

УДК 612.1: 577.112-092.4

**И.Н. Манаева, Ю.А. Бондарчук, И.И. Шахматов, С.В. Москаленко,
И.П. Бобров, П.С. Маршалкина, Д.А. Прокопец**

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ, ГЕМОСТАЗА И УРОВНЯ НЕКОТОРЫХ ВОЗРАСТ-ЗАВИСИМЫХ БЕЛКОВ У КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет»,
Барнаул, Российская Федерация

Резюме. Значимая роль в развитии сердечно-сосудистой патологии в пожилом возрасте принадлежит возрастным изменениям в микроциркуляторном русле и системе гемостаза. На развитие заболеваний, связанных с возрастом, оказывает влияние как уровень, так и соотношение белков «молодости» (ирисин) и «старости» (ССЛ11). Для проведения эффективной профилактики возникновения данных заболеваний необходимо изучение особенностей функционирования стареющего организма. **Цель** — оценить состояние микроциркуляторного русла, системы гемостаза, а также уровень белков ирисина и хемокина ССЛ11 у молодых и старых крыс. **Материалы и методы.** В эксперименте использовались молодые и старые крысы-самцы (28 особей) линии Wistar. Исследовалось состояние микроциркуляторного русла, системы гемостаза животных, а также уровень белков ирисина и ССЛ11. **Результаты.** У старых крыс по сравнению с молодыми животными на микроциркуляторном уровне наблюдался спазм артериол на фоне снижения нутритивного кровотока. Повышение агрегационной активности тромбоцитов у возрастных животных сопровождалось гиперкоагуляцией, зарегистрированной с помощью клоттинговых и глобальных методик, а также снижением антикоагулянтной активности плазмы крови и активацией фибринолиза. Кроме того, у старых животных регистрировалось снижение уровня белка ирисина при одновременном увеличении хемокина ССЛ11. **Заключение.** С увеличением возраста отмечаются существенное ухудшение состояния микроциркуляторного русла, гиперкоагуляционные сдвиги в системе гемостаза и неблагоприятные изменения в уровне и соотношении белков «молодости» и «старости».

Ключевые слова: микроциркуляторное русло, система гемостаза, ирисин, ССЛ11, молодые крысы, старые крысы

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Манаева Ирина Николаевна

krinitsina.irina@mail.ru

Дата поступления 21.06.2021 г.

Образец цитирования:

Манаева И.Н., Бондарчук Ю.А., Шахматов И.И., Москаленко С.В., Бобров И.П., Маршалкина П.С., Прокопец Д.А. Состояние систем микроциркуляции, гемостаза и уровня некоторых возраст-зависимых белков у крыс разного возраста. [Электронный ресурс] Вестник уральской медицинской академической науки. 2021, Том 18, №3, с. 197–208, DOI: 10.22138/2500-0918-2021-18-3-197-208

Введение

Люди пожилого возраста особенно подвержены патологическим изменениям со стороны сердечно-сосудистой системы. Неблагоприятное воздействие факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний реализуется, в том числе, через нарушение функции сосудистого эндотелия [1]. При этом формирование эндотелиальной дисфункции приводит, в свою очередь, к повыше-

нию сосудистого тонуса и увеличению периферического сопротивления [2]. Знание направленности и выраженности возрастных изменений показателей микроциркуляции поможет своевременно обращать внимание на риск возникновения той или иной патологии и осуществлять её коррекцию до появления осложнений. Важную роль в развитии патологии сердечно-сосудистой системы играют реологические свойства крови, во многом определяемые состоянием системы гемостаза. В пожилом возрасте происходят изменения не только состояния сосудистой стенки, но и нарушается оптимальное соотношение между прокоагулянтами и антикоагулянтами в крови, что формирует склонность к тромбообразованию [3]. В настоящее время идет активный поиск возможных предикторов развития различных сердечно-сосудистых патологий и их осложнений. В этой связи сохраняется актуальность изучения особенностей состояния системы гемостаза и микроциркуляторного русла.

Исследования последних лет привели к большому прогрессу в понимании процесса старения. В последнее десятилетие были открыты многие биологические соединения, оказывающие разнонаправленное влияние на процессы старения. Так, в 2011 году были описаны белки, оказывающие отрицательное воздействие на функционирование ЦНС и названные «белками старости» [4]. Одним из таких белков является хемокин CCL11, уровень которого увеличивается с возрастом [5]. Повышенный уровень CCL11 наблюдается при болезни Альцгеймера [6], а также рассеянном склерозе [7], ишемической болезни сердца [8], гипертонической болезни [9] и других заболеваниях, связанных с возрастом.

В 2012 году был выявлен белок ирисин, вырабатываемый при физической нагрузке, синтез которого уменьшается по мере старения [9]. Так как ирисин способствует увеличению длины теломер, которые являются маркерами продолжительности жизни клетки, он был назван «белком молодости» [10, 11]. При увеличении уровня ирисина в крови наблюдается улучшение течения «возрастных» заболеваний, таких как болезни Паркинсона и Альцгеймера [12], а также гипертонической болезни [13].

Таким образом, для объективной оценки возрастных изменений и проведения в последующем их качественной коррекции важное значение имеет не только изучение особенностей микроциркуляции и системы гемостаза, но и определение уровня и соотношения белков ирисина и CCL11 у лиц позднего периода жизни.

Материалы и методы

Исследования выполнены на 28 крысах-самцах линии Wistar разного возраста, которые были разделены на 2 экспериментальные группы. Молодые пятимесячные крысы ($n=14$) составляли первую группу (Группа 1) и имели среднюю массу $280,0 \pm 20,0$ г. Во вторую группу (Группа 2) вошли старые двадцатимесячные животные средней массой $535,0 \pm 20,0$ г ($n=14$). Экспериментальные животные обеих групп не подвергались никаким воздействиям.

С целью адаптации к условиям вивария все крысы помещались в стандартные условия содержания за неделю до эксперимента. Животные были размещены в клетках с полубарьерной системой в экологически контролируемых условиях. Пресная водопроводная вода и корм находились в свободном доступе. Проведение экспериментов на крысах осуществляли в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента (Совет от 22 сентября 2010 г.) по охране позвоночных животных, используемых в эксперименте [14]. Обезболивание и умерщвление животных проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Работа была одобрена этическим комитетом ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России (протокол № 8 от 22.10.2018 г.).

Для исследования показателей микроциркуляторного русла использовали метод лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) с анализом амплитудно-частотного спектра колебаний кровотока на аппарате ЛАКК-02 (НПО «Лазма», Россия). Головка оптического зонда фиксировалась в области основания хвоста животного. Длительность записи ЛДФ-граммы составляла 5 мин. Регистрировались следующие параметры микроциркуляции:

- Показатель микроциркуляции (ПМ, пф. ед.) — среднее арифметическое значение показателя микроциркуляции.
- Флакс (σ , пф. ед.) — среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения

показателя амплитуды колебаний микрокровотока, отражающее его среднюю модуляцию во всех исследуемых частотных диапазонах. Показывает временное изменение перфузии ткани.

– Эндотелиальные волны (VLF, very low frequency, пф. ед.) — колебания в частотном диапазоне 0,0095-0,02 Гц, обусловленные деятельностью эндотелия и выработкой им оксида азота (NO). Относятся к «активным» механизмам регуляции микрокровотока.

– Вазомоторные волны (LF, low frequency, пф. ед.) — колебания в частотном диапазоне 0,02-0,052 Гц, обусловленные работой гладкомышечных клеток в прекапиллярном звене резистивных сосудов. Относятся к «активным» механизмам регуляции микрокровотока.

– Дыхательные волны (HF 1, high frequency, пф. ед.) — колебания в частотном диапазоне 0,15-0,4 Гц, вызванные изменением венозного давления при легочной активности, а также присасывающим действием грудной клетки. Относятся к «пассивным» механизмам регуляции микрокровотока.

– Пульсовые волны (CF 1, cardio frequency, пф. ед.) — колебания в частотном диапазоне 0,8-1,6 Гц, обусловленные перепадами систолического и диастолического давления. Относятся к «пассивным» механизмам регуляции микрокровотока.

Перед забором крови животные подвергались наркотизации путём внутривенного введения раствора телазола из расчета 14 мг/кг массы тела животного. Кровь для исследования забиралась из печеночного синуса в два полистироловых градуированных шприца объемом 1,0 и 5,0 мл. В первый шприц, не содержащий цитрат натрия, забирали 0,4 мл крови для проведения низкочастотной пьезотромбоэластографии. Во второй шприц, содержащий 0,5 мл 0,11 М (3,8%) трехзамещенного 5,5-водного цитрата натрия (соотношение крови и цитрата — 9:1) забирали кровь до отметки 5,0 мл для оценки показателей системы гемостаза.

Кровь центрифугировали при 1200 g в течение 15 мин для получения обедненной тромбоцитами плазмы крови. Комплекс методик, позволяющий оценить состояние системы гемостаза, включал исследование агрегационной активности тромбоцитов, коагуляционного звена гемостаза, антикоагулянтной и фибринолитической активности. В качестве реагентов для оценки системы гемостаза были выбраны диагностические наборы фирмы «Технология–Стандарт» (Россия) с использованием коагулометров «Минилаб» (Россия) и «Trombostat-2» (Германия). Показатели периферической крови (количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, содержание гемоглобина, показатель MID — совокупность эозинофилов, базофилов, моноцитов, выраженная в абсолютных величинах и процентах) регистрировались при помощи гематологического анализатора «Drew-3» (США). Определение агрегационной активности тромбоцитов осуществлялось при помощи агрегометра «Биола» (Россия). Уровень антитромбина III оценивался с использованием спектрофотометра «СФ-46» (Россия).

Оценку гемостатического потенциала крови у животных методом низкочастотной пьезотромбоэластографии (НПТЭГ) производили на аппарате АРП-01М «Меднорд» (Россия) с использованием специальной компьютерной программы «ИКС ГЕМО – 3» [15, 16].

Оценивали следующие показатели:

t_1 — время контактной коагуляции, мин [Contact coagulation time, min].

t_3 — время свертывания крови, мин [Blood clotting time, min].

t_5 — время формирования фибрин-тромбоцитарной структуры сгустка, мин [Time of formation of the fibrin-platelet structure of the clot, min].

ИКК — интенсивность контактной коагуляции, о.е. [CCI — the contact coagulation intensity, r.u.].

КТА — константа тромбиновой активности, о.е. [TAC — the thrombin activity constant, r.u.].

Для определения уровня белков ирисина и ССЛ11 осуществляли забор крови для получения сыворотки. Кровь для исследования белков в объеме 2 мл получали путем забора из печеночного синуса в одноразовый полистироловый шприц с широкой иглой, не содержащий антикоагулянт. Полученную сыворотку замораживали при температуре минус 70°C. Перед процедурой анализа образцы размораживали при комнатной температуре. Содержание ирисина и хемокина ССЛ11 выявляли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с применением специальных наборов для крыс фирмы USCN Cloud Clone Corp. (США) на аппарате «Chem Well» (США).

Для обработки и хранения полученного экспериментального материала создавали базы данных с использованием редактора электронных таблиц Microsoft Excel 2010. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета статистического программного обеспечения MedCalc

Version 17.9.7 (лицензия BU556-P12YT-BBS55-YAH5M-UBE51). Данные исследований представлены в виде $Me [Q_{25}; Q_{75}]$, где Me — медиана в выборочной совокупности; $[Q_{25}; Q_{75}]$ — 25-й и 75-й перцентиль. Исходя из того, что не все наблюдаемые признаки подчинялись нормальному распределению, достоверность различий оценивали при помощи непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Различия считались достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

Результаты

Как видно из таблицы 1, у старых животных наблюдается развитие признаков вазоконстрикции по сравнению с молодыми крысами, что проявляется в снижении активных факторов модуляции кровотока, а именно в снижении показателей микроциркуляции и флакса на 7 и 46% соответственно. Данные показатели характеризуют роль миогенного компонента как причины повышения значения пристеночного напряжения сдвига.

Таблица 1
Показатели микроциркуляции у интактных старых (20 мес.) и молодых крыс (5 мес.) линии Wistar
Table 1
The microcirculation parameters in intact old (20 months) and young (5 months) Wistar rats

Показатели/ Parameters	Группа 1/ Group 1, (n=14)	Группа 2/ Group 2, (n=14)
Показатель микроциркуляции, пф. ед./ Microcirculation index, pf. Units	7,5 [6,9-8,6]	7,0 [5,6-7,7] $p=0,047$ ($\Delta - 7\%$)
Флакс, пф. ед./ Flax, pf. units	5,1 [3,7-7,7]	2,8 [2,4-3,6] $p=0,0001$ ($\Delta - 46\%$)
Эндотелиальные волны (VLF), пф. ед./ Endothelial waves, pf. units	8,5 [5,7-11,5]	6,8 [6,0-7,9] $p=0,027$ ($\Delta - 20\%$)
Вазомоторные волны (LF), пф. ед./ Vasomotor waves, pf. units	8,7 [6,1-11,6]	6,2 [3,6-6,8] $p=0,01$ ($\Delta - 29\%$)
Дыхательные волны (HF1), пф. ед./ Respiratory waves, pf. units	5,4 [2,9-7,0]	13,2 [12,6-13,8] $p=0,0001$ ($\Delta + 144\%$)
Пульсовые волны (CF), пф. ед./ Pulse waves, pf. units	2,8 [1,5-3,3]	10,6 [8,5-11,7] $p=0,0001$ ($\Delta + 278\%$)

Примечание. Результаты представлены в таблице в виде ($m [25-75\%]$), где m — медиана в выборочной совокупности; $[25-75\%]$ — 25-й и 75-й перцентиль; Δ — статистически значимая разница экспериментальных групп между собой при $p < 0,05$; p — уровень статистической значимости различий между экспериментальными группами; пф. ед. — перфузионные единицы; n — количество животных в исследуемой группе.

Note. The results are presented in the table in the form ($m [25-75\%]$), where m — The median in the sample; $[25-75\%]$ — 25th and 75th percentile; Δ — Statistically significant difference between experimental groups at $p < 0.05$; p — The level of statistical significance of differences between experimental groups; Pf units — Perfusion units; n — Number of animals in the study group.

Зарегистрированное у старых крыс снижение амплитуды эндотелиальных и вазомоторных волн на 20 и 29% соответственно (активные факторы модуляции кровотока), свидетельствовало об уменьшении притока крови в микроциркуляторное русло, что приводило к развитию стаза, а также к нарушению метаболизма тканей за счет шунтирования кровотока. Увеличение тонуса резистивных сосудов и градиента артериовенозного давления подтверждалось повышением амплитуды колебаний пульсовых волн на 278% и дыхательных волн на 144% (пассивные факторы) у старых животных по сравнению с молодыми крысами. Выявленная совокупность изменений активных и пассивных факторов модуляции доказывает наличие спазма сосудов микроциркуляторного русла у старых крыс, приводящего к обеднению нутритивного кровотока, развитию ишемии тканей и снижению показателя перфузии [17].

При анализе показателей периферической крови (Таблица 2) не выявлено различий в количестве эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов. Однако показатель MID (%), включающий содержание смеси эозинофилов, базофилов и моноцитов у старых животных превышал аналогичный параметр у молодых крыс на 121% ($p=0,001$). Также у старых особей наблюдалось увеличение гемоглобина на 6% ($p=0,04$).

Таблица 2
Показатели периферической крови и системы гемостаза у интактных старых (20 мес.)
и молодых крыс (5 мес.) линии Wistar
Table 2
Parameters of the peripheral blood and hemostasis system in intact old (20 months)
and young (5 months) Wistar rats

Методы исследования/ Research methods	Группа 1 /Group 1, (n=14)	Группа 2 /Group 2, (n=14)
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$ Erythrocytes, $\times 10^{12}/l$	6,1 [5,8-6,8]	6,5 [5,8-7,8] p=0,09
Гемоглобин, г/л / Haemoglobin, g/l	127,0 [122,0-130,0]	135,0 [125,0-142,0] p=0,04 ($\Delta + 6\%$)
Лейкоциты, $\times 10^9/л$ / Leucocytes, $\times 10^9/l$	5,1 [4,2-7,3]	4,3 [2,0-6,1] p=0,9
MID#, $\times 10^9/л$	0,5 [0,4-0,6]	1,0 [0,35-1,15] p=0,1
MID, %	10,3 [8,8-10,9]	22,8 [17,8-25,9] p=0,001 ($\Delta + 121\%$)
Тромбоциты, $\times 10^9/л$ Platelets, $\times 10^9 / l$	706,0 [628,5-799,5]	759,0 [618,0-829,3] p=0,4
АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов, макс. знач./ ADP-induced platelet aggregation, max. value	29,0 [28,5-29,8]	33,3 [28,7-37,9] p=0,03 ($\Delta + 14\%$)
АПТВ, с. / АРТТ, s	27,4 [26,4-28,6]	17,9 [16,0-19,5] p=0,03 ($\Delta - 34\%$)
Протромбиновое время, с. / Prothrombin time, s	14,4 [13,8-15,2]	14,6 [13,8-15,3] p=0,2
Тромбиновое время, с. / Thrombin time, s	23,3 [21,3-26,8]	21,7 [17,0-26,6] p=0,4
ВПФМ, с. / FMPT, s	41,5 [38,3-43,8]	37,4 [35,-42,2] p=0,9
Фибриноген, г/л / Fibrinogen, g/l	2,1 [1,9-2,4]	1,9 [1,4-2,0] p=0,2
РФМК, мг/100 мл / SFMC, mg / 100 ml	3,0 [3,0-4,5]	3,0 [3,0-3,0] p=0,3
Антитромбин III, % / Antithrombin III, %	96,2 [95,5-97,3]	77,2 [74,3-94,5] p=0,0001 ($\Delta - 19\%$)
Спонтанный эуглобулиновый фибринолиз, мин./ Spontaneous euglobulin fibrinolysis, min	532,5 [513,8-560,0]	354,3 [174,3-399,0] p=0,0001 ($\Delta - 33\%$)

Примечание: данные представлены в виде (m [25–75%]) где m — медиана в выборочной совокупности; p — уровень статистической значимости различий сравниваемых показателей; Δ — статистически значимая разница экспериментальных групп между собой при $p < 0,05$; p — уровень статистической значимости различий между экспериментальными группами; АПТВ — активированное парциальное тромбoplastинное время; РФМК — растворимые фибрин-мономерные комплексы; ВПФМ — время полимеризации растворимых фибрин-мономерных комплексов.

Note. The results are presented in the table in the form (m [25-75%]), where m — the median in the sample; [25-75%] — 25th and 75th percentile; Δ — Statistically significant difference between experimental groups at $p < 0.05$; p — The level of statistical significance of differences between experimental groups; АРТТ — activated partial thromboplastin time; SFMC — soluble fibrin-monomer complexes; FMPT is the polymerization time of soluble fibrin-monomer complexes.

Со стороны сосудисто-тромбоцитарного гемостаза у старых животных определялось повышение агрегационной функции тромбоцитов на 14% ($p=0,03$) при неизменном их количестве. Показатели, характеризующие внешний путь активации плазменного гемостаза (ПВ) и конечные этапы свертывания, не имели различий между экспериментальными группами. У старых животных регистрировалась гиперкоагуляция на внутреннем пути активации плазменного гемостаза, что проявлялось в укорочении АПТВ на 34% ($p=0,03$). На фоне активации процессов свертывания у старых крыс отмечалось снижение количества антитромбина III на 19% ($p=0,0001$) и активация фибринолиза на 33% ($p=0,0001$).

По данным низкочастотной пьезотромбоэластографии у старых животных наблюдалось усиление показателя интенсивности контактной коагуляции на 150%, что характеризовало усиление агрегационной функции тромбоцитов и других форменных элементов крови на начальных этапах образования сгустка (Таблица 3). Также регистрировался прирост активности тромбина на 44% у старых особей. Кроме того, отмечался сдвиг точки желирования влево, свидетельствующий об укорочении времени свертывания крови на 28% в группе старых крыс. Наряду с этим было зафиксировано снижение времени формирования фибрин-тромбоцитарной структуры сгустка на

46%, что позволяет говорить о хронометрической гиперкоагуляции у старых крыс по сравнению с молодыми животными.

По данным иммуноферментного анализа (Рисунок 1) уровень ирисина у старых животных был ниже в 2 раза ($p=0,04$) по сравнению с молодыми. Напротив, уровень хемокина CCL11 превышал в 1,7 раза аналогичный показатель у молодых особей ($p=0,001$).

Таблица 3
Показатели гемостаза по данным пьезотромбоэластографии у интактных старых (20 мес.) и молодых (5 мес.) крыс линии Wistar
Table 3
Indicators of low frequency piezothromboelastography in intact old (20 months) and young (5 months) Wistar rats

Методы исследования / Research methods	Группа 1 / Group 1, (n=14)	Группа 2 / Group 2, (n=14)
t_1 , мин. / t_1 , min	0,7 [0,6-1,0]	0,4 [0,3-0,6] $p=0,001$ ($\Delta - 43\%$)
ИКК, о.е. / CCI, r.u.	6,0 [4,3-8,4]	15 [10,5-22,0] $p=0,001$ ($\Delta + 150\%$)
КТА, о.е. / TAC, r.u.	47,6 [40,7-54,1]	68,8 [42,5-88,5] $p=0,03$ ($\Delta + 44\%$)
t_3 , мин. / t_3 , min	5,0 [4,0-5,5]	3,6 [2,9-4,0] $p=0,018$ ($\Delta - 28\%$)
t_5 , мин. / t_5 , min	26,9 [23,4-35,5]	14,5 [10,8-22,4] $p=0,017$ ($\Delta - 46\%$)

Примечание: данные представлены в виде (m [25–75%]) где m — медиана в выборочной совокупности; p — уровень статистической значимости различий сравниваемых показателей; Δ — статистически значимая разница экспериментальных групп между собой при $p < 0,05$; p — уровень статистической значимости различий между экспериментальными группами; t_1 — время контактной коагуляции; ИКК — интенсивность контактной коагуляции; КТА — константа тромбиновой активности; t_3 — время свертывания крови; t_5 — время формирования фибрин-тромбоцитарной структуры.

Note: data are presented in the form (m [25-75%]), where m — the median in the sample; [25-75%] — 25th and 75th percentile; Δ — Statistically significant difference between experimental groups at $p < 0.05$; p — The level of statistical significance of differences between experimental groups; t_1 — the contact coagulation time; CCI — the contact coagulation intensity; TAC — the thrombin activity constant; t_3 — the clotting time; t_5 — the time of forming the fibrin-plateletstructure.

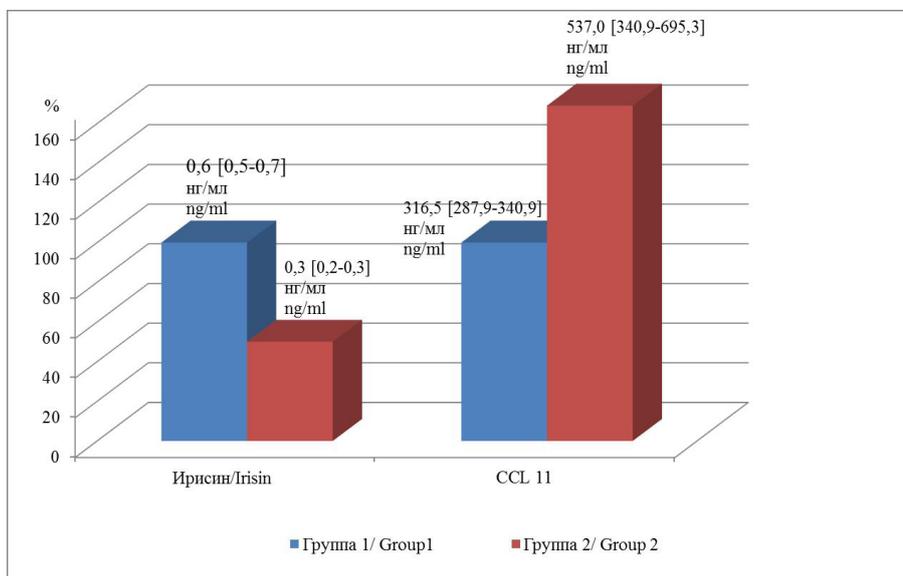


Рисунок 1. Уровень ирисина и CCL11 у интактных старых (20 мес.) и молодых крыс (5 мес.) линии Wistar

Примечание. На рисунке представлены данные, выраженные в % относительно контроля.

Figure 1. Irisin and CCL11 concentrations in intact old (20 months) and young (5 months) Wistar rats

Note. The figure shows the data expressed in % relative to the control.

Таким образом, возрастные изменения микроциркуляторного русла преимущественно выражаются в виде констрикторной реакции сосудов, что проявляется в спазме капиллярного звена

и снижении нутритивного кровотока. У старых животных регистрировалась тенденция к повышению вязкости крови. Со стороны системы гемостаза наблюдалось повышение агрегационной функции тромбоцитов, гиперкоагуляция по внутреннему пути активации плазменного гемостаза, снижение антикоагулянтной активности и активация фибринолиза. Гиперкоагуляционные сдвиги подтверждались результатами пьезотромбоэластографии. Уровень ирисина у старых животных снижался, в то время как содержание хемокина CCL11 возрастало.

Обсуждение

Хорошо известно, что с увеличением возраста баланс в системе гемостаза смещается в сторону гиперкоагуляции, что проявляется в активации свёртывания на различных этапах, увеличении содержания фибриногена и растворимых фибрин-мономерных комплексов, а также в снижении антикоагулянтной активности плазмы крови [3]. Наряду с изменениями в системе гемостаза в процесс вовлекается и микроциркуляторное русло. Наблюдаемая при этом вазоконстрикция приводит к усилению агрегации тромбоцитов, увеличению экспрессии тканевого фактора, что, в свою очередь, усугубляет гиперкоагуляцию и активирует фибринолиз [18]. Зарегистрированное и в наших исследованиях повышение агрегационной активности тромбоцитов связано, по-видимому, с увеличением с возрастом на их мембране количества рецепторов к АДФ [19], коллагену и фактору Виллебранда [20]. При этом АДФ, взаимодействуя с мембранными рецепторами тромбоцитов, активирует фосфолипазу А₂, которая стимулирует образование тромбосана А₂. Это усиливает активацию фосфолипазы С, а также ускоряет синтез диацилглицерола и протеинкиназы С с последующим выраженным фосфолированием протеинов сократительной системы [21], что, в свою очередь, способствует активному сокращению актомиозина. Таким образом, возрастающая по мере старения организма активность тромбоцитов увеличивает риск развития состояния тромботической готовности [22]. Рост прокоагулянтной активности у старых животных также может быть обусловлен увеличением с возрастом количества слушающихся эндотелиальных клеток, стимулирующих свертывание, а также повышением экспрессии тканевого фактора, что является одной из причин развития тромбоэмболических осложнений в пожилом возрасте [23].

Наблюдаемая нами тенденция к увеличению количества эритроцитов и тромбоцитов у старых крыс может вызывать повышение вязкости крови, что, в свою очередь, может формировать склонность к тромбозу за счет усиления активности начальных этапов тромбообразования. При этом показано, что повышенное количество эритроцитов, особенно с увеличенным содержанием гемоглобина, является одним из факторов риска возникновения тромбозов коронарных, мозговых и периферических сосудов [3]. Помимо этого факта, в старческом возрасте повышается экспрессия тканевого фактора лейкоцитами, что еще в большей степени способствует гиперкоагуляции [24]. Появляющийся в процессе свертывания тромбин через протеиназаактивируемые рецепторы PAR-1 (proteinase activated receptor) оказывает влияние на моноциты и повышает синтез IL-1, IL-6 и других провоспалительных цитокинов, которые способствуют образованию белков острой фазы воспаления, в том числе фибриногена [25].

При анализе параметров, характеризующих состояние микроциркуляторного русла, нами было выявлено понижение показателей микроциркуляции и флукса у старых крыс по сравнению с молодыми особями, что свидетельствует о развивающейся вазоконстрикции. Об этом же говорит обнаруженное нами снижение у старых животных, по сравнению с молодыми особями, таких активных факторов модуляции кровотока, как амплитуда эндотелиальных и вазомоторных волн. Зарегистрированное нами снижение данных показателей может быть обусловлено возрастным уменьшением активности эндотелия, что, в частности, проявляется в недостаточной выработке оксида азота и накоплении эндотелина 1, что увеличивает сосудосуживающий эффект и снижает приток крови в микроциркуляторное русло [17]. Таким образом, в условиях описанного нами сниженного напряжения сдвига происходит постепенное нарушение секреторной активности эндотелия, что способствует развитию эндотелиальной дисфункции.

Зарегистрированные нами возрастные изменения сосудистой стенки подтверждаются отрицательной динамикой одного из пассивных факторов модуляции кровотока. Об этом свидетельствует прирост амплитуды пульсовых волн у пожилых животных, обусловленный возрастным снижением эластичности стенки сосуда.

Процесс старения задействует все защитные механизмы организма, в частности, активирует иммунную систему, систему гемостаза и микроциркуляции, белки теплового шока и антиоксидантную систему. Гуморальные защитные системы организма также включаются в формирование ответной реакции на возрастные изменения, в том числе — белки «молодости» (ирисин, GDF11, TIMP-2, MANF и др.) и белки «старости» (CCL11, GDF15, JAM и др.). По данным литературы, одной из групп регуляторов экспрессии генов и синтеза этих белков являются цитогины (вилон, тимоген, эпиталон, пинеалон и др.), представляющие собой короткие пептиды, которые обладают способностью регулировать синтез белков «молодости» и «старости», белков теплового шока, а также функции иммунной и эндокринной систем. При этом ряд вышеназванных пептидов (пинеалон и вилон) осуществляет свое геропротекторное действие путем влияния на ген FNDC5, который кодирует образование белка ирисина [27]. В то же время, в промоторах генов CCL11 мышей обнаружены сайты связывания для кортагена, эпиталона и кардиогена [28]. Следовательно, возможные пути воздействия на механизмы, способствующие экспрессии «белков молодости» и супрессии «белков старости», могут рассматриваться в качестве эффективного способа профилактики возрастных заболеваний.

Проведенный корреляционный анализ между исследуемыми показателями системы гемостаза и уровнем белков «молодости» и «старости» выявил ряд закономерностей. Так, при исследовании показателей, полученных у молодых интактных крыс, была обнаружена прямая корреляционная зависимость между содержанием белка «молодости» ирисина и ключевыми показателями системы гемостаза (ирисин-протромбиновое время: $r=0,949$; $p=0,051$; ирисин-антитромбин III: $r=0,531$; $p=0,076$).

В свою очередь, показатели, полученные у старых животных, выявили слабую прямую корреляционную зависимость уровня ирисина и показателя MID% ($r=0,528$; $p=0,052$). Исследование корреляции между уровнем белка «старости» CCL11 и относительным показателем MID% выявило между ними отрицательную зависимость ($r=-0,796$; $p=0,006$). Аналогичная зависимость была установлена между содержанием белка CCL11 и уровнем фибриногена ($r=-0,685$; $p=0,029$).

Таким образом, возрастные изменения в организме проявляются, в частности, в виде неблагоприятных изменений микроциркуляторного русла, системы гемостаза и уровня белков ирисина и CCL11. Нарушения в микроциркуляторном звене сопровождаются активацией процесса свертывания крови и фибринолиза при снижении антикоагулянтной активности, что в пожилом и старческом возрасте может приводить к увеличению риска развития тяжелых тромботических осложнений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gwartz P.A. Teaching the interrelationship between stress, emotions, and cardiovascular risk using a classic paper by Walter Cannon. *Adv Physiol Educ.* 2008; 32(1): 18-22.
2. Луцкий И.С. Влияние хронического психоэмоционального стресса на формирование эндотелиальной дисфункции, процессы ремоделирования сосудов и снижение мозгового кровотока. *Кубанский научный медицинский вестник.* 2015; 3(152): 65-72.
3. Момот А.П., Баркаган З.С. Исследование системы гемостаза у лиц пожилого возраста: основные цели и методы. *Клиническая геронтология.* 2007; 4: 44-49.
4. Villeda S.A., Luo J., Mosher K.I. et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature.* 2011; 477: 90-94.
5. Bitto A., Kaeberlein M. Rejuvenation: it's in our blood. *Cell Metab.* 2014; 20(1): 2-4.
6. Khaibullin T., Ivanova V., Martynova E. et al. Elevated Levels of Proinflammatory Cytokines in Cerebrospinal Fluid of Multiple Sclerosis Patients. *Front Immunol.* 2017; 8: 531.
7. Kaehler J., Tuleweit A., Steven D. et al. Association between eotaxin (CCL11), C-reactive protein, and antimicrobial antibodies in patients undergoing coronary angioplasty. *J. Investig Med.* 2006; 54(8): 446-454.
8. Кузник Б.И., Давыдов С.О., Степанов А.В. и др. Белки «молодости» и «старости» и система гемостаза. *Тромбоз, гемостаз и реология.* 2016; 67(S3): 234-235.
9. Belviranli M., Okudan N., Kabak B. et al. The relationship between brain-derived neurotrophic factor, irisin and cognitive skills of endurance athletes. *Phys Sportsmed.* 2016; 44(3): 290-296.
10. Rana K.S., Arif M., Hill E.J. et al. Plasma irisin levels predict telomere length in healthy adults. *Age (Dordr).* 2014; 36(2): 995-1001.
11. Brailoiu E., Deliu E., Sporici R.A., Brailoiu G.C. Irisin evokes bradycardia by activating cardiac-projecting neurons of nucleus ambiguus. *Physiol Rep.* 2015; 3(6): e12419.

12. Wang S., Pan J. Irisin ameliorates depressive-like behaviors in rats by regulating energy metabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016; 474(1): 22-28.
13. Кузник Б.И., Давыдов С.О., Степанов А.В., Морарь Н.В. Влияние кинезитерапевтических процедур на содержание ирисина у женщин с заболеваниями сердечно-сосудистой системы в зависимости от массы тела и гормонального статуса. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 47-51.
14. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. (Council of the European Union, European Parliament. *Official Journal of the European Union.* 2010; 276: 33-80.
15. Тютрин И.И., Удут В.В., Шписман М.Н. Низкочастотная пьезотромбоэластография в диагностике гемостазиологических расстройств: методическое руководство. Томск: Меднорд-Техника; 2018.
16. Тютрин И.И., Удут В.В. Низкочастотная пьезотромбоэластография цельной крови: алгоритмы диагностики и коррекции гемостазиологических расстройств. Томск: Издательский дом Томского государственного университета; 2016.
17. Крупаткин А.И., Сидоров В.В. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем: колебания, информация, нелинейность: руководство для врачей. Москва: ЛИБРОКОМ; 2013.
18. Бондарчук Ю.А., Носова М.Н., Шахматов И.И. Влияние длительности ультразвукового воздействия на состояние микроциркуляторного русла и системы гемостаза у крыс. *Вестн. Том. гос. ун-та. Биология.* 2019; 48: 97-114.
19. Симоненко В.Б., Медведев И.Н., Толмачев В.В. Динамика активности первичного гемостаза у больных артериальной гипертензией при метаболическом синдроме на фоне лечения. *Клиническая медицина.* 2011; 89(3): 35-38.
20. Медведев И.Н., Кутафина Н.В. Агрегационная активность тромбоцитов у здоровых лиц второго зрелого возраста. *Фундаментальные исследования.* 2012; 8-2: 362-366.
21. Киперман Я.В., Завалишина С.Ю., Кутафина Н.В. Активность кровяных пластинок у молодых людей под действием умеренных регулярных физических нагрузок. *Современные проблемы науки и образования.* 2014; 6: 14-13.
22. Момот А.П., Тараненко И.А., Цывкина Л.П. Состояние тромботической готовности – возможности современной диагностики и перспективы. *Медицинский алфавит. Современная лаборатория.* 2013; 1: 24-27.
23. Bochenek M.L., Schütz E., Schäfer K. Endothelial cell senescence and thrombosis: Ageing clots. *Thromb. Res.* 2016; 147: 36-45.
24. Кузник Б.И., Витковский Ю.А., Лялюкина Е.В. Возрастные особенности системы гемостаза у людей. *Успехи геронтологии.* 2005; 18(16): 38-48.
25. Li X., Shao H., Taylor I.R., Gestwicki J.E. Targeting Allosteric Control Mechanisms in Heat Shock Protein 70 (Hsp70). *Curr Top Med Chem.* 2016; 16(25): 2729-2740.
26. Хавинсон В.Х., Кузник Б.И., Тарновская С.И. и др. Короткие пептиды и регулятор длины теломер гормон ирисин. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2015; 9: 332-336.
27. Хавинсон В.Х., Кузник Б.И., Тарновская С.И. и др. Пептиды и молекулярные маркеры старения CCL11 и HMGB1: обзор литературы и собственных данных. *Успехи геронтологии.* 2014; 27(3): 397-406.
28. Khavinson V.Kh., Kuznik B.I., Tarnovskaya S.I. et al. Peptides and CCL11 and HMGB1 as Molecular Markers of Aging: Literature Review and Own Data. *Advances in Gerontology.* 2015; 5(3): 133-140.

Авторы

Манаева Ирина Николаевна

Преподаватель кафедры нормальной физиологии

krinitsina.irina@mail.ru

Бондарчук Юлия Алексеевна

Кандидат медицинских наук, доцент кафедры нормальной физиологии

bondarchuk2606@yandex.ru

Шахматов Игорь Ильич

Доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии
iish59@yandex.ru

Москаленко Светлана Валерьевна

Кандидат медицинских наук, преподаватель кафедры нормальной физиологии
sunrisemsv@gmail.com

Бобров Игорь Петрович

Доктор медицинских наук, профессор кафедры судебной медицины имени профессора В.Н. Крюкова и патологической анатомии с курсом ДПО
ig.bobrov2010@yandex.ru

Маршалкина Полина Сергеевна

Студентка 5 курса института клинической медицины
marshalkina.polina@mail.ru

Прокопец Дарья Андреевна

Студентка 5 курса института клинической медицины
darya_prokopets@mail.ru

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России
656038, Российская Федерация, Алтайский край, г. Барнаул, проспект Ленина, д. 40

*I.N. Manaeva, Yu.A. Bondarchuk, I.I. Shakhmatov, S.V. Moskalenko,
I.P. Bobrov, P.S. Marshalkina, D.A. Prokopets*

THE STATE OF MICROCIRCULATION, THE HEMOSTASIS SYSTEM, AND LEVEL OF PROTEINS IRISIN AND CCL11 IN YOUNG AND OLD RATS

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Altai State Medical University» of the Ministry of Health of Russia, Barnaul, Russian Federation

Abstract. A significant role in the development of cardiovascular pathology in old age belongs to age-related changes in the microvasculature and the hemostatic system. The development of age-related diseases is influenced by both the level and the ratio of the proteins «youth» (irisin) and «old age» (CCL11). To carry out effective prevention of the occurrence of these diseases, it is necessary to study the characteristics of the functioning of an aging organism. *The aim* is to assess the state of the microvasculature, the hemostasis system, the level of the proteins irisin and the chemokine CCL11 in young and old rats. Young and old male rats (28 individuals) of the Wistar line were used in the experiment. The state of the microvasculature, the hemostasis system of animals, the level of the proteins irisin and CCL11 were studied. In old rats, compared with young animals, at the microcirculatory level, spasm of arterioles was observed on the background of a decrease in nutritional blood flow. An increase in the aggregation activity of platelets in aged animals was accompanied by hypercoagulation, recorded using clotting and global techniques, as well as a decrease in the anticoagulant activity of blood plasma and activation of fibrinolysis. In addition, in older animals, a decrease in the level of the irisin protein was recorded, while the chemokine CCL11 increased. So, with increasing age, there is a significant deterioration in the state of the microvasculature, hypercoagulative shifts in the hemostasis system and unfavorable changes in the level and ratio of proteins of «youth» and «old age».

Keywords: microvasculature, hemostasis system, irisin, CCL11, young rats, old rats

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Irina N. Manaeva

krinitsina.irina@mail.ru

Received 21.06.2021

For citation:

Manaeva I.N., Bondarchuk Yu.A., Shakhmatov I.I., Moskalenko S.V., Bobrov I.P., Marshalkina P.S., Prokopets D.A. The state of microcirculation, the hemostasis system, and level of proteins irisin and CCL11 in young and old rats. [Online] *Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science*. 2021, Vol. 18, no. 3, pp. 197–208. DOI: 10.22138/2500-0918-2021-18-3-197-208 (In Russ)

REFERENCES

- Gwartz P.A. Teaching the interrelationship between stress, emotions, and cardiovascular risk using a classic paper by Walter Cannon. *Adv Physiol Educ*. 2008; 32(1): 18-22.
- Luckij I.S. Vlijanie hronicheskogo psihohemotional'nogo stressa na formirovanie jendotelial'noj disfunkcii, processy remodelirovanija sosudov i snizhenie mozgovogo krovotoka. *Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik*. 2015; 3(152): 65-72 (in Russ).
- Momot A.P., Barkagan Z.S. Issledovanie sistemy gemostaza u lic pozhilogo vozrasta: osnovnye celi i metody. *Klinicheskaja gerontologija*. 2007; 4: 44-49 (in Russ).
- Villeda S.A., Luo J., Mosher K.I. et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*. 2011; 477: 90-94.
- Bitto A., Kaeberlein M. Rejuvenation: it's in our blood. *Cell Metab*. 2014; 20(1): 2-4.
- Khaibullin T., Ivanova V., Martynova E. et al. Elevated Levels of Proinflammatory Cytokines in Cerebrospinal Fluid of Multiple Sclerosis Patients. *Front Immunol*. 2017; 8: 531.
- Kaehler J., Tuleweit A., Steven D. et al. Association between eotaxin (CCL11), C-reactive protein, and antimicrobial antibodies in patients undergoing coronary angioplasty. *J. Investig Med*. 2006; 54(8): 446-454.
- Kuznik B.I., Davydov S.O., Stepanov A.V. i dr. Belki «molodosti» i «starosti» i sistema gemostaza. *Tromboz, gemostaz i reologija*. 2016; 67(S3): 234-235 (in Russ).
- Belviranli M., Okudan N., Kabak B. et al. The relationship between brain-derived neurotrophic factor, irisin and cognitive skills of endurance athletes. *Phys Sportsmed*. 2016; 44(3): 290-296.
- Rana K.S., Arif M., Hill E.J. et al. Plasma irisin levels predict telomere length in healthy adults. *Age (Dordr)*. 2014; 36(2): 995-1001.
- Brailoiu E., Deliu E., Sporici R.A., Brailoiu G.C. Irisin evokes bradycardia by activating cardiac-projecting neurons of nucleus ambiguus. *Physiol Rep*. 2015; 3(6): e12419.
- Wang S., Pan J. Irisin ameliorates depressive-like behaviors in rats by regulating energy metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 474(1): 22-28.
- Kuznik B.I., Davydov S.O., Stepanov A.V., Morar' N.V. Vlijanie kineziterapevticheskikh procedur na sodержanie irisina u zhenshhin s zabolevanijami serdechno sosudistoj sistemy v zavisimosti ot massy tela i gormonal'nogo statusa. *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija*. 2016; 60(4): 47-51 (in Russ).
- Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. (Council of the European Union, European Parliament. *Official Journal of the European Union*. 2010; 276: 33-80.
- Tjutrin I.I., Udut V.V., Shpisman M.N. Nizkochastotnaja p'ezotrombojelastografija v diagnostike gemostaziologicheskikh rasstrojstv: metodicheskoe rukovodstvo. Tomsk: Mednord-Tehnika; 2018 (in Russ).
- Tjutrin I.I., Udut V.V. Nizkochastotnaja p'ezotrombojelastografija cel'noj krovi: algoritmy diagnostiki i korrekcii gemostaziologicheskikh rasstrojstv. Tomsk: Izdatel'skij dom Tomskogo gosudarstvennogo universiteta; 2016 (in Russ).
- Krupatkin A.I., Sidorov V.V. Funkcional'naja diagnostika sostojanija mikrocirkuljatorno tkanevyh sistem: kolebanija, informacija, nelinejnost': rukovodstvo dlja vrachej. Moskva: LIBROKOM; 2013 (in Russ).
- Bondarchuk Ju.A., Nosova M.N., Shahmatov I.I. Vlijanie dlitel'nosti ul'trazvukovogo vozdejstvija na sostojanie mikrocirkuljatornogo rusla i sistemy gemostaza u krys. *Vestn. Tom. gos. un-ta. Biologija*. 2019; 48: 97-114 (in Russ).
- Simonenko V.B., Medvedev I.N., Tolmachev V.V. Dinamika aktivnosti pervichnogo gemostaza u bol'nyh arterial'noj gipertoniej pri metabolicheskom sindrome na fone lechenija. *Klinicheskaja medicina*.

2011; 89(3): 35-38 (in Russ).

20. Medvedev I.N., Kutafina N.V. Agregacionnaja aktivnost' trombocitov u zdorovyh lic vtorogo zrelogo vozrasta. *Fundamental'nye issledovanija*. 2012; 8-2: 362-366 (in Russ).

21. Kiperman Ja.V., Zavalishina S.Ju., Kutafina N.V. Aktivnost' krovjanyh plastinok u molodyh ljudej pod dejstviem umerennyh reguljarnykh fizicheskikh nagruzok. *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija*. 2014; 6: 14-13 (in Russ).

22. Momot A.P., Taranenko I.A., Cyvkina L.P. Sostojanie tromboticheskoj gotovnosti – vozmozhnosti sovremennoj diagnostiki i perspektivy. *Medicinskij alfavit. Sovremennaja laboratorija*. 2013; 1: 24-27 (in Russ).

23. Bochenek M.L., Schütz E., Schäfer K. Endothelial cell senescence and thrombosis: Ageing clots. *Thromb. Res*. 2016; 147: 36-45.

24. Kuznik B.I., Vitkovskij Ju.A., Ljul'kina E.V. Vozrastnye osobennosti sistemy gemostaza u ljudej. *Uspehi gerontologii*. 2005; 18(16): 38-48 (in Russ).

25. Li X., Shao H., Taylor I.R., Gestwicki J.E. Targeting Allosteric Control Mechanisms in Heat Shock Protein 70 (Hsp70). *Curr Top Med Chem*. 2016; 16(25): 2729-2740.

26. Havinson V.H., Kuznik B.I., Tarnovskaja S.I. i dr. Korotkie peptidy i reguljator dliny telomer gormon irisin. *Bjuleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny*. 2015; 9: 332-336 (in Russ).

27. Havinson V.H., Kuznik B.I., Tarnovskaja S.I. i dr. Peptidy i molekulyarnye markery starenija CCL11 i HMGB1: obzor literatury i sobstvennykh dannyh. *Uspehi gerontologii*. 2014; 27(3): 397-406 (in Russ).

28. Khavinson V.Kh., Kuznik B.I., Tarnovskaja S.I. et al. Peptides and CCL11 and HMGB1 as Molecular Markers of Aging: Literature Review and Own Data. *Advances in Gerontology*. 2015; 5(3): 133-140.

Authors

Irina N. Manaeva

Assistant at the Department of Normal Physiology

krinitsina.irina@mail.ru

Yulia A. Bondarchuk

Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Normal Physiology

bondarchuk2606@yandex.ru

Igor I. Shakhmatov

Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Normal Physiology

iish59@yandex.ru

Svetlana V. Moskalenko

Candidate of Medical Sciences, Assistant of the Department of Normal Physiology

sunrisemsv@gmail.com

Igor P. Bobrov

Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Forensic Medicine named after Professor V.N. Kryukov and pathological anatomy with APE course.

ig.bobrov2010@yandex.ru

Polina S. Marshalkina

5th year student of the Institute of Clinical Medicine

marshalkina.polina@mail.ru

Daria A. Prokopets

5th year student of the Institute of Clinical Medicine

darya_prokopets@mail.ru

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Altai State Medical University» of the Ministry of Health of Russia

40 Lenin Avenue Barnaul Altai Territory Russian Federation 656038