Jacobson L.O., Marks E. studies on erythropoiesis // Blood. 1959. Vol.14. P. 644-653.
 156. Jaffe E.R. Introduction to discussion of red cell. GSH metabolism the function of reduced glutathione in human erythrocytes // Exp. Eye Res. 1971. Vol.11. 306 p.

-
157. Japa I.A. A study of the mitotic activity of normal human bone marrow // J. exp. Pathol. 1942. №23. P. 272-277.
 158. Jelkmann W., Wolff M., Frandrey J. Modulation of the production of erythropoietin by cytokines: in vitro studies and their clinical implication // Contrib. Nephrol. 1990. Vol.87. P.68-77.
 159. Johnson G, Cook C, Furmanski P. In vivo suppression of erythropoiesis by tumor necrosis factor alpha: with exogenous erythropoietin // Exp. Hematol. 1990. Vol.18. P. 109-113.
 160. Jolly J. Sur la formation des globules rouges des mammiferes // Cpt. Rend des scances de la soc. de boil. 1905. Bd. 58. 528 s.
 161. Kikuchi Y., Da Q.W. Variation in red blood deformability and possible consequences for oxygen transport to tissue // Microvasc. Res. 1994. Vol.47, №2. P. 222-231.
 162. Killmann S.A. Cell classification and kinetic aspects of normoblastic and megalo-blastic erythropoiesis // Cell. Tissue Kinet. 1970. №3. P. 217-225.
 163. Killmann S.A., Cronkite F.P. Mitotic indices of human bone marrow cells // Blood. 1964. №24. P. 267-272.
 164. Konar D.B., Manchanda S.K. Role of hypothalamus in the phagocytic activity of the reticulo-endothelial system // Int. J. Physiol. Pharmacd. 1970. Vol.14, №2. P. 23-24.
 165. Krantz S.B., Jacobson L.O. Erythropoietin and the regulation of erythropoiesis. Chicago. 1970.
 166. Krzymowski T., Krzymowski H. Studies on the erythropoiesis inhibitory factor in the plasma of animals with transfusion polycythemia // Blood. 1962. Vol.19. P. 38.
 167. Krzymowski T. The erythropoiesis - inhibiting factor and erythropoietin in the regulation of red all production. - In: Simposium on the physiology of the hemopoietic system. Olsztyn, 1968. P. 11
 168. Krzymowski T. Participation of the erythropoiesis-inhibiting factor and erythropoietin in regulatori'of erythrocytes production // Acta physiol pol. 1971. Vol.22. 881 p.
 169. Krzymowski T. Физиологический механизм регуляции гемопоэза. – Материалы симпозиума гуморальной регуляции кроветворения. Ереван. 1972. 61 с.
 170. Lajtha L., Oliver R. Studies on the kinetics of erythropoiesis. A model of the erythron. Ciba foundation Symp. On haemopoiesis. London. 1960. 289 p.
 171. Lajtha L., Oliver R. Kinetic model of bone marrow stem cell population // Brit. J. Haemat. 1969. №8. P. 442-448.
 172. Lewis I., Passovay. The repopulating potential and differentiation capacity of hematopoietic stem cells from the blood and bone marrow of normal mice // J. cell. Physiol. 1968. №71. P. 21-28.
 173. Liu J. et al. Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves oxidative stress-mediated expression of hypoxia-inducible factor and erythropoietin // Stroke. 2005. Vol.36, №6. P. 1264-1269.
 174. London J., Bruns G. Medicine, 1964. Vol.43, №6. 789 p.
 175. Marks P., Fantoni A. Hemoglobin synthesis and differentiation of erythroid cells vitamins and hormones. N.Y. 1968. Vol.26. 331 p.

176. Marquis C. Das Knochenmark der Amphibien in den verschiedenen Jahreszeiten. Jnaug. Diss., Dorpat. 1892.
177. Maximow A. Weiters über Entstehung Stuktur und Veränderungen des Narbengewebes Ebenda 1902 Bd. 34. 8. 153 s.
178. Maximow A. Über embryonale Blutbildung Bemerkungen zu dem Referat. Herm. Schriddes «Über Regeneration des Blutes unter normalet und krankhaften Verhältnissen». Zentralbt. F. allg. Pathol. U pathol. Anat. 1909. Bd.20. 145 s.
179. Maximow A. Untersuchungen über Blut und Bindegewebe. VIII Die cytologischen Eigenschaften der Fibroblasten, Reticulumzellen und Lymphocyten des Organismus, ihre genetischen Wechselbeziehungen und prospektiven Entwicklungspotenzen. Arch. T. mikroskop. Anat // 1923. Bd. 97, 8. 283 s.
180. Maximow A. Über die Entwicklungsfähigkeiten der Blutleukocyten und des Blutgefäßendothels bei Entzündung und in Gewebeskulturen // Klin. Wochenschr. 1925. Bd. 4, 8. 1486 s.
181. McGough A.M., Josephs R. On the structure of erythrocyte spectrin in partially expanded membrane skeleton // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. Vol.87, №13. P.5208-5212.
182. Micklem H.DS., Odgden D.A. Compartments and cell flow within the mouse haemopoietic system II Cell Tissue Kinet. 1975. Vol.8. P. 233-248.
183. Mosior M, Mikolajczak A., Gomulkiewicz I. The effect of ATP on the order and the mobility of lipids in the bovine erythrocyte membrane // Biochim. et Biophys. Acta: Biomembranes. 1990. Vol.1022, №3. P.361-364.
184. Moldaver L.L., Manaro M.A., Wei H. [et al.] Cachetin - tumor necrosis factor alpha alters red blood cell kinetics and induced anemia in vivo // FASEB J. 1989. Vol.3, № 5. P.1637-1643.
185. Moore M.A., Metcalf D. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sae origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo // Brit. J. Haemat. 1970. №183. P. 279-285.
186. Moore M.A.,Williams H. Analysis of proliferation and differentiation of foctal CF Ue in haemopoietic tissue Cell Tissue Kinet. 1973. Vol.6. P. 461-476.
187. Muller C. Zur Frage der Blutbikdung. Sitzungsber d. K. Akad. D. Wiss. Wien. Mathem. Naturw. Kl. III. Bd. 98. 1889. 219 s.
188. Murphy J. Erythrocyte metabolism. The equilibration of glucose – C¹⁴ between serum and erythrocytes // J. Lab. Clin. Med. 1960. Vol.55. 281 p.
189. Murphy M., Lord B. Haemopoietic stem cell regulation // Blood. 1973. Vol.42. P. 81-87.
190. Nageli O. Über rotes Krochenmark und Myeloblasten. Dtsch. Med. Wochenschr. 1900. Bd.26. 287 s.
191. Necheles T.F., Boles T.A., Allen D.M. Erythrocyte glutathione-peroxidase deficiency and hemolytic disease of the newborn infant // J. Pediat. 1968. Vol.72. P. 319-324.

192. Necheles T.F., Allen D.M., Gerald P.S. The many forms of thalassemia syndromes // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1969. Vol.165. P. 5-12.
193. Necheles L.F., Steinberg M.H., Cameron D. Erythrocyte glutathione-peroxidase deficiency // *Brit J. Haemat.* 1970. Vol.19. P. 605-612.
194. Neumann E. Das Gesteze der Verbreitung des gelben roten Knochenmarkes. *Eben- da.* 1882. Bd.30 321 s.
195. Neumann E. Über die Bedeutung des Knochenmarkes für die Blutbildung. *Zentralbl. F. d. med. Wiss.* 1868. Bd.6. S. 689.
196. O'Grady L.F., Levis I.P. Stem cell renewal in frozen marrow. *Cryobiology.* 1969. №5. P. 250-255.
197. Osgood F.E. Regulation of cell proliferation. The kinetics of cellular proliferation. N.Y. 1950. P. 282-295.
198. Pappenheim A. Vergleichende untersuchungen über die elementare zusammensetzung des roten Knochenmarks einige Säugethiere. *Arch. F. pathol. Anatomie und Physiol. und für klinische Medicin.* 1899. Bd. 159.
199. Parker J.W., Metcalf D. Production of CSF in mixed lymphocyte culture // *Immunology.* 1974. Vol.26. P. 1039-1049.
200. Patt H.M. A consideration of myeloid-erythroid balance in man // *Blood.* 1957. №12. 777 p.
201. Patten L.M., Lelieveld D. Factors determining cell killing by chemotherapeutic agents // *Europ. J. Cancer.* 1970. Vol.6. P. 313-321.
202. Perutz M., Mazzerella L. Preliminary X-ray analysis of haemoglobin H. // *Nature.* 1963. Vol.199. 639 p.
203. Perutz M. Stereochemistry of cooperative effect of haemoglobine. The Bohr effect and combination with organic phosphates // *Nature.* 1970. Vol.228. 734 p.
204. Pestonjamosh K.N., Menta N.G. Effect of a skeletal protein on the shape of erythrocytes and their ability to respond to shape-modulation agents. Important role of protein 4.1 in determination maintenance of the discoid shape of erythrocytes // *Exp. Cell Res.* 1995. Vol.219, №1. P. 74-81.
205. Ponder E. The kinetics of in vivo hemolytic system. *J. Gen. Physiol.* 1944. 27. 483 p.
206. Ponder E. Hemolysis and Related Phenomenon. New York: Grune and Stratton. 1971. 389 p.
207. Price G.B., McCulloch E.A. A new human low molecular weight granulocyte colony stimulating activity // *Blood.* 1973. Vol.42. P. 341-348.
208. Qiu Y., Peng Y. Immunoregulatory role on neurotransmitters // *Adv. Neuroimmunol.* 1966. Vol.6, №3. P. 223-231.
209. Rapoport S., Luebering J. An optical study of diphosphoglycerate mutase // *J. Biol. Chem.* 1952. Vol.196. 583 p.
210. Rondanelli F., Gorini P. Differences in proliferative activity between normoblasts and pernicious anemia megaloblasts // *Blood.* 1964. №24. P. 542-549.
211. Rorth M., Astrup P. Oxygen affinity of hemoglobin and red cell acidbase status. Ed. M. Rorth P. Astrup. Copenhagen. 1972. 120 p.

212. Rorth M. Hemoglobin interactions and red cell metabolism. Ser. Haematol. 1972. Vol.5. p. 1.
213. Roodman G.D. Mechanisms of erytroid suppression in the anemia of chronic disease // Blood. Cells. 1987. Vol.13. P. 171-184.
214. Schumacher H.R., Erslev A. Bone marrow kinetics. Nuclear Haematology. N.Y. – London. 1965. p. 89.
215. Seno S. Studies on the differentiation of erythroblast by using ratio isotopes. Acta haemat. Japan. 1964. №24. P. 718-723.
216. Siems W.G., Sommerburg O., Grune T. Erythrocyte free radical and energy metabolism // Clin. Nephrol. 2000. Vol.53, №1 Suppl. P. 9-17.
217. Smith J.E. Erythrocyte membrane: structure, function and pathophysiology // Vet. Pathol. 1987. Vol.24 (6). P. 471-476.
218. Soszynski M., Filipiak A., Bartosz G. [et al.] Effect of amino acid peroxides on erythrocyte // Free Radic. Biol. Med. 1996. Vol. 20, №1. P.45-51.
219. Suit H.D., Lajthe L.G. Studies on the Fe⁵⁹ uptake by normoblasts and the failure of x-ray irradiation to affect uptake. Brit. J. Haemat. 1957. №4. P. 165-170.
220. Till J., Mc Culloch. A stochastic model of stem cell proliferation based on the growth of spleen colony-forming cells // Proc. Nat. Acad. Sci. 1964. Vol.51. P. 29-35.
221. Torelli U., Vaccari G. Characteristics of the RNA synthesized in vitro human erythroblasts. Acta haemat. 1970. №43. P. 1-9.
222. Tsao C.W., Lin Y., Darkcr K. Effect dopamine on immune cell proliferation in mice // Life Sci. 1997. Vol.61, №24. P. 361-371.
223. Uyesaka N., Hasegawa S., Ishioka N. [et al] Effect of superoxide anions on red cell deformability and membrane // Bioreology. 1992. Vol.29, № 2-3. P.217-229.
224. Walensky L.D., Natra M, Lux E. Disorders of the red blood cell membrane. Blood principles and practices of hematology Editors R.I. Mandin, S. Lux, T.P. Stosseli. Chapter 51, 2 edition Lippicott Williams and Wilkins. 2003, P. 1709-1858.
225. Watson J.D., Crick F. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid // Nature. 1953. Vol.1971. P. 737-738.
226. Watson M.L. Further observations on the nuclear envelope of the animal cell // J. Biophys. Biochem. Cytol. 1959. Vol.6. P. 147-156.
227. Watson J.D., Hopkins N. Molecular biology of the gene. 4 th ed. Chapter 28. Meno Park C.a. Benjamin-Cummings. 1987.
228. Winqvist Q. Morphology of the blood and the haemopoietic organe in cattle under normal and some experimental condition // Acta Anatomica. 1954. Vol.21. 22 p.
229. Weidenreich F. Die ro fen Blutkörperchen II // Zeitschr. F. d. ges Anat. Abt. 3. 1904. Bd. 24. 186 s.
230. Zancan P., Sola-Penna M. Regulation of human erythrocyte metabolism by insulin cellular distribution of 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for red blood cell function // Mol. Genet. Metab. 2005. Vol.86, №3. P. 401-411.
231. Zakharow S.D., Ivanov A.V. Light-oxygen effect as a physical mechanism for activation of biosystems by quasi monochromatic light // Biophysics. 2005. Vol.50. Suppl. 1. P. 64-85.

Сведения об авторах:

**Луценко
Михаил Тимофеевич**

академик РАН, д-р мед. наук, профессор, руководитель лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов при неспецифических заболеваниях легких Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания

**Андриевская
Ирина Анатольевна**

д-р биол. наук, главный научный сотрудник лаборатории механизмов этиопатогенеза и восстановительных процессов при неспецифических заболеваниях легких Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ
В ЭРИТРОИДНЫХ ЭЛЕМЕНТАХ В НОРМЕ
И ПРИ ПАТОЛОГИИ**

Монография

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания,
г. Благовещенск, ул. Калинина, 22, тел. (4162) 77-28-00.
отпечатано в типографии «Фабрика рекламы» ООО «Антураж»,
г. Благовещенск, ул. Ленина, 60, тел (4162) 377-570
Формат 64×84/16. Усл. печ. л. 8,53. Тираж 500.
Подписано к печати 02.04.2015.