

УДК 612.111.7.085.2(045)

**АВТОКОЛЕБАТЕЛЬНЫЙ ПРОЦЕСС, МОДИФИЦИРУЮЩИЙ  
ФУНКЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ *IN VITRO***Брилль<sup>1</sup> Г.Е., Будник<sup>1</sup> И.А., Гаспарян<sup>2</sup> Л.В.<sup>1</sup>Государственный медицинский университет, Саратов<sup>2</sup>EMRED Oy, Хельсинки, Финляндия

**В опытах на цитратной крови 50 доноров обнаружены периодические изменения адгезии тромбоцитов на полистирене при высокой ( $1800 \text{ с}^{-1}$ ) скорости сдвига. Средние значения периода колебаний, полученные при обработке нативных кривых и по данным вейвлет-анализа, составили около 35 мин. Отчетливая периодичность и высокая амплитуда циклов, бездекрементный характер осцилляций при отсутствии внешнего по отношению к исследуемой системе водителя ритма позволяют предположить наличие нового явления – существование автоколебательного процесса в цельной крови *in vitro*.**

Ритмическая активность является универсальным свойством живых систем. У отдельных индивидов, принадлежащих к разным биологическим видам, обнаруживаются многочисленные ритмы [1,5,7]. Ритмические процессы необходимы для обеспечения и поддержания жизнедеятельности живой системы (ритм сердечных сокращений, дыхания и др.). Нарушение нормального течения периодических процессов играет важную роль в патологии (сердечные аритмии, периодическое дыхание, аменорея и др.) [2]. Одни ритмы поддерживаются в течение всей жизни человека (например, пейсмекерная активность клеток водителя ритма сердца), другие – возникают лишь на определенном этапе онтогенеза (менструальный цикл, сокращения матки во время родов и др.). Ритмические процессы взаимодействуют друг с другом, что обеспечивает слаженность и точность регуляции функций в организме [6].

В иерархии биоритмов можно выделить два основных их типа: биоритмы, в формировании которых ключевая роль принадлежит воздействию факторов внешней среды (например, циркадные ритмы) и биоритмы, возникающие в самой биосистеме в результате реализации ее генетической программы развития (например, работа пейсмекерных клеток). В отношении биоритмов второго типа средовые воздействия оказывают лишь модифицирующее влияние. Их генез связан с особенностями внутренней организации элементов биосистемы.

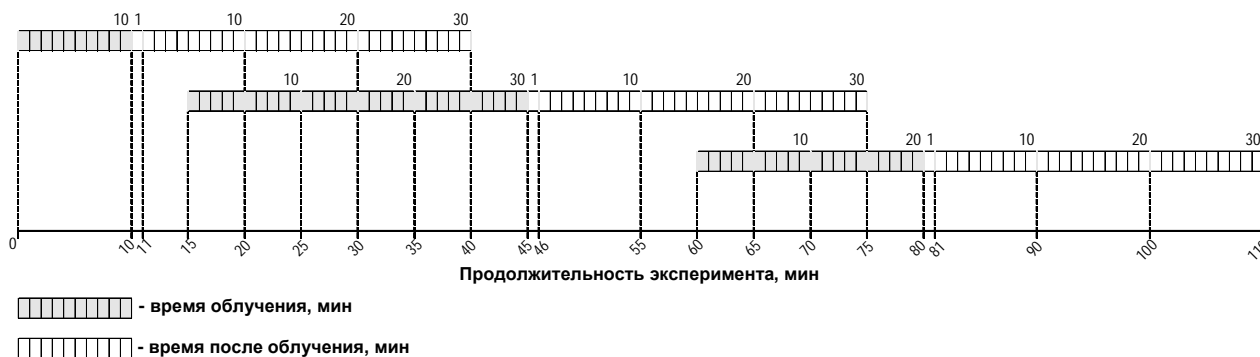
У здорового человека обнаруживается сложная мозаика ритмов, которые прослеживаются на всех уровнях организации. Так, осцилляторные процессы характерны для проявлений генной активности и клеточного метаболизма [4]. В основе регулярных перистальтических сокращений

гладких мышц желудочно-кишечного тракта лежит пейсмекерная активность межмышечных клеток Кахала, генерирующих повторяющиеся высокоамплитудные волны деполяризации, распространяющиеся на оба слоя клеток мышечной оболочки. Осцилляции сосудистого тонуса (вазомоции) зависят от периодических изменений состояния гладкомышечных клеток [3]. Ритм дыхания связан с фазной деятельностью нейронов бульбарного отдела дыхательного центра и т.д. Для понимания механизмов ритмогенеза необходимо исследовать ритмическую активность клетки или даже ее отдельных компонентов. Оказывая направленное воздействие на структуры, ответственные за реализацию биологических ритмов, можно тормозить, усиливать или инициировать периодическую работу отдельных клеток, тканей и органов. Отсюда становится очевидной практическая значимость и перспективность изучения механизмов возникновения биологических ритмов и поиск возможностей управления ими. Совершенно очевидно, что известные в настоящее время биоритмы представляют собой лишь небольшую часть сложной биоритмической системы, существующей на разных уровнях организации живой материи. Обнаружение новых биоритмов, с одной стороны, способствует лучшему пониманию принципов функционирования живых объектов, а с другой – служит отправной точкой для выявления хронопатологии и поиска методов ее коррекции. О новом биологическом явлении – существовании автоколебательного процесса, модифицирующего функцию тромбоцитов в цельной крови *in vitro*, сообщают авторы в настоящей публикации.

Обнаружение нового биологического явления – это всегда счастливый случай, в котором сочетается получение неожиданного научного

результата и озарение, настигающее исследователя и позволяющее интерпретировать необычный факт не как артефакт, а как новую биологическую закономерность. Изначальная задача, которую ставили перед собой авторы, была довольно скромной: изучить зависимость от дозы и временную динамику реакции кровяных пластинок человека на воздействие низкоинтенсивного лазерного излучения. Предполагалось облучать донорскую кровь светом красного лазера в течение 10, 20 и 30 мин и сразу после прекращения фотовоздействия, а также каждые 10 мин на протяжении получаса исследовать адгезию и агрегацию тромбоцитов на полистирене при высокой скорости сдвига ( $1800 \text{ с}^{-1}$ ). Перед началом опытов была разработана хронокарта эксперимента (рис. 1), т.е. такой его алгоритм, который позволял бы на пробе крови одного донора анализировать зависимость биоэффекта от дозы облучения, а также временную динамику изменения показате-

телей в течение 30 мин после прекращения фотовоздействия. Исследование крови начинали через 60 мин после ее взятия. Поскольку при такой организации экспериментов донорская кровь должна была сохраняться более 2,5 часов, было решено для каждой облученной пробы крови поставить соответствующий контроль, в котором исследовалась бы необлученная кровь того же донора, которая выдерживалась все это время в закрытой пластиковой пробирке при комнатной температуре. *A priori* казалось очевидным, что стояние донорской крови при комнатной температуре без какого-либо воздействия не отразится на функции тромбоцитов и в пробах крови, исследованных с 10-минутными интервалами, не будет выявлено различий исследуемых показателей. Предполагалось, что в конечном итоге можно будет ограничиться однократной регистрацией показателей, отражающих исходное состояние пластинок перед началом эксперимента.



**Рисунок 1.** Хронокарта эксперимента

Каково же было наше удивление, когда в контрольных пробах, различавшихся только тем, что каждая последующая проба исследовалась на 10 мин позже предыдущей, были выявлены существенные (в 2–3 раза) различия изучаемых показателей. Первое объяснение этих различий – погрешность метода, дающего плохо воспроизводимые результаты. Однако многолетний опыт работы с прибором “Cone and Plate(let) Analyzer” не дает оснований для сомнений в его точности. Проверка прибора показала совпадение результатов на его четырех каналах. Вместе с тем, выявилась еще одна странная закономерность: если сравнить результаты измерений, сделанных через 60, 90 и 120 мин после взятия крови, то различия между показателями в этих временных точках оказывались статистически не достоверными. Иными словами, «ползучесть» показателей отмечалась только между этими временными точками. Попытка объяснить наблюдаемое явление влиянием на кровь каких-то возмущающих внешних факторов ни к чему не привела. Ясность в понимание существа явления внесло графическое представление временной динамики

изменения исследуемых показателей, при котором обнаружилась отчетливая периодичность изменений адгезии и агрегации тромбоцитов.

В связи с этим целью настоящего сообщения является представление научных фактов, свидетельствующих о наличии периодических изменений функций тромбоцитов в цельной крови при высокой скорости сдвига.

**Материал и методы исследования**

Объектом изучения служила цельная кровь 50 здоровых доноров обоего пола в возрасте от 19 до 50 лет. В течение 10 дней до взятия крови доноры не принимали каких-либо лекарственных препаратов. Кровь из локтевой вены собирали в пластиковую пробирку, содержащую в качестве антикоагулянта 3,8% раствор трехзамещенного цитрата натрия, и смешивали с ним в соотношении 9:1 по объему. Цитратную кровь выдерживали в течение 60 мин при комнатной температуре (20 °C).

Адгезию и агрегацию тромбоцитов на полистиреновой поверхности изучали с помощью аппарата “Cone and Plate(let) Analyzer” (Matis Medical Ltd., Ramat-Gan, Israel), позволяющего исследовать функцию кровяных пластинок в широком

диапазоне скоростей сдвига. Образец цельной крови в объеме 130 мкл помещали на дно полистиреновой ячейки и подвергали воздействию скорости сдвига ( $1800 \text{ с}^{-1}$ ) в течение 2 мин при комнатной температуре. Далее ячейку с адгезированными тромбоцитами и их агрегатами отмывали от крови фосфатным буфером (рН 7,4), и фиксированные на дне ячейки объекты окрашивали краской May-Grünwald в течение 2 мин. Затем краситель отсасывали, препарат высушивали на воздухе и исследовали под микроскопом БИОЛАМ П2-1 (ОАО «ЛОМО», Санкт - Петербург, Россия), оснащенный ССD-камерой. Полученное изображение обрабатывали с помощью имидж-анализатора. Адгезию и агрегацию кровяных пластинок на полистиреновой поверхности оценивали по двум показателям: площади, занимаемой объектами (surface coverage, в процентах от общей площади ячейки), и среднему размеру адгезированных частиц (average size, в  $\text{мкм}^2$ ). В каждой ячейке показатели измеряли в восьми полях зрения и для статистической обработки использовали средние значения. Регистрацию показателей начинали спустя 60 мин после взятия крови. Измерения производили каждые 10 мин в течение 2–4 часов. На основании полученных результатов для каждого показателя с помощью программы “SigmaPlot” строили кривую, отражающую его изменения в реальном времени

(нативная кривая). Периодические колебания характеризовали двумя параметрами: периодом и амплитудой цикла. Период колебаний рассчитывали по нативным кривым, а также оценивали с помощью вейвлет-анализа, позволяющего выделить главную периодическую составляющую и определить ее частотные параметры.

Амплитуду колебаний определяли по разнице максимального и минимального значения показателя в отдельном цикле и выражали в соответствующих абсолютных единицах. Кроме того, рассчитывали разброс каждого показателя во временной развертке в одной реализации, то есть разницу между максимальным и минимальным его значением в течение 2–4-часового наблюдения. Данный показатель характеризует изменение (дрейф) регистрируемых параметров во времени вне зависимости от периодичности. Полученные результаты представлены в виде  $M \pm m$ .

#### Результаты исследований

Исследование временной динамики функции кровяных пластинок в цельной цитратной крови при высокой скорости сдвига показало, что параметры, характеризующие адгезию и агрегацию тромбоцитов на полистирене, существенно изменяются во времени и эта изменчивость имеет отчетливый периодический характер (рис. 2).

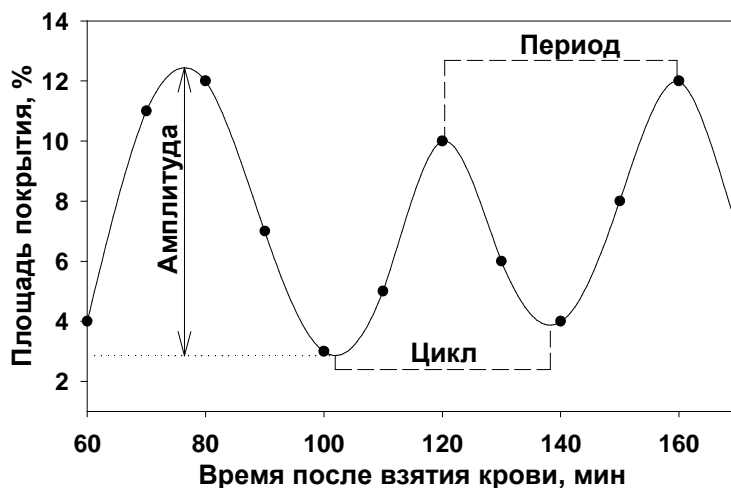
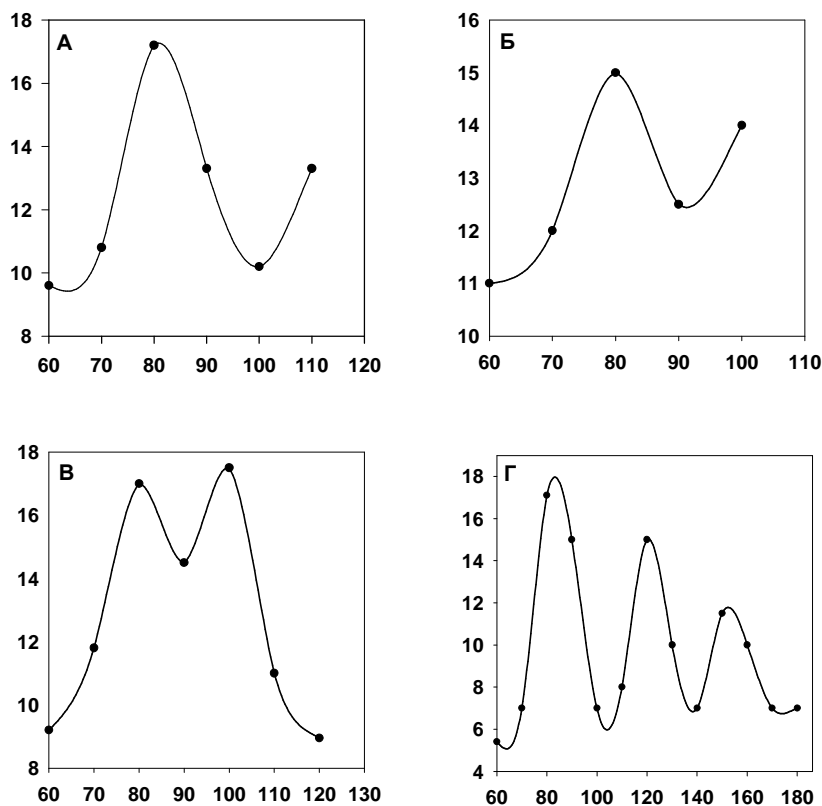


Рисунок 2. Временная динамика адгезии тромбоцитов на полистирене

На зарегистрированных кривых можно выделить отдельные циклы, имеющие начальную точку с низким значением исследуемого показателя, фазу увеличения значений показателя, достигающую пика с последующим уменьшением значений параметра. По характеру кривых можно выделить несколько типов периодичности: *завершенный цикл*, когда величина показателя после подъема возвращается к исходному значе-

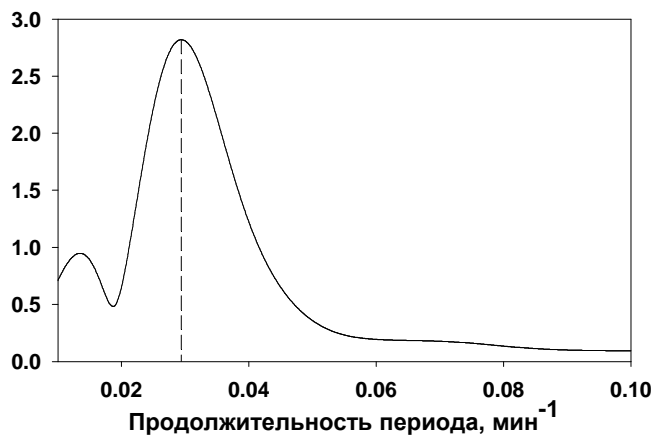
нию, *незавершенный цикл*, когда нисходящая часть кривой не доходит до исходных значений, и как бы «преждевременно» начинается новый цикл (разновидностью незавершенного цикла является *M-образный цикл*, когда нисходящая часть кривой не достигает половины амплитуды ее восходящей части), *затухающая периодичность*, когда амплитуда каждого последующего цикла меньше амплитуды предыдущего (рис. 3).



**Рисунок 3.** Типы кривых, отражающих периодические изменения адгезии тромбоцитов на полистирене. По оси абсцисс – время после взятия крови (мин.), по оси ординат – площадь покрытия ячейки (%).  
 А – завершённый цикл,  
 Б – незавершённый цикл,  
 В – М – образный цикл,  
 Г – затухающая периодичность.

Периодические изменения исследуемых параметров обнаруживались у всех обследованных доноров. Амплитудные и временные параметры колебательного цикла могли существенно различаться как в рамках одной реализации (от цикла к циклу у одного донора), так и у разных доноров. Средние значения осцилляционного периода, рассчитанные по нативным кривым, составили для среднего размера объектов  $34,2 \pm 0,95$  мин (от 23,8 до 47,6 мин), для площади, занимаемой

объектами, –  $35,7 \pm 0,95$  мин (от 22,2 до 47,6 мин). По результатам вейвлет-анализа (рис. 4), средний период колебаний размера адгезированных объектов составил  $33,9 \pm 0,86$  мин, площади, занимаемой адгезированными объектами, –  $34,2 \pm 0,96$  мин. Следовательно, значения продолжительности цикла, вычисленные по нативным кривым и полученные при вейвлет-анализе, практически совпадают.



**Рисунок 4.** Спектр колебания процесса по данным вейвлет – анализа. По оси ординат – условные единицы. Максимальное значение амплитуды кривой указывает на доминирующую ритмическую составляющую.

Амплитуда цикла для среднего размера адгезированных объектов составила  $52,3 \pm 5,3$  мкм<sup>2</sup>, для площади, занимаемой объектами, –  $6,5 \pm 0,4\%$ . Значения показателей в нижней и верхней точке цикла иногда различались в 2 раза и более.

В течение всего периода наблюдения размах изменения показателей составил для размера объектов в среднем  $81,4 \pm 7,2$  мкм<sup>2</sup> (от 15 до 213 мкм<sup>2</sup>), для площади объектов –  $10,7 \pm 0,5\%$  (от 5 до 17%). Как можно видеть, величина разброса регистрируемых параметров в течение всего периода наблюдения превышает амплитуду периодических колебаний, что связано с постепенным смещением с течением времени значений показателей по амплитудной шкале, приводящим к изменению общего наклона кривой.

Выявленные нами периодические изменения поведения тромбоцитов в цельной крови при высокой скорости сдвига имеют все признаки автоколебательного процесса:

1. наблюдается достаточно четкая периодичность колебаний, что подтверждается данными вейвлет-анализа;
2. имеет место незатухаемость периодических колебаний в течение 4-часового наблюдения;
3. обнаруженные периодические колебания возникают без какой-либо связи с внешними индуцирующими воздействиями и являются проявлением внутренней динамики процессов, протекающих в исследуемой системе (в цельной крови);
4. выявленные периодические колебания являются устойчивой биологической функцией – их наличие не зависит от пола, возраста и групповой принадлежности крови (по системе АВ0);
5. большая амплитуда колебаний и их четкая периодичность исключают случайный характер явления.

В настоящее время не представляется возможным ответить на вопрос: существует ли аналогичная временная динамика изменения функции тромбоцитов в условиях *in vivo*, где работают механизмы системного нейро-гуморального контроля? Создается впечатление, что пусковым моментом возникновения регистрируемых колебаний является сам акт взятия крови. В пользу данного предположения свидетельствует то обстоятельство, что значения показателей у разных доноров через 60 мин после взятия крови располагаются в нижней точке цикла или близко к ней. Поскольку средняя продолжительность периода составляет около 35 мин, значения показателей, зафиксированные нами через 60, 90 и 120 мин после взятия крови, статистически достоверно не различались.

Обнаружение в цельной крови автоколебательного процесса ставит вопрос о природе осциллятора, задающего определенный ритм функционирования тромбоцитов в исследуемой гетерогенной системе. Отмеченная периодичность может быть связана с циклическими изменениями свойств самих тромбоцитов: с колебаниями внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  (подобно обнаруженной в мегакариоцитах [8,9]), с изменением количества и аффинности мембранных рецепторов (GPIb и GPIIb/IIIa), с чередованием периодов чувствительности и рефрактерности кровяных пластинок к агонистам (например, к АДФ) и т.п. Однако при попытке объяснить наблюдаемую цикличность периодическими изменениями свойств отдельных тромбоцитов, следует учитывать необходимость синхронизации этих процессов на уровне клеточной популяции. С другой стороны, важным фактором, определяющим поведение тромбоцитов при высокой скорости сдвига, является наличие и активность фактора фон Виллебранда. Не исключено, что конформационная организация молекулы фактора фон Виллебранда, равно как и состояние фермента его активирующего, могут претерпевать определенные изменения во времени в соответствии с динамикой образования и разрушения фермент-субстратного комплекса. Неким аналогом данной ситуации может служить известная осциллирующая реакция Белоусова - Жаботинского.

Вне зависимости от понимания механизма автоколебательного процесса, существующего в крови, знание закономерностей временной динамики изменения реактивности тромбоцитов в цельной крови, позволяет объяснить наблюдаемую в ряде случаев плохую воспроизводимость результатов, получаемых при исследовании крови в разные сроки после ее взятия у пациента. Несовпадение результатов в данном случае не может быть преодолено модификацией условий лабораторного исследования, поскольку зависит не от точности метода, а определяется специфической временной динамикой поведения биоматериала (наличием автоколебательного процесса). С этой особенностью тромбоцитов будет сталкиваться исследователь, пытающийся проверить воспроизводимость результатов при последовательном анализе одной и той же пробы. Игнорирование временной организации тромбоцитарной функции может привести к получению артефактов и неправильным умозаключениям при анализе результатов научных экспериментов, когда при изучении влияния на кровяные пластинки какого-либо фактора (лекарственного препарата, физического воздействия и т.п.) естественная «ползучесть» параметров, обусловленная нали-

чем автоколебаний, будет принята за результат воздействия исследуемого фактора.

На основании представленных нами результатов, а также с учетом новых данных, которые будут получены в ближайшее время, в понятие «биологической нормы» для тромбоцитов, кроме количественных и качественных показателей, может быть введено еще одно измерение – временная шкала, отражающая естественную динамику изменения свойств кровяных пластинок. Нарушение этой временной динамики (хронопатология) может быть маркером или предиктором каких-то патологических состояний, что открывает новое направление теоретических и прикладных исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глас Л., Мэки М. От часов к хаосу: Ритмы жизни. 1991. М., Мир. 248 с.
2. Хетагурова Л.Г., Салбиев К.Д. Хронопатофизиология. 2000. Владикавказ, Проект-Пресс. 175 с.
3. Aalkaer C., Nilsson H. //Brit. J. Pharmacol. 2005. V.144. N 5. P. 605.
4. Fung E., Wong W.W., Suen J.K. et al. //Nature. 2005. V. 5, N 435(7038). P. 118.
5. Glass L. //Nature. 2001. V. 410. N 8. P. 277.
6. Hauser, M. J., Kummer U., Larsen A. Z., Olsen L.F. //Faraday Discuss. 2001. V. 120. P. 215.
7. Olsen L.F., Kummer U., Kindzelskii A.L., Petty H.R. //Biophys. J. 2003. V. 84. P. 69.
8. Uneyama C., Uneyama H., Takahashi M., Akaike N. //Brit. J. Pharmacol. 1994. V. 112. N 2. P. 349.
9. Uneyama C., Uneyama H., Torii K., Akaike N. //Int. J. Mol. Med. 1999. V. 4. N 2. P. 163.

#### **AUTOOSCILLATORY PROCESS MODIFYING PLATELET FUNCTION IN THE WHOLE BLOOD *IN VITRO***

Brill<sup>1</sup> G.E., Budnik<sup>1</sup> I.A., Gasparyan<sup>2</sup> L.V.

<sup>1</sup>State Medical University, Saratov, Russia,

<sup>2</sup>EMRED Oy, Helsinki, Finland

In experiments on the citric whole blood of 50 volunteers periodic changes of platelet adhesion on polystyrene at high ( $1800 \text{ s}^{-1}$ ) shear rate were found. Marked periodicity and high amplitude of the cycles, non-decremental character of oscillations, absence of the external pacemaker allow to suggest a new phenomenon – existence of autooscillatory process in the citrated whole blood *in vitro*.