

Федеральное агентство по образованию  
ГОУ ВПО «Белгородский государственный университет»

Е.А. Липунова, М.Ю. Скоркина

Система красной крови  
Сравнительная физиология

Белгород  
2004

УДК 612:591.111.1  
ББК 28.912  
Л61

Печатается по решению  
редакционно-издательского совета  
Белгородского государственного университета

#### Рецензенты

Доктор биологических наук,  
профессор Курского государственного университета  
Ю.В. Фурман  
Доктор биологических наук, профессор Белгородского  
Государственного университета  
Федорова М.З.

Л61 Липунова Е.А., Скоркина М.Ю.  
Система красной крови: Сравнительная физиология: Монография. –  
Белгород: Изд-во БелГУ, 2004. – 216 с.

#### ISBN

В работе в сравнительно-физиологическом аспекте излагаются вопросы общей гематологии (тории кроветворения, эмбриональный и постэмбриональный гемопоэз, эритропоэз), морфологии и физиологии красных клеток крови в физиологических условиях и при действии экстремальных факторов; предложены новейшие подходы к лабораторному контролю и анализу показателей и свойств красных клеток крови, разработанные авторами и поддержанные патентами Российской Федерации на изобретение.

Для научных работников, аспирантов, преподавателей, а также студентов биологических, медицинских, ветеринарных факультетов университетов.

ББК 28.912

Исследовательская работа поддержана грантом

Российского фонда фундаментальных исследований (03-04-96-473)

© Е.А. Липунова, М.Ю. Скоркина, 2004  
© Белгородский государственный  
университет, 2004

ISBN

Федеральное агенство по образованию  
Государственное образовательное учреждение  
Высшего профессионального образования  
«Белгородский государственный университет»

Е.А. Липунова, М.Ю. Скоркина

**СИСТЕМА КРАСНОЙ КРОВИ**  
(СРАВНИТЕЛЬНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ)

Монография

Белгород 2004

# СОДЕРЖАНИЕ

## Предисловие

### ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА КРОВИ

#### ГЛАВА I ГЕМОПОЭЗ

- 1.1. Теории кроветворения
- 1.2. Эмбриональный гемопоэз
- 1.3. Постэмбриональный гемопоэз
- 1.4. Эритропоэз
- 1.5. Филогенез очагов гемопоэза позвоночных животных

#### ГЛАВА II ЭРИТРОЦИТЫ

- 2.1. Количественные характеристики и морфологические особенности эритроцитов
- 2.2. Функциональные свойства эритроцитов
  - 2.2.1. Структурная организация и функционирование эритроцитарных мембран
  - 2.2.2. Резистентность эритроцитов при экстремальных воздействиях
  - 2.2.3. Метаболизм эритроцита. Метаболизация глюкозы
    - 2.2.3.1. Прямой гликолитический путь
    - 2.2.3.2. Пентозомонофосфатный путь. Метаболизм глутатиона
  - 2.2.4. Газотранспортная функция эритроцитов
    - 2.2.4.1. Дыхательные пигменты.
    - 2.2.4.2. Гетерогенная система гемоглобина.
    - 2.2.4.3. Биосинтез гемоглобина и его деструкция
    - 2.2.4.4. Кислородная емкость крови
    - 2.2.4.5. Транспорт двуокиси углерода
    - 2.2.4.6. Эволюция дыхательной функции крови

#### ГЛАВА III ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ЭРИТРОЦИТОВ. КИНЕТИКА ЭРИТРОНА

- 3.1. Методы изучения продолжительности жизни эритроцитов
- 3.2. Основные понятия клеточной кинетики
- 3.3. Цитокинетика двух эволюционных ростков эритроидного ряда (ядерных и безъядерных форм эритроцитов)

## ГЛАВА IV ЭРИТРОН – ЦЕЛОСТНАЯ ГОМЕОСТАТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА

- 4.1. Основы регуляции кроветворения
- 4.2. Механизмы ауторегуляции эритрона
- 4.3. Эритропоэтин – гуморальный регулятор эритропоэза

## ГЛАВА V СПОСОБЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ ПТИЦ И НИЗШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ

- 5.1. Современные методологические подходы к анализу клеток крови
- 5.2. Способ визуализации форменных элементов крови птиц на одном мазке
- 5.3. Способ определения ретикулоцитов в инкубированной крови птиц
- 5.4. Способ идентификации субпопуляций эритроцитарной системы
- 5.5. Способ оценки активности эритропоэза
- 5.6. Лабораторные тесты исследования системы красной крови

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

«...Живая клетка относится к числу таких систем, для которых целое не просто сумма отдельных компонентов, а нечто большее. Процесс объединения компонентов в одно целое означает их взаимодействие, изменяющее поведение каждого из них.

В химическом отношении такое взаимодействие приводит к тому, что компоненты клетки взаимно модифицируют способность каждого из них вступать в различные реакции, и это играет важнейшую роль в работе регуляторных механизмов. Оно отличает сложное целое от сложной смеси».

(Х. Кребс, 1964)

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Система красной крови – сложнейшая функциональная структура, объединяющая совокупность функционирующих в сосудистом русле эритроцитов, органов их продукции и разрушения вместе с комплексом рецепторов, эффектора и регулятора, обеспечивающих стационарное состояние и настройку ее соответственно с меняющимися потребностями организма [63, 196, 197]. Вопросы регуляции красной крови и сохранения кислородного гомеостаза, объединенные в научную программу «Эритрон», успешно решаются как физиологическими, так и методами математического моделирования. Среди первых перспективен сравнительно-физиологический метод, позволяющий «... понять, как в зависимости от различных условий существования развились отдельные филогенетические линии и как одни и те же функции совершенствовались, развивались или, наоборот, выпали на отдельных филогенетических линиях в результате тех условий, в которых жили эти организмы. Тут встает вопрос о том, как одна и та же функция претерпевает изменения в различных условиях и, с другой стороны, как под влиянием факторов внешней среды первоначально различные функциональные отношения сближаются и приводят к одному и тому же конечному результату. ...Сравнительная физиология из огромного материала, доставляемого зоофизиологией, выбирает только определенные объекты и вопросы, дающие возможность сравнения, сопоставления и выяснения определенных закономерностей» (цит. по: [131], с. 16).

Повышенный интерес исследователей к эритроциту обусловлен его участием в процессах, связанных с поддержанием гомеостаза на уровне целого

организма. Вовлекаясь в патологический процесс, эритроцит изменяет структуру и функцию в зависимости от генеза заболевания.

Проведенные в последнее десятилетие исследования позволяют на системном, молекулярном и клеточно-клеточном уровнях характеризовать клетки красной крови, эритропоэз, регуляцию процессов дифференциации эритроидных клеток-предшественниц и регуляцию кроветворения в физиологически комфортных условиях и при измененных состояниях организма [50, 51, 63, 182, 301]. Глубокая степень проработки поименованных вопросов у человека и млекопитающих животных способствует автоматическому переносу обобщений, выявленных закономерностей и методических подходов к исследованию и анализу полученной информации на систему эритрона птиц и низших позвоночных, что неправомерно в силу экологических, морфофизиологических особенностей и специфики клеточных, системных, и регуляторных механизмов у этих групп животных [47, 94-101, 140, 143, 144]. Кроме того, с использованием промышленных технологий возросшие нагрузки на организм животных/птиц при их выращивании делают актуальными раскрытие механизмов протекания стресс-реакции в различных системах жизнеобеспечения.

Анализ научной литературы позволяет отметить, что в практическом птицеводстве и ветеринарии наиболее часто используются биохимические методы исследования крови. К изучению морфологии и физиологии клеток крови обращаются значительно реже, отсюда недостаточная разработанность методов исследования крови птиц и низших позвоночных. В результате игнорируется важнейшая физиологическая роль клеток (в первую очередь эритроцитов) в функциях крови.

Довольно часто обсуждается информация о якобы несовершенной форме эритроцитов птиц (овалоцитоз). Но насколько правомочно такое утверждение? Установлено, что безъядерные эритроциты высших млекопитающих и человека, деформируясь в микроциркуляторном русле, ориентируются вдоль потока благодаря высокой скорости сдвига, и по мере



увеличения сдвигающего усилия (до 100-150  $\text{с}^{-1}$ ) все большее число красных клеток крови приобретает эллипсоидную форму, располагаясь своей длинной осью вдоль потока. Это приводит к снижению сопротивления движению крови и изменению ее некоторых физико-химических свойств [31], способствующих улучшению гемодинамики, а, следовательно, и кислородтранспортной функции крови.

Изучение свойств клеток красной крови птиц и низших позвоночных может оказаться полезным в изучении дыхательной функции крови, раскрытию свойств гемоглобина, так необходимых для успешной разработки программы «Искусственная кровь», решения проблемы длительного хранения донорской крови, выявления антигенов эритроцитов и т. д.

Книга посвящена характеристике общих вопросов гематологии, современным аспектам морфологии и физиологии системы красной крови и анализу собственных исследований авторов, проведенных на птицах и низших позвоночных. В монографии приводится описание некоторых методов изучения системы красной крови птиц и низших позвоночных животных, разработанных авторами и поддержанных патентами Российской Федерации на изобретение.

## ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА КРОВИ

Кровь – сложная функциональная система, обеспечивающая своевременную доставку кислорода и питательных веществ клеткам тканей и удаление продуктов метаболизма из органов и интерстициальных пространств [29].

Как система, кровь не только саморегулирующаяся структура, но и сложный комплекс компонентов, включающихся в систему и выпадающих из нее по мере «запроса», исходящего из тканей и органов. Уровень функциональной активности системы крови может резко повышаться при отклонениях физиологических функций от оптимального для метаболизма уровня.

В рамках системного подхода, согласно классификации биологических объектов, кровь относится к корпускулярно-нуклеарным системам, отличающимся высокой надежностью функционирования (за счет регенерации однотипных клеток) и реакцией, как единого целого, на возмущающие воздействия. Согласованность действий ее частей «оплачивается» тем, что при поражении центрального элемента (костного мозга) неизменно нарушается вся система. Равновесные динамические системы клеточных популяций предполагают метаболическое взаимодействие их с другими тканями и стоящих над ними регулирующих механизмов [5]. Эффективное управление клеточными популяциями – необходимое условие существования сложного организма.

Функциональная система крови обеспечивает гомеостатический потенциал организма и его способность противостоять экстремальным воздействиям благодаря совершенным механизмам регуляции физиологических функций – генетического консерватизма рецепторов и пластичности исполнительного аппарата [29, 34].

Кровь объединяет работу многих физиологических систем организма, «накапливает» конечные приспособительные «результаты» их деятельности. Таким образом, гомеостаз представляет совокупность различных

физиологических констант внутренней среды, поддерживаемых на определенном для метаболических процессов уровне.

Функциональная система крови представляет собой иерархию подсистем регуляции [22, 29]: качественного и количественного состава клеток крови; биохимического состава плазмы крови; агрегатного состояния крови; газового баланса. Иерархически построенная, кровь как система обладает высокой прочностью по отношению к внешним и внутренним воздействиям.

Система крови тонко реагирует на воздействия факторов среды набором специфических и неспецифических компонентов. Например, гипоксический стресс различной этиологии включает активацию биосинтетических процессов в почках увеличивает продукцию эритропоэтина, простагландинов, стероидных гормонов, серотонина [24], активирующих эритропоэз, что ведет к количественной и качественной перестройке эритрона на всех уровнях его структурной организации [48, 106, 197]. Гомеостатическая регуляция направлена на достижение оптимального уровня константы, максимально отклонившейся от своего среднего значения. Закономерности отклонений гомеостатических констант подчиняются правилам фона (направленность и величина изменения константы зависит от исходных, фоновых значений) и гиперкомпенсации. (новое значение константы, достигнутое вследствие гомеостатирования, не идентично, а превышает фоновое).

Различают два типа гомеостатической регуляции: регуляция по отклонению, если фактор действует на систему впервые, и опережающая гомеостатическая регуляция, возникающая при повторных воздействиях фактора, и запоминание системой его параметров. На субклеточном и клеточном уровнях преобладает регуляция по отклонению. Таким путем регулируются внутриклеточный рН, осмотическое давление и объем клетки, эндо- и экзоцитоз, состояние ионных каналов. На системном уровне оба типа регуляции равноправны; на организменном – преобладает опережающая регуляция [165].

Понятие «система крови» впервые ввел Г.Ф. Ланг (1939), включив в нее кроветворные органы, системы циркуляции, кроверазрушения и регуляции. В 1953 г. Castle и Minot ввели термин «эритрон», под которым понимали всю массу эритроидных клеток организма, включая ядерные костномозговые формы, ретикулоциты и зрелые эритроциты. По определению современной функциональной гематологии «эритрон» объединяет совокупность функционирующих в сосудистом русле эритроцитов, органов их продукции и распада с комплексом рецепторов и эффекторов, обеспечивающих стационарное состояние этой системы и ее подстройку к потребностям организма в изменяющихся условиях [196, 197], а также процессы эритрокинетики и количественные характеристики (объем эритрона) [22, 34].

Shumacher и Erslev (1965) в соответствии с функциональными потребностями организма выделили в костном мозге пул делящихся клеток (пронормобласты, базофильные и частично полихроматофильные нормобласты) и пул созревающих (дифференцирующихся) клеток, включающий часть полихроматофильных нормобластов, оксифильные нормоциты и костномозговые ретикулоциты. Циркулирующие в крови клетки объединены в функционирующий пул [232].

Пулами называют совокупность клеток, находящихся в разных фазах жизненного цикла. В настоящее время в соответствии с потребностями организма в костном мозге различают:

- пул стволовых клеток. Включает популяцию стволовых кроветворных клеток, дифференцирующихся в направлении лейкоцита, эритроцита и мегакариоцита, способных поддерживать численность собственной популяции;
- пролиферирующий пул. Объединяет стволовые клетки, вступившие в стадию дифференцировки. В отличие от первого, клетки этого пула способны к ограниченному числу митозов. Основная функция клеток – усиление клеточной продукции стволовых клеток;
- пул созревания и хранения. Его формируют клетки, утратившие способность к делению и последовательно проходящие в костном мозге

дальнейшие стадии дифференцировки – от нормобласта до эритроцита (они составляют костномозговой резерв);

– функционирующий пул. Его образуют дифференцированные форменные элементы, вышедшие в кровоток [194].

Принципиально важно разделение клеток на синтезирующие и не синтезирующие гемоглобин. Синтез гемоглобина завершается на стадии ретикулоцита. Структурная организация клеток на разных этапах дифференцировки обуславливается их функциональными особенностями [116].

Таким образом, происходящие в кроветворной ткани процессы на различных этапах эритропоэза однонаправленны, необратимы и обеспечивают образование специализированных клеток крови.

Установлено, что в норме эритроциты не представляют собой однородную массу клеток, выявляемую при микроскопировании мазка или препарата нативных эритроцитов, а образуют систему, в которой закономерно сочетаются клетки различных возрастов, морфологии и функционального состояния. Качественные отличия между отдельными эритроцитами обнаруживаются, например, при определении их стойкости к гемолитикам различной природы методом дисперсионного анализа и др. [34].

Важная характеристика физиологии и патологии системы крови – количественный и качественный состав эритроцитарной популяции, одного из наиболее важных звеньев эритрона.

Система красной крови организма – один из примеров равновесных биологических систем. При нарушении динамического равновесия изменяются не только количественные показатели, но и качественные – происходят изменения в распределении клеток по диаметрам, физико-химическим свойствам, биохимическому составу [105, 106]. Следовательно, качественный состав популяции эритроцитов в сосудистом русле – регулируемый признак эритрона.

## ГЛАВА 1. ГЕМОПОЭЗ

Клетки крови представляют собой разнородную цитологическую систему, состоящую из элементов, различающихся между собой в функционально-кинетическом аспекте. Первые попытки изучения гистогенеза форменных элементов методом визуального анализа были сделаны А.А. Максимовым [271, 272]. Результаты его работ легли в основу современных представлений о кроветворении.

### 1.1. Теории кроветворения

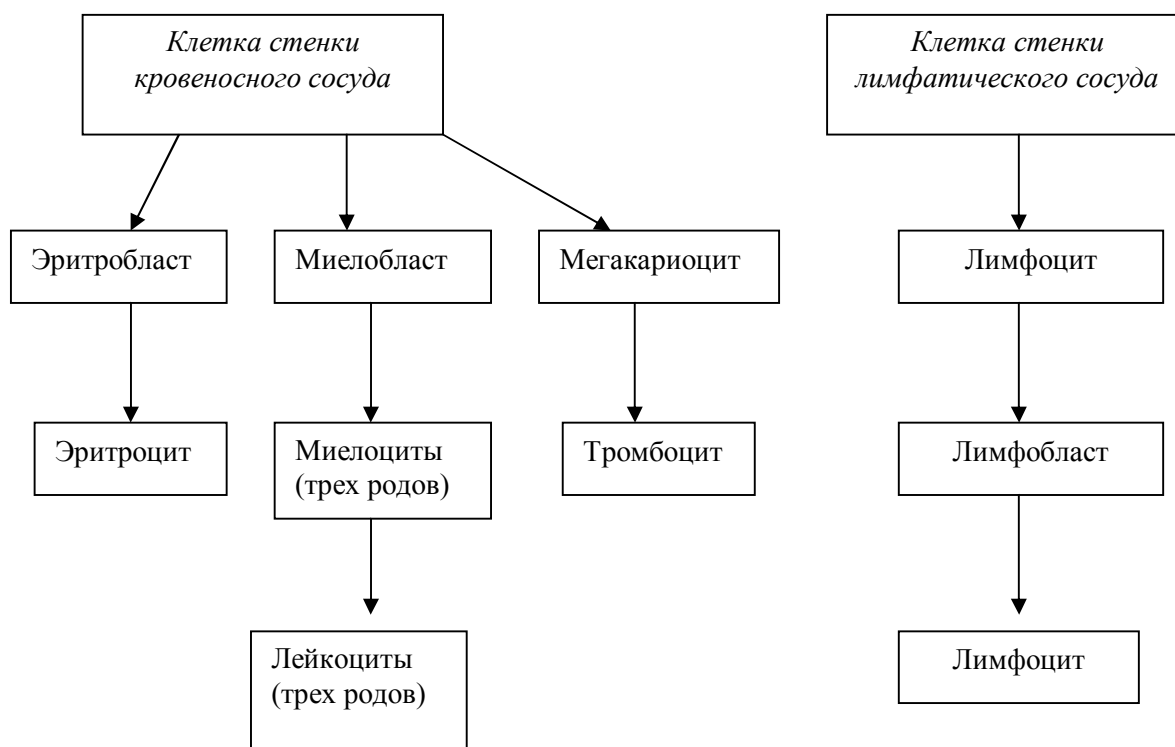
Изучение соединительной ткани и крови резко продвинулось вперед после того, как для их исследования был применен экспериментальный метод [43], дополнивший клинический. В основе экспериментального метода лежит изучение воспалительной и некоторых других реакций соединительной ткани и крови в ответ на действие различных экзо- и эндогенных факторов. В последнее время в гематологии широкое применение нашел метод тканевых культур.

Клеточный состав крови наряду с ее биохимической характеристикой нашел широкое применение в медицинской практике. В диагностических целях клиническое изучение морфологии крови ограничивается исследованиями картин крови и костного мозга при различных физиологических и патологических состояниях организма.

Важной вехой в развитии гематологии стал метод окраски клеток, предложенный Романовским. Этот метод позволил определять последовательность различных стадий кроветворения на основании морфологических характеристик, однако не обеспечивает возможности проведения идентификации молодых клеточных элементов костного мозга, а также определения последовательности развития и тем более функциональной направленности этих клеток. Это привело к различному трактованию ранних стадий клеточной дифференцировки и послужило основанием для возникновения теорий кроветворения: полифилетической, дуалистической и унитарной [18].

Первой теорией, отражающей взаимоотношения элементов крови, была полифилетическая, сформулированная в 1891 году П. Эрлихом. Согласно этой теории, кровяные клетки имеют во взрослом организме родоначальные формы, не способные переходить одна в другую, как и кровяные клетки сосудистого русла [43]. Веским аргументом в пользу полифилетической теории кроветворения служит наличие трех видов лейкоемий – миелоидной, лимфоидной и моноцитарной.

Из полифилетических воззрений П. Эрлиха в современной гематологии сложились различные дуалистические представления, в основе которых лежит абсолютная разграниченность лимфоидного и миелоидного кроветворения. Согласно Шриdde (1923) (рис.1), родоначальные клетки миелоидных и лимфоидных элементов отличаются друг от друга своим происхождением.



**Рис. 1.** Схема дуалистического кроветворения (цит. по: [18]).

Клетки миелоидного ряда происходят от эндотелия кровеносных, а лимфоидные элементы – эндотелия лимфатических сосудов [43]. Однако обособление миелоидной и лимфоидной ветвей кроветворения носит

гипотетический характер, т. к. принципиальной разницы между эндотелием кровеносных и лимфатических сосудов не установлено. Дуалистическая и полифилетическая теории кроветворения имеют общее положение: лимфоидные и миелоидные системы обособлены.

Унитарная теория кроветворения была сформулирована А.А. Максимовым [274] на основании работ по восполнительному новообразованию соединительной ткани, эмбриональному и постэмбриональному гемопоэзу. По мнению ученого, «...теории кроветворения должны отражать не только генетические взаимоотношения клеточных элементов в тканевой системе, но и взаимовлияния клеток элементов в тканевой системе внутренней среды организма в целом» [цит. по:43, с. 563].

Основные положения теории:

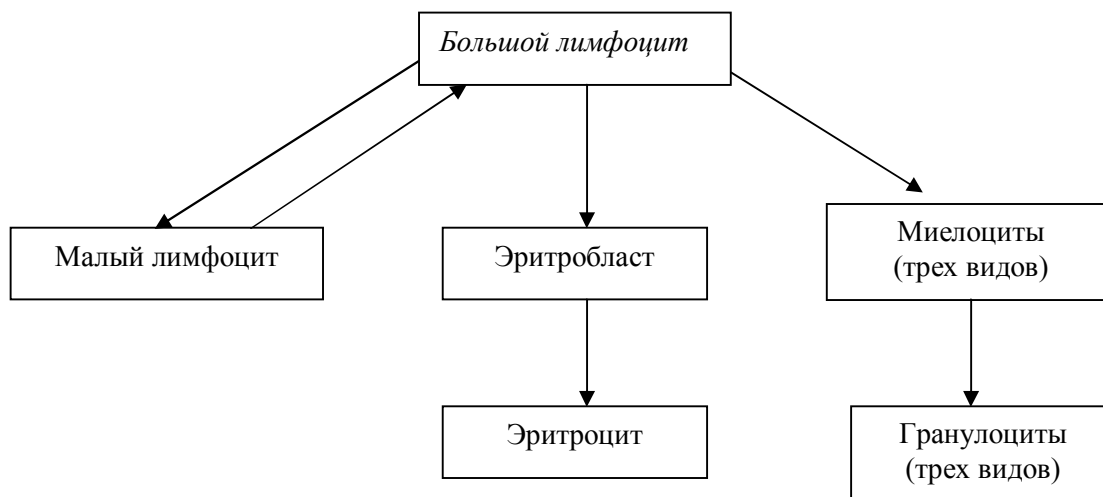
- лимфоидные элементы в организме равнозначны, несмотря на их полиморфизм;
- малый лимфоцит – индифферентная форма, способная к всевозможным специальным превращениям в любой кровяной элемент;
- родоначальницей всех специализированных кровяных клеток является полиморфная лимфоидная форма;
- реализация потенциальных возможностей развития лимфоцитов определяется окружающими условиями. Результаты развития могут быть разнообразны.

Впоследствии унитарная теория кроветворения была дополнена с позиции нового учения о мононуклеарной фагоцитарной системе (рис.2).

Значительным достижением в развитии современных представлений по теории кроветворения стали исследования, в которых были разработаны методы клонального анализа кроветворных клеток в селезенке смертельно облученных животных [275]. Они позволили изучить кинетику клеток крови и выявить их свойства на разных уровнях кроветворения, поведение под влиянием различных факторов, характер пролиферации и дифференцировок. Было установлено, что через 7-10 дней после введения облученным мышам костного мозга здоровых животных в селезенке образуются колонии



кроветворных клеток, относящихся к эритро-, грануло-, мегакариоцитарным. С помощью метода хромосомной метки было показано, что все образующиеся колонии имеют донорское происхождение. При введении клеток любой из колоний того или иного типа вторичного реципиента образуются колонии с тем же распределением вне зависимости от того, какой тип колонии был использован для переноса. Это доказывает, что все миелоидные клетки – производные колониеобразующей единицы селезенки (КОЕ-с) [201].



**Рис. 2.** Схема унитарной теории [263].

Эти результаты свидетельствуют о наличии в костном мозге полипотентных клеток, способных при определенных условиях дифференцироваться в любом направлении гемопоэза. Клетки эти были названы колониеобразующими, или родоначальными.

В 1967 г. впервые из среды родоначальных клеток был выделен отдел стволовых и унипотентных клеток-предшественников (Barnes, Goutit, 1967). В дальнейшем Д. Меткалф и М. Мур (Metcalf, Moor, 1971), несколько позднее И. А. Чертков и А. И. Воробьев (1973) и независимо от них Г. Астальди и Г. Лизивец (Astaldi, Lisiewicz, 1971) создали более совершенные и практически однотипные схемы кроветворения [цит. по: 18, с. 49].

В современной гематологии сформировалось представление о том, что единой кроветворной клеткой гемопоэза является гемопоэтическая стволовая клетка (ГСК), обладающая способностью к самоподдержанию и обновлению, дифференциации в различные клеточные популяции и быстрой пролиферации

[200-202]. Подтверждение высокой частоты обновления клеток крови способствовало созданию теории стволовых клеток, обеспечивающих гемопоэз. Установлен стохастический характер дифференцировки ГСК, т. е. полная независимость их дифференцировки от запроса [231].

В процессе гемопоэтической дифференциации из плюрипотентных ГСК образуются высокоспециализированные клеточные линии: миелоидная – в костном мозге и лимфоидная – в лимфоидных органах. Клетки миелоидной линии дифференцируют на эритроидные, гранулоцитарные и мегакариоцитарные, а клетки лимфоидной линии – на Т- и В-лимфоциты. В организме число ГСК находится под строгим регулирующим контролем.

Современная схема гемопоэза была предложена в 1975 г. И. А. Чертковым и А. И. Воробьевым [27, 202]. В ней все клетки в зависимости от степени дифференцировки объединены в 6 классов:

I – класс полипотентных клеток-предшественников, включает стволовые кроветворные клетки;

II – класс частично детерминированных полипотентных клеток-предшественников. Его существование выявляется опосредованно. Например, в пострadiационный период восстановления крови при облучении в пределах (500-600 рад) наблюдается временный подъем количества эритроцитов и гранулоцитов (но не лимфоцитов). Основная масса клеток находится в костном мозге, но не исключается возможность их перемещения из одних участков кроветворной системы в другие. Содержание клеток в крови незначительное;

III – класс унипотентных клеток-предшественников, способных к ограниченному самоподдержанию (могут существовать в течение 10-15 митозов, затем погибают). Класс формируют клетки-предшественники родоначальных клеток отдельных рядов кроветворения: а) эритропоэтин-чувствительная клетка; б) колониеобразующая в культуре клеток (клетки, дающие начало гранулоцитам и макрофагам); в) тромбоцитопоэтин-чувствительная клетка; г) клетки-предшественники Т- и В-лимфоцитов. Клетки-предшественники всех уровней морфологически не идентифицируются,

их характерная особенность – способность находиться в двух морфологически различных формах – бластной и лимфоцитоподобной;

IV – класс морфологически распознаваемых пролиферирующих клеток. Представлен бластными формами, дающими начало отдельным рядам кроветворения – гранулоцитам, эритроцитам, моноцитам, мегакариоцитам и лимфоцитам. При окраске по Романовскому-Гимзе ядра клеток имеют красно-фиолетовый цвет, нежно-сетчатую структуру, несколько хорошо очерченных ядрышек и ободок цитоплазмы с окраской от светло-голубой до интенсивно базофильной. Форма ядра бластных клеток, как правило, круглая, реже овальная или овально-вытянутая. Ядро расположено в центре клетки или несколько смещено к одному из полюсов. Характерная особенность клеток – преобладание площади ядра над площадью цитоплазмы;

V – класс созревающих клеток;

VI – класс зрелых клеток с ограниченным жизненным циклом.

**Модель гемопоэза стволовых клеток.** Для современного этапа развития клеточной биологии характерен возросший интерес к изучению стволовых клеток, с участием которых осуществляются восстановительные процессы в организме: естественное восстановление, восстановление при патологических состояниях или средовых воздействиях. Исследования в этой области проводятся в двух направлениях – а) изучение стволовых клеток взрослого организма в плане становления их роли в дифференцировке и восстановительных процессах и б) изучение эмбриональных стволовых клеток [129].

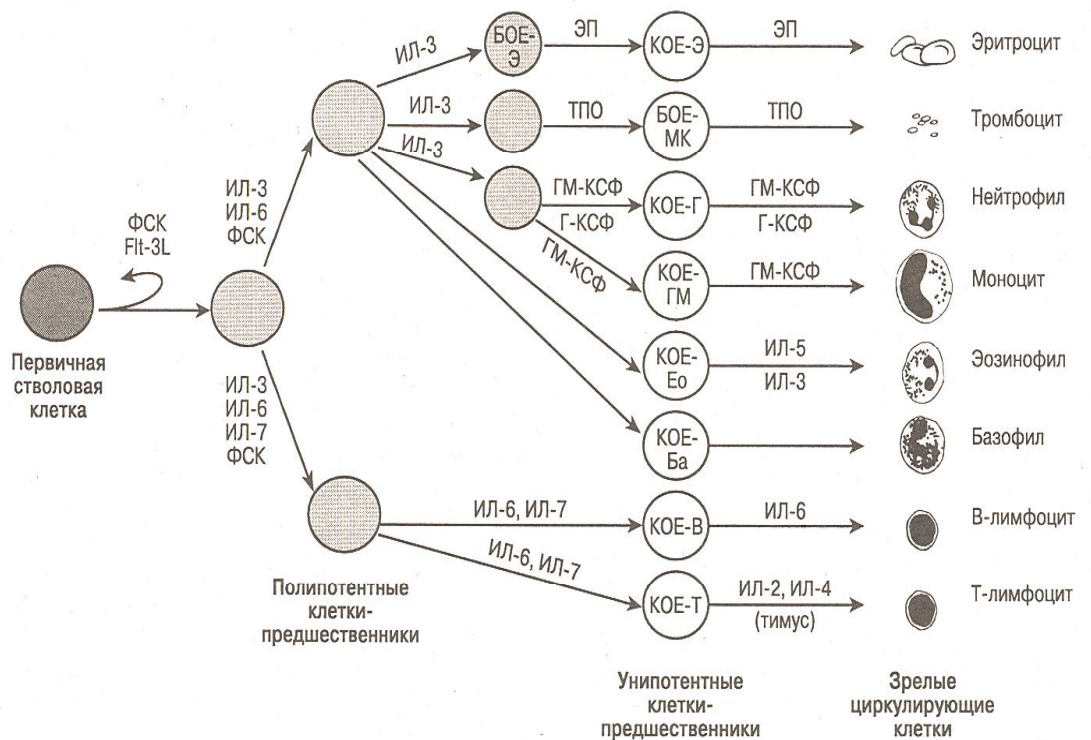
В настоящее время стволовые клетки определены функционально, а не морфологически. Впервые представление о родоначальных клетках крови сформулировал в начале XX в. А. А. Максимов, который считал, что по своей морфологии они сходны с лимфоцитами [271, 272]. Это представление нашло подтверждение и развитие в новейших экспериментальных исследованиях.

Выявление ГСК стало возможным при применении метода колониеобразования. В отношении морфологического строения ГСК показано,

что они подобны малому лимфоциту. Установлено, что стволовые клетки, обнаруженные в костном мозге человека, обезьяны, мыши, курицы, морфологически идентичны [18, 44].

Популяция ГСК рассматривается как полипотентная клеточная система, дифференцирующаяся в различные функциональные клеточные популяции, способная к самообновлению и самоподдержанию. Общее число ГСК сохраняется на постоянном уровне, который контролируется в организме и ограничивается размерами стромальной ткани. Способность к самообновлению является ключевой в концепции стволовой клетки [201, 295].

В настоящее время наибольшее признание получили две теории, объясняющие механизм самообновления. Согласно первой – деление стволовой клетки асимметрично: из двух производных стволовой клетки одна – недифференцированная, другая – дифференцируется с образованием зрелых клеток крови. В соответствии со второй теорией стволовая клетка при каждом делении производит или две новые стволовые клетки, или две более зрелые. Пул стволовых клеток, таким образом, поддерживается равновесием между числом делений, увеличивающих количество стволовых клеток, и делений, связанных с появлением более зрелых клеток. Эти теории легли в основу иерархической модели гемопоэза (рис.3) [210].



**Рис. 3. Иерархическая модель гемопоэза, включающая важнейшие цитокины [210]**

*Примечание. Здесь и далее: ИЛ-2 – интерлейкин-2, ИЛ-3 – интерлейкин-3, ИЛ-5 – интерлейкин-5, ИЛ-6 – интерлейкин-6, ИЛ-7 – интерлейкин-7, ФСК (Flt-3L) – фактор стволовых клеток, БОЕ-Э – бурстобразующая единица, эритроцитарная, БОЕ-МК – бурстобразующая единица, мегакариоцитарная, КОЕ-Э – колониеобразующая единица, эритроцитарная, КОЕ-Г – колониеобразующая единица, гранулоцитарная, КОЕ-ГМ – колониеобразующая единица, гранулоцитарная-моноцитарная, КОЕ-Ео – колониеобразующая единица, эозинофильная, КОЕ-Ба – колониеобразующая единица, базофильная, КОЕ-В – колониеобразующая единица, В-клеточная, КОЕ-Т – колониеобразующая единица, Т-клеточная. ЭП – эритропоэтин, ТПО – тромбопоэтин, ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, Г-КСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор.*

При дифференцировке ГСК выделяют две линии. Одна дает начало мультипотентной клетке – родоначальнице гранулоцитарного, эритроцитарного, моноцитарного и мегакариоцитарного рядов гемопоэза (КОЕ-ГЭММ); вторая – мультипотентной клетке – родоначальнице лимфопоэза (КОЕ-Л) [301].

Из мультипотентных клеток дифференцируются олигопотентные (КОЕ-ГМ) и унипотентные родоначальные клетки. Методом колониеобразования определены родоначальные унипотентные клетки для моноцитов (КОЕ-М), нейтрофильных гранулоцитов (КОЕ-Г), эозинофилов (КОЕ-Эо), базофилов (КОЕ-Б), эритроцитов (БОЕ-Э и КОЕ-Э), мегакариоцитов (КОЕ-МГЦ), из которых образуются клетки-предшественницы. В лимфатическом ряду выделяют унипотентные клетки-предшественницы для В- и Т-лимфоцитов. Дифференцировка полипотентных клеток в унипотентные обусловливается действием ряда специфических факторов – эритропоэтинов (для эритроцитов), гранулопоэтинов (для миелобластов), лимфопоэтинов (для лимфобластов), тромбопоэтинов (для мегакариобластов).

### *1.2. Эмбриональный гемопоэз*

Различают эмбриональный гемопоэз, который происходит в эмбриональный период и приводит к развитию крови как ткани, и постэмбриональный гемопоэз, который представляет собой процесс физиологической регенерации крови. Наиболее полно гемопоэз изучен у млекопитающих и птиц.

У млекопитающих в развитии крови как ткани в эмбриональный период выделяют 3 основных этапа, последовательно сменяющих друг друга: 1) мезобластический – развитие клеток крови во внезародышевых органах (мезенхиме стенки желточного мешка, хориона и стебля) протекает с 3 по 9 неделю развития зародыша человека, при этом появляется первая генерация ГСК; 2) печеночный – начинается с 5 – 6-й недели развития плода, основным органом гемопоэза становится печень, в ней образуется вторая генерация ГСК. Кроветворение достигает максимума через 5 месяцев и завершается перед рождением. ГСК заселяют тимус (с 7 – 8-й недели выявляются Т-лимфоциты), селезенку (с 12-й недели) и лимфатические узлы (с 10 – 12й недели); 3) медулярный (костномозговой) – появляется третья генерация ГСК в костном мозге, где гемопоэз начинается с 10-й недели и нарастает к рождению. После рождения костный мозг становится центральным органом гемопоэза [33].

*Кроветворение в стенке желточного мешка.* Первые этапы кроветворения происходят в желточном мешке, где найдены недифференцированные клетки – мезобласты, которые мигрируют в него из первичной полоски. Мезобласты обладают высокой митотической активностью и дифференцируются в клетки – первичные эритробласты. В течение нескольких часов после миграции происходят деление и дифференцировка мезобластов желточного мешка до первичных эритроцитов. Большинство этих клеток – ядродержащие, но некоторые из них не содержат ядер [210]. Другие мезобласты дифференцируются в клетки гемоцитобласты. Для эмбрионов кролика известна вторая стадия гемопоза в желточном мешке, в ходе которой гемоцитобласты дифференцируются в эритробласты, которые становятся окончательными или вторичными нормобластами, которые теряют ядра и превращаются в нормоциты. В кровяных островках формируются сосудистые каналы, создаются первичные эритробласты и гемоцитобласты, а на более поздних этапах – зрелые эритробласты и эритроциты [299, 301]. Развитие эритроцитов в стенке желточного мешка происходит внутри первичных кровеносных сосудов – интраваскулярно. Одновременно экстраваскулярно из бластов, расположенных вокруг сосудистых стенок, дифференцируется небольшое количество гранулоцитов – нейтрофилов и эозинофилов. Часть ГСК остается в недифференцированном состоянии и разносится током крови по различным органам зародыша, где происходит их дальнейшая дифференцировка в клетки крови или соединительной ткани.

*Кроветворение в печени.* Печень у млекопитающих закладывается на 3 – 4-й неделе эмбриональной жизни и с 5-й недели становится центром кроветворения, которое происходит экстраваскулярно – по ходу капилляров, растающих вместе с мезенхимой внутрь печеночных долек. Источником кроветворения служат ГСК, из которых образуются бласты, дифференцирующиеся во вторичные эритроциты. Одновременно с развитием эритроцитов в печени образуются зернистые лейкоциты – нейтрофилы и эозинофилы. Кроме гранулоцитов формируются гигантские клетки –

мегакариоциты. К концу внутриутробного периода кроветворение в печени прекращается [44].

*Кроветворение в тимусе.* Тимус закладывается в конце первого месяца внутриутробного развития, и на 7 – 8-й неделе его эпителий начинает заселяться ГСК, которые дифференцируются в Т-лимфоциты [190].

*Кроветворение в селезенке.* Закладка селезенки происходит в конце первого месяца эмбриогенеза. Из ГСК экстравакулярно образуются все клетки крови. Образование эритроцитов и гранулоцитов достигает максимума на пятом месяце эмбриогенеза [210].

*Кроветворение в лимфатических узлах.* Большинство лимфатических узлов закладывается на 9 – 10-й неделе; в них проникают ГСК, из которых на ранних стадиях дифференцируются эритроциты, гранулоциты и мегакариоциты. Формирование этих элементов быстро подавляется образованием лимфоцитов. Массовое «заселение» лимфатических узлов предшественниками Т- и В-лимфоцитов начинается с 16-й недели, когда образуются посткапиллярные венулы, через стенку которых осуществляется процесс миграции клеток. Из клеток-предшественников дифференцируются лимфобласты (большие лимфоциты), а затем средние и малые лимфоциты. Дифференцировка Т- и В-лимфоцитов происходит в Т- и В-зависимых зонах лимфатических узлов [44, 210].

*Кроветворение в костном мозге.* Закладка костного мозга осуществляется на втором месяце эмбрионального развития. Первые ГСК появляются на 12-й неделе развития; в это время основную их массу составляют эритробласты и гранулоциты. Из ГСК в костном мозге формируются все клетки крови, развитие которых происходит экстравакулярно. Часть ГСК остается в недифференцированном состоянии: они могут расселиться по другим органам и тканям и стать источником развития клеток крови и соединительной ткани. Таким образом, костный мозг становится центральным органом, осуществляющим универсальный гемопоэз, и остается им течение постнатальной жизни [18, 43, 191]. Эмбриональный



костный мозг отличается от центров более раннего развития гемопоэза активным образованием миелоидных клеток и доминированием этого процесса в гемопоэзе. Миелопоэз начинается в центральной части костномозговой полости и распространяется оттуда по всей полости кости. Эритропоэз в эмбриональном костном мозге развивается позже, чем в органах, рассмотренных ранее, и «смешивается» с процессом миелопоэза. [210].

*Эмбриональное кроветворение у птиц.* У птиц в различные этапы эмбриогенеза наблюдается перемещение очагов гемопоэза. В эмбриональном периоде они локализованы в селезенке, фабрициевой сумке (бурсе) и стенке кишечника. Печень в развитии эмбрионального кроветворения у птиц существенной роли не играет. В ней происходит незначительное образование экстравакулярных гемоцитобластов из эндотелия, которые дают начало эритробластам и миелоцитам. В мезенхиме закладки селезенки образуются гемоцитобласты, которые дают начало интраваскулярному и экстравакулярному гранулопоэзу. После закладки костного мозга мезенхима дифференцируется аналогично, только лимфоциты развиваются в меньшем количестве [18, 43]. В период вылупления (птенца) основными очагами гемопоэза становятся печень, селезенка и костный мозг [18, 86].

Костный мозг, как кроветворный орган, начинает функционировать с 14-го дня у куриного эмбриона и с 15-го – у утиного [23]. В развитии и формировании костного мозга птиц выделяют три основные стадии: остеобластическую, красного и желтого костного мозга. Последовательность перехода одной стадии костного мозга в другую у различных видов птиц осуществляется в разные сроки. Первоначально образуется остеобластический (первичный) костный мозг со слабо развитой сосудистой системой; как кроветворный орган структура не функционирует. В дальнейшем происходят образование и дифференцировка ретикулярной стромы, разрастание кровеносных сосудов и появление первых органов кроветворения. Их функционирование совпадает во времени с периодом повышенной потребности эмбриона в кислороде и питательных веществах. Одновременно происходит

перестройка сосудистой системы аллантоиса, капиллярная сеть которого начинает непосредственно соприкасаться с подскорлуповой оболочкой.

Перед вылуплением канал эмбриона целиком заполнен красным костным мозгом, в центре которого начинают появляться жировые клетки. В просвете синусов обнаруживаются развивающиеся эритробласты. Из гранулоцитов преобладают псевдоэозинофильные миелоциты. Красный костный мозг диафизов костей отдельными тяжами врастает в эпифизарные участки.

Закладка и формирование костного мозга во всех костях конечностей эмбриона идет одновременно, но более интенсивно в проксимальных концах предплечья и голени. Различия в развитии костного мозга у утенка и цыпленка прослеживаются в последний период эмбрионального развития; у утенка в центре костномозгового канала передних конечностей происходит разрастание жировой ткани, у цыпленка этого явления не наблюдается. Миелоидная ткань расположена преимущественно по периферии мозгового канала, и только незначительное количество ее элементов сосредоточено между жировыми клетками.

Первым в крови эмбрионов птиц созревают эритроциты; на 3-е сут инкубации обнаруживаются тромбоциты и лейкоциты (в виде малодифференцированных клеток лимфоидного ряда); гранулоциты (псевдоэозинофилы) в крови эмбрионов выявляются на 6-е сут инкубации [18].

С первых часов развития эмбриона в яйце птиц формируется густая сеть кровеносных сосудов и начинается интенсивный процесс кроветворения, который протекает вначале во внезародышевых органах эмбриона (желточном мешке и аллантоисе), затем и в теле зародыша (сосудистое, печеночное, костномозговое кроветворение и кроветворение в мезенхиме зародыша) [46].

Исследованиями Г. Ф. Задарновской [46] установлен ряд общих закономерностей в эмбриональном кроветворении у птиц:

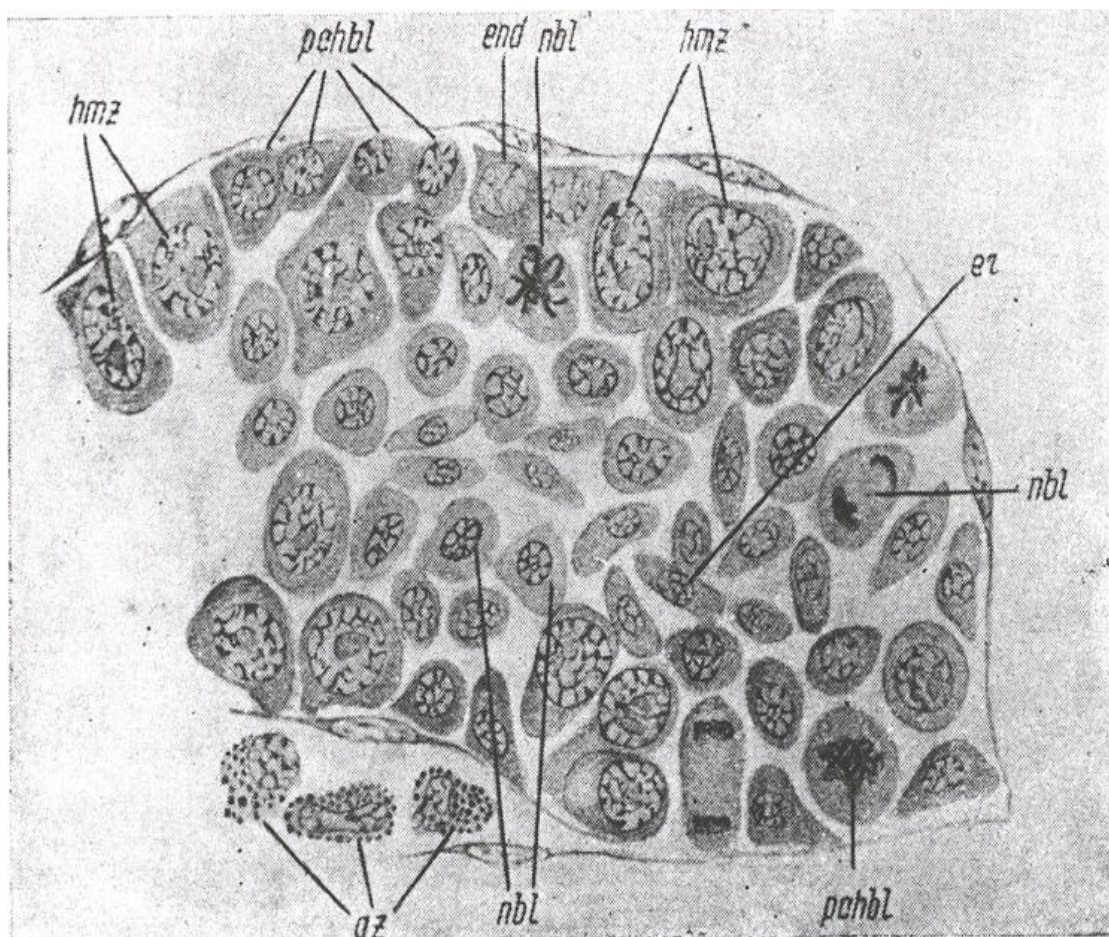
а) постепенное увеличение количества эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина в крови эмбриона по мере роста и развития;

б) снижение этих показателей в критические периоды инкубации: (8, 11 и 16 – 18-е сут для кур; 8, 10, 18, 20 и 23 – 24-е – для эмбрионов уток; 7, 11, 14, 16, 18, 21 и 23 – 25-е – для гусиных эмбрионов; 8, 11, 12, 16, 19, 21 и 23-е – для индеек; 9, 10, 13, 16, 18 и 21-е сут – для эмбрионов цесарок);

в) высокая напряженность эритропоэза на ранних стадиях инкубации и лейкопоэза – на более поздних;

г) обратная зависимость между динамикой регенерации красной и белой крови на всех этапах онтогенеза.

На более поздних стадиях (10 – 15 сут насиживания/инкубации) процесс желточного эритропоэза достигает максимального развития, причем образуются только вторичные эритробласты. При этом гемоцитобласты и полихроматофильные эритробласты располагаются всегда в пристеночном положении, а эритроциты занимают центральное положение [43]. В окружающие сосуды мезенхимы желточного мешка также образуются гемоцитобласты (рис. 4). Они дают начало миелоцитам, которые могут проникать через эндотелий в полость сосудов [229].



**Рис. 4. Венозный капилляр из стенки желточного мешка 11-дневного зародыша цыпленка [229]:** *end* – эндотелий; *er* – эритроциты; *gz* – экстраваскулярный гранулоцит; *hms* – гемоцитобласты; *nbl* – нормобласты; *pchbl* – полихроматофильные эритробласты.

В мезенхиме тела зародыша на 4 – 5-е сут инкубации/насиживания образуются гистоидные и лимфоидные элементы. Из лимфоидных блуждающих клеток (гемоцитобластов) в некоторых участках головы и около вентральной стенки аорты образуются небольшие экстраваскулярные островки из эритробластов или миелоцитов. Некоторые из островков окружаются эндотелиальной стенкой и включаются в сосудистое русло [230].

В опытах на химерах перепелиного эмбриона и желточного мешка цыпленка показаны различные внутриэмбриональные пути дифференцировки ГСК у птиц. Экспериментально подтверждена конвергенция ГСК из желточного мешка в область аорты [243].

*Кроветворение у амфибий.* Эмбриональное развитие крови у амфибий изучено недостаточно. Основные работы в этом направлении выполнены

H. Mietens (1909, 1910), H. Doms (1916), R. Lillie (1919), A. Maximow (1910, 1927). Установлено, что у хвостатых и бесхвостых первые стадии развития протекают однозначно. Из мезенхимы желточного мешка в кровяное русло попадают первичные кровяные клетки округлой формы, заполненные желтком и содержащие пигмент. В дальнейшем большая часть этих клеток, теряя желток, превращается в первичные эритробласты, содержащие гемоглобин. Часть кровяных клеток не накапливает гемоглобин, протоплазма их базофильна, и они превращаются в первичные гемоцитобласты. Одновременно в мезенхиме головы образуются блуждающие клетки – лимфоцитоподобные. Они различны по величине, имеют складчатое ядро и светлую цитоплазму. Клетки проникают в кровяное русло и превращаются в гранулоциты.

Затем у бесхвостых амфибий начинается усиленное образование гемоцитобластов во всех мезенхимных участках тела, особенно в области зубной железы, глотки, жаберной области, в интерстициальной ткани предпочки и первичной почки и в окружности мезентериальной артерии. Во всех этих очагах образуются малые лимфоциты и лейкоциты. В селезенке эритропоэз не выявлен. К моменту метаморфоза первичные эритроциты замещаются на вторичные в кровяном русле, здесь же из малых лимфоцитов развиваются тромбоциты. Затем эритропоэз на некоторое время сосредоточивается в сосудах печени, откуда переходит в сосуды костного мозга, где экстравакулярно сосредоточена и лимфо-миелоидная ткань [43, 44, 273, 274].

У хвостатых амфибий кроветворение отличается тем, что в период развития гемоцитобластов мезенхима предпочки и почки не участвует в гемопоэзе, а весь процесс эритропоэза сосредоточивается в селезенке; в печени субперитонеально развивается лимфо-миелоидная ткань [44].

### 1.3. Постэмбриональный гемопоэз

Постэмбриональный гемопоэз представляет собой процесс физиологической регенерации крови (клеточное обновление), который компенсирует физиологическое разрушение дифференцированных клеток.

Миелопоэз у млекопитающих происходит в миелоидной ткани, расположенной в эпифизах трубчатых и полостях многих губчатых костей. Здесь развиваются форменные элементы крови: эритроциты, гранулоциты, моноциты, кровяные пластинки, предшественники лимфоцитов. В миелоидной ткани находятся стволовые клетки крови и соединительной ткани [33, 44].

Лимфопоэз протекает в лимфоидной ткани, которая имеет несколько разновидностей, представленных в тимусе, селезенке и лимфатических узлах. Лимфоидная ткань выполняет функции образования Т- и В-лимфоцитов и иммуноцитов (плазмоцитов) [190].

Миелоидная и лимфоидная ткани – разновидности соединительной ткани. В них представлены две основные клеточные линии: гемопоэтические и клетки ретикулярной ткани.

Ретикулярные, а также жировые, тучные и остеогенные клетки вместе с матриксом (межклеточным веществом) формируют для гемопоэтических элементов микроокружение, оказывающее воздействие на дифференцировку гемопоэтических клеток. Гемопоэтическое микроокружение относится к стромальным элементам органов, в которых происходит гемопоэз, его формируют клеточные и внеклеточные элементы, образующие структурный матрикс, где стволовые клетки и их потомки пролиферируют и дифференцируются по перемещению в кровотоку [48, 210].

Структурный матрикс (стромальные клетки) – это гетерогенная группа клеток, состоящая из фибробластов, эндотелиальных клеток, остеобластов и адипоцитов, располагающихся в костномозговой полости. Гемопоэтические клетки нуждаются в растворимых гемопоэтических факторах роста (ГФР) и мембраносвязанных молекулах присоединения.

ГФР (колониестимулирующие факторы – КСФ) представляют собой класс гликопротеиновых гормонов, которые необходимы для деления и дифференцировки ГСК. К ним относятся интерлейкин-6 (ИЛ-6); гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), фактор стволовых клеток (ФСК) и Flt-3 ([Flt-3L] – лиганд). Они непрерывно продуцируются стромальными клетками костного мозга, тем самым стимулируя гемопоэз [210].

По современным представлениям, в регуляции активности кроветворных клеток участвуют 6 семейств рецепторов цитокинов. Большая их часть относится к I типу рецепторов и включает рецепторы лейкемию ингибирующий фактор (ЛИФ), ИЛ-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -9, -13 и -18; ГМ-КСФ (гранулоцитарно-макрофагальный фактор); Г-КСФ (гранулоцитарный фактор), эритропоэтина, пролактина, цилиарного нейротрофного фактора и тромбопоэтина (c-mpl). В плазме крови рецепторы I типа представлены растворимыми формами. К цитокинам, оказывающим тормозящее влияние на гемопоэз, относят трансформирующий рост фактор  $\beta$  (ТРФ- $\beta$ ), фактор некроза опухолей (ФНО), хемокины ИЛ-8 и *mir-1a* [51].

Установлено, что сочетание фактора Стила (SF), ИЛ-6 и ИЛ-3 является особенно сильным пусковым механизмом для дифференцировки ГСК в направлении коммитированных предшественников [268]. Относительно гормональной природы этих факторов идут дискуссии [123, 261, 301]. Полагают, что факторы микроокружения индуцируют поэтапную экспрессию генов, ответственных за гемопоэз, а также присоединение антигенных структур, осуществляющих обмен генетическим материалом с формированием рекомбинантных генотипов [29, 123, 284].

Цитоплазма ГСК обеспечивает передачу информации от микроокружения в геном. Установлено, что Т-лимфоциты определяют направление дифференцировки КОЕ, стимулируя образование элементов красного ростка, причем регулирующей способностью обладают только живые относительно кортизон- и радиорезистентные Т-лимфоциты [37].

Таким образом, в кроветворной системе млекопитающих осуществляются локальные регулирующие взаимодействия между кроветворными клетками и их микроокружением. Более того, структуры, ответственные за специфичность микроокружения, содержатся в самих кроветворных органах.

Присутствие ГФР и механизм их влияния на гематологические клетки у других представителей позвоночных изучен недостаточно. Имеются сведения, что из клонотеки кДНК эритробластов домашней курицы, трансформированных вирусом эритробластопа птиц, выделена кДНК, соответствующая гену, который кодирует новый предполагаемый регулятор типа «цинковых пальцев». Этот новый белок обозначен chCiti, состоит из 377 аминокислот: ближе к С-концу отмечено присутствие цистеин-2-гистидин-2 аминокислоты. Показана строгая специфичность нового белка для эритроидных клеточных линий курицы, причем на всех стадиях дифференцировки этих клеток. Функциональное значение белка обсуждается [224].

Постэмбриональный гемопоэз у млекопитающих происходит в структурно-функциональных образованиях гемопоэтической ткани – эритробластических островках (ЭО). Впервые эти морфофункциональные ассоциации костного мозга были описаны французским гематологом М. Бесси (1958) [219]. ЭО состоит из центрального гистиоцита (макрофага), окруженного одним или несколькими кольцами эритроидных предшественников, развивающихся из унипотентной КОЕ-Э, вступившей в контакт с макрофагом. КОЕ-Э и образующиеся из нее клетки (от эритробласта до ретикулоцита) удерживаются в контакте с макрофагом его рецепторами – сиалоадгезинами [49].

ЭО в костном мозге описаны у многих видов млекопитающих: в костном мозге человека; в селезенке и костном мозге взрослой и печени новорожденной мыши; в печени эмбриона крысы. У плода человека в печеночной фазе эритропоэза выявляются «фетальные ЭО». Они концентрируются экстравакулярно в печеночной паренхиме. Входящие в состав ЭО



эритроидные элементы обнаруживают признаки эритропоэза нормобластического типа [28].

Исследование организации ЭО с помощью световой и электронной микроскопии показало, что молодые эритробласты находятся в центральных областях ЭО, а более дифференцированные – на периферии. Форма ЭО, реконструированных трехмерными изображениями, не сферичная. Макрофаги в ЭО располагаются центрально, их цитоплазматические отростки всегда имеют тесный контакт с эритробластами, причем эритробласты ранних стадий развития более плотно сгруппированы. По мере созревания они начинают отделяться от центра островка. Способность зрелых эритробластов к дисперсии в ткани костного мозга позволила предположить изменения свойств поверхности их мембран при созревании.

По числу ядродержащих эритроидных клеток ЭО подразделяются на три класса. Первый класс включает до восьми клеток; второй – от девяти до шестнадцати и третий класс – более семнадцати. В костном мозге крысы ЭО первого класса составляют 54,5%, второго – 38% и третьего – 7,5%. Установлено, что эритропоэз в костном мозге крысы протекает на всем пространстве костномозговой ткани и не ограничивается, как предполагалось ранее, территорией, прилегающей к синусоидам [49, 50].

Особенности постэмбрионального кроветворения у птиц и низших позвоночных. У птиц (взрослые голуби и куры) и низших позвоночных ЭО в кроветворной ткани не выявлены. Основные гемопоэтические органы – костный мозг и селезенка [183]. В постэмбриональный период центральным очагом образования лейкоцитов, тромбоцитов и эритроцитов становится костный мозг, но в отличие от млекопитающих эритроциты образуются интраваскулярно. У взрослой курицы синусоиды костного мозга содержат различные клетки эритробластического ряда [43].

Взрослый организм птицы сохраняет черты эмбрионального кроветворения. Характерная особенность постэмбрионального кроветворения – диффузное расположение очагов гемопоэза (они встречаются даже в коже) и

отсутствие четкого разграничения между миелоидным и лимфоидным кроветворением [18, 43, 46, 80]. Наличие мультипотентных ГСК в кроветворных системах птиц доказано на экспериментальной модели, аналогичной по клонированию стволовых клеток у млекопитающих.

В онтогенезе птиц выделяют две популяции ГСК: первая – появляется на ранних этапах онтогенеза и обеспечивает формирование провизорной популяции эритроцитов, а затем элиминируется. Предотвращение массового попадания в циркуляцию незрелых эритробластов обеспечивает рецепторный аппарат дифференцирующихся клеток, который у птиц обладает средством к эндотелию венозных синусов, вследствие этого эритробласты образуют пристеночные сплетения. По мере созревания эритроцитов свойства поверхности эритробластов утрачиваются и эритроциты уносятся кровотоком [44].

Кроветворение у амфибий изучено недостаточно, его характерными чертами являются: 1) различная локализация и специализация кроветворных участков у разных представителей; 2) диффузный характер кроветворения и интраваскулярное (в циркулирующей крови) протекание; 3) отсутствие деления на лимфоидное и миелоидное кроветворение [37]. Органы гемопоэза у амфибий – костный мозг, селезенка, печень [191].

#### **1.4. Эритропоэз**

В процессе эритропоэза клетки проходят три стадии развития: ГСК, эритроидные клетки-предшественники (ЭКП) и созревающий эритрон. Родоначальница эритроидных клеток крови – плюрипотентная, или полипотентная ГСК, способная формировать колонии в культуре костного мозга. Дифференцирующаяся полипотентная ГСК дает два типа мультипотентных частично коммитированных ГСК: 1) коммитированные к лимфоидному типу дифференцировки; 2) КОЕ-ГЭММ-единицы, образующие смешанные колонии, состоящие из гранулоцитов, эритроцитов, моноцитов и мегакариоцитов (аналог КОЕ-С *in vitro*). Из второго типа мультипотентных

ГСК дифференцируются унипотентные единицы: бурстобразующая (БОЕ-Э) и колониеобразующая (КОЕ-Э) эритроидные клетки, которые являются коммитированными родоначальными клетками эритропоэза [116, 134].

Первым эритроидным предшественником является бурстобразующие единицы (клетки) эритроцитарные (БОЕ-Э, burst – англ. – взрыв, взрывообразующая). По сравнению с колониеобразующей единицей эритроцитарной (КОЕ-Э) – менее дифференцирована. При культивировании кроветворных клеток в плазменном геле, в присутствии высоких концентраций эритропоэтина (порядка 3-10 Ед/мл) образуются колонии клеток. Число колоний, состоящих из сотен клеток, растет линейно с увеличением количества клеток, что подтверждает клональную природу колоний и их возникновение из одной клетки – БОЕ-Э; в течение 10 сут она осуществляет 12 делений и образует колонию из 5000 эритроидных клеток с незрелым фетальным гемоглобином [200]. БОЕ-Э малочувствительна к эритропоэтину и вступает в фазу размножения под влиянием интерлейкина-3 (бурстпромоторная активность), вырабатываемого моноцитами – макрофагами и Т-лимфоцитами. Интерлейкин-3 – гликопротеин с молекулярной массой 20-30 кД. Он активирует ранние полипотентные ГСК, обеспечивая их самоподдержание, а также запускает дифференцировку полипотентных клеток в коммитированные. Интерлейкин-3 способствует образованию клеток (КОЕ-Э), чувствительных к эритропоэтину [73, 75].

Отдел БОЕ-Э неоднороден и включает несколько стадий дифференцировки. Более зрелые БОЕ-Э отличаются большей чувствительностью к эритропоэтину, образуя бурсты меньшей величины. Самые ранние БОЕ-Э продуцируют огромные бурсты, состоящие из 16 дочерних колоний, обладают некоторой чувствительностью к колониестимулирующей активности, вызывающих образование гранулоцитарно-макрофагальных колоний. Этот (первый) ряд эритроидной дифференцировки не утратил способности и к гранулоцитарной дифференцировке [200].

Следующий по зрелости эритроидный предшественник – клетка, способная в плазменных культурах за 2 дня пролиферации, в присутствии относительно низких концентраций эритропоэтина (0,25 Ед/мл), образовывать колонию из 4-32 эритроидных элементов. КОЕ-э более зрелая, высокочувствительная к эритропоэтину клетка (без гормона она не образуется), формирующаяся из пролиферирующей БОЕ-э. Под влиянием эритропоэтина КОЕ-э формирует более мелкие колонии, состоящие примерно из 60 эритроцитарных элементов. Количество эритроидных клеток, образуемых в сутки из КОЕ-э, в 5 раз меньше количества аналогичных клеток, образуемых из БОЕ-э. Таким образом, БОЕ-э наиболее примитивные клетки-предшественники эритроцитов, которые способны генерировать тысячи эритроидных предшественников. Они содержатся в малом количестве в костном мозге и крови благодаря лишь частичному самоподдержанию и миграции из компартмента мультипотентных ГСК. Под влиянием эритропоэтина КОЕ-э дифференцируется в морфологически распознаваемые предшественники эритроцитов [161, 263].

К морфологически распознаваемым клеткам эритроцитарного ряда относятся: эритробласт, пронормоцит (проэритробласт), нормоцит, ретикулоцит и эритроцит [18, 51, 81, 157, 161, 199].

*Эритробласт* – родоначальная клетка эритроцитарного ростка диаметром 20 – 25 мкм. Ядро нежной структуры, округлое, занимает большую часть клетки, красно-фиолетового цвета, содержит от 1 до 5 ядрышек. Цитоплазма насыщенного синего цвета, зернистости не содержит. Вокруг ядра заметна зона просветления.

*Пронормоцит* (проэритробласт) – клетка диаметром 12 – 18 мкм. Ядро более грубое, чем у эритробласта, но еще сохраняет нежную сетчатую структуру. Нуклеолы отсутствуют, цитоплазма базофильная, зернистости не содержит.

*Нормоцит* (нормобласт) – клетка несколько меньшего размера (8 – 12 мкм). Различают базофильный, полихроматофильный и оксифильный

нормоциты в зависимости от степени насыщения их цитоплазмы гемоглобином. Наиболее крупные – базофильные нормоциты, с синей цитоплазмой; чуть меньше – полихроматофильные, с серовато-фиолетовой цитоплазмой и наименьшие – оксифильные, с розовой цитоплазмой. Ядро базофильного эритробласта включает больше гетерохроматина, цитоплазма обладает резко выраженной базофилией в связи с накоплением рибосом, в которых начинается синтез гемоглобина. В ядре полихроматофильного нормобласта еще больше гетерохроматина, в цитоплазме накапливается гемоглобин. Проэритробласты, базофильные и полихроматофильные нормобласты способны размножаться путем митоза. Оксифильный нормобласт – клетка размером 8 – 10 мкм, имеет маленькое пикнотическое ядро, в цитоплазме содержится много гемоглобина, обеспечивающего ее оксифилию. Нормоцит вызревает в эритроцит через стадию ретикулоцита, молодого предшественника эритроцита, сохранившего остатки базофильной субстанции (РНК) цитоплазмы.

*Ретикулоцит* – клетка диаметром 9 – 11 мкм, неправильной формы, что связано с ее подвижностью. Ретикулоцит имеет нитчато-сетчатую субстанцию ретикулофиламентозной природы, содержащей РНК. В ретикулоцитах некоторое время продолжает синтез гемоглобина и по мере созревания происходит инволюция органелл. В зависимости от присутствия РНК и характера зернистости выделяют 4 стадии созревания ретикулоцитов: I – зернистость в виде клубка; II – в виде сети; III – в виде неполной сети; IV – в виде отдельных гранул (формула Гельмейера). При выходе в кровь ретикулоцит созревает в эритроцит в течение 1 – 2-х суток.

В современных схемах кроветворения ретикулоцит занимает особое положение. Одни исследователи приводят доказательства в пользу искусственного характера включения ретикулоцита в схему эритропоэза, указывая на то, что определенная часть ретикулоцитов окрашивается по Романовскому-Гимзе как полихроматофилы; другие – рассматривают ретикулоциты как оксифильные эритроциты, поэтому, по их мнению, неправомерно помещение ретикулоцита в схему эритропоэза после

оксифильного эритробласта. «...Учитывая, что все клетки в схеме кроветворения даны в окраске по Романовскому-Гимзе, а ретикулоциты выявляются только при суправитальной окраске, ретикулоцит вообще следует убрать из схемы. Его место не может быть фиксированным» (цит. по: [185], с. 27).

Несмотря на дискуссии относительно местоположения ретикулоцита в схеме гемопоэза, нельзя отрицать диагностического значения этой генерации клеток в определении функциональной активности костного мозга при оценке эритроцитарного баланса в условиях физиологической и репаративной регенерации системы крови.

*Эритроцит* – зрелая клетка периферической крови диаметром 7 – 8 мкм, имеет форму двояковогнутого диска, оксифильную цитоплазму, насыщенную гемоглобином. Период образования эритроцита от эритробласта до зрелой клетки занимает 7 дней.

В процессе эритропоэза происходят уменьшение размера клетки, уплотнение ядра и выход его из клетки (у млекопитающих), уменьшение содержания РНК, накопление гемоглобина, сопровождаемое изменением окраски цитоплазмы, потеря способности к делению клетки.

Потеря ядра эритроцитами наблюдается чаще всего на стадии оксифильного нормобласта, но в ряде случаев может наступить и на стадии полихроматофильного нормобласта. Процесс потери ядра из эритробластов осуществляется тремя путями: при недостаточной зрелости ядра, вследствие кариорексиса (выталкивание), кариолизиса и потери – выхода из цитоплазмы. При кариорексисе от ядра начинают отшнуровываться куски, придавая ему форму розетки. Куски, отделяясь от общей массы, округляются и уменьшаются в размерах. Такие включения (тельца Жолли) представляют собой продукты неполного растворения ядра. Располагаются они одиночно, иногда по два – три, напоминая паразитарные включения. При кариолизисе ядро, благодаря расплавленному в нем хроматину, приобретает красноватый оттенок, зависящий от цвета ядерной оболочки. После того как хроматин рассосется,

остается красноватое образование в форме овала, восьмерки, двойных или тройных петель (тельце, или кольцо Кабо). Третий путь потери ядра – это выход его из цитоплазмы.

В периферической крови можно встретить эритроциты, в которых зрелое пикнотическое ядро вышло из протоплазмы и лежит рядом с клеткой (голое ядро). Процессы выталкивания ядер имеют место только у млекопитающих животных [28, 200].

Поддержание постоянного уровня эритроцитов (и гемоглобина) в крови достигается за счет выработки в организме специфических веществ и гормонов стимулирующих и угнетающих эритропоэз, что в значительной мере реализуется через регуляцию синтеза эритропоэтина. Общий суммарный эритропоэз оценивается по количеству эритробластов в костном мозге, соотношению степени их зрелости, пролиферативной активности на разных стадиях созревания, величине лейкоэритробластического соотношения, а также по величине экскреции уробилиногена и стеркобелина.

В костном мозге наряду с общим (суммарным) эритропоэзом происходит также разрушение части эритроидных клеток (неэффективный эритропоэз). Термином «неэффективный эритропоэз» обозначают кроме внутрикостномозгового разрушения ядродержащих эритроидных предшественников также продукцию функционально неполноценных эритроцитов. Количество клеток, созревающих до стадии эритроцита, характеризует величину эффективного эритропоэза.

Для тканей позвоночных характерны две формы гибели клеток: некроз и апоптоз. Посредством некроза ткань быстро очищается от клеточных осколков и репарирует. Апоптоз – более мягкий процесс клеточной гибели, морфологические признаки апоптоза появляются лишь при физиологической гибели клеток (гибель клеток с коротким жизненным циклом, удаление аутоиммунных Т-клеток, инволюция клеток, лишенных необходимых факторов роста и т.д.). В пренатальном периоде реакции апоптоза контролируют переселение стволовых клеток из желточного мешка в печень и окончательно в

костный мозг. В постнатальном периоде примером супрессии апоптоза является взаимодействие эритропоэтина и эритроидных предшественников на стадии, когда этот процесс становится зависимым от гормона.

### **1.5. Филогенез очагов гемопоэза позвоночных**

В эволюции животного мира развитие крови (как ткани) было связано с появлением сосудистой системы, отделенной от пищеварительной трубки и полостей тела, а кровяных клеток – с образованием мезодермы (среда зародышевого листка) и соединительной ткани, которые с кровью гистогенетически объединены в единую систему.

У позвоночных животных (и у человека) органы кроветворения дифференцированы и сосредоточены преимущественно в костях в виде красного костного мозга. Органы гемопоэза образуют наибольший по объему и по активности орган высших млекопитающих; 20 – 30% красного костного мозга приходится на эритропоэтическую ткань.

Наиболее полный обзор филогенеза очагов гемопоэза представлен в работах П.А. Коржуева [80, 81]. Известно, что в филогенезе позвоночных животных переход к наземному образу жизни был сопряжен с глубочайшими перестройками в организме, прежде всего в системе органов внешнего дыхания. Первые выходцы на сушу среди позвоночных – амфибии – столкнулись с угрозой выживания и стали вести приводный образ жизни [81].

Для амфибий характерны несовершенные органы дыхания (малая поверхность легких, неэффективные механизмы газообмена) и смешивание артериальной и венозной крови в сердце, вследствие чего поверхность тела (кожа) становится дополнительным органом дыхания; кожа амфибий богата железами и всегда влажная.

Жизнь в наземных условиях требовала больших затрат энергии, а следовательно, повышался кислородный запрос тканей, который мог быть удовлетворен посредством увеличения массы крови и гемоглобина. Это стало возможным благодаря интенсификации деятельности очагов гемопоэза.



Принципиально новым в эволюции позвоночных в связи с переходом к наземному образу жизни стало появление нового очага гемопоэза в костном мозге. Рыбы не обладают костным мозгом, только у наземных животных скелет берет на себя гемопоэтическую функцию [81]. Сравнительный анализ очагов гемопоэза представлен в табл. 1.

Основной причиной смены очагов гемопоэза послужило действие сил гравитации в условиях наземного образа жизни. Если в воде организм «взвешен» и энергия тратится лишь на передвижение, то в наземных условиях не только требуются большие энергозатраты на передвижение, но еще и на поддержание тяжести собственного тела.

Таблица 1

**Очаги гемопоэза у различных представителей животных [131]**

Очаги	Эритропоэз	Гранулопоэз	Лимфопоэз	Моноцитопоэз*	Тромбопоэз <sup>3</sup>
Зеркальный карп					
Костный мозг	—	—	—	—	—
Селезенка	—	—	++++	+	—
Почка	++++	++++	++	++	+
Кишечник	—	—	++++	—	—
Сердце	—	—	—	+	—
Озерная лягушка					
Костный мозг	++++	++++	++	++	++
Селезенка	++	+	++++	++	—
Печень	+	++	++	+	—
Почка	—	—	+	—	—
Кишечник	—	—	++	—	—
Черепаша					
Костный мозг	++++	++++	++	++	
Селезенка	—	++	++++	++	
Печень	—	+	++	++	
Почка	—	—	+	—	
Кишечник	—	—	+	—	
Варан					
Костный мозг	++++	++++	++	++	
Селезенка		++	++++	++	
Печень		+	++	++	
Почка		—	+	—	
Кишечник		—	+	—	
Голубь					
Костный мозг	++++		+	++++	
Селезенка	+	+	++++		
Печень	—	+	++		

Почка	—	+	+++		
Кишечник	—	+	++		
млекопитающие					
Костный мозг	++++	++++	++	+++	++++
Лимф. узлы	—	—	+++	—	—
Селезенка	—	++	++	+	—

*Примечание:* +- низкая активность, ++- умеренная активность, +++- высокая активность, ++++- наибольшая активность, \* – для голубя миелопоза.

С точки зрения П.А. Коржуева [81] эволюция наземных позвоночных представляет собой эволюцию адаптаций, направленных на преодоление сил гравитации. Более того, если в воде нагрузка на различные участки тела одинакова, то на суше она приходится преимущественно на конечности. Это оказалось одной из причин смены очагов гемопоэза. Мощность очагов гемопоэза, локализованных в различных отделах скелета, определяется нагрузкой, приходящейся на тот или иной отдел; мощность гемопоэтической функции скелета в целом определяется степенью активности животного, его положением в филогенетическом ряду, т. е. в филогенезе позвоночных животных прослеживается тенденция снижения массы скелета, наиболее выраженная у птиц, и связана у них с приспособлением к полету.

В действительности темпы роста скелета соответствуют темпу роста организма, и большая масса скелета свидетельствует о наличии у животного мощного очага гемопоэза в виде костного мозга. Таким образом, у животных, ведущих более активный образ жизни или находящихся в условиях затрудненного доступа кислорода, скелет должен обладать более мощным развитием [80, 81].

Рога у самок северного оленя представляют приспособление к суровым условиям тундры, а мощное развитие рогов высокогорных архаров и козлов – к пониженному парциальному давлению кислорода. У этих животных рога выполняют роль дополнительного источника эритроцитов и гемоглобина, в первом случае – сезонного, во втором – постоянного.

Выявлены существенные различия в количестве и дислокации костного мозга у птиц и млекопитающих. У подавляющего большинства исследованных взрослых птиц осевой скелет содержит незначительное количество или совсем

не содержит костного мозга. Лишены костного мозга у многих птиц кости плеча и предплечья. Существует мнение, что основной биологической причиной, обуславливающей различия в количестве костного мозга у млекопитающих и птиц являются особенности, свойственные ранним стадиям развития птиц и млекопитающих [80].

У млекопитающих в период внутриутробного развития плода для бесперебойного поступления в его организм кислорода необходимы мощные резервы гемоглобина и крови у матери, что возможно только при мощных очагах гемопоэза. Напротив, птицы, не относящиеся к группе животных с внутриутробным типом развития, не нуждаются в этом, и относительная масса костного мозга у только что выклюнувшихся птенцов не превышает уровня, характерного для взрослых особей. Тем не менее у птиц и млекопитающих масса костного мозга в целом достигает значительных величин (2-7 % массы тела), тогда как масса очагов синтеза гемоглобина у рыб (селезенки, почки) составляет всего сотые или десятые доли процента.

Таким образом, в филогенезе наземных позвоночных (особенно у птиц и млекопитающих) наблюдалось все возрастающее накопление костного мозга, мощность очагов синтеза гемоглобина, обусловив им высокую активность и значительные энерготраты. Решающей предпосылкой, обусловившей расцвет наземных позвоночных, было превращение скелета в один из самых мощных очагов синтеза гемоглобина, и важнейшего средства преодоления сил гравитации.

## **ГЛАВА 2. ЭРИТРОЦИТЫ**

Основная функция эритроцита – транспорт респираторных газов: кислорода от легких к тканям и двуокиси углерода – от ткани к легочным альвеолам. Выполнению этой задачи подчинены структурные особенности эритроцита: отсутствие ядра; дисковидная, двояковогнутая форма; способность цитоскелета к деформабельности, что позволяет клетке изменять форму и легко двигаться через тонкие капилляры; низкие энерготраты. Помимо газотранспортной функции эритроциты наделены способностью принимать участие в регуляции кислотно-основного состояния, водно-солевого обмена, микрореологического статуса крови, в иммунных реакциях, связывании и переносе аминокислот, липидов, вирусов, гормонов (инсулин, тироксин), а также лекарственных средств. Эритроциты вовлекаются в патологический процесс при этом претерпевают специфические изменения структуры и функции при болезнях разного генеза. Основной источник энергии – глюкоза – метаболизируется в ходе анаэробного гликолиза в пути Эмбдена-Мейергофа. Обмен глюкозы в эритроците осуществляется так же по пентозомонофосфатному пути, при этом образуется 2,3-ДФГ, регулирующий сродство гемоглобина к кислороду.

### **2.1. Количественные характеристики и морфологические особенности эритроцитов**

Особенностью эволюционной динамики тканей внутренней среды является усложнение взаимодействий между отдельными клеточными элементами внутри каждой дивергентно дифференцирующейся разновидности. Причем наибольшей сложности организации процессы размножения и дифференцировки клеток крови характерны для позвоночных животных [44].

Ученые полагают, что в процессе эволюции позвоночных произошло заметное увеличение концентрации эритроцитов, при этом в обратной зависимости от их размеров [61, 70]; продолжительность жизненного цикла

большинства дифференцированных элементов, функционирующих в русле, сокращается [44].

Работами П.А. Коржуева [80, 81] показано, что нет определенного соответствия между количеством эритроцитов и местом животного в эволюционном ряду. Между тем в пределах параллельных рядов наземных и водных позвоночных наблюдается одна и та же тенденция – увеличение количества эритроцитов при переходе от низших форм к высшим. Установлена определенная зависимость между активностью животного и количеством эритроцитов в пределах одной и той же группы: чем активнее животное, тем больше эритроцитов в его крови.

По литературным данным, наибольшее количество эритроцитов характерно для млекопитающих, в 1 л крови которых в среднем содержится  $9,27 \cdot 10^{12} \text{ л}^{-1}$  эритроцитов, у птиц –  $3 \cdot 10^{12} \text{ л}^{-1}$ , у рептилий –  $0,90 \cdot 10^{12} \text{ л}^{-1}$ , у бесхвостых амфибий –  $0,46 \cdot 10^{12} \text{ л}^{-1}$ , у хвостатых амфибий –  $0,08 \cdot 10^{12} \text{ л}^{-1}$ , у костистых рыб – от 0,87 до  $3,3 \cdot 10^{12} \text{ л}^{-1}$ , у хрящевых –  $0,16 \cdot 10^{12} \text{ л}^{-1}$ , у круглоротых –  $0,14 \cdot 10^{12} \text{ л}^{-1}$  [80]. Количество эритроцитов у взрослого мужчины составляет  $3,9-5,5 \cdot 10^{12} \text{ л}^{-1}$ , у женщин –  $3,7-4,9 \cdot 10^{12} \text{ л}^{-1}$  крови.

Число эритроцитов у животных, в том числе у человека, может варьировать в зависимости от возраста, эмоциональной и мышечной нагрузки, действия экологических факторов. Собственные исследования, проведенные на самцах лягушек *R. ridibunda* подтвердили установленную ранее закономерность о количественном колебании клеток крови в различные сезонные периоды. Так, количество эритроцитов в состоянии анабиоза составляет  $0,29 \pm 0,01 \cdot 10^{12} \text{ л}^{-1}$ , а в отдельные периоды весенне-летней активации эритропоэза может достигать –  $2,48 \pm 0,33 \cdot 10^{12} \text{ л}^{-1}$  [170].

Эволюция системы эритрона наземных позвоночных сопровождается вначале укрупнением эритроцитов, которые затем становятся мельче. Это связывают с ведущей ролью костного мозга как кроветворного органа. При этом скелет принимает на себя большую нагрузку в связи с выходом животных на сушу [43, 61].

Эритроциты позвоночных по форме разделяются на две группы: плоские эллипсоиды с хорошо заметным ядром (рыбы, амфибии, рептилии, птицы) и дисковидные двояковогнутой формы без ядра (млекопитающие) [37]. Эритроциты верблюда плоские эллипсоиды, а у круглоротых – содержат ядро и имеют форму диска. У некоторых беспозвоночных, как и у млекопитающих, зрелые эритроциты лишены ядер. Такие безъядерные эритроциты обнаружены в полостной жидкости у одной из офиур и в крови полихеты *Magellona papillicornis* – ее безъядерные мелкие эритроциты обладают способностью к гемолизу [37, 80].

Популяция эритроцитов неоднородна по форме и размерам. В крови человека в норме основную массу (80-90%) составляют эритроциты двояковогнутой формы – дискоциты. Кроме того, встречаются planoциты (с плоской поверхностью) и стареющие формы эритроцитов – шиповидные или эхиноциты (~6%), куполообразные, или стоматоциты (~1-3%), и шаровидные, или сфероциты (~1%) [63].

Различают обратимые формы (эхиноциты и стоматоциты), которые могут возвращаться в дискоциты и необратимо измененные формы (акантоциты и кодоциты – мишеневидные клетки, сфероциты и необратимо измененные стоматоциты). Трансформация формы эритроцита не всегда сопровождается изменением отношения поверхности к объему. Плазменными факторами, вызывающими эхиноцитоз, служат лизолейцин и фермент лецитин-холестерин-ацетилтрансфераза. Преход дискоцита в эхиноцит происходит при некотором защелачивании среды ( $pH > 9,0$ ), но при этом снижается объем клетки [P.L. La Cell, 1980; цит. по 31, с. 26].

При инкубации эритроцитов изменение формы – превращение дискоцита в эхиноцит – осуществляется вследствие понижения в клетках концентрации АТФ и накопления кальция. Заметим, что изменения наружной концентрации кальция не оказывает действия. Следовательно, местом трансформирующего действия кальция является цитоплазма или внутренняя поверхность мембраны эритроцита (R.I. Weed et. al., 1969).

Переход дискоцита в стоматоцит так же происходит при постоянном объеме эритроцита. Стоматоцитогенными факторами являются не проникающие анионы или катионные амфифилы, снижение рН среды ниже 6,0 (при этом изменяется объем клетки).

Механизмы трансформации эритроцита обусловлены мембранными структурами и метаболическими процессами. Установлено, что объем эритроцита определяется преимущественно проницаемостью их плазматической мембраны для пассивной диффузии катионов, содержанием гемоглобина и 2,3-ДФГ (последнее зависит от скорости гликолиза).

Изменение формы эритроцитов (пойкилоцитоз) у человека может наблюдаться при анемии, независимо от ее генеза. Тем не менее, некоторые типы эритроцитов специфически характерны для конкретных патологий, например, наследственный сфероцитоз (микросфероциты) и серповидноклеточная анемия (серповидные клетки). Эхиноциты *in vivo* могут появляться при уремии, кровоточащей пептической язве, раке желудка, болезнях сердца, некоторых анемиях.

За поддержание формы эритроцита ответственен белковый каркас мембраны, в частности процесс ферментативного фосфорилирования спектрина и, связанное с ним, образование комплекса спектрин – актин (возможно и других надмолекулярных структур). Гибкость и текучесть мембраны эритроцита обусловлена наличием в ней липидного бислоя, обладающего в нативной мембране свойствами жидкого кристалла.

Размеры эритроцитов не одинаковы. Определение диаметра эритроцита позволяет вычислить его поверхность, а также судить о размерах капилляров тела животного. Размеры эритроцитов могут быть использованы для характеристики различных систематических групп животных. Показано, что каждая систематическая группа животных имеет эритроциты с диаметром, свойственным только ей [126]. Из всех позвоночных животных наименьший диаметр эритроцитов у млекопитающих, а среди них – у животных из группы жвачных (парнокопытных), в частности у мускусной кабарги, лани, дикой и

домашней козы [37, 80]. Из всех позвоночных, обладающих ядерными эритроцитами, наименьшую величину отмечают у птиц [126], что связывают с их теплокровностью и более интенсивным обменом веществ [43].

Наибольший диаметр эритроцитов у хвостатых амфибий, например, амфиумы они достигают гигантских размеров (70 мкм по длиной и 1 мкм по короткой оси эллипса). У протей размер эритроцита составляет 58 X 35 мкм. Среди конкретной группы животных отклонения в размерах эритроцитов наблюдаются в незначительных пределах: у млекопитающих, например, от 21 до 10,6 мкм [80].

Размеры эритроцитов человека на сухих мазках – 7,2-7,7 мкм. В изотонической среде эритроцит человека имеет диаметр 7,1-9,2 мкм (в среднем 8,0 мкм). Высота утолщенного края (высота тора) около 1,7-2,4 мкм, в центре 0,9-1,2 мкм. Большинство эритроцитов крови человека (до 75%) имеют диаметр ~7,5 мкм (7,2-7,7 мкм) и называются нормоцитами. Остальная часть эритроцитов представлена микроцитами ~12,5% и макроцитами ~12,5 %. При высыхании мазка линейные размеры эритроцитов уменьшаются, по данным разных авторов, на 10-20% [37, 80]. Изменение размеров эритроцитов встречается при заболеваниях крови [64, 208].

Поддержание оптимальной формы эритроцита в виде двояковогнутого диска (дискоцита) обеспечивающей адекватное участие клетки в газообмене обусловлено физико-химическим состоянием мембраны (процессы активного транспорта ионов, особенности функционирования мембран ассоциированных ферментов), а также сбалансированностью молекулярной организации эритроцита и микроокружения, стабильностью работы катион транспортирующих систем и сохранением ионного гомеостаза.

Исследователи отмечают, что обычная световая микроскопия дает нечеткое изображение краев объекта (0,5 мкм), что соответствует 6% возможной ошибки в определении диаметров и 20% – в определении средней толщины клетки [91]. Для исключения субъективных ошибок в определении линейных размеров эритроцитов применяют различные способы анализа



формы клеток. Теоретические исследования в области обработки медицинских изображений привели к созданию автоматизированных систем – анализаторов изображений. Изображение несет в себе информацию об объекте и в этом смысле может рассматриваться как многомерный сигнал, описываемый функцией двух или большего числа переменных. Первые результаты цифровой обработки изображений стали применяться для автоматизированных подходов решения многих стандартных задач анализа медицинской видеоинформации [173].

Современные компьютеризированные цитологические методы, применяемые в области исследования клеточной физиологии, дают возможность изучить морфологические особенности клеток на качественно новом уровне [2, 63, 90].

Методы сканирующей электронной микроскопии позволяют получить трехмерное изображение, сведения об особенностях строения поверхностной цитомембраны, морфологически охарактеризовать различные формы эритроцитов, определить их процентное содержание и функциональные особенности [112, 133].

На основе данных многомерного анализа клеток возможно создание моделей, позволяющих раскрывать фундаментальные аспекты патогенеза многих заболеваний. Один из примеров – способ анализа взвешенных частиц, состоящий в том, что в одной плоскости одновременно регистрируют два или три изображения каждой частицы, соответствующие ее проекциям на взаимно перпендикулярные плоскости. Полученные изображения дают возможность сделать заключение о размерах частиц и определить геометрические параметры объектов формы эллипсоида вращения. Автоматизированная оценка несферичности частиц позволяет описать форму и размеры эритроцитов человека при патологии [76].

В современной гематологической практике для определения количества и формы клеток используют анализаторы, работающие по принципу

кондуктометрического подсчёта клеток с использованием лазерного светорассеивания [75, 79].

Кроме того, используют анализаторы изображений, позволяющие найти для каждого объекта координаты  $x$  и  $y$ , определяющие его положение в измеряемом поле, а также положение его центра масс. Другие измеряемые величины, которые часто закладываются разработчиками в программное обеспечение, – это ряд параметров формы, данные о ближайших соседних объектах, оптическая плотность и интегративная оптическая плотность исследуемой площади [92].

Геометрическими характеристиками формы и размеров эритроцитов являются объем и площадь поверхности. Выявлена определенная зависимость между объемом и количеством клеток: чем больше эритроцитов в крови, тем меньше их объем. Количество эритроцитов крови птиц в среднем  $3 \cdot 10^{12-1}$  л, средний объем клетки  $150 \text{ мкм}^3$ , у рептилий -  $1 \cdot 10^{12-1}$  л красных клеток, а средний объем  $355 \text{ мкм}^3$ , у млекопитающих – около  $9 \cdot 10^{12-1}$  л, средний объем  $57,1 \text{ мкм}^3$  [37, 70].

Одна из важнейших физиологических характеристик эритроцитов – площадь поверхности клеток. Гемодинамика обеспечивает протекание обмена на разделительных поверхностях систем «кровь – ткань» и «кровь – внешняя среда», структурной единицей которых является эритроцит. Этот показатель трудно определить, т. к. эритроциты не представляют по форме правильных геометрических тел.

Подсчитано, что эритроциты ламы, содержащиеся в  $1 \text{ мм}^3$ , обладают поверхностью, равной  $893 \text{ мм}^2$ , тогда как эритроциты ящерицы –  $375$ , лягушки –  $224$ , а протей –  $124 \text{ мм}^2$ . Эти цифры отражают постепенное увеличение дыхательной поверхности эритроцитов в ряду наземных позвоночных [80, 81]. Каких-либо корреляций диаметра эритроцитов с размерами тела млекопитающих не установлено.

Типичный эритроцит млекопитающих имеет двояковогнутую торроидальную форму, обеспечивающую равномерность насыщения

эритроцита кислородом как по краям, так и в центре диска при прохождении крови через легкие. Из всех возможных торроидов заданного объема форма, соответствующая эритроциту млекопитающих, обеспечивает максимальное отношение площади поверхности к объему ( $S/V$ ), равное 1,638 (для сферических эритроцитов того же объема  $S/V=0,55$ ). Торроид, соответствующий эритроциту млекопитающих, имеет особенности: диаметры центральной вогнуто-уплощенной и прогибающихся частей диска и всего дискоцита находятся в соотношении: 3:5:8, а толщина центральной вогнутой части и высота тора 1:2. Таким образом, эритроцит представляет собой геометрически упорядоченное тело, имеющее энергетически оптимальную базу [259].

В современной гематологии для описания формы эритроцита используют модель цилиндрического тела, в основе которой положены промеры диаметров клеток. Однако величина диаметра клетки не дает представления об истинном увеличении или уменьшении размеров эритроцита, которые соотносятся с изменениями геометрии клетки. Слабым звеном в методологии эритроцитометрии является вычисление объема эритроцитов, который рассчитывается по Велькеру [81] из соотношения между объемной массой эритроцитов (гематокрита) и количеством эритроцитов в единице объема крови:  $V = \frac{Ht * 100}{RBC}$ , при этом возникают погрешности, присущие определению гематокрита (не учитываемые межклеточные пространства) [203]. В дальнейшем объем клетки, рассчитанный таким образом, увязывают с математическими формулами для определения других характеристик клетки, что приводит к рассогласованию данных.

Слабая изученность морфологии эритроцитов птиц и низших позвоночных и неправомочность приложения к их исследованию традиционных математических моделей предопределили поиск новых способов для оценки морфометрических особенностей эритроцитарных популяций эллипсоидной формы. Нами был разработан новый способ оценки геометрии

эритроцитов, адаптированный к исследованию крови птиц и лягушек [138, 168, 169].

Математические модели цилиндрического тела и эллипсоида вращения представлены в табл. 2 [168].

Таблица 2

**Приемы расчетов эритроцитарных показателей**

Параметр эритроцита	Традиционный метод (цилиндрическое тело)	Предложенный способ (эллипсоид вращения)
Объём	$V = \frac{Ht}{RBC}$ ,	$V = \frac{4}{3} \pi a b^2$ ,
Площадь поверхности	$S = \frac{2V}{T} + 2\pi TR$ ,	$S = 2\pi b \left( b + \frac{a}{\varepsilon} \arcsin \varepsilon \right)$ ,
Толщина	$T = \frac{V}{\pi R^2}$ ,	$T = \frac{\pi b}{4}$ ,
Сферичность (эксцентрисность)	$H = \frac{T}{D}$ ,	$\varepsilon = \sqrt{1 - \left( \frac{b}{a} \right)^2}$ ,

*Примечание:*  $Ht$  – гематокрит (в отн. ед.),  $RBC$  – число эритроцитов в 1 мкл ( $\times 10^6$ ),  $V$  – объем,  $T$  – толщина,  $R$  – средний радиус эритроцита,  $D$  – диаметр эритроцита  $a$  – длинная полуось,  $b$  – короткая полуось эллипса,  $\varepsilon$  – числовая эксцентрисность.

Преимущества предлагаемой нами модели состоят в следующем:

1) вычисление объемов в карио- и цитометрических исследованиях производятся одинаковым способом, что в дальнейшем не приведет к рассогласованию данных;

2) при вычислении толщины эритроцита учитывается особенность его формы – двояковогнутый эллипсоид с ядром;

3) количественный способ оценки формы клеток основывается на измерении их осей и выделении коэффициента конфигурации ( $\varepsilon$ ). Использование коэффициента числовой эксцентрисности, вместо сферичности, на наш взгляд, методологически верен, так как в стандартных физиологических условиях эритроцит птиц и амфибий далёк от приближения к сфере;

4) модель позволяет вычлнить морфометрические различия между микроцитами, нормоцитами, макроцитами и мегалоцитами.

Предлагаемая модель не лишена недостатков. Основной – технически неосуществимое (пока) измерение третьего диаметра клетки, отсюда:

1) завышены результаты расчета объема и площади поверхности клетки (форма эритроцита не является «геометрически правильной», и эта особенность исключается в применяемых математических формулах);

2) не учитывается содержание микро- и макропланов в популяции, по величине диаметров относящихся к микро- и макроцитам, для которых соответственно и вычисляется объём (реально величина объема будет близка к аналогичному показателю нормоцита);

3) пренебрегается форма клетки, т. е. содержание в популяции эхиноцитов, шизонтов и обломков клеток, размеры которых сильно варьируют и могут быть отнесены к любому из классов.

При исследовании морфометрических особенностей эритроцитарной популяции петухов кросса «Иза Браун» нами использована общепринятая классификация эритроцитарной популяции (табл. 3).

Таблица 3

**Морфометрические параметры эритроцитарной популяции петухов**

Классы	Диаметр, мкм		Средний габарит, мкм
	короткий	длинный	
Микроциты	5,500-6,500	7,000-9,200	6,250-7,850
Нормоциты	6,500-8,000	9,200-12,200	7,850-10,100
Макроциты	8,000-9,500	12,200-14,500	10,100-12,000
Мегалоциты	9,500-10,900	14,500-17,100	12,000-14,000

Эритроцитарные показатели петухов в физиологических условиях представлены в табл. 4.

Таблица 4

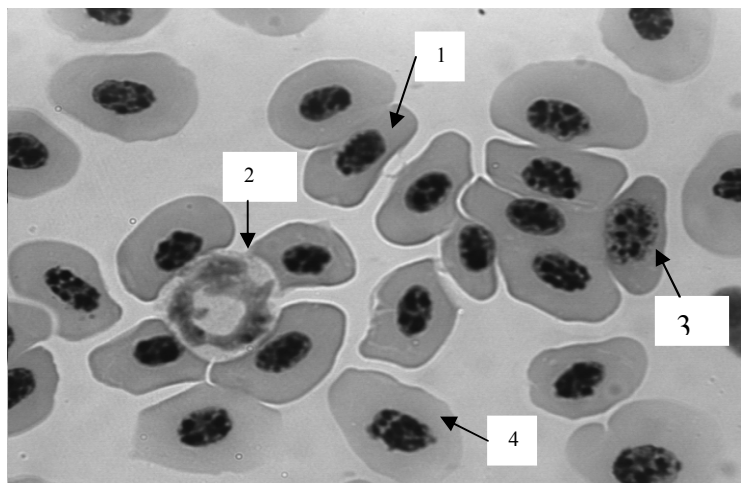
**Эритроцитометрические характеристики петухов в физиологических условиях**  
(модель клетки – эллипсоид вращения)

	D <sub>1</sub> , мкм	D <sub>2</sub> , мкм	ε	V, мкм <sup>3</sup>	S, мкм <sup>2</sup>	T, мкм
Микроциты	6,13±0,02	8,52±0,05	0,93±0,001	167,46±1,40	164,61±0,96	2,41±0,01
Нормоциты	7,27±0,02	10,351±0,10	0,94±0,001	285,69±3,03	235,54±1,80	2,85±0,01
Макроциты	8,49±0,03	12,15±0,20	0,94±0,001	460,43±9,21	323,79±4,47	3,33±0,01
Мегалоциты	10,06±0,10	15,17±0,30	0,94±0,002	805,01±2,55	472,39±8,55	3,95±0,03

Ядро	3,83±0,03	4,93±0,05	0,92±0,002	37,98±0,78	60,83±0,83	1,51±0,01
------	-----------	-----------	------------	------------	------------	-----------

*Примечание:  $D_1$  – короткий диаметр,  $D_2$  – длинный диаметр,  $\varepsilon$  – коэффициент числовой эксцентричности,  $V$  – объем,  $S$  – площадь поверхности,  $T$  – толщина клетки.*

Эритроциты исследованных нами лягушек имели овальную форму с различной степенью эксцентричности (удлиненности) и центрально расположенным ядром. В периферической крови обнаружены элементы более ранней стадии развития (рис. 5).



**Рис. 5. Мазок периферической крови лягушек.**

1 – эритроцит, 2 – сегментноядерный нейтрофил,  
3 – тромбоцит, 4 – полихроматофильный нормобласт.  
Увеличение 1600.

Одна из характерных тенденций в современной гематологии низших позвоночных – отсутствие номенклатуры клеток крови. Поскольку автоматический перенос номенклатуры эритроцитарных субпопуляций млекопитающих животных недопустим, предлагаем классифицировать эритроцитарную субпопуляцию лягушек по коэффициенту эксцентричности на 3 класса:

- *eliptocytus* (нормальные эллипсоидные клетки) – коэффициент эксцентричности ( $\varepsilon$ ) – 0,7-0,75;
- *magnulocytus* (широкоэллиптические клетки) –  $\varepsilon \geq 0,76$ ;
- *teretocytus* (округлые клетки) –  $\varepsilon \leq 0,69$ .

Морфологическая классификация эритроцитарной популяции лягушек представлена в табл. 5.

**Морфометрические параметры эритроцитарной популяции  
лягушек *R. ridibunda* в физиологических условиях**

Класс	$\epsilon$	$V$ , $\mu\text{м}^3$	$S$ , $\mu\text{м}^2$	$T$ , $\mu\text{м}$
Eliptocytus	$0,74 \pm 0,004$	$2900,21 \pm 87,13$	$1005,55 \pm 20,51$	$6,08 \pm 0,06$
Magnulocytus	$0,81 \pm 0,004$	$2688,99 \pm 86,69$	$973,71 \pm 19,93$	$5,65 \pm 0,07$
Teretioctus	$0,63 \pm 0,012$	$3231,67 \pm 79,98$	$1067,39 \pm 17,58$	$6,60 \pm 0,06$

Как видим, характерной особенностью морфологии эритроцитов лягушек в физиологических условиях является высокая вариабельность формы и отсутствие единой картины крови для всего класса.

*Ультраструктурная организация эритроидных клеток.* Морфологические исследования эритрона на субмикроскопическом уровне у млекопитающих животных широко представлены в работах отечественных и зарубежных авторов. Относительно ультраструктурных особенностей эритрона у птиц и низших позвоночных в литературе имеются отрывочные данные, которые носят незавершенный характер [18, 191, 192].

Основными компонентами эритроидных клеток являются ядро и цитоплазма. В ультраструктуре ядра млекопитающих животных отсутствуют выраженные специфические особенности. Его содержимое состоит из хроматина с пониженной электронной плотностью – эухроматина и плотных компактных глыбок – гетерохроматина. В основном компоненте ядрышка выделяются аморфная, филаментозная и зернистая части, которые содержат РНК. Ядерная оболочка образована внутренней и наружной мембранами, которые сливаются в области ядерных пор и ограничивают щель, называемую перинуклеарным пространством. В процессе эритроидной дифференцировки структура ядра подвергается инволютивным изменениям, связанным с перераспределением эу- и гетерохроматина, перестройкой ядрышка, ядерных пор в ядерной оболочке. По мере развития прогрессирует степень конденсации хроматина и в ядре начинает преобладать гетерохроматин. Ядрышко

уменьшается, становится более компактным. Постепенно его части замещаются на зернистые нуклеомеры [11].

Цитоплазма отделена от окружающей среды клеточной оболочкой (цитолеммой), а от нуклеоплазмы в эритро- и нормобластах – ядерной оболочкой (нуклеолеммой), содержит органеллы, цитоплазматические включения, гиалоплазму. В эритроидных клетках обнаружены и описаны все органеллы общего значения: центросома, комплекс Гольджи, эндоплазматическая сеть, рибосомы, микротрубочки, митохондрии, микропероксисомы, лизосомы.

Комплекс Гольджи в эритроидных клетках развит слабо, представлен в виде нескольких уплощенных друг к другу мешочков и пузырьков, расположенных вокруг центриолей. Наиболее выражен он на ранних этапах развития. На мембранах комплекса Гольджи осуществляются синтез гликопротеидов цитолеммы, концентрации и конденсации продуктов специфического синтеза гема и глобина. Морфологические доказательства синтеза гемоглобина в области пластинчатого комплекса у позвоночных животных отсутствуют [220].

Эндоплазматическая сеть слабо выражена и представлена каналцами гранулярного ретикулума с фиксированными на их стенках рибосомами и цистернами, вакуолями агранулярной сети. Характерной особенностью ультраструктуры созревающих клеток красного ряда является наличие большого количества моно- и полирибосом, свободно располагающихся в гиалоплазме.

Снижение гемоглобинсинтетических процессов по мере созревания клеток сопровождается дезагрегацией полисом в монорибосомы. Сравнительно резко в цитоплазме эритро- и нормобластов около центриоли выявляются микротрубочки. Правильно ориентированные параллельными рядами, они могут образовывать пакеты в краевых зонах клетки или в цитоплазматическом мостике, соединяющем две клетки в конце митоза. Предполагается, что эти



субмикроскопические каналцы осуществляют транспорт железа из трансферина [257], а также выполняют роль цитоскелета [251].

Количество, форма, размеры и характер ультратонкого строения митохондрий зависит от стадии созревания эритроидной клетки. На ранних стадиях развития (эритробласты, базофильные нормобласты) встречаются митохондрии различной формы: округлой, эллипсоидной, булавовидной, гантелевидной и палочковидной. На более поздних этапах созревания преобладают овальные и эллипсоидные митохондрии. Субмикроскопической перестройке наиболее подвержена внутренняя митохондриальная мембрана, что выражается в уменьшении концентрации и протяженности крист, увеличении межкристных промежутков, просветлении матрикса, что в конечном итоге приводит к нарушению процессов генерации энергии [11].

На ранних этапах дифференцировки, сопровождающихся высоким уровнем сукцинаддегидрогеназы (СДГ) и цитохромоксидазы (ЦХО), биоэнергетические процессы осуществляются за счет окислительного фосфорилирования. В более дифференцированных популяциях снижение активности СДГ и ЦХО и нарастание активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназы связаны с активацией гликолиза – основного метаболического пути зрелых эритроцитов [10, 14, 15].

Во всех созревающих клетках эритроидного ряда присутствуют мелкие гранулы размером 0,09-0,2 мкм – микропероксисомы. Они наиболее характерны для ранних эритроидных предшественников [25]. В цитоплазме эритроидных клеток содержатся структуры, в состав которых входят негемовое железо и как основной компонент – ферритин. Электронно-микроскопическими исследованиями установлено, что молекулы ферритина имеют форму пяти- или шести угольников с поперечником 10-11 нм и стороной 7-8 нм. В их центре располагается «ядро» из железа [219].

## **2.2. Функциональные свойства эритроцитов**

### **2.2.1. Структурная организация и функционирование эритроцитарных мембран**

Эритроцит – гибкая эластичная структура, изменяющая свою форму при прохождении через капилляры тела. На электронных микрофотографиях эритроциты выглядят как однородные или мелкозернистые электронно-плотные образования, покрытые оболочкой толщиной 6-12 нм. В настоящее время показано, что мембрана эритроцита гетерогенна в разных ее участках [208].

Эритроцит человека имеет следующий химический состав, %: вода - 70-71; гемоглобин – 25-28%; липиды – 5-7%; углеводы, соли, ферменты – 3% [64, 91].

Важнейший органоид эритроцита – плазматическая мембрана. Она выполняет функции механической оболочки с регулируемыми физическими свойствами и одновременно роль «диспетчера», координирующего работу клетки в зависимости от физических и химических сигналов, поступающих к ней [66], играя, таким образом, ключевую роль в детерминации гомеостаза и функциональной способности клетки.

В современной мембранологии особое внимание уделяется структурной организации и функционированию биомембран, участвующих в интеграции регуляторных процессов и реакций клетки [39]. Установлено, что уровень физиологической активности и биоэнергетика во многом определяются физико-химическими свойствами мембран (в частности, качественным и количественным составом липидов и скоростью их обновления) [108].

Физико-химическое состояние мембраны эритроцита обуславливает процесс активного транспорта ионов, функционирование мембранассоциированных ферментов, характер взаимодействия клетки со средой, поддержание формы двояковогнутого диска, оптимальной для газообменной функции, сохранение ионного гомеостаза [198, 276].

Эритроцитарная мембрана – композитарная структура; ее основу составляет липидный бислой с асимметрично встроенными белками. Мембранные белки способны влиять на липиды, изменяя их молекулярную упорядоченность и ограничивая подвижность анулярных липидов, вызывая изменение низкочастотных колебаний липидной фазы, стимулируя разделение фаз и способствуя асимметричному распределению липидов [16, 245, 292]. Липиды мембраны регулируют подвижность и активность внутримембранных белков, обеспечивая клетке селективную проницаемость и нормальное функционирование мембранных ферментов и рецепторов [32].

Наиболее детально изучены мембрана и цитоскелет эритроцитов млекопитающих животных [122, 198]. Содержимое эритроцита представляет гидрофильную коллоидную систему, в которой дисперсная фаза состоит из гемоглобина, воды и солей, а непрерывная фаза – из воды и солей. В цитоплазме эритроцитов в больших количествах присутствует гемоглобин, а также ферменты гликолитического цикла, органические соединения и неорганические ионы, состав и количество которых в красных клетках крови значительно отличается от аналогичного их показателя в плазме. Процентная доля стромы эритроцитов (отделенной от гемоглобина) у разных видов млекопитающих колеблется в пределах от 1 до 4%; у птиц она выше (около 13%), что обусловлено наличием ядерного вещества (табл. 6) [168].

Таблица 6

**Химический состав постгемолитического остатка (стромы) [300]**

Составные части стромы	Корова	Овца	Лошадь	Человек	Птица
	<i>в % от общего остатка</i>				
Гемоглобин	5	2	10	23	5
Зола	3	3	2	5	2
Белки	57	68	53	50	89
Липиды	26	24	20	11	4
<i>в % от общего количества липидов</i>					
Фосфолипиды	63	62	63	65	83
Свободный холестерол	27	20	34	20	14
Эфир холестерола	3	0	2	4	0
Нейтральный жир	8	18	1	11	3

Различия, характеризующие состав эритроцитов птиц, обусловлены особенностями их структуры и геометрии. Сравнивая эритроциты овцы и птиц по количеству липидов, приходящихся на отдельный эритроцит ( $10^{-12}$  мг), установили обратную зависимость: чем больше количество эритроцитов в крови, тем меньшее содержание липидов в единичном эритроците [80].

Липиды эритроцитарных мембран представлены тремя классами: нейтральные липиды, гликолипиды и фосфолипиды; в составе мембраны они находятся в соотношении 30:10:60. В химическом составе мембраны преобладают фосфолипиды (фосфотидилхолин, фосфотидилсерин, фосфотидилэтаноламин, сфингомиелин) и холестерол [32, 65, 205]; они во многом обуславливают свойства мембран [85].

Структурно мембраны липидов построены по единому принципу – на базе спиртов (глицерина, этиленгликоля). Молекула липида включает гидрофобные «хвосты», из предельных или непредельных жирных кислот и полярной головки, состоящей из фосфорной кислоты и этиленамина, серина, холина, инозита и др (табл 7).

Таблица 7

**Липидный состав эритроцитов человека и кишечной палочки**  
(% различных липидов от общего их количества)

Липиды	Эритроциты человека	Мембрана E. coli
Фосфатидиновая кислота	1,5	0
Фосфатидилхолин	19,0	0
Фосфатидилэтаноламин	18,0	65
Фосфатидилглицерин	0,0	18,0
Фосфатидилинозит	1,0	0
Фосфатидилсерин	8,5	0
Кардиолипин	0,0	12
Сфингомиелин	17,5	0
Гликолипиды	10,0	0
Холестерол	25,0	0

Молекулы фосфолипидов формируют липидный бислои – основу структуры мембран эритроцитов. В составе молекулы фосфолипидов имеются остатки ненасыщенных жирных кислот, содержащих от четырех до шести

двойных связей, на долю которых приходится около 17% всех жирнокислотных остатков [227]. Плотность упаковки липидного бислоя эритроцитов зависит от степени ненасыщенности фосфолипидов и содержания холестерина, что отражается на упругих свойствах материала мембраны и величине модуля поверхностного сжатия. Фосфолипиды распространены неравномерно. Так, фосфатидилхолин и сфингомиелин являются основными компонентами внешней поверхности мембраны, а фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин локализованы преимущественно на ее внутренней стороне. Миграция в мембране молекул фосфолипидов, их избирательный гидролиз, формирование небислойных липидных фаз в определенных участках мембраны играют важную роль в процессах образования везикул и разрушения красных клеток [293, 306]. Молекулы холестерина расположены между молекулами фосфолипидов.

Большинство молекул белка сосредоточено на цитоплазматической поверхности липидного бислоя, который полностью пронизывает белок полосы 3 и гликофорин [293].

Поверхность биологической мембраны замкнутая, состоит из фиксированного числа молекул и способна существовать в равновесном ненатяженном состоянии. Благодаря полярным группам молекулы фосфолипидов обладают амфифильными свойствами, что определяет высокое сродство их и водных растворов; наличие двух остатков жирных кислот придает им гидрофобные свойства. Взаимодействие мембраны с водой зависит от площади контакта гидрофобных групп липидов с молекулами воды, которая определяется плотностью упаковки молекул фосфолипидов в мембране [180].

Фосфатиды регулируют активный и пассивный транспорт веществ, определяют чувствительность клеток к действию лигандов, активность мембранных ферментов; фосфатидилсерин, обладая иммуностимулирующей активностью, служит триггером для макрофагального удаления эритроцитов из кровотока. Фосфоинозитолы участвуют в генерации диацилглицерола, активирующего  $Ca^{2+}$ -фосфолиидзависимую протеинкиназу C и регулирующего

работу  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы и  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов инозитол-1,4,5-трифосфата [16, 218]. Поддержание соотношения между фракциями фосфолипидов обеспечивает нормальное функционирование эритроцита.

При дезорганизации мембранных липидов клетка утрачивает способность регулировать ионный и антиоксидантный гомеостаз, нарушаются активность мембранных ферментов и метаболизм, что ведет к необратимым изменениям структуры и физиологии эритроцита [17, 65, 88]. Например, нарушаются микровязкостные свойства, оптимальный уровень текучести (в частности, подвижность углеродных атомов в углеродной цепи), длина углеродных цепей фосфолипидов, степень ненасыщенности жирных кислот [17].

При старении эритроцитов мембрана претерпевает структурную и метаболическую модификации, приводящие к их элиминации. В мембране уменьшается концентрация фосфолипидов и холестерина (без изменения содержания мембранных белков) и соответственно снижается соотношение липид/белок. При этом сравнение состава эритроцитарных мембран старых и молодых доноров выявило увеличение при старении организма отношение холестерол/фосфолипид [198]. Работами зарубежных ученых установлено, что включение холестерина в мембраны липосом изменяет их упругие свойства: возрастает величина модуля поверхностного сжатия и критическое значение относительного увеличения площади мембраны и ее натяжения. Наблюдаемые эффекты холестерина на упругие свойства липидного бислоя мембраны ученые связывают с увеличением плотности упаковки фосфолипидов и уменьшением проницаемости мембран для воды [237, 283, 303].

Белки в эритроцитарной мембране распределяются неравномерно. По степени влияние на структуру бислоя и силе взаимодействия с ним белковые компоненты мембраны эритроцитов делят на периферические, интегральные и полуинтегральные белки. В большинстве случаев белки имеют ориентацию в направлении, перпендикулярном плоскости липидного бислоя, – иными словами мембрана представляет собой упорядоченную векторную структуру [198].

Белки участвуют в транспорте молекул внутрь клетки и из нее, в клеточном метаболизме, выполняют рецепторную функцию (получают и преобразуют химические сигналы из окружающей среды) определяют морфологические и химические свойства клетки [65, 78, 180].

Все компоненты полипептидного профиля мембраны эритроцита по функциональному назначению разделяются на две группы: белковые компоненты, участвующие в формировании мембранного скелета (спектрин, анкирин, белки полос 4.1, 4.2, 4.9, актин) и полипептиды, обеспечивающие метаболизм и ионный гомеостаз (белок полосы 3 – анионный канал, гликофорин, аддуцин,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза и ацетилхолинэстераза, а также ряд белков полосы 4.5, обеспечивающих транспорт моносахаридов и нуклеозидов, белок фракции 6, представляющий глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу) [163, 180, 198, 205, 216, 252, 258].

Липидно-белковое взаимодействие в мембране эритроцита обуславливает течение специфических мембранассоциированных процессов, включающих и транспорт ионов, обеспечивая, например, долгосрочное поддержание концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле на низком уровне. Нарушение мембранного транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  – вторичного мессенджера, участвующего в регуляции фактически всех процессов клеточного метаболизма, приводит к изменению функциональной активности зрелых эритроцитов [132, 296]. Характерно, что  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза эритроцитарной мембраны, являясь тонким регулятором кальциевого равновесия, находится сама под контролем регуляторов – кальмодулина и ряда модулирующих систем, обеспечивающих активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы и ее сродство к ионам  $\text{Ca}^{2+}$ . Контроль за функциональным состоянием  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы достигается посредством изменения фосфорилирования энзима, а это опосредуется активностью цАМФ-зависимой протеинкиназы и протеинкиназы С [269].

Для ядерных эритроцитов типично наличие хорошо выраженного цитоскелета, формирующего микротрубочки в виде характерного кольца в субмембранной области клетки [44, 189].

Углеводы в составе мембран в свободном виде фактически не встречаются, они входят в состав белков (гликопротеиды) и липидов (гликолипиды). Углеводная часть белковой молекулы находится на поверхности мембраны, что связано с их функциональной ролью – осуществление межклеточных взаимодействий, ограничение подвижности белковых молекул, обеспечение иммунных реакций [198, 205].

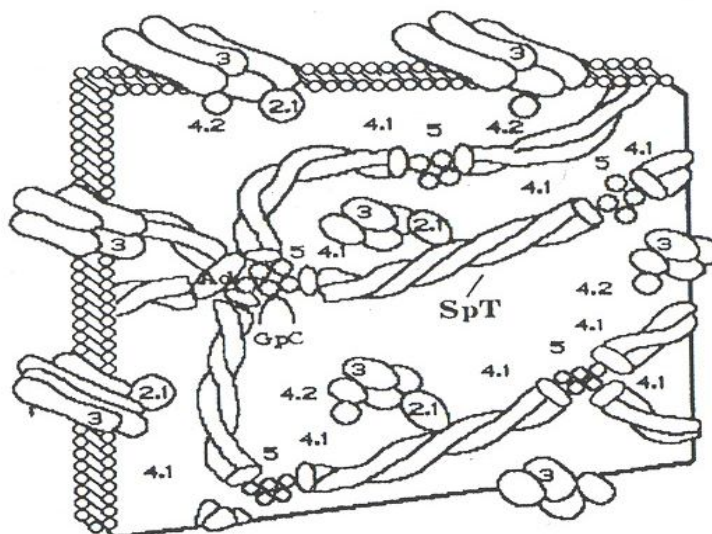
Мембранным маркером эритроцита служит сиалосодержащий гликопротеид – гликофорин А (PAS-1), большая часть полипептидной цепи которого располагается на наружной поверхности мембраны. Наличие остатков нейраминовой кислоты в составе этого белка определяет высокий отрицательный заряд на наружной поверхности мембраны. При развитии и дифференцировке клетки остатки сиаловой кислоты служат антигенными маркерами, ассоциированными с опухолями [235], участвуют в процессах клеточного роста [222], а так же выступают носителями антигенов групп крови и других иммунологических детерминант [113].

Структурной особенностью эритроцитарной мембраны является наличие эластичной белковой сети цитоскелета, локализованного на внутренней поверхности липидного матрикса и связанного с интегральными белками. Взаимодействие белкового цитоскелета с липидным матриксом мембраны обеспечивает ее стабильность [298]. Белковый цитоскелет обуславливает поведение мембраны эритроцита как упругого твердого тела [254, 264]. Наиболее прост и вместе с тем хорошо изучен цитоскелет безъядерных эритроцитов. Основа молекулярной структуры цитоскелета – спектрин-актиновый комплекс, содержащий добавочные белки 4.1 и 4.9. Спектрин-актиновое взаимодействие обеспечивают белок полосы 4.2, аддуцин [246, 280], тропомиозин [241], тропомодулин [242].

Основу белковой сети цитоскелета образуют молекулы спектрин. Гетеродимеры спектрин представлены  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами, которые взаимодействуют друг с другом концевыми фрагментами. В результате формируется гибкий многоугольник, в углах которого локализованы молекулы



актина, белков полос 4.1, 4.9, тропомиозина и кальмодулинсвязывающего белка – аддуцина (рис. 6) [180].



**Рис. 6. Молекулярная структура цитоскелета мембраны эритроцита [180]:**

SpT – молекулы спектрина тетрамера; 2.1 – анкирин; 3 – интегральный белок полосы 3.1; GpC – гликофорин-С; Ad – аддуцин; 5 – актин; 4.1 и 4.2 – белки полос 4.1 и 4.2.

Аддуцин и белок полосы 4.1. формируют тройные комплексы со спектрином и актином, обеспечивая спектрин-актиновую связь. Белок полосы 4.1 взаимодействует с молекулами спектрина; аддуцин и актин проявляют большое сродство [217]. Выявлена способность молекул гемоглобина образовывать комплексы с  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами спектрина в результате его взаимодействия с глобином. По мере старения клетки количество этих комплексов возрастает [262].

Критерий зрелости клеток эритроидного ряда – завершение процессов формирования цитоскелета. Молодые ядродержащие эритроидные клетки лишены некоторых белковых компонентов цитоскелета.

Биогенез цитоскелета эритроцитарных мембран изучался на различных моделях, например, культуре эритробластов эмбрионов цыпленка [249, 234] и эритроидных клетках различной степени зрелости, выделенных из селезенки крыс с фенилгидразиновой анемией [255]. Согласно экспериментальным данным, асинхронность синтеза белков цитоскелета зависит от степени зрелости клеток.

Синтез субъединиц спектрина и анкирина наиболее интенсивно протекает в малодифференцированных эритроидных клетках – проэритроблестах, базофильных эритроблестах и снижается по мере созревания эритроидных клеток в полихроматофильных и оксифильных эритроблестах [114]. Синтез белков полосы 4.1 и полосы 3 наиболее интенсивно протекает в полихроматофильных и оксифильных эритроблестах [265].

Установлено, что при формировании стабильной структуры цитоскелета эритроидных клеток основную роль играют следующие факторы [180]:

- опосредуемое рецепторами концентрирование молекул спектрина на цитоплазматической поверхности мембраны до уровня, достаточного для спектрин-актиновых взаимодействий. Роль специфических рецепторов при этом выполняют молекулы фибронектина или аддуцина;

- связывание белка полосы 4.1 с мембраной и взаимодействие мембраносвязанных молекул белка полосы 4.1 со спектрин-актиновым комплексом, стабилизирует структуру цитоскелета;

- синтез и включение в структуру мембраны молекул анкирина и белка полосы 3, что обеспечивает фиксацию цитоскелета к липидному матриксу мембраны за счет спектрин-анкирин-белко полосы 3-взаимодействий;

- наличие двух этапов формирования ассинхронности синтеза белковых компонентов цитоскелета в эритроидных клетках – нестабильной и стабильной фаз структуры цитоскелета.

Нестабильную структуру цитоскелета имеют малодифференцированные эритроидные клетки (проэритроблесты, базофильные эритроблесты). Стабилизация структуры цитоскелета осуществляется на уровне полихроматофильных и оксифильных нормобластов при возрастании количества белка полосы 4.1 и белка полосы 3. Завершение процессов самосборки цитоскелета происходит в костном мозге на уровне ретикулоцитов ранней степени зрелости до их выхода в кровотоки [180].

Как видим, цитоскелет мембраны – сложное структурное образование, локализованное в субмембранном слое и необходимое для нормального функционирования эритроцита.

*Деформабельность эритроцитов.* Эритроциты обладают уникальной способностью к изменениям формы и размеров, что обеспечивает их возможность свободно проходить через микроциркуляторное русло. Свойства мембран эритроцитов при деформациях обуславливаются молекулярной организацией мембраны и физико-химическими свойствами образующих ее молекул. Особая роль в обеспечении упругих способностей при сдвиговой деформации и поддержании формы клетки отводится белковому цитоскелету мембран эритроцитов, формирование которого завершается к моменту выхода ретикулоцитов из костного мозга в кровь [181]. Деформация эритроцитов в кровеносном русле осуществляется за счет сил напряжения сдвига со стороны смещающихся слоев плазмы крови. Способность эритроцитов к обратимым изменениям размеров и формы названа деформабельностью.

Форма эритроцитов и их реологические свойства (деформабельность и способность к агрегации) играют важную роль в транспорте респираторных газов.

Стабильность и деформабельность мембран эритроцитов во многом зависит от жесткости белковой сети цитоскелета, которую определяют межмолекулярные взаимодействия его белковых компонентов. Способность эритроцитов к деформации определяют следующие основные факторы: 1) вязко-эластические свойства мембранного материала; 2) форма клеток (отношение площадь поверхности / объем  $S/V$ ); 3) вязкость внутриклеточного содержимого относительно вязкости внеклеточного раствора. С увеличением концентрации гемоглобина в эритроците, и соответственно, с увеличением вязкости внутриклеточного содержимого, изменяется отношение  $S/V$  и, как следствие снижается деформабельность клетки [91].

Деформация сдвига, при которой происходят изменения формы и линейных размеров клеток при постоянной величине площади поверхности

мембраны, сопровождается изменением расположения молекул спектрина на внутренней поверхности липидного бислоя. При значительных деформациях мембраны может произойти разрыв белковой сети цитоскелета в местах взаимодействия молекул спектрина (предел стабильности мембран), что приводит к фрагментации мембран эритроцитов [175, 180]. Установлено, что функциональная активность цитоскелета находится под регуляторным контролем ряда механизмов, таких, как – фосфорилирование и кальциевый обмен. Действие кальция опосредуется через кальмодулин. Увеличение концентрации кальция в цитоплазме приводит к изменению формы, снижению деформабельности и уменьшению продолжительности жизни эритроцитов [289]. Инкубация эритроцитов с ионами кальция индуцирует сфероцитоз и уменьшение площади поверхности клетки [164].

На интактных крысах была выявлена более низкая способность к деформации старых эритроцитов в отличие от молодых. Для популяции старых клеток оказались характерны достоверное увеличение концентрации гемоглобина и уменьшение отношения  $S/V$ , что возможно связано с изменениями вязко-эластических свойств мембранного материала [180].

Для эритроцитов свойственны трансформации формы. В модельных опытах установлено, что эритроциты млекопитающих из дискоцитов могут превращаться в стоматоциты и эхиноциты без изменения объема. Снижение внутриклеточного рН ведет к стоматоцитозу; в то же время зависимость формы эритроцитов от величины рН не носит линейного характера [204].

Помимо цитоскелета важную роль в поддержании формы эритроцита отводят мембране. Предложено несколько гипотез о статических реологических свойствах мембраны эритроцита, определяющих его форму: 1) гипотеза о роли электростатических сил, ответственных за поддержание дискообразной формы; 2) гипотеза «спонтанной» кривизны двухмерного материала (тенденция каждого участка мембраны приобрести в покое определенную, зависящую от состава, кривизну); 3) гипотеза о локальной сократительной реакции участков мембраны при участии  $Ca^{2+}$  под влиянием трансформирующих воздействий.

Существует мнение, согласно которому диск сохраняет форму под влиянием факторов, уменьшающих ограничивающий эритроцитарной мембраной объем. Один из них – работа  $\text{Na}^+$ -помпы. Выкачивая ионы  $\text{Na}^+$  из клетки, помпа создает такое распределение ионов в системе эритроцит – плазма крови, при котором возникает избыточное давление снаружи клетки. В этих условиях равновесный объем эритроцитов оказывается меньше максимальной, возможной для данной величины его площади поверхности. При блокировании работы  $\text{Na}^+$ -помпы осмотическое давление в эритроцитах возрастает, что приводит к сферуляции клеток и минимальному отношению  $S/V$  [91].

### **2.2.2. Резистентность эритроцитов при экстремальных воздействиях**

Важная функция эритроцитарных мембран – создание барьера для прохождения веществ и осуществления избирательного их транспорта. Высокие барьерные свойства определяются липидным бислоем мембран [198]. Основным показателем стойкости эритроцитарных мембран – резистентность, устойчивость к действию различных факторов. При экстремальных воздействиях ее характеристики изменяются.

Непрерывность липидного бислоя мембраны в процессе жизненного цикла клетки может нарушаться с образованием структурных дефектов типа сквозных гидрофильных пор. Примером дестабилизации биологических мембран выступает гемолиз эритроцитов, при котором мембрана растягивается и в ней появляются гидрофильные поры вследствие латеральных флуктуаций плотности поверхности. Такие поры быстро захлопываются. При определенном пороговом уровне натяжения мембраны гидрофильные поры обеспечивают выход гемоглобина и низкомолекулярных веществ. Превращение поры в гидрофильную обусловлено переориентацией липидных молекул [204]. Выход веществ сопровождается снижением разности осмотического давления, при этом натяжение мембраны уменьшается, и поры залечиваются. Однако, если размер поры выше критического значения, происходит нарушение мембраны [4]. Как видим, процесс дестабилизации мембран носит циклический характер.

При гипоосмотическом «шоке» полного механического разрушения клетки не происходит, так как белки цитоскелета позволяют эритроциту сохранять форму, при этом образуется так называемая «тень» эритроцита [3].

Для оценки резистентности эритроцитов актуальны исследования осмотической, кислотной, перекисной, мочевиной, глицериновой устойчивости, обусловленной функционированием одного или нескольких транспортных каналов клетки. Резистентность характеризует структурно-функциональное состояние эритроцитарных мембран, ее определение имеет важное диагностическое значение и связано с решением одной из важнейших задач физиологии и патологии системы крови – изучение качественного состава функционирующих эритроцитов.

Методы дисперсионного анализа, характеризующие качественный состав эритроцитов, были разработаны И.И. Гительзоном и И.А. Терсковым. Принцип метода состоит в фотоэлектрической регистрации убыли числа эритроцитов в процессе гемолиза, развивающегося под влиянием кислот в стабильных условиях. Опыты, проведенные с гемолитиками различного механизма действия, позволили авторам предложенного метода сформулировать следующие представления о кинетике гемолиза. Стойкость клетки, определяемая по выходу гемоглобина, представляет собой результирующую трех процессов: 1) времени, необходимого для преодоления гемолитиком барьера оболочечной непроницаемости; 2) скорости распада внутриклеточных структур; 3) времени, в течение которого механическая прочность оболочки противостоит нарастающему осмотическому давлению внутри клетки [35].

Осмотический гемолиз не приводит к химическим изменениям содержимого эритроцита. В ходе этого процесса диффундирует только свободная фракция гемоглобина, причем при усилении гипотонии прекращается выход гемоглобина. Свободное проникновение его из клетки возможно при условии образования дефектов в мембране. Так, при осмотическом гемолизе (по мере выхода гемоглобина) размеры разрыва

мембраны уменьшаются, что указывает на ее способность к самовосстановлению [87].

Химический (кислотный) тип гемолиза включает ряд последовательно протекающих стадий: предгемолитическая, стадия гемоглинолиза, строматопороза, строматолита. Главный критерий предгемолитической стадии – выход ионов калия в окружающую среду и сферуляция эритроцитов. Гемоглинолиз протекает в зависимости от свойств гемолитика. Например, при химическом гемоглинолизе происходит нарушение физико-химических свойств связанного гемоглибина вследствие распада гемолитостроматинного комплекса, в котором липиды образуют комплекс с гемоглибином и строматином. На стадии строматопороза под влиянием, например, концентрированного сапонина происходит нарушение морфологической целостности эритроцита. Строматолит (полная деградация клеточных структур) наступает при действии холево-, дезоксихолево-, олеиновокислого натрия [145].

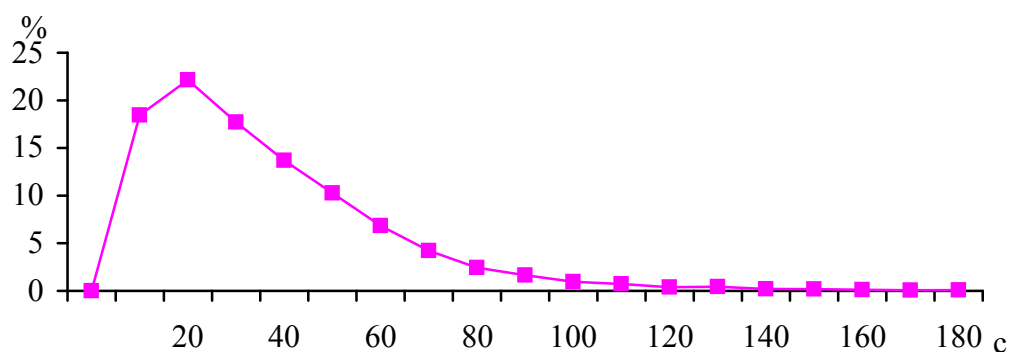
Гемолитическое влияние сильных кислот и оснований обусловлено высокореакционным действием ионов  $H^+$  и  $OH^-$ , вызывающих повреждение мембраны, которое приводит к повышению внутриклеточного осмотического давления. В результате эритроцит сферулирует, а при достижении критического объема – гемолизует.

Наиболее полно явление резистентности эритроцитов изучено у человека и млекопитающих животных. Метод построения эритрограмм используется для диагностики различных видов анемий [35, 119, 188].

Известны внутривидовые и межвидовые различия кислотной резистентности у мышей [7], изменения резистентности клеток в условиях гипоксии, гипотермии и гиперкапнии [155], получены эритрограммы метгемоглибиновых эритроцитов [128], показана роль липидов в распределении эритроцитов на кислотной эритрограмме [22], анализируются в филогенетическом аспекте причины устойчивости разных типов клеток [172].

В настоящее время активно исследуются цитофизиологические особенности осмотического баланса клеток эритроидного ряда у представителей различных классов животных. В частности, установлено закономерное снижение осмотической резистентности клеток в ряду земноводные – птицы – человек, что связывают с положением животного в эволюционном ряду: животные более низких ступеней эволюционного развития снабжены высокоэффективной системой стабилизации клеточного объема в условиях осмотического стресса, так как их внутренняя среда вследствие несовершенства гомеостатических систем, более подвержена влиянию внешних факторов [13].

*Резистентность эритроцитов лягушки.* Собственные исследования осмотической и кислотной резистентности лягушек *R. ridibunda* в физиологических условиях позволили отметить многоочаговость эритропоэза (рис. 7).



**Рис. 7. Кислотная эритрограмма лягушек *R. ridibunda* в физиологических условиях**

Максимальная скорость гемолиза наблюдалась на 20-й секунде (разрушаются  $22,15 \pm 1,76\%$ ) клеток. По функциональным свойствам отчетливо выделились три популяции клеток: низкостойкие с продолжительностью гемолиза до 70 с при этом разрушается  $93,31 \pm 1,25\%$  клеток; среднестойкие – до 130 с ( $6,58 \pm 0,20\%$ ) и высокостойкие – до 180 с ( $0,66 \pm 0,06\%$ ). Среднее время гемолиза составило 170 с; эритрограмма асимметрична; до 30-й с скорость гемолиза максимальна. Присутствие в периферическом русле явно выраженных



трех разностойких популяций клеток (рис. 7) свидетельствует об их разнофункциональности.

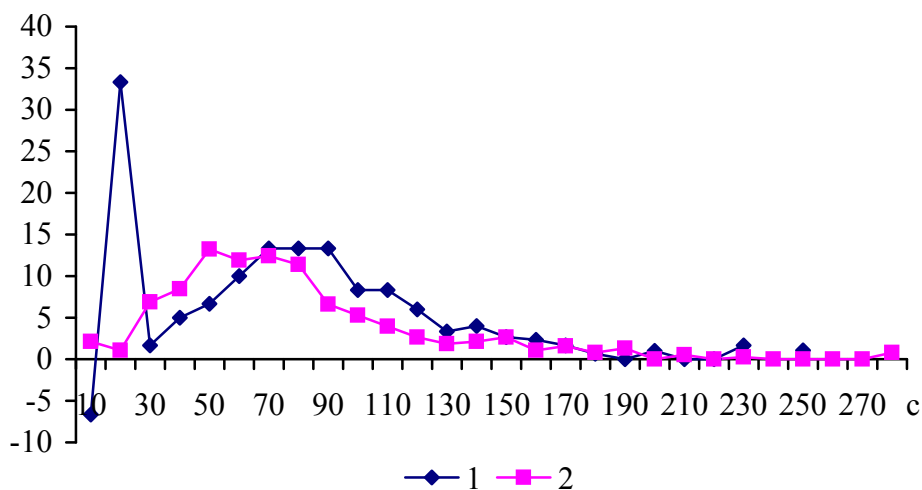
Анализ научной литературы показывает, что для кроветворения лягушек характерна разноочаговость. Очагами эритропоэза выступают селезенка, краевая подкапсульная зона печени, кишечник, костный мозг. Процесс кровообразования может протекать также в периферическом русле [111, 191].

Как показали наши исследования, основную часть клеток составила низкостойкая популяция (быстроразрушающаяся), что связано, вероятно, со структурно-функциональными особенностями эритроцитарной мембраны лягушек. Полученный экспериментальный материал не противоречит существующему мнению о том, что эритроцитам лягушек свойственно динамическое старение. По сравнению с эритроцитами других видов жизненный цикл эритроцитов лягушки более продолжительный и достигает 1000 – 1400 сут, т.е. старение эритроцитов по своему характеру приближается к старению других неделящихся специализированных клеток организма. При этом эритроциты лягушек способны к обновлению белков ядра и негемоглобиновых белков цитоплазмы. О большей биохимической и биологической полноценности эритроцитов земноводных косвенно свидетельствуют и данные о способности эритроцитов земноводных к фагоцитозу бактерий, попадающих в кровь [111].

У отдельных особей функциональная гетерогенность эритроцитарной популяции подтверждается наличием двух пиков кроветворения на кислотной эритрограмме: первый – на 20-й с, отражающий популяцию низкостойких клеток (их 23,33%) с явно выраженным периодом сферуляции; второй – на 70-90-й с, включающий популяцию среднестойких клеток (их 39,99%). Популяция высокостойких клеток составила 37,31% с максимумом гемолиза на 100 с (рис. 8, особь №1). Нами отмечена активация эритропоэза у отдельных лягушек, находящихся в состоянии анабиоза (особь №2, см. рис. 8) – пик гемолиза низкостойкой популяции клеток сдвинут вправо (50 с) при этом эритрограмма

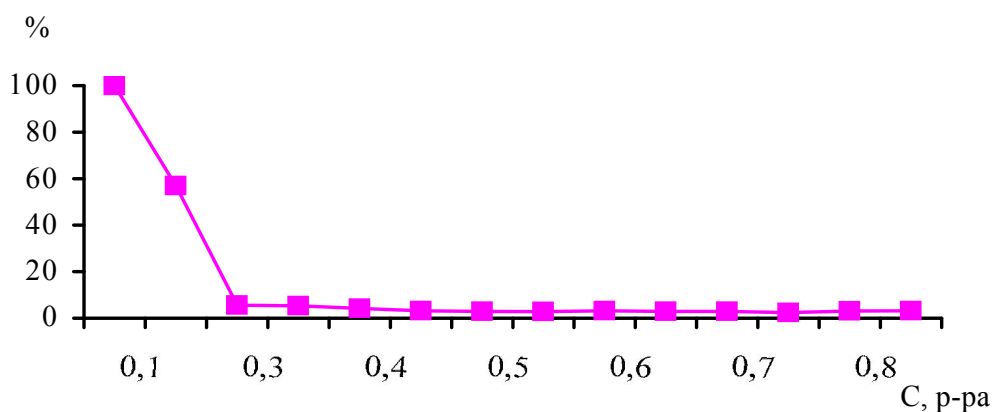
уплощена и вытянута. Среднее время гемолиза у особей №1 и №2 составило соответственно 120 и 145 с.

$\Delta G_{Hb}/\Delta t$



**Рис. 8. Индивидуальные особенности кислотной резистентности эритроцитов лягушек *R. ridibunda***

Характер изменения осмотической устойчивости эритроцитов лягушек соответствовал возрастным особенностям клеток эритроцитарной популяции, установленной нами методом построения кислотных эритрограмм. Эритроциты обладают повышенной осмотической устойчивостью. Критическая точка резистентности – 0,2% раствор хлорида натрия (рис. 9).

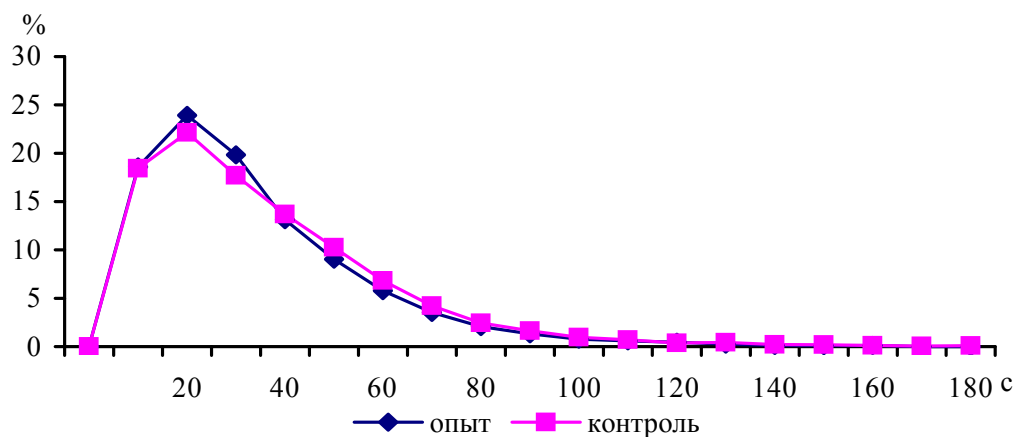


**Рис. 9. Осмотическая эритрограмма лягушек *R. ridibunda* в физиологических условиях**

Точка минимальной устойчивости отмечалась при концентрации растворе хлорида натрия 0,6%, при которой 96,85% клеток резистентны. В точке

максимальной гипотонии (0,2% раствор хлорида натрия) устойчивы 43,07% клеток.

Инкубация (in vitro) эритроцитов с адреналином (0,25 ммоль/л) в течение 15 мин привела к снижению гемолитической стойкости клеток (рис. 10).



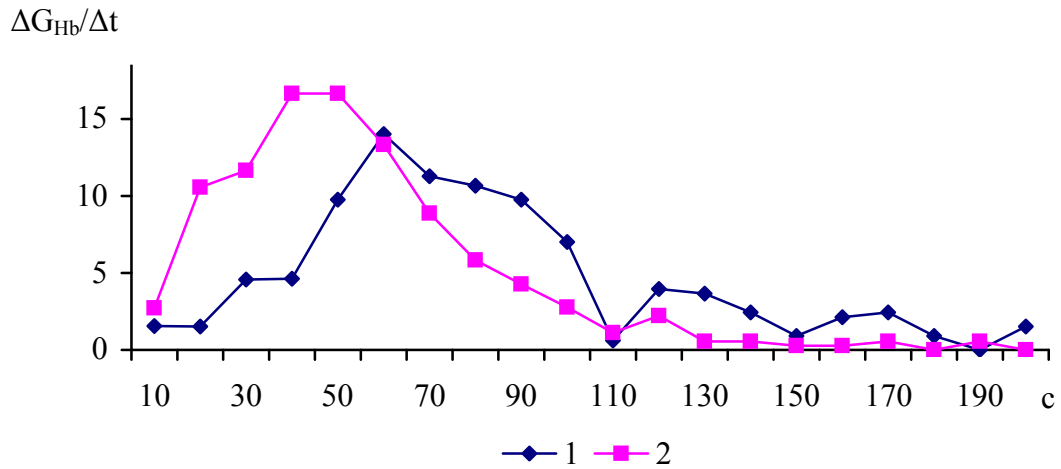
**Рис. 10. Кислотные эритрограммы лягушек *R. ridibunda* при адреналиновой и гипотонической нагрузках**

Анализ кислотных эритрограмм, отражающих липидную разнокачественность мембран популяции эритроцитов, позволяет заключить, что  $93,85 \pm 1,02\%$  и  $93,31 \pm 1,25\%$  в популяции составляют клетки пониженной стойкости (с гемолизом до 70 с);  $9,02 \pm 0,14\%$  и  $6,58 \pm 0,20\%$  – средней стойкости (гемолиз до 130 с) и  $0,31 \pm 0,05\%$  и  $0,66 \pm 0,06\%$  – эритроциты повышенной стойкости (время гемолиза – до 180 с), соответственно, в опытной и контрольной группах. Эритрограммы асимметричны, скорость гемолитического процесса максимальна на 20-й с, которой соответствует разрушение большей части низкостойких клеток, при этом в опытной группе эритроциты менее резистентны по сравнению с контрольной. В обеих группах гемолиз начинается через 10 с и заканчивается через 160 с в опытной группе и 180 с – в контрольной. Ширина интервала гемолиза в опытной и контрольной группах составила соответственно 150 и 170 с. Сужение интервала гемолиза происходит за счет увеличения скорости гемолитического процесса на 20-й с: максимум эритрограммы лягушек опытной группы (на 20-й с превышал контрольной на 7,40%).

Полученные данные отражают одноочаговость эритропоза у «анабиозных» лягушек и присутствие в периферической крови зрелых форм клеток. Снижение стойкости эритроцитов под влиянием адреналиновой нагрузки в наших опытах, возможно, связано с повреждающим действием адреналина на мембраны, а также с особенностями организации адреналового регуляторного механизма. В исследованиях *in vivo*, проведенных Н.А. Троицкой (1967) на кроликах, установлены две стороны в эффектах гормона на красные клетки крови при разовом (однократном) воздействии в дозе  $0,20 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ : повышение стойкости эритроцитов в первые 30 мин после инъекции и уменьшение – в более позднее время наблюдения. Продолжительное введение гормона (в той же дозе в виде эмульсии с 0,5 мл масла) вызывает увеличение стойкости эритроцитов. Анализируя эти данные, автор приходит к выводу, что метод кислотных эритрограмм позволяет характеризовать свойства эритроцитов, циркулирующих в кровяном русле: так же, как и в случае осмотического гемолиза, устойчивость красных клеток крови к кислотному гемолизу зависит от свойств мембраны и особенностей внутриэритроцитарных метаболических процессов [186]. Косвенно адреналин может влиять на проницаемость мембраны эритроцита через изменение концентрации глюкозы в крови. Избыток глюкозы, как известно приводит к гликозилированию белков мембраны эритроцитов (спектрина, гликофорина и белка полосы 3) и гемоглобина. При этом меняется конформация гемоглобина (повышается доля HbA<sub>1c</sub> от общего гемоглобина крови), что снижает деформабельность красных клеток. Снижению пластичности эритроцитов способствует так же интенсификация полиолового пути метаболизма глюкозы, приводящая к накоплению в клетках сорбитола. Изменение внутриэритроцитарного метаболизма приводит к осмотическому дисбалансу, нарушению барьерной функции мембраны, увеличению ее проницаемости для липидов, кислых мукополисахаридов, катионов [31].

У некоторых лягушек подопытных обнаружена активация эритропоза: появление на эритрограмме нескольких пиков, отражающих наличие в

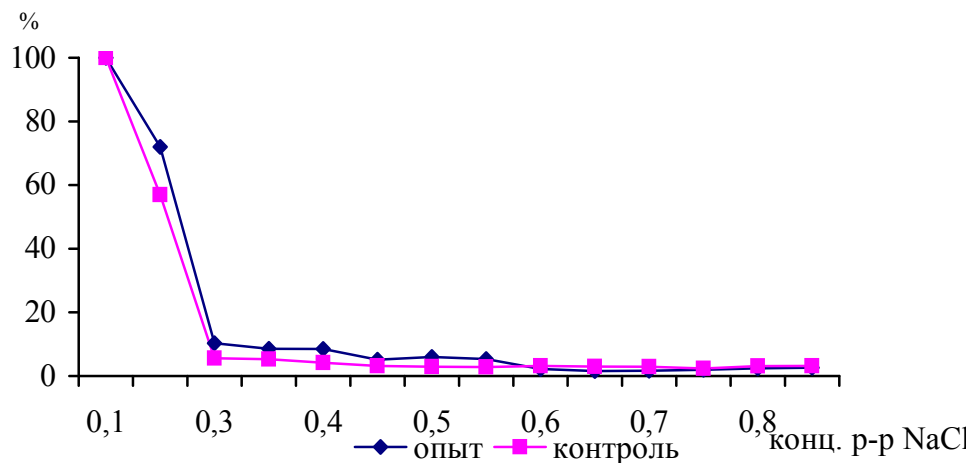
периферической крови разностойких клеток, и увеличение времени гемолиза до 200 с (рис. 11).



**Рис. 11.** Индивидуальные особенности кислотной резистентности эритроцитов лягушек *R. ridibunda* (особи № 1 и №2)

Наблюдаемые эффекты мы связываем с особенностями функционального состояния эритрона и эритропоза у отдельных особей.

Осмотическая стойкость эритроцитов лягушек опытной группы в точке максимальной гипотонии (0,2% раствор NaCl) выше на 20,90% по сравнению с контролем (рис. 12).



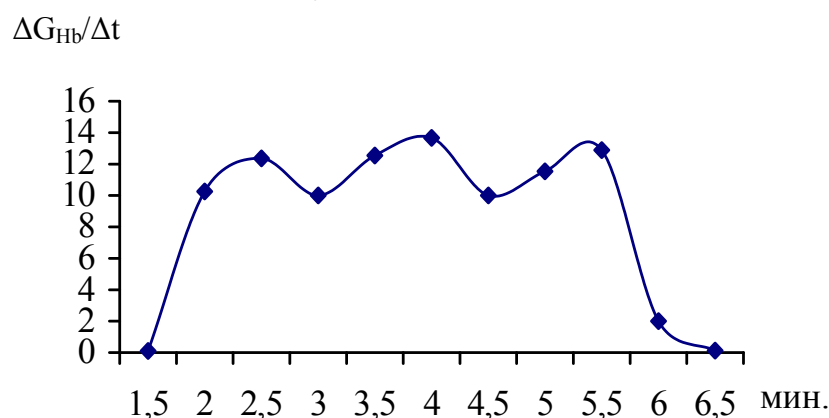
**Рис. 12.** Осмотическая резистентность эритроцитов лягушек под влиянием адрениновой и гипоосмотической нагрузок

Ускорение гемолитического процесса мы связываем со структурно-функциональными изменениями мембран под влиянием адренина, с ростом в эритроцитарной популяции процентной доли magnulocytus, имеющих большую

площадь поверхности и обладающих большим количеством сквозных гидрофильных пор, по которым вода диффундирует в клетку.

Таким образом, адреналиновая и гипоосмотическая нагрузки воздействуют на внутриэритроцитарный метаболизм, что приводит к изменению морфофункциональных характеристик эритроцитарной популяции, связанные с увеличением проницаемости мембраны и изменением механизмов трансмембранного переноса ионов, что отражается на морфометрических и биометрических индексах клеток, их стойкости к гемолитикам.

Тесты на резистентность, проведенные нами на птицах (петухи кросса «Иза Браун»), показали качественную разнородность эритроцитарной системы, обусловленную возрастными особенностями клеток. Кривая распределения эритроцитов по их стойкости в физиологических условиях полимодальна (рис. 13) и отражает одновременное присутствие в крови нескольких принципиально различающихся между собой популяций клеток.



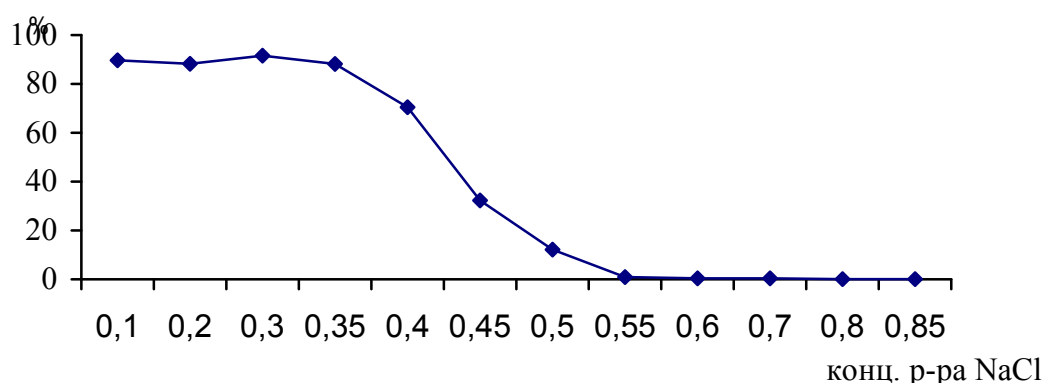
**Рис. 13. Дифференциальная кислотная эритрограмма петухов в физиологических условиях**

Анализ приведенной эритрограммы позволяет выделить три максимальных пика, которые отражают скорость гемолитического процесса и соотносятся со стойкостью клеток: максимум высокостойких клеток выявлен на 5,5-й мин, их  $12,89 \pm 2,74\%$ ; среднестойких — на 4-й мин, их  $13,67 \pm 2,74\%$ ; низкостойких клеток — на 2,5-й мин,  $12,36 \pm 2,16\%$  клеток. Точка начала гемолиза отмечается на 1,5-й мин, заканчивается процесс на 6,5-й мин. Ширина интервала гемолиза в физиологических условиях составляет 5,0 мин. Появление

нескольких максимумов – признак двойственного и неравномерного кроветворения [35], что мы связываем с особенностями новообразования эритроцитов у птиц и сохранением у взрослых особей черт эмбрионального кроветворения. Кроме того, для костномозгового эритропоэза птиц свойственно интраваскулярное происхождение. Основным источником образования эритроцитов – эндотелиальные клетки синусов костного мозга. Процессы созревания и дифференцировки эритроцитов происходят в просвете сосудов костного мозга [18].

Исследование возрастной динамики красных клеток крови птиц и млекопитающих методом построения эритрограмм выявило их общность, несмотря на морфологические различия клеток эритроидного ряда.

Тест на осмотическую резистентность эритроцитов дополняет данные анализа кислотных эритрограмм в наблюдаемой нами в физиологических условиях разновозрастной картине эритроцитарной популяции (рис. 14). Установлено, что критическая точка резистентности, т. е. концентрация NaCl, при которой еще не наблюдается полного разрушения клеток, как и у млекопитающих, соответствует 0,55% NaCl и отражает группу среднестойких эритроцитов. Границу минимальной резистентности определяют старые эритроциты, а максимальной – молодые [187, 188].



**Рис. 14.** Осмотическая эритрограмма петухов в физиологических условиях

Осмотическая резистентность, как установлено многими исследованиями, отражает проницаемость эритроцита по отношению к различным веществам и зависит от формы клетки и свойств мембраны [64]. Гипотоническое окружение

может провоцировать разрыв клеточной мембраны из-за механического повреждения. В физиологических условиях осмотическая стойкость клеток – величина достаточно постоянная, но может изменяться при старении клетки, повышении ее функциональной активности, в условиях патологии или дополнительных воздействий на организм [20]. Причем при низменных условиях существования клетки в качестве основной причины мембранного разрыва выступают не механические, а биохимические повреждения мембраны [226].

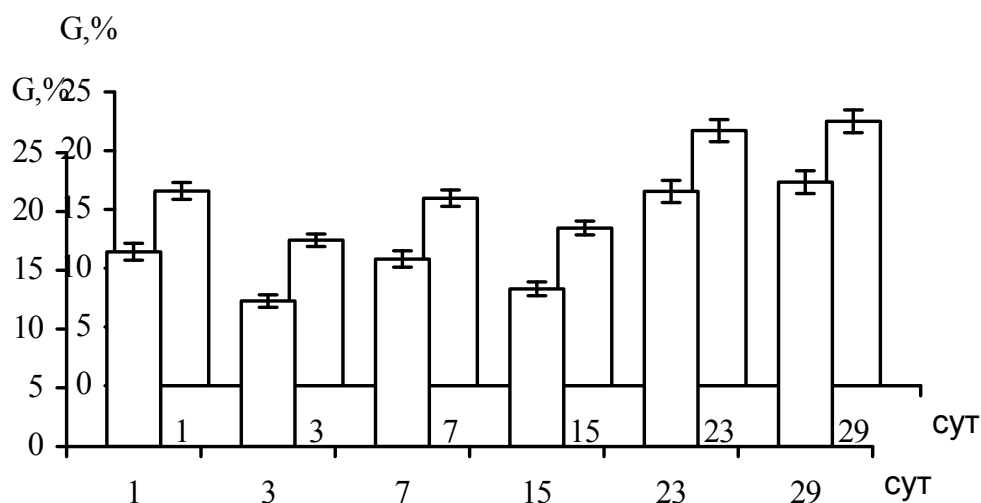
По нашим данным, у птиц в фоновых исследованиях 0,08% клеток эритроцитарной популяции дестабилизируются в физиологическом растворе (0,85% NaCl), и зона резистентности, характеризующая разницу между физиологическим раствором и точкой наименьшей резистентности, отсутствует. Поскольку процентная доля этих клеток ничтожно мала при анализе осмотических эритрограмм в физиологических условиях, за точку минимальной резистентности мы приняли клетки, устойчивые в 0,60% растворе NaCl, что составило 99,63% всех клеток. Максимальную гипотонию всех эритроцитов не происходит, и лишь в дистиллированной воде наблюдается полный гемолиз с образованием так называемой «лаковой» крови.

При воздействии стрессоров различной природы в кровотоке обнаруживаются клетки пониженной резистентности. Результаты наших свидетельствуют о развитии у птиц экстремального эритродиереза как стереотипной реакции системы красной крови на стрессоры, играющей важную роль в механизмах адаптации и компенсации при гипоксии, сопровождающей стресс реакции. В качестве модели физиологического стресса мы применили нейрогенный стресс – десинхроноз, создаваемый искусственным нарушением суточной периодики инверсией фотопериода (12С:12Т): 3-сут чередование 12-часовых периодов освещенности (с 20<sup>00</sup> до 18<sup>00</sup> ч) и затемнение (с 8<sup>00</sup> до 20<sup>00</sup> ч) и затем переводом птиц на естественный ритм освещенности [101, 141, 142]. Выбор этой модели обусловлен тем, что для птиц свет является доминирующим синхронизатором суточной ритмики процессов жизнедеятельности, и взрослые



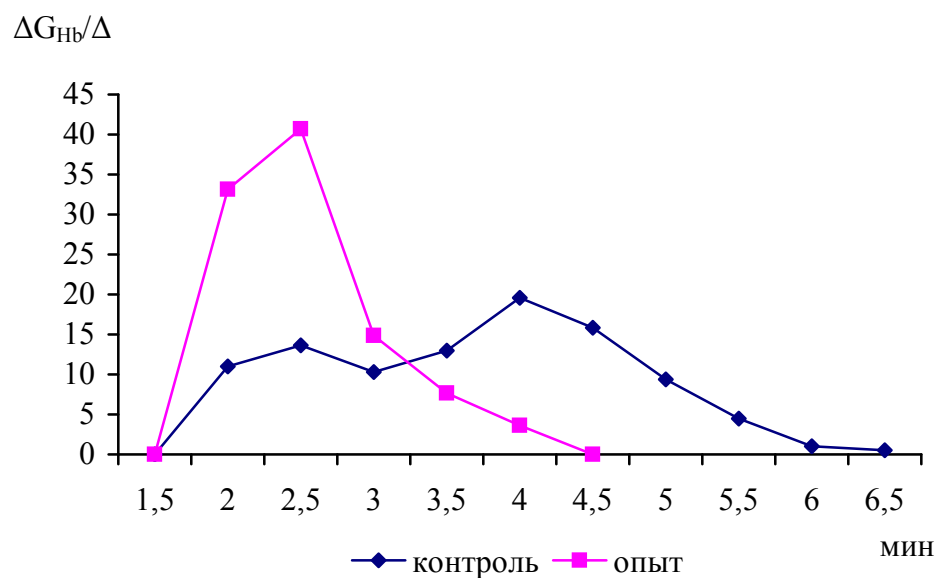
птицы обладают особо высокой чувствительностью к любым изменениям светового периода. Инверсия вызывает у птиц нарушение рефлекторной деятельности мозга, изменение гормонального гомеостаза, вегетативных и эмоционально-поведенческих реакций.

В процессе постстрессовой реабилитации (1-29-е сут) выявлен экстремальный эритродиерез, проявившийся поднятием левого крыла кислотной эритрограммы и ее укорочением, сокращением времени гемолиза, увеличением процентной доли клеток, не выдерживающих даже минимальной гипотонии (0,7% NaCl) (рис. 15) [105], не разрушаются лишь 33% клеток эритроцитарной популяции; остальные либо имеют дефекты в мембране, либо гемолизируются.

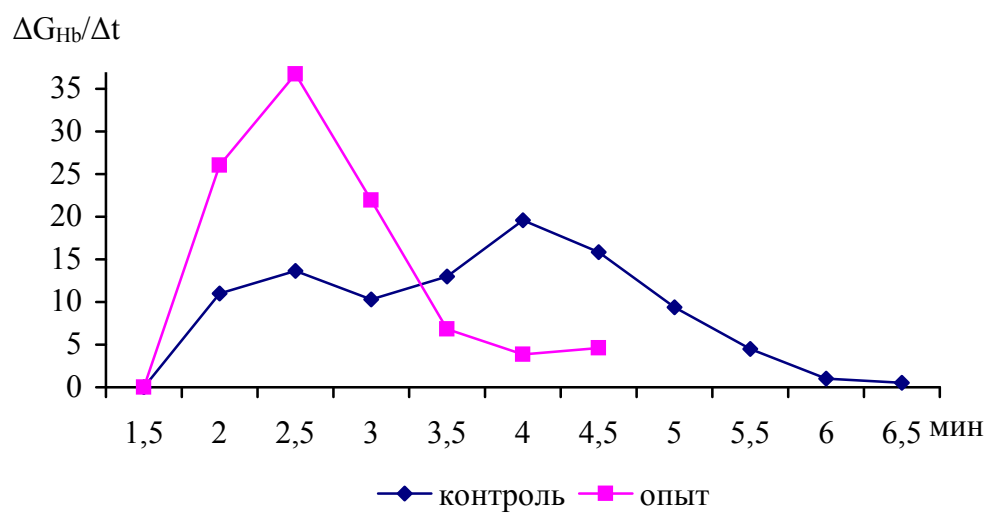


**Рис. 15.** Относительное количество гемолизированных клеток (% к контролю) в точке аутогемолиза (0,7% NaCl)

Кислотные эритрограммы характеризуют однофазность структурных изменений, обусловленных снижением барьера проницаемости для  $H^+$ -ионов, что выражается в смещении эритрограммы стрессируемой птицы левее контроля в первые 7 сут (рис. 16, 17). Следовательно, в постстрессовый период страдают белки мембран и в кровотоке присутствуют клетки с пониженной резистентностью [153, 154].



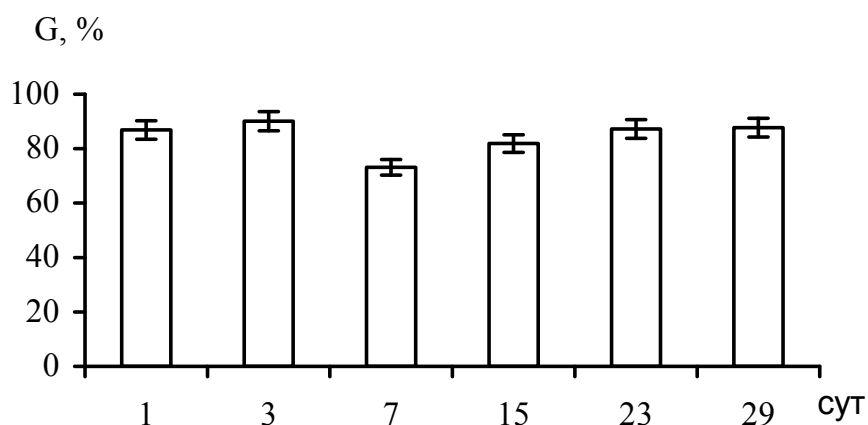
**Рис. 16.** Дифференциальные кислотные эритрограммы петухов на 1-е сут после хронофизиологической нагрузки



**Рис. 17.** Дифференциальные кислотные эритрограммы петухов на 7-е сут после хронофизиологической нагрузки

На 29-е сутки кислотная резистентность эритроцитов приближается к контрольной и восстанавливается белковый компонент мембран. Эффект нормализации отмечается на фоне повышения числа эритроцитов со скрытыми структурными нарушениями (до 84,74 % эритроцитов разрушаются в 0,55% NaCl, рис. 18) и высокой аутогемолитической активностью старых низкостойких эритроцитов (до 21% клеток разрушаются в 0,7% NaCl, см. рис. 15).

В первые 7 суток хронофизиологической адаптации мы выделяем инерционный период, при котором происходит накопление скрытых нарушений на фоне повышенной кислотной устойчивости (рис. 18), их проявление обнаруживается лишь спустя две недели (см. рис. 15).



**Рис. 18.** Относительное количество гемолизированных клеток (% к контролю) в критической точке резистентности (0,55% NaCl)

Как показали наши исследования [103, 104], стрессирование активирует костномозговое кроветворение и выброс в кровоток молодых пониженностойких форм клеток. Отсутствие высокостойких форм (см. рис. 16) обусловлено, с одной стороны, усилением гемолитических свойств крови, проявлением аутоиммунных реакций, с другой – продукцией менее совершенных в функциональном плане клеток при интенсивном эритропоэзе. Таким образом, подтверждается известная физиологическая закономерность о существовании механизмов, регулирующих не только количественный уровень, но и качество продуцируемых эритроцитов.

Пониженную стойкость эритроцитов птиц к гемолитическим воздействиям мы связываем с особенностями метаболизма у представителей этого класса животных. Известно, что межвидовые различия в содержании эритроцитов и их гемолитической стойкости представляют собой одну из форм адаптации организма к окружающей среде, сложившуюся в связи с особенностями экологии того или иного вида и оказавшуюся эволюционно более целесообразной, а потому и закрепленной в последующих поколениях [70, 81, 37]. Количество разрушенных эритроцитов зависит от их исходной генетически детерминированной резистентности [63, 148, 149].

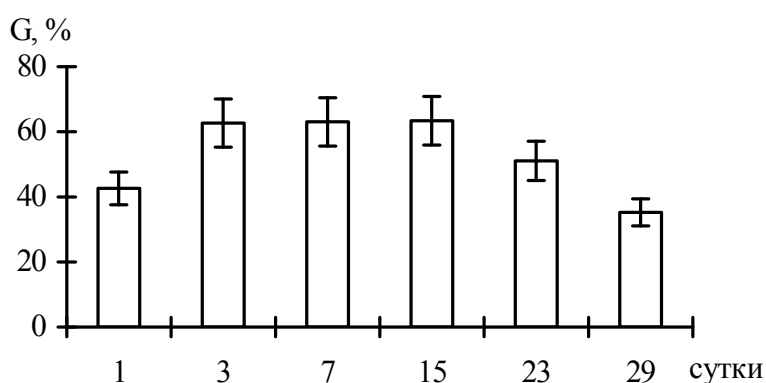
Осмотические эритрограммы позволили выявить в точке аутогемолитических процессов (0,7% NaCl) скрытые повреждения, вероятно, обусловленные стрессовыми пробоями в липидном бислое или изменениями в составе липидов биомембран, синтезированных в условиях стресс-эритропоэза. Данное предположение косвенно подтверждается результатами определения мочевинового гемолиза и сорбционной способности эритроцитов.

На 1-е сутки после стрессирования в различных концентрациях рабочего раствора мочевины проницаемость эритроцитарных мембран (ПЭМ) была повышенной по сравнению с контролем на 73-97%. О высокой повреждаемости мембран свидетельствует увеличение концентрации внеэритроцитарного (плазменного) гемоглобина (ВЭГ) на 70,26% ( $p < 0,001$ ), при этом сорбционные свойства эритроцитов (ССЭ), являясь показателем их восстановительной способности, снижались в пределах не достоверных с контролем различий (на 9,75%). По-видимому, при стрессе изменения в мембранной системе регуляции приводят к конформационным перестройкам в белково-липидном бислое, и мембрана становится жесткой [106].

В сосудистом русле на мембрану эритроцита влияет целый комплекс гуморальных факторов. Особое значение среди них имеет уровень гормонов и метаболитов. При стрессе у птиц происходит гипертрофия гипофизарно-надпочечниковой системы и повышенная секреция адаптивных гормонов – адренокортикотропного (АКТГ) и кортикостерона [146]; кортикостерон уже в

1-е сут стрессирования «заменяется» более активной формой – гидрокортизоном [1]. Кроме отмеченных гормонов в срочную защиту включается также симпатoadреналовая система (САС) – повышается тонус симпатического отдела ВНС и продукция катехоламинов. Росту уровня кортикостероидов в крови сопутствуют изменения картины крови, а катехоламинов – инициирует белковый катаболизм ферментных систем дыхания и гликолиза, что показано в исследованиях *in vitro* на эритроцитах млекопитающих животных [63]. Из метаболитов актуальны  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NO}$ , глюкоза. Уровень последней, как известно, при стрессе возрастает [102]. Гипергликемия сопровождается изменением молекулярного состава липидного бислоя мембраны эритроцитов: увеличиваются соотношение холестерол/фосфолипиды, содержание сфингомиелина и лизофосфатидилхинона, понижается концентрация фосфотадилэтаноламина, что приводит к увеличению жесткости мембраны и понижению деформабельности эритроцитов [31, 267].

Анализируя особенности ПЭМ можно отметить увеличение проницаемости мембраны в первые 15 сут реабилитационного периода (рис. 19).



**Рис. 19. Процент гемолизированных клеток относительно контроля при модификации 1,8% раствором мочевины**

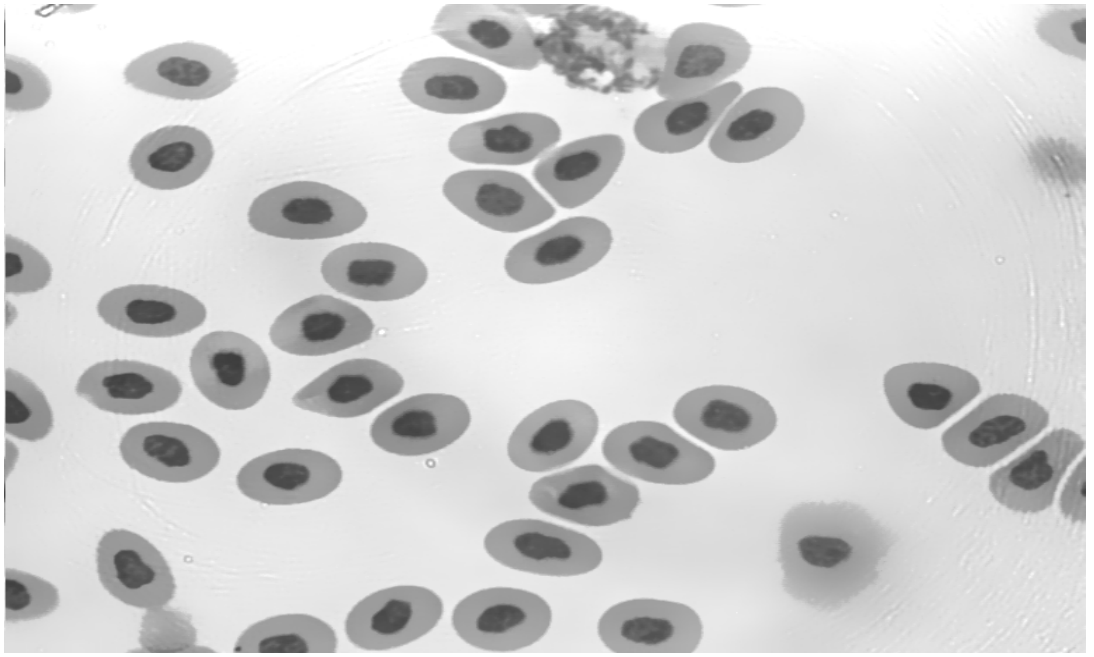
Наблюдаемый эффект можно связать с усилением метаболических процессов и активацией перекисного окисления липидов (ПОЛ) и белков (ПОБ) при адаптации к экстремальному воздействию. Адаптивные или повреждающие

эффекты в условиях целого организма реализуются опосредованно через мембранные системы клеток. Полагают, что интенсификация процессов СРО в первую очередь оказывает влияние на эритроцитарные мембраны (рис. 20), что подтверждается результатами исследования осмотической резистентности эритроцитов в присутствии сывороток различной степени окисленности [156].

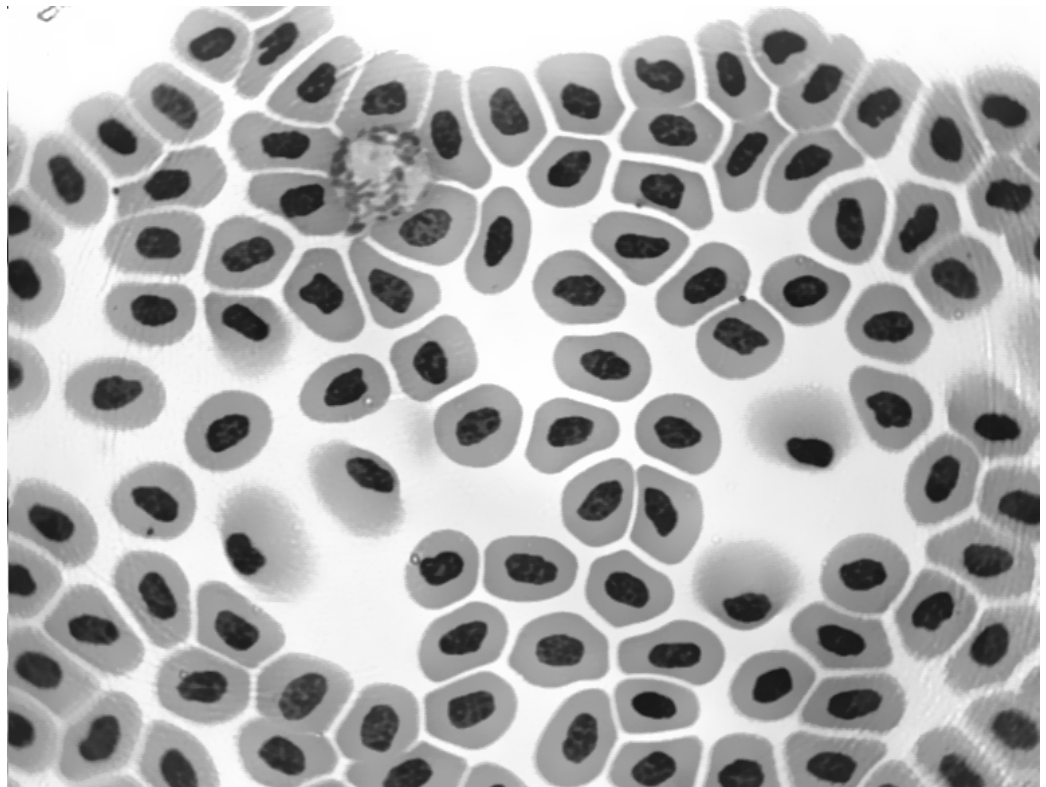
Не исключается также, что стрессовые воздействия приводят к сдвигам в функциональной активности мембран, которые сопровождаются конформационными перестройками в структуре их жирнокислотного состава. Показано, что чем больше в мембране ненасыщенных жирных кислот, тем она более стойкая, при этом жирные кислоты в молекулах фосфолипидов – самые быстро обновляемые компоненты, их синтез находится под генетическим контролем и зависим от воздействий внешней среды [65].

Таким образом, неспецифический адаптационный синдром клеточной системы (АСК) на примере эритроцитарной популяции у петухов проявляется в увеличении ПЭМ, снижении ССЭ и росте ВЭГ в первые 7 сут адаптации и играет важную роль в создании предпосылок в формировании срочной адаптации к возникающей в организме гипоксической ситуации. При повышенной функциональной нагрузке на эритроциты в экстремальных условиях происходит изменение барьерной функции мембраны, в частности активация фосфолипаз и ПОЛ мембран способны нарушить гомеостаз и биоэнергетику эритроцитов, усилить процессы деструкции клеток и элиминации из кровотока низкоустойчивых популяций [63].

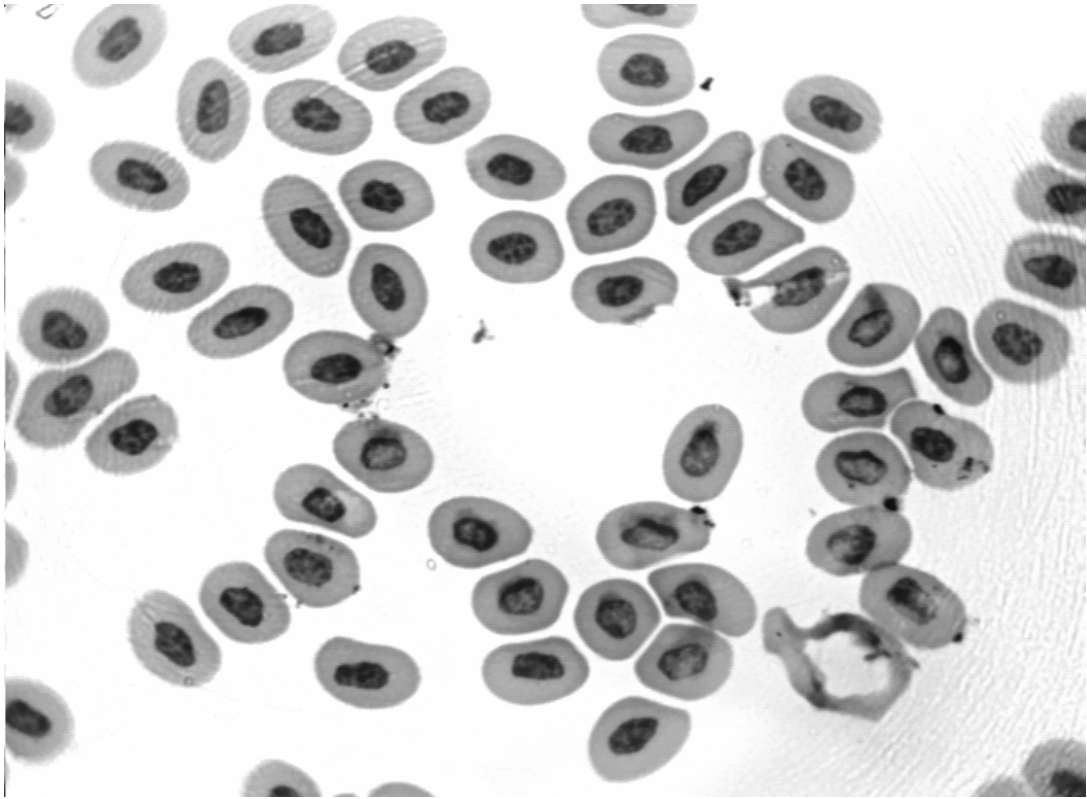
Под влиянием стрессового воздействия сдвиги в системе эритрона обнаруживаются в форме функциональной неоднородности различных субпопуляций клеток. Первоначально адаптивная реакция проявляется в изменении общей функциональной способности системы на фоне тонкой регуляции ее функций, которая находится под жестким физиологическим (нейрогуморальным) контролем.



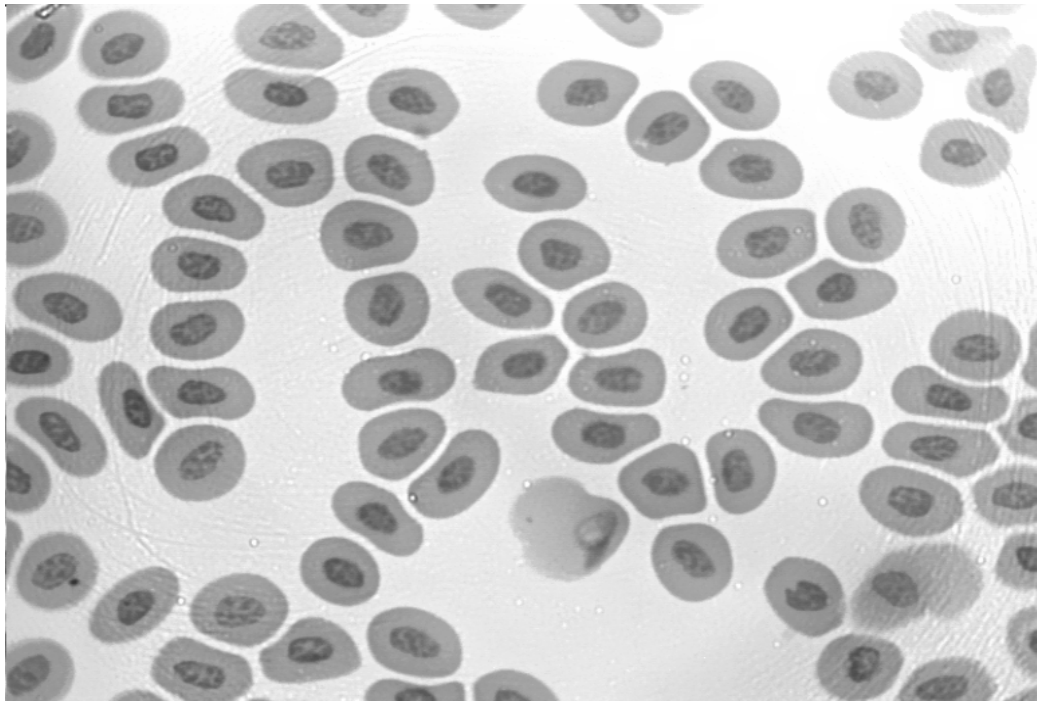
a)



b)



в)



г)

**Рис. 20. Стадии гемолитического процесса в эритроцитарной популяции у петухов:**

а) – начало предгемолитической стадии – изменение формы клетки вследствие нарушения осмотического давления внутренней среды; б) – смещение ядер и нарушение геометрического профиля клетки под влиянием нарастающей гипотонии; в) – смещение ядер и частичное разрушение мембраны клеток вследствие нарушения осмотического давления внутриклеточной среды; г) – полное разрушение клетки (Увеличение 1600).



На начальном этапе адаптации к внешним экстремальным воздействиям реализуется срочный, но не совершенный набор защитно-компенсаторных реакций, который поддерживает адекватную жизнедеятельность за счет усиленного использования функциональных резервов.

Так, после 3-сут инверсии светового режима в ходе 29-сут адаптации в системе крови нами установлены:

1) регенераторная реакция, проявляющаяся в увеличении концентрации эритроцитов, гемоглобина и показателя гематокрита в 1-е сут адаптационного периода. На 23-е сут процессы носили стабилизирующий характер, что привело к снижению количества эритроцитов на фоне роста гемоглобина, гематокрита и содержание гемоглобина в эритроците;

2) устойчивая тенденция увеличения размеров клеток с нарастанием их гиперхромности;

3) активация эритропоэза и поступление в кровоток незрелых форм эритроцитов – продукция ретикулоцитов возрастает на 66,31% ( $p < 0,001$ ) с укороченным (до  $1,93 \pm 0,25$  ч) периодом полувыведения их из кровотока;

4) усиление (в 1-е сут адаптационного периода) процессов эритродиереза и развитие гемолитической ситуации, присутствие в кровотоке низкостойких форм (на кислотных эритрограммах – поднятие левого крыла). Омоложение состава крови начинается на 15-е сут последствия хронофизиологической нагрузки (на эритрограмме – поднятие правого крыла);

5) рост проницаемости эритроцитарных мембран, внутриэритроцитарного гемоглобина и снижение сорбционной способности эритроцитов в первые 7 сут реабилитационного периода.

Особенности генеза ответной реакции системы крови при стрессе зависят от характера стрессирующих воздействий.

В качестве модели хронического стресса мы использовали перегруппировку и увеличение плотности посадки в клетках до  $570 \text{ см}^2$  на голову (зоосоциальный стресс). Неизбежными последствиями перенаселения (скученности) являются накопление газообразных продуктов

жизнедеятельности и нарушение кондициональных условий, вызывающих интоксикацию организма метаболитами продуктами жизнедеятельности, и гипокинезия, которой сопутствуют многогранные изменения в различных системах, прежде всего в сердечно-сосудистой и дыхательной, осуществляющих транспорт кислорода и метаболитических продуктов. В условиях гипоксии активируются обменные процессы, возрастает кислородный запрос, инициируются нервно-гуморальные механизмы регуляции и организм, таким образом, оказывается в новых условиях дыхания, при этом максимальная нагрузка возлагается на систему красной крови.

При хронической гипоксии адаптация сопровождается изменением содержания гемоглобина и его свойств, интенсивности дыхания и анаэробного гликолиза [8, 9], изменяются геометрия и реология красных клеток крови, играющих решающую роль в транспорте респираторных газов [52,82, 106, 120]. В этих условиях понижается активность каталазы эритроцитов и, таким образом, облегчается проявление эндогенной перекиси водорода, вызывающей окислительное разрушение гемоглобина, образование телец Гейнца, эритродиерез (помимо клеток, запрограммированных на быструю гибель [123]), в результате которого образуются продукты распада эритроцитов, инициирующих эритропоэз [187].

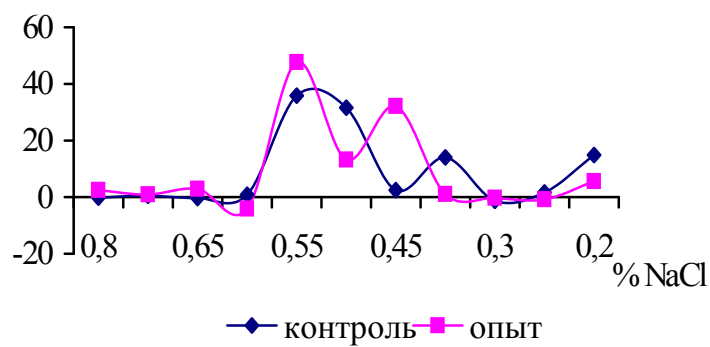
Длительное стрессирование нарушает динамическое равновесие в системе эритрона.

Данные анализа кислотных и осмотических эритрограмм демонстрируют усиление процессов эритродиереза уже на 2-е сут стрессирования. Сокращение в подопытной группе птиц ширины интервала гемолиза (до 3 мин, в контроле – 4 мин), а также увеличение скорости гемолитического процесса (на 27,26%;  $p > 0,05$  на 2-й мин) соответствуют относительному увеличению в периферической крови старых и/или физиологически изношенных клеток вследствие количественного снижения эритропоэза или сокращения жизненного цикла эритроцитов. Архитектура кислотной эритрограммы –

поднятие левого крыла – свидетельствует о снижении барьера для  $H^+$ -проницаемости и повреждении мембранных белков.

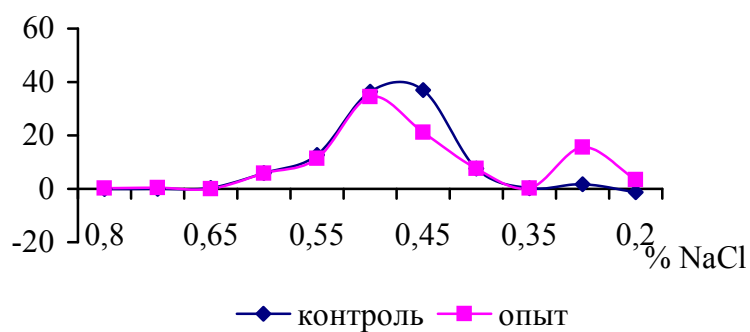
На осмотической эритрограмме через 48 ч от начала стрессирования скорость гемолитического процесса в критической точке резистентности у подопытной птицы выше, чем у контрольной (рис. 21, а), а смещение второго максимума влево (в сторону меньшей стойкости) свидетельствует о снижении резистентности юных эритроцитов на фоне смещения вправо (в сторону большей стойкости) – среднестойких клеток. Эти процессы приводят к регистрации одновершинной кривой на 3-и сут, отражающей однородность эритроцитарной популяции (рис. 21, б).

$\Delta G_{\text{НВ}}/C$



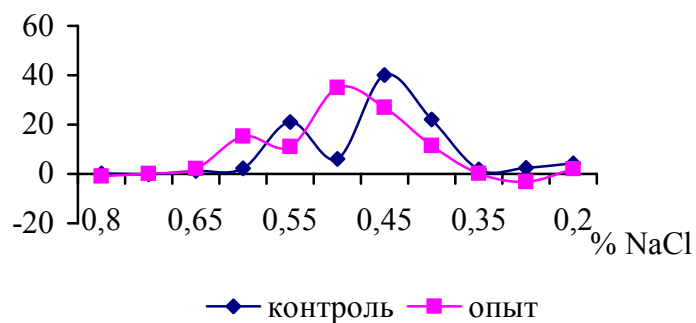
$\Delta G_{\text{НВ}}/C$

а)



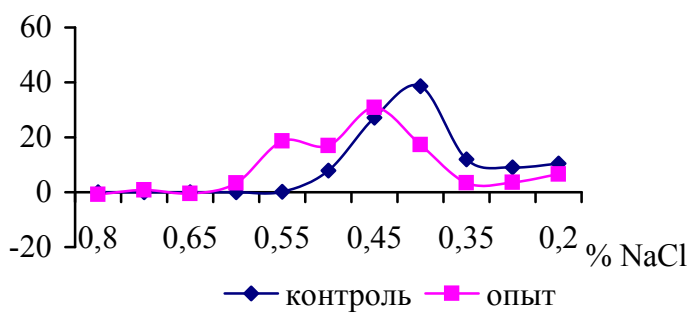
$\Delta G_{\text{НВ}}/C$

б)

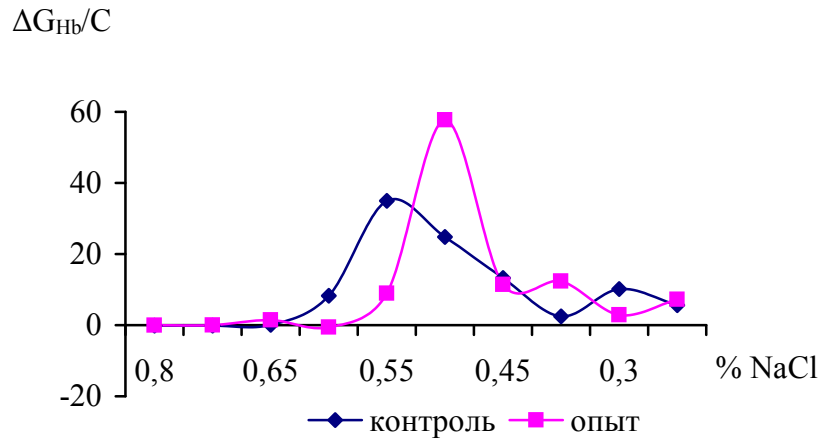


$\Delta G_{\text{НВ}}/C$

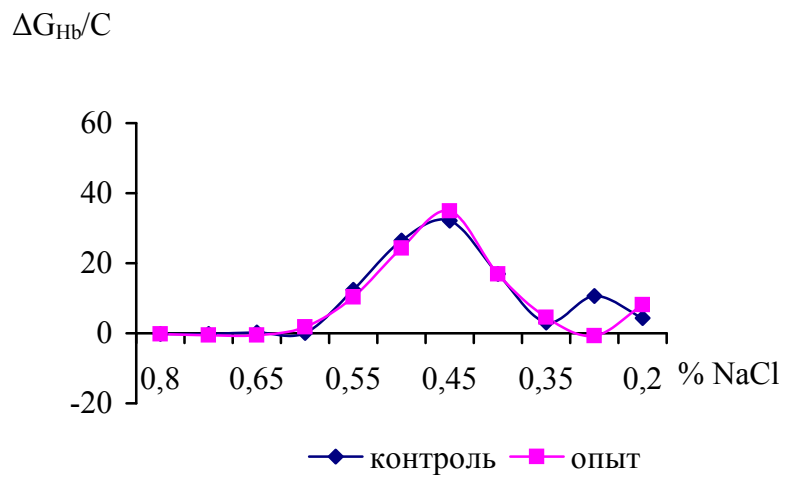
в)



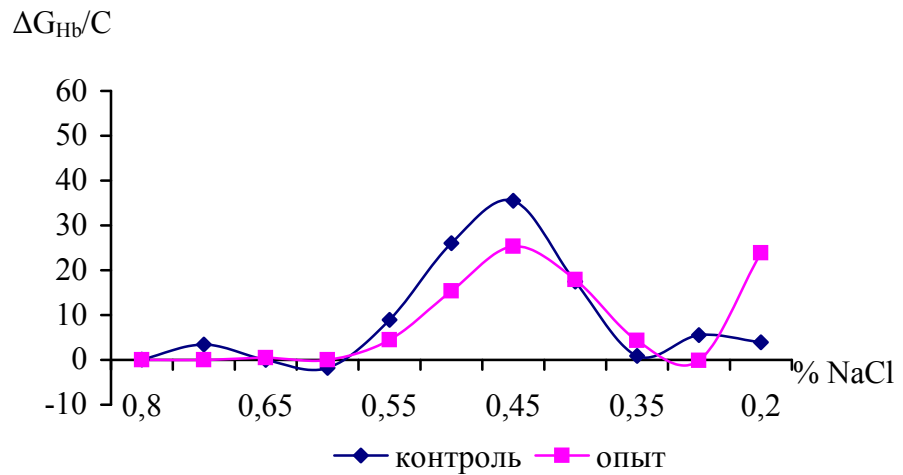
г)



д)



е)



ж)

**Рис. 21.** Дифференциальные осмотические эритрограммы пегухов на 2-е сутки (а), 3-е (б), 7-е (в), 10-е (г), 15-е (д), 23-е (е) и 29-е сутки (ж) непрерывного стрессирования.

В последующие сутки наблюдаются смещение осмотических кривых в сторону повышностойких клеток и омоложение популяции (см. рис. 21, в-ж). На 3-и сут стрессирования ширина интервала кислотного гемолиза у подопытных птиц возрастала на одну минуту, при этом максимальная скорость гемолиза на 13,4% ( $p > 0,05$ ), а среднее время гемолиза на 0,25 мин были выше, чем в контроле.

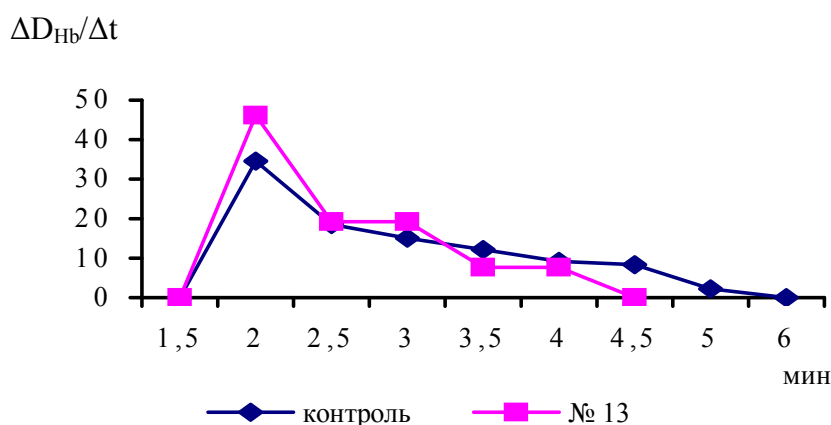
Сдвиг кислотных и осмотических эритрограмм влево демонстрирует наличие большого процента низкостойких форм и позволяет выявить изменения качественного состава красной крови, позволяющие характеризовать уровень и соотношение процессов эритропоэза и эритродиереза и дифференцировать эритроциты по их физиологическому возрасту.

Отсутствие в условиях экстремального эритродиереза на кислотной эритрограмме высокостойких форм клеток (при интенсификации эритропоэза) мы объясняем ускоренным созреванием эритроидных клеток, сопутствующим всякой значительной активации эритропоэза. При напряженном эритропоэзе эритроидные клетки у птиц созревают ускоренно и даже перескакивают этапы при терминальных делениях [89]. В итоге продуцируются популяции эритроцитов, отличающихся по своим морфологическим, биохимическим и биофизическим свойствам от нормальных, что приводит к ускоренной их разрушаемости.

При моделировании стресса в экспериментальных условиях отчетливо прослеживается варибельность эффектов у подопытных животных. Выраженность психоэмоционального напряжения коррелирует с эмоциональной реактивностью животных и особенностями их высшей нервной деятельности. М.М. Хананашвили (1987) отмечает, что ограничение двигательной активности животных ведет к развитию информационного невроза, более того, высшие животные (обезьяны, собаки) в этих условиях стремятся к самостимуляции отдельных структур мозга (латерального гипоталамуса), способствующих повышению резистентности организма (и систем) к стрессирующим воздействиям.

Птицы (даже одного вида) также обладают неодинаковой устойчивостью к воздействию стресс-факторов, проявляемой в особенностях поведения и выраженности функционирования системы гипофиз – кора надпочечников: у одних особей в крови быстро нарастает уровень адренокортикотропного гормона (АКТГ), кортикостероидных гормонов, и наступает гипертрофия коры надпочечников, инволюция тимико-лимфатической системы; у других – гормональные реакции на те же самые стресс-воздействия выражены слабее. В связи с этим различают птиц чувствительных и устойчивых к стрессу. Устойчивые к стрессу птицы способны переносить воздействия большей интенсивности и продолжительности, чем стресс-чувствительные [19].

Индивидуальная реакция на стрессирование особенно была выражена у петуха № 13. На 3-и сут наблюдалось угнетение эритропоэза: продукция ретикулоцитов понизилась на 26,11%, время их созревания увеличилось до 15,05 ч, а костномозговая продукция сократилась на 68,79%. На кислотной эритрограмме интервал гемолиза составлял 2,5 мин (в контроле – 3 мин), максимальная скорость гемолиза отмечалась на 2-й мин (52,73%) и лишь незначительное количество среднестойких форм (1,82%) разрушалось на 4-й мин (рис. 22).



**Рис. 22. Кислотная эритрограмма петуха № 13 на 3-и сутки стрессирования**

Угнетение эритропоэза у петуха № 13 мы рассматриваем как компенсаторно-приспособительную реакцию, направленную на сохранение гомеостаза: эритроцитоз в условиях скученности и недостатка воды мог бы спровоцировать ухудшение реологических свойств крови. Рассмотренный

механизм отражает проявление нейрогуморального контроля деятельности различных органов, в частности, регуляцию ритмики регенераторных процессов, то есть настройку и установку их на темп и интенсивность, необходимые в каждый конкретный момент в интересах самосохранения организма [165]. Одновременно особь № 13 более остро испытывает влияние хронического стресса в связи с повышенной нагрузкой и быстрой изнашиваемостью эритроцитов на фоне замедленного эритропоза.

К концу эксперимента (29-е сут) у этой особи наблюдались повышение длительности функционирования эритроцитов (период полувыведения красных клеток из кровотока составил «рекордное» время – 214,3 сут), удлинение времени созревания ретикулоцитов (до 10,03 ч) и снижение костномозговой продукции (до 1261,06 тыс·мкл·сут<sup>-1</sup>), что отражает перенапряжение всей системы компенсаторных механизмов: нарушение гомеостатической регуляции и срыв процесса адаптации.

Таким образом, накопленный фактический материал позволяет сделать вывод о том, что в основе мембранной проницаемости эритроцитов для ионов эволюционно различно организованных животных лежат одни и те же механизмы. Главнейшим выступают селективная проницаемость мембраны для ионов и стабилизация клеточного объема. При этом различное положение животных в филогенетическом ряду предопределяет разную степень реактивности клеток эритроидного ряда на возмущающие воздействия. Независимо от степени организации животного первоначальный стереотипный механизм на стрессовое воздействие связан с понижением резистентности эритроцитов.

### **2.2.3. Метаболизм эритроцита. Метаболизация глюкозы.**

Клетки эритроидного ряда в процессе развития претерпевают не только структурные, но и метаболические превращения (табл. 8). Эритроциты при созревании утрачивают митохондрии, а, следовательно, и ферменты системы аэробного окисления пирувата, и, углеводный обмен переключается на



анаэробный. Гликолиз в эритроцитах даже в аэробных условиях всегда завершается образованием лактата.

Таблица 8

**Состояние обменных процессов в клетках эритроидного ряда млекопитающих [161]**

Строение и метаболизм	Нормобласт	Ретикулоцит	Эритроцит
<i>Структура:</i>			
<i>ядро</i>	+	0	0
<i>митохондрии</i>	+	+	0
<i>микросомы</i>	+	+	0
<i>Синтез нуклеиновых кислот:</i>			
ДНК	+	0	0
РНК	+	+	0
<i>Синтез:</i>			
<i>протеина</i>	+	+	0
гема	+	+	0
липидов	+	+	0
<i>Обмен углеводов:</i>			
глюкозо-монофосфатный шунт	+	+	+
цикл Эмбдена-Мейергофа	+	+	+
цикл Кребса	+	+	0
цитохромная система	+	+	0

Зрелый эритроцит человека и высших млекопитающих животных не способен синтезировать белки (т.к. отсутствует ядро и рибосомы), нуклеиновые кислоты и липиды, метаболизировать пируват в цикле лимонной кислоты. Тем не менее, эритроцит метаболически активен.

Биохимические реакции, протекающие в зрелых эритроцитах, обеспечивают нормальное функционирование гемоглобина и выполнение основной функции клетки – транспорт кислорода. В процессе метаболизма в эритроцитах происходят генерирование АТФ, образование и разрушение фосфатных эфиров, окисление и восстановление никотинамидадениновых нуклеотидов. В эритроцитах синтезируется ряд веществ, важных для жизнедеятельности клетки, например, глутатион, который обеспечивает окислительно-восстановительный статус в клетке и поддерживает в активном состоянии ряд ферментных систем [113].

В физиологических условиях эритроциты человека и большинства животных утилизируют как источник энергии только глюкозу. Глюкоза

проникает в эритроцит с помощью переносчика, расположенного в мембране и не зависит от инсулина. Концентрация глюкозы во внутриэритроцитарной среде такая же, как и в плазме крови. Диффузия глюкозы в эритроцит не является лимитирующим фактором ее утилизации. Лишенный глюкозы, эритроцит погибает: утрачивает способность поддерживать градиент  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  на мембране, накапливает метгемоглобин и окисленный глутатион (особенно при окислительном стрессе), не генерирует АТФ [14, 15, 91, 176, 189, 198].

Кислородная потребность эритроцитов по сравнению с ядерными клетками эритроидного ряда снижена приблизительно в 10 раз. Это объясняется отсутствием в нормоцитах цитохромной системы. В процессе анаэробного гликолиза из одной молекулы глюкозы в эритроците синтезируются две молекулы АТФ и две молекулы молочной кислоты:



Несмотря на малую энергетическую эффективность гликолиза, в эритроцитах он обеспечивает потребность клеток в энергии. Энергия, освобождаемая при метаболизме глюкозы, расходуется для поддержания формы клеток, процесса активного транспорта катионов через клеточную мембрану, предотвращения окисления гемоглобина в метгемоглобин, для синтеза глутатиона.

При обеднении среды АТФ изменяется форма эритроцитов: поверхность их покрывается шипами (спикулами), клетки превращаются в эхиноциты, затем сфероциты и в конечном итоге подвергаются осмотическому лизису.

В эритроците глюкоза метаболизируется по двум основным путям: прямом гликолитическом (путь Эмбдена-Мейергофа) и в пентозомонофосфатном (табл. 9).

Таблица 9

**Функции основных путей метаболизма глюкозы в эритроците [15]**

Путь Эмбдена-Мейергофа $\text{Г-6-Ф} \longrightarrow \text{лактат}$	Пентозомонофосфатный путь $\text{Г-6-Ф} \longrightarrow \text{CO}_2 + \text{пентоза} + \text{триоза и т.д.}$
$\text{АДФ} \longrightarrow \text{АТФ}$ ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -насос)	

$\text{НАД} \rightarrow \text{НАД}\cdot\text{Н}$ (восстановление MetHb)	$\text{НАДФ}^+ \rightarrow \text{НАДФ}\cdot\text{Н}$ (восстановление GSSG и сульфидных связей в белках)
$1,3\text{-ДФГ} \rightarrow 2,3\text{-ДФГ}$ (регуляция кислородной диссоциации)	Гексоза $\rightarrow$ пентоза (подготовка субстратов для синтеза нуклеотидов)

В пути Эмбдена-Мейергофа до 90% глюкозы катаболизируется до пирувата или лактата. Основное количество образующейся энергии запасается в виде макроэргического фосфата – АТФ, обеспечивающего превращение НАД<sup>+</sup> в НАД·Н, образуя коэнзим, который восстанавливает метгемоглобин до гемоглобина. В этом пути синтезируется важнейший модулятор сродства гемоглобина к кислороду – 2,3-дифосфоглицератфосфат (2,3-ДФГ). Снижая сродство гемоглобина и кислорода, 2,3-ДФГ стабилизирует дезоксигенированную форму гемоглобина.

Пентозомонофосфатный путь, как альтернативный гликолизу путь окисления глюкозы, значительно отличается от последнего: окисление глюкозы осуществляется на первой стадии, и в ней участвует не НАД, как в гликолизе, а НАДФ; один из продуктов – CO<sub>2</sub>, который в реакциях гликолиза не образуется; пентозомонофосфатный путь не генерирует АТФ; в реакциях восстановительного синтеза НАДФ используется восстановленный глутатион.

В пентозомонофосфатном пути (ПМФП) в физиологических условиях потребляется около 10% метаболизируемой глюкозы. На его начальном этапе обязательно присутствие кислорода. Скорость метаболизма в ПМФП контролируется наличием НАДФ<sup>+</sup>. При окислительном стрессе НАДФ·Н окисляется до НАДФ<sup>+</sup> и потребление глюкозы эритроцитом увеличивается.

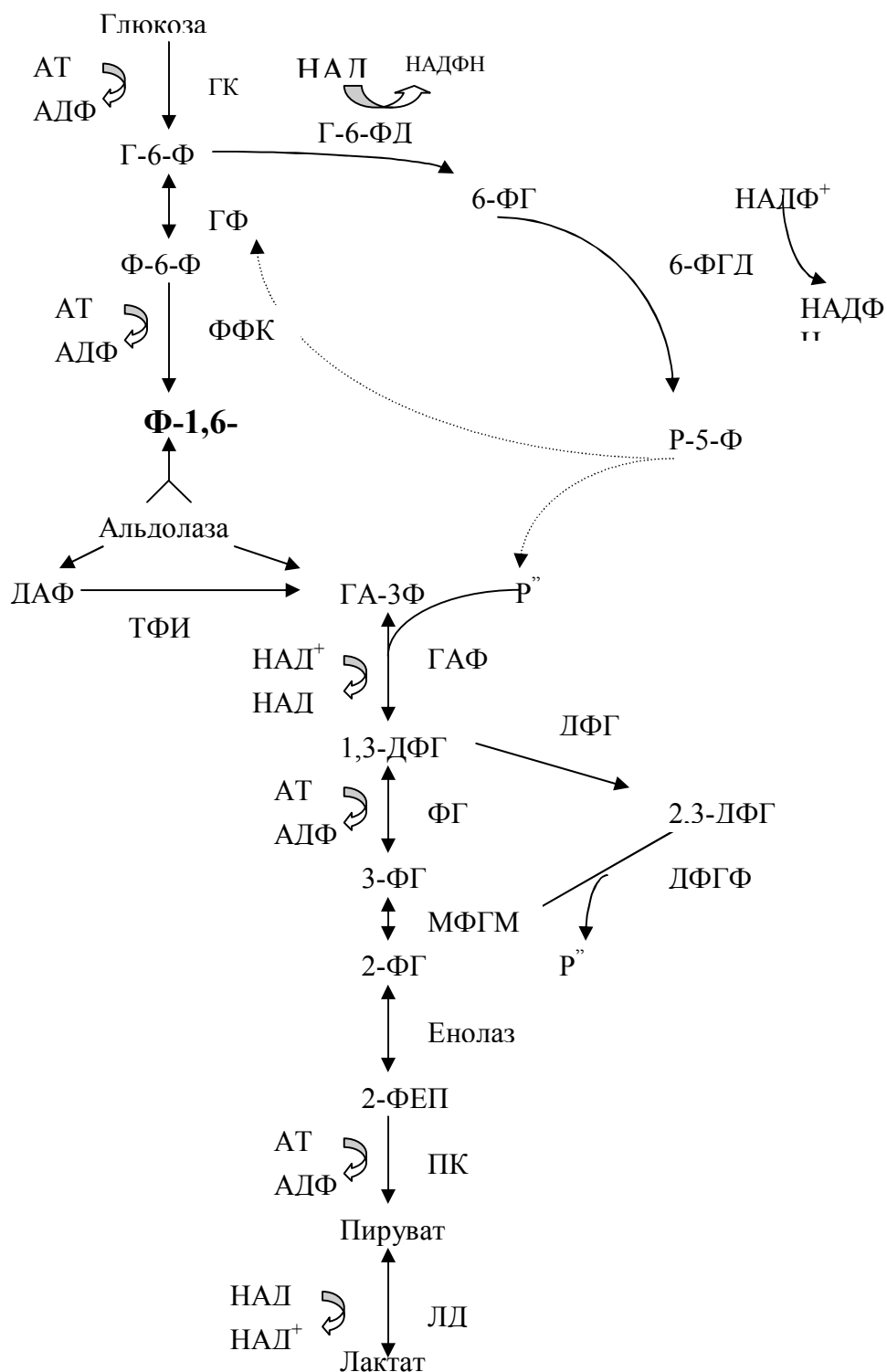
Главнейшая функция ПМФП – поддержание НАДФ<sup>+</sup> в его восстановленной форме – НАДФ·Н. Этот коэнзим необходим для поддержания в восстановленной форме глутатиона, играющего важную роль в защите эритроцита от перекисного повреждения. При восстановлении НАДФ<sup>+</sup> до НАДФ·Н первый углерод глюкозы окисляется до CO<sub>2</sub>, и образуется пентоза. В эритроците пентоза используется для синтеза нуклеотидов или (в ходе дальнейшего метаболизма) для образования трех- и шестиугольных сахаров –

основных метаболитов пути Эмбдена-Мейергофа. Таким образом объединяются оба пути метаболизма глюкозы: глюкоза, проходящая через ПМФП, после пересечения с прямым гликолитическим путем обмена глюкозы (путь Эмбдена-Мейергофа) частично может использоваться для образования АТФ и 2,3-ДФГ.

*2.2.3.1. Прямой гликолитический путь обмена глюкозы (путь Эмбдена-Мейергофа).* На первом этапе гликолитического обмена глюкоза фосфорилируется гексокиназой до глюкозо-6-фосфата (Г-6-Ф). Для осуществления реакции необходимы АТФ (донор фосфора) и  $Mg^{2+}$  (кофактор). Г-6-Ф занимает важнейшее положение в области стыковки в эритроците двух путей: гликолиза (путь Эмбдена-Мейергофа) и пентозомонофосфатного (рис. 23).

Вторая стадия в пути Эмбдена-Мейергофа – изомеризация Г-6-Ф до фруктозо-6-фосфата (Ф-6-Ф) при участии глюкозофосфатизомеразы (ГФИ) (фосфогексоизомеразы). «Обращение» глюкозофосфатизомеразной реакции ответственно за «рециклирование» Г-6-Ф, которая входит в ПМФП.

Третья стадия в пути Эмбдена-Мейергофа – еще одно фосфорилирование Ф-6-Ф осуществляемое АТФ до фруктозо-1,6-дифосфата (Ф-1,6-ДФ), оно катализируется фосфофруктокиназой (ФФК). В эритроците эта реакция необратима (в физиологических условиях) и представляет собой наиболее существенную стадию в гликолизе.



**Рис. 23. Основные пути метаболизма эритроцита [15]**

*Примечание: здесь и далее обозначения см. в списке сокращений.*

Четвертая стадия состоит в расщеплении Г-1,6-ДФ с образованием глицеральдегид-3-фосфата (ГАФ) и дигидрооксиацетонфосфата (ДАФ). Это превращение катализируется альдолазой. В эритроците ГАФ и ДАФ находятся

в равновесии благодаря двум ферментам –  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназе и трифосфатизомеразе (ТФИ) (фосфотриизомераза).

ГАФ находится на «столбовом» пути гликолиза и непрерывно превращается в нестабильный интермедиат – 1,3-дифосфоглицерат (1,3-ДФГ). Реакция обратима, катализируется глицеральдегидфосфатизомеразой (ГАФД) и нуждается в присутствии неорганического фосфата. В эритроците это единственная метаболическая стадия, в которой неорганический фосфат включается в сахара. При этом НАД<sup>+</sup> восстанавливается, выступая в роли акцептора электрона (пятая стадия).

1,3-ДФГ может метаболизироваться с фосфоглицераткиназой (ФГК). Окончательный результат реакции – образование 3-фосфоглицериновой кислоты (3-ФГ) и 2,3-ДФГ (шестая стадия).

В эритроцитах млекопитающих имеется фермент, позволяющий направлять процесс в обход стадии, катализируемой фосфоглицераткиназой (ФГК); при этом свободная энергия высокоэнергетического фосфата в молекуле 1,3-дифосфата, рассеивается в форме теплоты. Дополнительный фермент – дифосфоглицератмутаза катализирует превращение 1,3-дифосфоглицерата в 2,3-дифосфоглицерат, который в свою очередь превращается в 3-ФГ при участии 2,3-дифосфоглицератфосфотазы (этой активностью обладает фосфоглицератмутаза).

На этой стадии не происходит синтеза АТФ, поскольку «теряется» высокоэнергетический фосфат. Преимущества этой особенности заключаются в том, что гликолиз в эритроците может продолжаться при минимальных потребностях в АТФ. Образующийся 2,3-дифосфоглицерат связывается с гемоглобином, понижает его сродство к кислороду, и таким образом, кривая диссоциации оксигемоглобина сдвигается вправо. Следовательно, присутствие 2,3-ДФГ в эритроците способствует диссоциации кислорода из оксигемоглобина и переходу его в ткани [14, 15].

Эритроцит характеризуется высокой концентрацией 2,3-ДФГ (~4мМ) – другие клетки тканей организма содержат лишь следовые количества этого соединения. 2,3-ДФГ играет общую роль в качестве кофактора при превращении 3-фосфоглицерата в 2-фосфоглицерат, осуществляемой фосфоглицератмутазой.

В эритроците под влиянием монофосфоглицеромутазы (МФГМ) осуществляется перенос фосфата из третьего положения 2,3-ДФГ на второй атом углерода в 3-ФГ. При этом 2,3-ДФГ регенерирует, а вместо 3-ФГ образуется 2-ФГ (седьмая стадия). В клетке 2-ФГ находится в равновесии с фосфоенолпируватом (ФЕП); реакция дегидратации катализируется енолазой (восьмая стадия). ФЕП служит донатором фосфата для АДФ на второй стадии АДФ в гликолизе эритроцитов; реакция протекает с участием пируваткиназы (ПК) (девятая стадия).

Пируват, образующийся в пируваткиназной реакции, может диффундировать из эритроцита в плазму или переходить в лактат с помощью лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (десятая стадия). Этот процесс зависит от внутриэритроцитарного отношения НАД·Н/НАД<sup>+</sup> и рН: при избытке НАД·Н и пониженном значении рН пируват восстанавливается до лактата, который приходит в равновесие с лактатом плазмы крови.

Развитие пятой и шестой стадии пути Эмбдена-Мейергофа зависит от уровня метаболитов в эритроците. Например, 2,3-ДФГ ингибирует дифосфоглицератмутазную реакцию, понижая таким образом синтез 2,3-ДФГ, т. е. проявляется саморегуляция синтеза и уровня 2,3-ДФГ в эритроците. Аналогично действуют Н<sup>+</sup>, отводя 1,3-ДФГ в фосфоглицераткиназную реакцию [14, 15, 176].

Большая часть гликолитических реакций обратима. Реакции, катализируемые гексокиназой, фосфофруктокиназой и пируваткиназой, являются экзергоническими и физиологически необратимыми.

Существует мнение, что 2,3-ДФГ служит резервом гликолитических процессов. Он используется при прохождении эритроцитов через те участки

кровенного русла, где возникает относительный недостаток глюкозы, в частности, в селезенке [161].

Гликолиз в эритроците контролируется в основном гексокиназой и фосфофруктокиназой. Дефицит этих ферментов, а также ГФИ, ФФК, ТФИ,ДФГМ, ПК является причиной развития наследственной несфероцитарной гемолитической анемии.

Большая часть энергии в эритроцитах расходуется на поддержание функциональной активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -насоса и сохранение объема и формы клеток. Поддержание двояковогнутой формы эритроцита обусловлено состоянием глутатионредуктазной системы, которая реализуется в рамках метаболического пентозомонофосфатного пути.

*2.2.3.2. Пентозомонофосфатный путь. Метаболизм глутатиона.* Пентозомонофосфатный путь, называемый также пентозным или гексозомонофосфатным шунтом, расходится с прямым гликолитическим путем обмена глюкозы на уровне глюкозо-6-фосфата и после дегидрогенирования и декарбоксилирования продуцирует пентозофосфаты, которые затем превращаются в фруктозо-6-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат. Таким образом, пентозомонофосфатный цикл возвращается в гликолитический. Этот путь обмена – аэробный, один из метаболитов –  $\text{CO}_2$  [159]. Важнейшая физиологическая роль пентозомонофосфатного пути заключается в предотвращении окисления гемоглобина в метгемоглобин в ходе активации глутатионредуктазной системы (рис. 24).

ПМФП и путь Эмбдена-Мейергофа имеют общий исходный субстрат – глюкозо-6-фосфат. Направления дальнейшего превращения Г-6-Ф зависят от его количества и соотношения восстановительных и окислительных коферментов –  $\text{НАДН}_2/\text{НАД}$  и  $\text{НАДФН}_2/\text{НАДФ}$ . Путь Эмбдена-Мейергофа регулируется отношением  $\text{НАДН}_2/\text{НАД}$ , а пентозомонофосфатный –  $\text{НАДФН}_2/\text{НАДФ}$ . Если образующийся в пентозомонофосфатном пути  $\text{НАДФН}_2$  не способен окислиться, то этот путь тормозится. Так как в эритроцитах нет



цикла Кребса и не протекают реакции, обеспечивающие синтез жирных кислот, т.е. нет процессов с вовлечением НАДФН<sub>2</sub>, окисление его в нормальных эритроцитах связано с глутатионом и глутатионредуктазой [159].

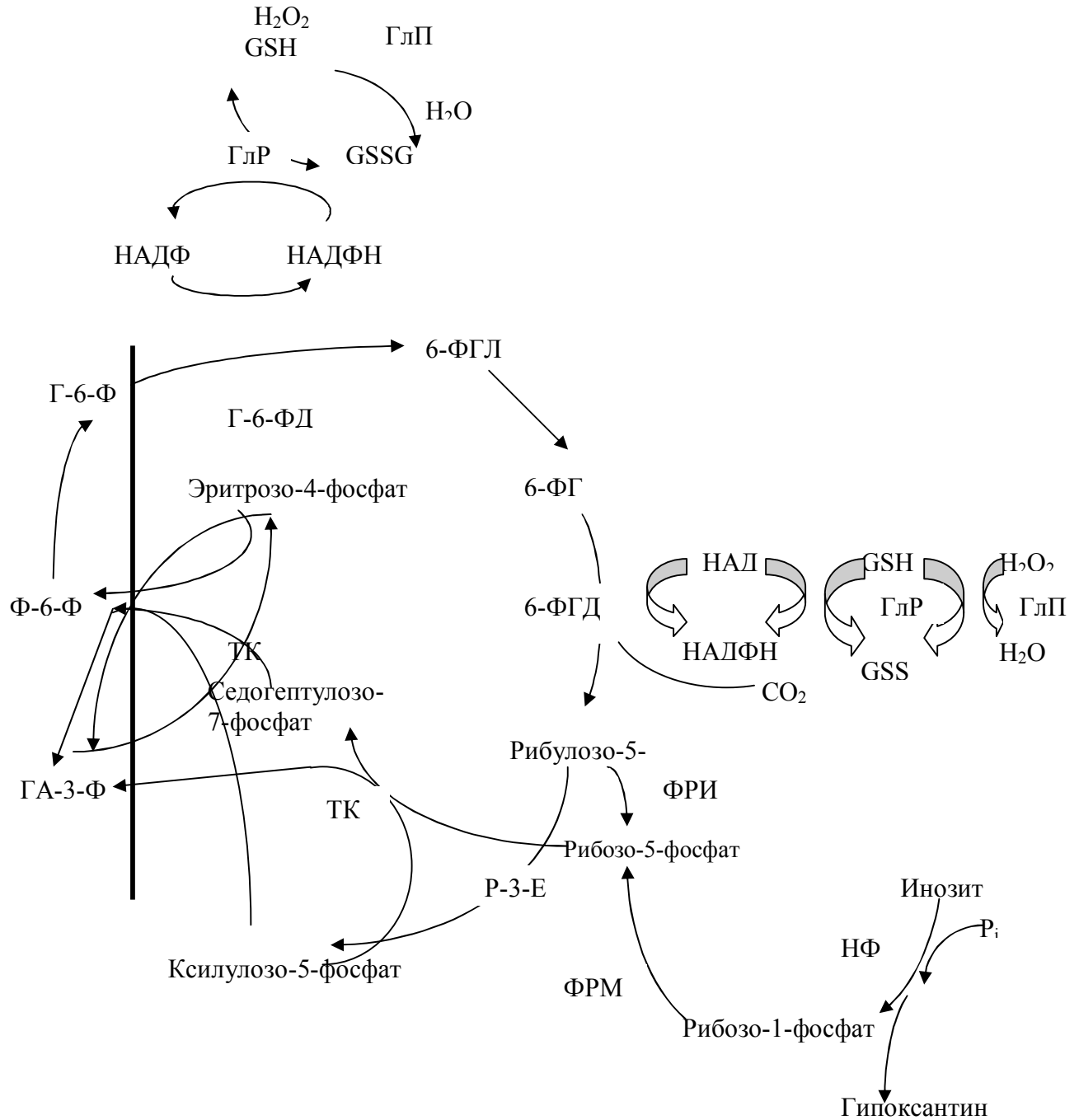
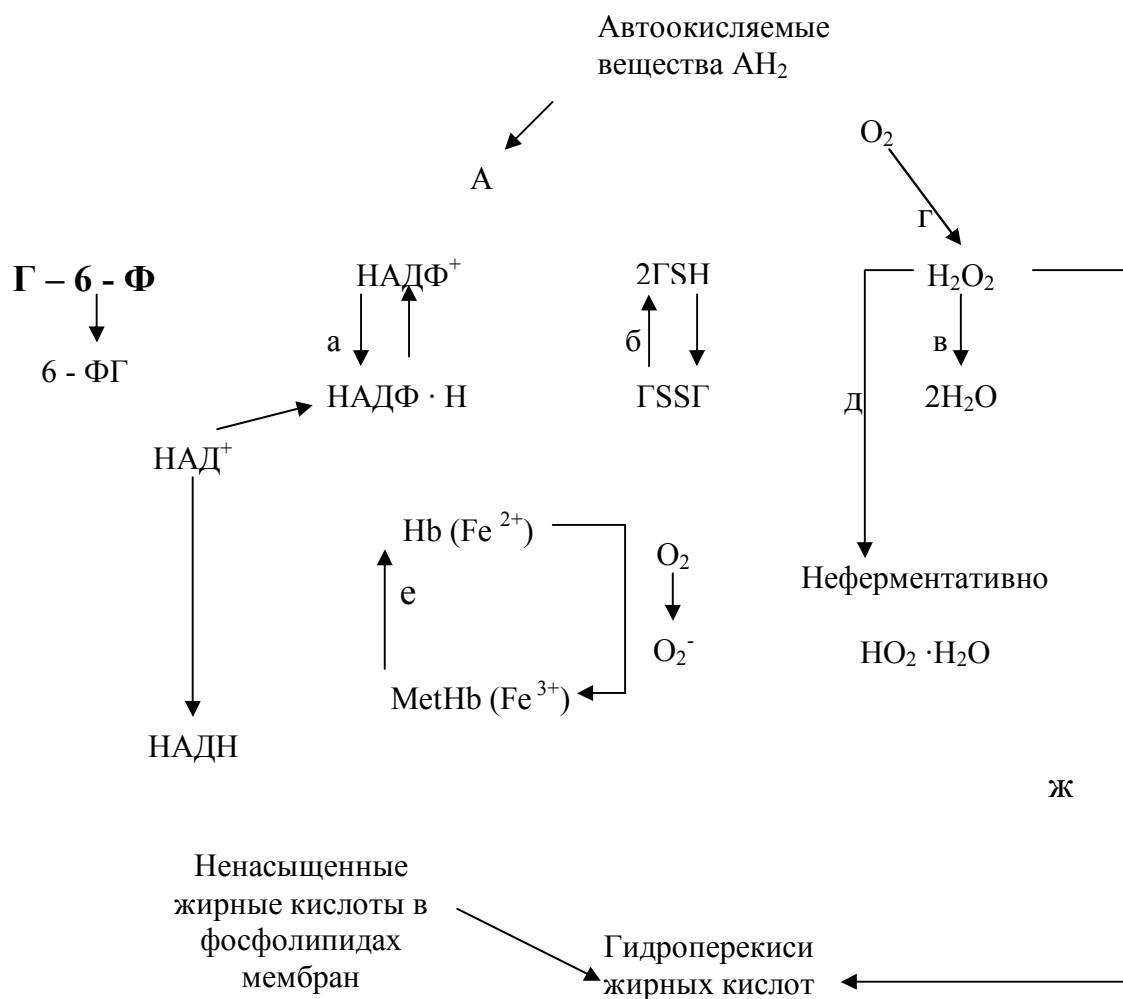


Рис. 24. Пентозомонофосфатный путь метаболизма глюкозы [15]

Основными компонентами глутатионредуктазной системы являются восстановленный глутатион (ГSH), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

(Г-6-ФДГ) и глутатионредуктаза (ГССГ-Р). В эритроцитах эта система оказывает влияние на энзиматический перенос и внедрение железа ферритина, сидерофилина, гемосидерина в гем и тем самым способствует образованию гемоглобина (а), участвует в его защите от окисления в метгемоглобин (б), в регуляции скорости глюкозы по ПМФП (в), в регуляции поступления  $K^+$  и  $Na^+$  через мембрану (г), активирует SH-содержащие ферменты (д) (рис. 25) [159].



**Рис.25. Биохимические процессы, препятствующие развитию гемолиза и образованию метгемоглобина [116]**

В физиологических условиях в эритроцитах всегда присутствуют глутатион и аскорбиновая кислота, восстанавливающие метгемоглобин с участием фермента  $NADPH$  – метгемоглобинредуктазы. Окисление функционирующего гемоглобина ( $Fe^{2+}$ ) в метгемоглобин ( $Fe^{3+}$ ) под влиянием супероксидного аниона  $\bar{O}_2$  или  $H_2O_2$  происходит в небольших количествах в

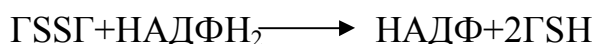
физиологических условиях (около 3%). НАД·Н необходим (при участии метгемоглобинредуктазы) для восстановления метгемоглобина (см. рис.25, реакция е) [116].

Различные воздействия могут приводить к образованию  $H_2O_2$  (см. рис.25, реакция 2); функция глутатиона заключается в разрушении  $H_2O_2$ , реакция катализируется ГНС-пероксидазой.



Глутатион вновь восстанавливается с помощью глутатионредуктазы (рис. 25, реакция б); в качестве донора водорода используется НАДФ·Н.

Глутатион-трипептид синтезируется в эритроцитах. Глутатионредуктазная система способствует активированию процессов в ПМФП, его скорость снижается при накоплении НАДФН<sub>2</sub>, окисление – связано с глутатионом и глутатионредуктазой.:



Если GSSG не может восстановиться в GSH, то снижается интенсивность в ПМФП.

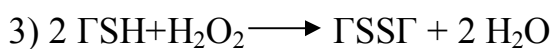
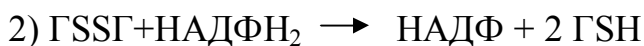
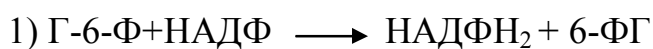
SH-группы, входящие в состав гемоглобина (по одной в  $\alpha$ -цепи и по две в  $\beta$ -цепи) играют существенную роль в выполнении основной функции гемоглобина. Если в эритроцитах нет условий для поддержания достаточного уровня глутатиона в восстановленном состоянии (например, при снижении активности GSSG-редуктазы), то он превращается в GSSG. Последний связывается с SH-группами глобина с образованием смешанного дисульфида типа HbSSG. Сульфгидрильные группы глобина при этом оказываются блокированными.

Комплекс HbSSG обладает увеличенным сродством к кислороду и уменьшенной способностью к гем-гем взаимодействиям. Добавление GSH предотвращает образование комплекса HbSSG и таким образом способствует уменьшению сродства гемоглобина к кислороду [159].

Пентозомонофосфатный путь обмена глюкозы и система глутатиона связаны с целостностью клеток. При недостаточности ряда гликолитических ферментов –

гексокиназы, фосфогексоизомеразы, 2,3-дифосфоглицератизомеразы, пируваткиназы – наблюдается гемолиз эритроцитов. Это связано с тем, что глутатион, разрушая  $H_2O_2$ , защищает ненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов мембран от перекисного окисления. Поэтому при недостатке глутатионредуктазы  $H_2O_2$  атакует двойные связи ненасыщенных жирных кислот, что ведет к разрушению мембраны и гемолизу.

Биохимия гемолиза тесно связана с нарушениями метаболизма глюкозы по ПМФП и ассоциированного с ним метаболизма глутатиона. В поддержание целостности красных клеток включаются три звена:



Роль ПМФП в восстановлении метгемоглобина установлена экспериментально. У молодых клеток увеличена активность Г-6-ФДГ, выше количество ГSH и меньше – метгемоглобина, т. е. в молодых клетках механизм восстановления метгемоглобина глутатионом весьма активен [113, 159].

Мы рассмотрели пути метаболизма глюкозы в безъядерных эритроцитах высших млекопитающих, причем утилизация клетками кислорода определяется активностью пентозомонофосфатного пути и всегда ниже, чем в ядерных эритроцитах.

По данным П. А. Коржуева [64],  $1 \text{ см}^3$  эритроцитарной массы голубя и кур потребляет  $105\text{-}120 \text{ мм}^3 \text{ O}_2$  за 1 ч, что в 2 раза больше, чем у озерной лягушки ( $70 \text{ мм}^3$ ), и в 5 раз больше, чем у кролика ( $26 \text{ мм}^3$ ). Эритроциты голубя обладают выраженным пастеровским эффектом: в аэробных условиях – энергично дышат и слабо гликолизируют, в анаэробных – активно гликолизируют. В зрелых эритроцитах птиц, цитоплазма которых практически лишена митохондрий, энергообеспечение метаболических процессов осуществляется в основном за счет ядра. Это установлено в опытах по выявлению дегидрогеназной активности ферментов окислительного

фосфорилирования на различных этапах созревания клеток эритроидного ряда [115, 124]. Оказалось, в ретикулоцитах активность ЛДГ, МДГ и СДГ выявляется исключительно в перинуклеарной зоне.

Определение активности Н- и М-форм ЛДГ показало, что во всех клетках преобладает М-форма. Эта характерная особенность эритроцитов птиц отражает своеобразие веществ в них и свидетельствует о том, что эти клетки обладают большей способностью к анаэробному гликолизу [18]. Установлено, что гидролитические и окислительные ферменты в зрелых эритроцитах птиц продолжают сохранять свою активность в ядре и ядерной мембране, тогда как в цитоплазме она исчезает. Это показатель того, что в энергетическом метаболизме данных клеток важная роль принадлежит ядру.

В физиологических условиях в эритроците энергетические потребности покрываются утилизацией глюкозы в путях Эмбдена-Мейергофа и пентозомонофосфатном. Эритроцит обладает также способностью метаболизировать другие субстраты, включая гексозы: фруктозу, маннозу и галактозу.

Фруктоза фосфорилируется по шестому положению гексокиназой. Образующийся Ф-6Ф либо изомеризуется в процессе глюкозофосфатизомеразовой реакции Г-6-Ф, либо фосфорилируется фосфофруктокиназой до Ф-1,6-ДФ.

Манноза также фосфорилируется гексокиназой по шестому положению. Образующийся маннозо-6-фосфат, прежде чем метаболизироваться в эритроците, превращается во фруктозо-6-фосфат под влиянием маннозофосфатизомеразы и используется далее в метаболизме эритроцита.

Метаболизм галактозы в эритроците осуществляется более сложным путем, чем фруктоза или манноза. Эритроцит способен производить энергию из нуклеозидов, например, инозина [15, 109].

В эритроцитах гликолиз и транспорт кислорода связаны между собой участием в обоих процессах 2,3-ДФГ и нарушения гликолиза могут оказывать

негативное влияние на транспорт кислорода. У людей с наследственными изменениями гликолиза в эритроцитах кривые диссоциации кислорода изменены. При недостаточности гексокиназы концентрация промежуточных продуктов гликолиза низкая, т. к. нарушается первая стадия – фосфорилирование глюкозы. В эритроцитах – пониженное содержание 2,3-ДФГ, вследствие этого гемоглобин обладает очень высоким сродством к кислороду. Дефицит пируваткиназы в эритроцитах инициирует развитие противоположных процессов: концентрация промежуточных продуктов гликолиза значительно превышает физиологический уровень, чем объясняется блокирование конечной стадии гликолиза. Содержание 2,3-ДФГ превышено вдвое, что приводит к низкому сродству гемоглобина и кислорода. Таким образом, 2,3-ДФГ служит регулятором транспорта кислорода в организме.

Недостаток кислорода в периферических тканях приводит к накоплению 2,3-ДФГ (из промежуточного продукта гликолиза 1,3-ДФГ). Тетрамер гемоглобина связывает одну молекулу 2,3-ДФГ, она размещается в центральной полости, выстланной остатками всех четырех субъединиц. Связывание 2,3-ДФГ осуществляется посредством образования солевых мостиков между атомами кислорода 2,3-ДФГ и группами, принадлежащими к обеим  $\beta$ -цепям: концевыми аминокетильными группами остатков Val<sup>1</sup>, аминокетильными группами остатков Lys<sup>6</sup>, и боковыми цепями остатков His<sup>21</sup>. следовательно 2,3-ДФГ стабилизирует дезоксигенированную Т-форму гемоглобина, образуя поперечные связи между  $\beta$ -цепями – это дополнительные солевые мостики, которые разрушаются при переходе гемоглобина из Т- в R-форму.

С фетальным гемоглобином 2,3-ДФГ связывается менее прочно, чем с гемоглобином взрослого человека, т. к. в его  $\beta$ -цепи в положении Н 21 находится не His, а Ser, который не может участвовать в формировании солевых мостиков, удерживающих 2,3-ДФГ в центральном положении. Поэтому 2,3-ДФГ в меньшей степени способствует стабилизации Т-формы фетального гемоглобина, что обуславливает его более высокое сродство к кислороду.

Ведущим механизмом перехода между R- и T-формами гемоглобина служит перемещение атома железа ( $\text{Fe}^{2+}$ ) в полость порфиринового кольца или от нее [14]. Следовательно, смещение атома железа относительно порфиринового кольца вызывает значительные изменения конформации гемоглобина и решающим образом влияет на ответную реакцию (недостаток/норма/избыток кислорода в тканях).

#### **2.2.4. Газотранспортная функция эритроцитов**

Появление дыхательных пигментов – переносчиков респираторных газов у животных связано с развитием системы кровообращения, выполняющей функцию транспорта кислорода к тканям тела. Только у немногих малоактивных форм кровь может переносить достаточное количество кислорода в растворенном состоянии без участия пигмента.

У одних животных пигмент участвует в переносе  $\text{O}_2$  постоянно, у других – исключительно при низком парциальном давлении кислорода ( $\text{P}_{\text{O}_2}$ ), у третьих – пигменты играют роль депо  $\text{O}_2$ , используемого при гипоксии. Помимо кислородтранспортной функции пигменты крови выполняют функцию основных буферов при транспорте  $\text{CO}_2$  и, как белки, в растворенном состоянии создают в крови коллоидно-осмотическое давление.

*2.2.4.1. Распространение пигментов.* Основа клеточной дыхательной структуры – железопорфириновый белок цитохром. Из всех пигментов – переносчиков  $\text{O}_2$  более полно изучен железопропорфирин. Связанная с ним белковая часть различна у разных животных по размеру, аминокислотному составу, растворимости и физико-химическим свойствам.

Все пигменты-переносчики представляют собой металлоорганические комплексы. Большинство пигментов содержат железо (гемоглобин, хлорокруорин, гемэритрин), немногие (гемоцианин) – медь. В организме первичноротых животных встречаются все четыре пигмента, вторичноротых –

только гемоглобин, локализованный преимущественно в эритроцитах [67, 147, 151, 152].

**Гемоглобин** – наиболее распространен и спорадически встречается в самых различных группах животных (рис. 26). Гемоглобин у всех позвоночных включен в эритроциты, а в мышцах содержится миоглобин. Гемоглобин и миоглобин отсутствуют лишь у некоторых рыб – у лептоцефалических личинок угря и у трех родов антарктических рыб семейства Chaenidichthidae.

У большинства представителей низших хордовых и у ланцетника (*Amphioxus*) гемоглобин отсутствует.

У голотурий и форонид гемоглобин включен в кровяные тельца; у олигохет – растворен в плазме, а в мышцах (например, у *Lumbricus*) имеется миоглобин.

Характерной особенностью полихет является присутствие гемоглобина в клетках целомической жидкости и в плазме крови (животные с замкнутой кровеносной системой) или исключительно в целомической жидкости. У некоторых видов в плазме содержится хлорокруорин; у отдельных видов одновременно присутствует и хлорокруорин, и гемоглобин. У животных семейства *Madelona* в кровяных тельцах содержится гемэритрин.

Среди низших ракообразных распространен гемоглобин, а высших – гемэритрин.

Из класса Насекомые гемоглобин имеется у личинок комаров и овода, а Моллюски – у немногих пластинчатожаберных; миоглобин найден (в мышце радулы) у многих брюхоногих и хитонов (панцирных).

У немертин гемоглобин встречается и в плазме крови, и в эритроцитах, а у *Polia* найден также в клетках нервных ганглиев.

Гемоглобины обнаружены у нескольких паразитических сосальщиков и прямокишечных турбеллярий (плоские черви).

У представителей нескольких семейств круглых червей гемоглобин обнаружен в псевдоцеломической жидкости и в клетках гиподермы стенки тела.



Из Простейших гемоглобины обнаружены у *Paramecium* и *Tetrahymena*.

Как видим, гемоглобин может быть растворен в жидкостях тела или концентрироваться в кровяных тельцах, клетках мышечной и нервной ткани.

Гемоглобин может встречаться в отдельных родах одного семейства и спорадически – у представителей отдельных семейств. Ученые полагают, что молекула гемоглобина возникала в эволюции независимо многократно, чем и объясняют наличие разных гемоглобинов (с разными белками, но с одним и тем же гемом).

**Хлорокруорин** – зеленый железосодержащий пигмент, но его порфириновое кольцо отличается от профирина гемоглобина одной боковой цепью в одном пирольном кольце. Распространен достаточно ограниченно. Выявлен у представителей нескольких семейств многощетинковых червей. У одного и того же вида хлорокруорин может сочетаться с гемоглобином (например, у *Potamilla* обнаружен хлорокруорин в крови и гемоглобин в мышцах), а у *Serpilla* в крови присутствует и хлорокруорин, и гемоглобин.

**Гемэритрин** – третий железосодержащий пигмент; сосредоточен в кровяных тельцах и окрашен в фиолетовый цвет. Железо в его молекуле не входит в порфириновое кольцо. Встречается редко и исключительно у беспозвоночных животных.

**Гемоцианин** – после гемоглобина наиболее распространенный дыхательный пигмент. В сравнении с гемоглобином имеет иное молекулярное строение и представляет собой крупную медьсодержащую белковую молекулу. Пигмент существует как в восстановленной, так и в связанной с кислородом форме (оксигемоцианин). Оксигемоцианин имеет интенсивную голубую окраску. Соединение гемоцианина с кислородом обусловлено наличием в его молекуле атома меди, прочно связанного с белком. Одна молекула кислорода соединяется с двумя атомами меди. Для сравнения: одна молекула  $O_2$  соответствует одному атому железа в молекуле гемоглобина, а в молекуле гемэритрина – трем атомам железа. Теоретически 1 г меди может связать  $176,1 \text{ см}^3 O_2$ . При сопоставлении гемоглобина и гемоцианина по количеству

связываемого кислорода оказалось: 1 г гемоглобина связывает 1,34 – 1,36 см<sup>3</sup> O<sub>2</sub>, а 1 г гемоцианина – только 0,53 см<sup>3</sup>. Благодаря гемоцианину значительно повышается содержание O<sub>2</sub> в гемолимфе. Например, у виноградной улитки количество связанного с гемоцианином O<sub>2</sub> в два раза выше, чем физически растворенного. У одного и того же животного гемоцианин может иметь различное строение.

Гемоцианин найден у моллюсков (боконервные, головоногие, некоторые брюхоногие) и у членистоногих (ракообразные, мечехвосты, некоторые паукообразные). Пигмент встречается исключительно в растворенном в гемолимфе состоянии. Нередко у организмов, у которых в качестве кровяного пигмента выступает гемоцианин, в отдельных органах присутствует гемоглобин; например, у моллюсков в нервных узлах и сердечной мышце содержится значительное количество гемоглобина.

Белковые соединения меди, широко представленные у животных (и растений), играют важную роль в клеточных окислительных процессах; так, медь активирует окисление глутатиона и аскорбиновой кислоты.

Сравнительный анализ тканей животных показал, что медь в наибольшей концентрации сосредоточена в метаболически высокоактивном органе – печени; концентрация меди в органе особенно высока в ранней стадии онтогенеза.

Хорошо известна способность меди стимулировать синтез гематиновых соединений (цитохрома) и железопорфиринов. По мнению Х.С. Каштоянца [67] наличие в тканях моллюсков и ракообразных железосодержащих дыхательных тел (пигментов) – цитохромы, цитохромоксидаза, миоглобин – указывает на то, что у животных, кровяным пигментом у которых служит гемоцианин, железосодержащие дыхательные пигменты играют важную роль в клеточных дыхательных процессах, и что гемоцианин подобно гемоглобину является звеном в процессе передачи O<sub>2</sub> от органов внешнего обмена газов к системе клеточных дыхательных структур.

В экспериментальных условиях установлена роль гемоцианина в дыхании тканей тех животных, у которых кровяной пигмент гемоглобин. Перфузируя различные органы млекопитающих животных искусственным физиологическим раствором, содержащим гемоцианин, установлено быстрое восстановление оксигемоцианина, что указывает на возникшую связь между гетерогенным кровяным пигментом и дыхательными пигментами их органов [Бинг, 1938; цит. 67, с. 254].

В сравнительно-физиологическом анализе распространения дыхательных пигментов следует отметить, что у животных, гемолимфа которых содержит гемоцианин, вычленяется стадия развития, когда жизненные функции протекают без медьсодержащего протеида (очевидно, при участии железосодержащих дыхательных пигментов). По данным Ранца (1938), у *Seria officinalis* гемоцианин отсутствует на ранних стадиях развития и только между X и XVI стадиями, вследствие абсорбции меди из морской воды, происходит синтез гемоцианина [цит. по 67, с. 254].

Впервые в научной литературе схема эволюции дыхательных пигментов построена Х.С. Коштойанцем в 1940 году (рис. 27). При ее обосновании ученый исходил из представления о материальной непрерывности окислительно-восстановительных процессов органической и неорганической природы, роли порфиринов и металлопорфирина в эволюции дыхательных пигментов, и филогенетической связи цитохрома и кровяных пигментов.

Известны также другие пигменты, но их роль в транспорте кислорода полностью не установлена. Например, хромоген некоторых асцидий содержит ванадий. У морских ежей в элеоцитах целомической жидкости и гонадах присутствует красный пигмент эхинохром. В тканях многих актиний найден гематопорфирин актиногематин. Полагают, что названные пигменты могут участвовать во внутриклеточных окислительных процессах, а также поддерживать в крови коллоидно-осмотическое давление.

Синтез гемопорфиринов и их соединений с азотистыми основаниями, первоначально присущий всем органам и тканям, на определенном этапе

эволюции животных концентрируется в отдельных тканях и органах. Те из них, в которых происходило избыточное образование вещества типа гемоглобина, легли в основу развития системы органов кроветворения.

Значительным этапом в эволюции дыхательных пигментов явилось возникновение специальных клеток, где осуществлялся синтез кровяного пигмента, которые в виде специальных кровяных телец, содержащих гемоглобин, появились в крови. Первоначально это были ядерные клетки, но у высших позвоночных на определенном этапе эмбриогенеза ядра исчезают, и клетки крови представляют собой высокоспециализированные тельца, наполненные гемоглобином.



**Рис. 27. Схема эволюционного процесса возникновения и развития дыхательных пигментов [67]**

Постепенно вычлняются и две важнейшие функции гемоглобина: главная – захват, транспорт и отдача кислорода и добавочная – депонирование кислорода (в миоглобине).

2.2.4.2. *Гетерогенная система гемоглобина.* В составе гемоглобина содержится бесцветная белковая часть – глобин и простетическая группа – гем. Глобины отличаются по аминокислотному составу, молекулярной массе, электрофоретической подвижности, иммунологическим свойствам и сродству к кислороду. В организме одного вида может присутствовать несколько гемоглобинов. Одни из гемоглобинов сменяют друг друга в онтогенезе, другие – являются генетическими мутантами взрослой формы и различаются по одному или нескольким аминокислотным остаткам. Гемоглобины с высокой молекулярной массой – от 400 000 до нескольких миллионов – растворены в плазме, с малой – от 20 000 до 120 000 – заключены в клетки крови.

Упаковка гемоглобина в клетки имеет ряд преимуществ: значительно снижена вязкость крови; в эритроците формируется химическая среда, отличная от плазмы (по концентрации неорганических ионов, органических фосфатов и спектру ферментов), оказывающая значительное влияние на сродство гемоглобина к кислороду [207].

В структуре порфирина основной элемент – пиррол, принадлежащий к группе гетероциклических соединений и представляющий собой пятичленное кольцо. Замкнутая структура из четырех пиррольных колец, соединенных между собой четырьмя метиловыми (метиленовыми) связями (мостиками), образует плоскую кольцевую структуру – ядро порфирина. В центре плоского кольца (ядра) находится один атом  $Fe^{2+}$ . Порфирин, вступая во взаимодействие с железом, образует железопорфирин (гемин) (рис. 28), способный связываться с белком. Гем, соединенный с глобином, обладает способностью обратимо связывать кислород [14, 81].

порфирин

гемин

**Рис. 28. Структурные формулы компонентов гемоглобина.**

Гемоглобины – тетрамерные белки, образованные полипептидными цепями ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , S и др.). Гемоглобин А (HbA) образует  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи. Их отличие состоит в разной последовательности N-терминальной (концевой) аминокислоты (имеет свободную аминокислотную группу), которая в  $\alpha$ -цепи является валинлейцином, а  $\beta$ -цепи – валингистидином. В процессах оксигенации HbA главную роль играют  $\beta$ -цепи. В состав  $\alpha$ -цепи входит 141, а  $\beta$ -цепи – 146 аминокислот [14, 113]. Особое значение имеет гистидин – аминокислота, усиливающая буферные свойства гемоглобина и обуславливающая способность пигмента связывать гем [81].

Глобин обладает высокой степенью спирализации: в каждой  $\beta$ -цепи имеется по 8, а в  $\alpha$ -цепи – по 7 спиральных участков, которые чередуются с неспиральными. Спиральные участки каждой цепи уложены в плотную глобулу, внутри которой в «кармане» (углублении) находится гем. Внутри молекулы перпендикулярно друг другу расположены  $\alpha$ -полости, одна из которых разделяет  $\alpha$ -, а другая –  $\beta$ -цепи. Взаимодействуя друг с другом,  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи образуют четвертичную структуру [221, 240]. Она наделяет гемоглобин дополнительными важными особенностями, которые способствуют выполнению им уникальной биологической функции и обеспечивают возможность строгой регуляции его свойств.

В ходе оксигенации более реакционными оказываются  $\alpha$ -цепи, так как при соединении кислорода с молекулой гемоглобина происходят кооперативные структурные изменения  $\beta$ -цепей, в результате молекула кислорода помещается между  $\beta$ -цепями и гемом. Таким образом, субъединицы молекулы гемоглобина оксигенируются не одновременно, а последовательно,

причем количество энергии, необходимое для присоединения кислорода, постепенно снижается от первого к четвертому гему [116]; уменьшается также время, необходимое для этого процесса, т. е. реакция с кислородом для  $\beta$ -цепей протекает более легко. Изменение сродства к кислороду различных гемов молекулы гемоглобина называют гем-гем взаимодействием. Один грамм гемоглобина присоединяет  $\sim 1,34$  мл кислорода [80, 81]. Содержание гемоглобина в 100 мл крови составляет у большинства млекопитающих и птиц 12-18 г, у амфибий и рептилий – 6-10 г, у рыб – 6-11 г [147].

Установлена гетерогенная природа гемоглобинов. Как мы отметили ранее, гемоглобин взрослого человека (HbA) состоит из двух  $\alpha$ - и  $\beta$ -полипептидных цепей. Фетальный гемоглобин (HbF) человека образуют две  $\alpha$ -полипептидные цепи, идентичные  $\alpha$ -цепям гемоглобина A и две  $\gamma$ -цепи (HbF $\alpha_2\gamma_2$ ).

В эритроцитах взрослого человека, помимо HbA, имеется несколько разновидностей: HbA<sub>2</sub> (около 2-3 %), HbA<sub>1</sub> и HbA<sub>3</sub> (около 5%). В состав HbA<sub>2</sub> наряду с  $\alpha$ -цепями входят также дельта-цепи; его обозначают HbA<sub>2</sub> $\alpha_2\delta_2$ . Описаны и другие разновидности гемоглобина человека: HbH, HbJ, HbM, HbK, HbL, HbN, HbO, HbP, HbQ. При некоторых патологиях (лептоцитоз, ретикулоцитоз) обнаружено наличие фракций HbA, C и C<sub>1</sub> у одного индивида.

Состояние, при котором мутация вызывает изменение биологических функций гемоглобина называют гемоглобинопатией. Известно более 200 вариантов гемоглобинопатий, из них некоторые проявляются в виде заболеваний. В семействе гемоглобинов M остатки проксимального и дистального гистидина в  $\alpha$ - или  $\beta$ -субъединицах заменены на остатки тирозина. Атом железа в составе гема находится в Fe<sup>3+</sup>-состоянии, что обусловлено образованием прочного ионного комплекса с фенолятным анионом тирозина. Результатом такой мутации является метгемоглобинемия, т. к. ферри-гем не способен связывать кислород. В  $\alpha$ -цепи гемоглобина M R – T-равновесие смещено в сторону образования T-формы. Сродство к кислороду низкое,

эффект Бора отсутствует. В  $\beta$ -цепи гемоглобинов М возможен переход между R и T состояниями, следовательно, наблюдается эффект Бора.

Примеров мутации, приводящей к образованию преимущественно R-формы, является гемоглобин Чезапик; эти гемоглобины обладают повышенным сродством к кислороду. Следовательно, такие гемоглобины не способны поставлять кислород тканям. Развивается тканевая гипоксия, и как компенсаторная реакция – полицитемия.

К патологическим типам гемоглобинов у человека относится также серповидный (серповидно-клеточный) гемоглобин S (HbS). Его присутствие в эритроцитах связано с генетическим заболеванием крови – серповидно-клеточной анемией [179].

Аномалия, характерная для HbS, локализована в  $\beta$ -цепи (в шестом положении). Глутаминовая кислота, находящаяся в этом положении в гемоглобине здорового человека замещается в гемоглобине S на валин:  $\text{Glu A}_2 \beta \rightarrow \text{Val}$ . При низком парциальном давлении кислорода HbS в эритроцитах кристаллизуется (осаждается в виде длинных волокон), что приводит к деформации эритроцитов и нарушению их структуры: они приобретают серповидную форму и легко разрушаются в связи со снижением их толерантности к гемолизу – в итоге развивается анемия. Появление остатка гидрофобной аминокислоты валина в шестом положении, находящемся недалеко от конца молекулы, способствует образованию нового связывающего центра. В результате тетрамеры гемоглобина ассоциируют, образуя длинные микротрубчатые структуры, которые кристаллизуются внутри эритроцита [113].

Формирование гетерогенной системы гемоглобина тесно связано с дифференцировкой клеток эритроидного ряда. В настоящее время выдвинуты две гипотезы о механизмах синтеза гемоглобина разных типов. Согласно первой, клетки эритроидного ряда детерминированы для синтеза гемоглобина определенного типа. Рядом экспериментов доказано существование HbA и HbF в одном и том же эритроците в клонированных культурах. По второй гипотезе,



каждая из клеток-предшественниц эритропоэза может дать начало эритроидным элементам, способным производить гемоглобин разных типов [178].

Экспериментально установлено, что переключение синтеза гемоглобина от одного типа к другому происходит в процессе дифференцировки частично коммитированных стволовых клеток под влиянием факторов, обладающих бурстпромоторной активностью, и унипотентных эритроидных предшественников при участии эритропоэтина. Причем показано, что высокий уровень гемоглобина при стрессах связан с повышением активности эритропоэтина в крови. Повышенное образование  $\gamma$ -цепей рассматривается как компенсаторно-приспособительная реакция в экстремальных условиях [162, 178].

*2.2.4.3. Биосинтез гемоглобина и его деструкция.* Длительность функционирования гемоглобина обусловлена продолжительностью жизни эритроцитов; исходя из этого, можно определить и время его функционирования.

Продолжительность жизни эритроцитов ограничена во времени, неодинакова для разных видов животных и составляет: 120 сут у человека [118, 119]; 130 – у каракульской овцы; 225 – у ламы гуанако [179]; 90-135 – у собаки; 50-60 – у крысы; 50-70 – у кролика [194]; 28-38 сут – у птиц [18, 147, 212]. Эритроциты черепахи живут более 11 месяцев [147], а лягушек – до 1400 сут (верхняя граница не установлена) [111].

В ходе жизненного цикла красная клетка крови человека и животных претерпевает примерно одинаковое количество оксигенаций, поэтому ведущим фактором, определяющим длительность жизни эритроцита, является число совершенных им рециркуляций, что определяется интенсивностью метаболизма [179].

Увеличение срока жизни эритроцита – эволюционно приобретенный адаптивный механизм, существенно зависящий от уровня обмена веществ в период формирования клеток красного ростка [213], сдвигов ионного

равновесия, степени зрелости клеток, входящих в кровяное русло [36], особенностей экологии, а также от состояния гетерогенной системы гемоглобина [179].

Обнаружена тесная физико-химическая связь молекулы гемоглобина с компонентами стромы. Взаимодействуя с внутренней поверхностью мембраны, гемоглобин влияет на мембранный белок спектрин и ряд ферментов, в том числе участвующих в осуществлении гемолиза [214].

Интенсивное старение эритроцитов сопровождается глубокими изменениями морфофункциональных характеристик и компонентов плазматической мембраны, нарушением метаболизма. В старых эритроцитах происходит накопление метгемоглобина [36, 71]; гемоглобин подвергается структурным и физико-химическим изменениям, связанным с функциональной изнашиваемостью молекулы [55]. Обнаружено увеличение НбА при старении эритроцитов. На функционально изношенных эритроцитах показано повышение уровня гемоглобина, в состав которого входят  $\beta^a$ -цепи и одновременно снижено содержание гемоглобина с  $\beta^b$ , и  $\beta^c$ -цепями [177].

У человека в физиологических условиях около 10% старых эритроцитов разрушаются в кровяном русле; основная же масса утилизируется внутриклеточно.

Благодаря комплексу белков плазмы (гаптоглобин, гемопексин, альбумин) гемоглобин связывается и транспортируется к органам, где подвергается катаболизму. Поступая в плазму, гемоглобин распадается на два  $\alpha$ - $\beta$ -димера, которые связываются с гаптоглобином ( $\alpha$ -глобулин). Комплекс гаптоглобин – гемоглобин удаляется из плазмы в течение получаса. При повышенном поступлении гемоглобина в плазму свободные  $\alpha$ - $\beta$ -димеры распадаются на ферригем и глобин. Ферригем связывается с гемопексином ( $\beta$ -глобулин) и альбумином. Эти комплексы элиминируются клетками печени. При значительном внутрисосудистом гемолизе почки способны катаболизировать до 3 г гемоглобина в сутки [6].

Основная масса старых эритроцитов удаляется из крови макрофагами печени, селезёнки, костного мозга. Предполагают, что распознавание макрофагами старых эритроцитов основано на снижении поверхностного заряда клетки [209] и изменении их антигенных свойств [247, 287].

В макрофагах происходят разрушение эритроцитов и распад их главной составной части – гемоглобина. В геме разрываются мостики, соединяющие пирроловые ядра, что приводит к образованию вердогемоглобина, окрашенного в зеленый цвет. Вердогемоглобин затем распадается с освобождением глобина, железа и биливердина. Из биливердина восстанавливается билирубин; железо гема связывается с белком плазмы ( $\beta$ -глобулином), транспортируется в печень и откладывается в виде ферритина или же доставляется в костный мозг, где используется для синтеза гемоглобина новых эритроцитов (рис.29) [81].

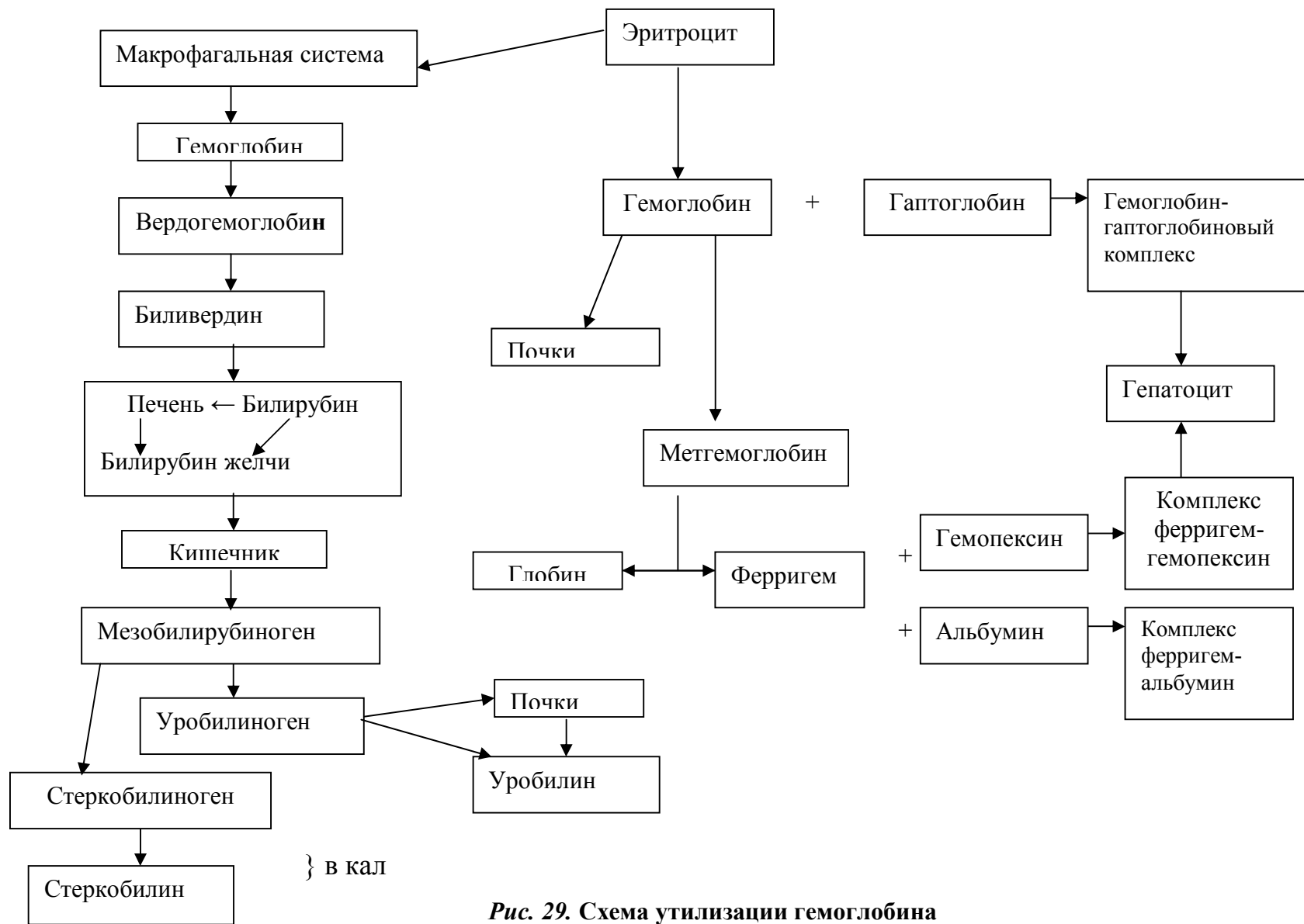


Рис. 29. Схема утилизации гемоглобина

Образующийся в клетках мононуклеарной фагоцитарной системы (МФС) билирубин доставляется в печень в комплексе с белками. В печени комплекс распадается, освободившийся билирубин поступает в желчные канальцы и через протоки – в желчный пузырь, и далее в виде составной части желчи в двенадцатиперстную кишку. Под влиянием кишечной флоры билирубин восстанавливается с образованием бесцветного мезобилирубиногена, используемого для синтеза пигментов. Некоторое количество стеркобилиногена образуется в кишечнике, всасывается в кровь, поступает в печень; затем часть его остается в кишечнике, а остальная часть с кровью доставляется к почкам и удаляется с мочой.

Таким образом, в образовании желчных пигментов из гемоглобина и в элиминации их из организма участвуют клетки мононуклеарной фагоцитарной системы, печень, почки, микрофлора кишечника.

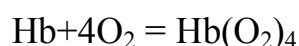
Исходные вещества для синтеза гема – глицин и сукцинил коэнзим А. Источником азота в составе всех четырех пирроловых колец протопорфирина является глицин; для синтеза молекулы протопорфирина используются восемь атомов углерода, входящих в состав метиленовых групп, и восемь молекул глицина. Промежуточный продукт синтеза протопорфирина –  $\delta$ -аминолевулиновая кислота. Из двух ее молекул синтезируется профобилиноген – производное пиррола.

*2.2.4.4. Кислородная емкость крови.* Транспортируемые в нормальных условиях дыхания газы – кислород экзогенного происхождения, двуокись углерода и оксид углерода – эндогенного. Кислородная емкость – способность крови, эритроцитов и гемоглобина связывать кислорода до полного насыщения гемоглобина – зависит от содержания эритроцитов и гемоглобина в крови и их сродства к молекулам газов. Последнее зависит от структуры (типа) гемоглобина и физико-химических свойств внутриэритроцитарной среды.

Количество кислорода, которое связывает и переносит  $100 \text{ см}^3$  крови, называют кислородной емкостью крови (КЕК). Наибольшей кислородной

емкостью обладает кровь животных, содержащая гемоглобин (от 15 до 22 об.%); затем – хлорокруорин (~ 10 об.%) и гемоцианин (у головоногих моллюсков ~ 5,0 об.%). Гемеритрин связывает не более 3,0 об.% кислорода [64]. Из млекопитающих животных высокую емкость имеет кровь кенгуру (~ 27 об.%) и глубоководных ныряльщиков (например, у тюленя – до 29 об.%) [81].

Эффективность гемоглобина как переносчика кислорода определяется скоростью диффузии  $O_2$  через стенку капилляров при прохождении через них крови. Фактором, ограничивающим интенсивность тканевого дыхания, выступает скорость диффузии кислорода. Реакция взаимодействия газа с гемоглобином подчиняется закону действующих масс:



Соотношение между количеством гемоглобина и образовавшегося оксигемоглобина зависит от содержания физически растворенного кислорода в крови – оно пропорционально его напряжению. Кислородное насыщение гемоглобина ( $S_{O_2}$ ) определяется процентной долей оксигемоглобина от общего содержания гемоглобина в крови и вычисляется по формуле:

$$S_{O_2} = \frac{[HbO_2]}{[Hb] + [HbO_2]} \cdot 100\%$$

При полном дезоксигенировании гемоглобина кислородное насыщение равно 0; если же весь пигмент превращается в оксигемоглобин, кислородное насыщение составляет 100%. В соответствии с законом действующих масс насыщение гемоглобина кислородом зависит от напряжения  $O_2$  в среде, с которой контактирует кровь. Гемоглобин связывает четыре молекулы кислорода на тетрамер, т. е. по одной молекуле на гем в каждой субъединице. Кривая насыщения кислородом (кривая диссоциации гемоглобина) имеет сигмовидную (S-образную) форму (рис. 30).

«Сложность» диссоциационной кривой объясняется кооперативным эффектом четырех полипептидных цепей гемоглобина,

кислородсвязывающие свойства (сродство к кислороду) которых различны и зависят от ряда факторов.

***Рис. 30. Форма диссоциационной кривой оксигемоглобина [67]***

Среди них наиболее существенные – биохимические, физико-химические свойства гемоглобина, число и расположение ионов металла, связанных с молекулой гемоглобина как малодиссоциированной кислотой, и экологические особенности вида.

Подавляющее большинство диссоциационных кривых оксигемоглобина у различных животных имеют S-образную форму (рис. 31).

***Рис. 31. Формы диссоциационных кривых кислорода различных животных [151]***

1 – *Arenicola*; 2 – *Urechis*; 3 – скат; 4 – человек; 5 – *Amphiuma*; 6 – крокодил

Специфические свойства формы кривой диссоциации, некоторые отклонения от нее (атипические кривые) у некоторых животных с большим постоянством характеризуют гемоглобины разных животных и различные типы гемоглобина у одного и того же животного [67, 147] (рис. 32).

**Рис. 32. Диссоциационные кривые кислорода крови атипичной формы [151]:**

**1– угорь; 2 – карп; 3 – скумбрия; 4 – утка; 5 – голубь**

Как видим (см. рис. 32), эффект полунасыщения ( $P_{50}$ ) достигается у отдельных животных при разных парциальных давлениях кислорода: кровь одних форм (*Arenicola*, *Urechis*) достигает полунасыщения при низких, кровь других форм (крокодил, амфиума, утка) – при высоких значениях парциального давления кислорода. Эти различия имеют важное биологическое значение и объясняются особенностями экологии животных (виды, живущие в условиях дефицита кислорода, обладают способностью связывать кислород при очень низких его давлениях, тогда как в среде, богатой кислородом, – способны связывать кислород лишь при очень низких давлениях), степенью эволюционного развития организмов, уровнем внутриклеточных окислительных процессов и напряженностью метаболизма, характерным для этих животных [67, 147].

Диссоциационные кривые оксигемоглобина различаются не только у животных разных филогенетических групп, но и у одного и того же животного на различных стадиях онтогенеза; например, кровь зародыша млекопитающих и птиц в сравнении с материнской кровью: диссоциационные кривые кислорода крови зародышей, находящихся в условиях менее благоприятных, в части снабжения кислородом, расположены значительно левее и выше, чем кривые материнской крови (рис. 33).

**Рис. 33. Характер диссоциационных кривых крови: плода овцы (З) и матери (М) – по сравнению с нормой (В)**



Эта разница прослеживается также у человека. Эффект полунасыщения ( $P_{50}$ ) для крови взрослого человека составляет  $\sim 28$  мм рт. ст., а для крови плода – несколько выше и зависит также от уровня рН. Кривые кислородного равновесия для крови плода лежат значительно левее, чем у взрослого человека. Фетальный гемоглобин (HbF) плода, получающего кислород из крови матери через плацентарный барьер, обладает большим сродством к кислороду и более устойчив к щелочной денатурации, чем HbA.

Онтогенетические изменения свойств гемоглобина выявлены также у амфибий: у личинок, дышащих жабрами, гемоглобин имеет большее сродство к кислороду, чем у взрослых форм (рис. 34).

**Рис. 34. Характер диссоциационных кривых крови жабы в разные стадии развития**

(по F.H. McCutcheon, 1936; цит. по: 67):

Прерывистая линия – кривые крови головастика; сплошные – жабы.

Температура  $25,4^{\circ}$ , рН – 7,38.

Как мы отмечали ранее (см. 2.2.4.2.), способность гемоглобина связывать кислород зависит от того, содержатся ли в данном тетрамере другие молекулы  $O_2$ . При их присутствии последующие молекулы кислорода присоединяются легче, т. е. гемоглобину свойственна кинетика кооперативного связывания, благодаря которой он присоединяет максимальное количество кислорода в легких и отдает максимальное количество при тех  $P_{O_2}$ , которое создается в тканях.

Сродство гемоглобина к кислороду характеризуется величиной  $P_{50}$  – значением  $P_{O_2}$ , при котором осуществляется полунасыщение гемоглобина кислородом. Значение  $P_{50}$  существенно различается у животных, но обязательно превышает значение  $P_{O_2}$  в периферических тканях.

У млекопитающих животных, которым свойственны быстрые движения (мышь, кошка), величины  $P_{50}$  обычно выше, чем у медленных и спокойных (собаки):  $P_{50}$  у мыши достигает 72 мм рт. ст., а у лесного сурка – лишь 24 мм рт. ст. С увеличением размеров тела  $P_{50}$  уменьшается согласно уравнению:  $P_{50} = 50,34 W^{0,054}$  ( $W$  – масса тела).

Животные – глубинные ныряльщики и обитатели горной местности имеют гемоглобин с высоким сродством к кислороду. Так, некоторые виды тюленей способны нырять на глубину до 400 м и находиться под водой до 43 мин; гемоглобин у этих животных отличается сильно выраженным эффектом Бора и Холдена и может связывать большие количества  $\text{HCO}_3^-$ ; у них также высокое содержание гемоглобина в крови (до  $264 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ ) [цит. по: 147, с. 43-44].

Для полного насыщения гемоглобина крови птиц нужны более высокие значения напряжения кислорода, чем для пигмента млекопитающих. У уток (и голубей) в тканях потребляется до 60% кислорода, содержащегося в крови. Для сравнения: у человека используется ~ 27%, черепах ~ 44, ската ~ 66%. У пингвина  $P_{50}$  равно ~ 34,4 мм рт. ст. [214].

У цыплят, выведенных в инкубаторе, гемоглобин имеет большее сродство к кислороду, чем у взрослых кур. У вылупившихся птенцов кривая диссоциации сдвигается вправо, и они постепенно утрачивают устойчивость к низкому парциальному давлению кислорода.

Как правило, рыбы, живущие в стоячей воде, имеют низкие значения  $P_{50}$  и эффект Бора не сдвигает у них кривую диссоциации за физиологические пределы. У рыб с высоким значением  $P_{50}$  увеличение  $P_{\text{CO}_2}$  от 2 до 10 мм рт. ст. может резко сдвинуть кривую вправо, и рыба начнет задыхаться даже при избытке кислорода.

Методом электрофореза установлено у цыплят пять форм гемоглобина: так,  $\text{Hb}_4$  – основной компонент в первые 7 сут инкубации;  $\text{Hb}_2$  – его количество значительно возрастает к моменту вылупления;  $\text{Hb}_3$  –

второстепенный компонент как у зародыша, так и у вылупляющегося цыпленка.

Уровень оксигенации крови влияет на синтез гемоглобина. Так, если яйца выдерживать при пониженном  $P_{O_2}$ , синтез гемоглобина в костном мозге начинается не на 14-е сутки инкубации, а значительно позднее [291]. Ген «взрослой» формы гемоглобина активируется у домашних кур на шестые сутки инкубации, а у индейки – двумя-тремя сутками позже [270]. У цыплят по мере их развития хориоаллантоис все меньше и меньше обеспечивает эмбрион кислородом [244].

Кровь головастика лягушки-быка насыщается кислородом при меньших парциальных давлениях, чем кровь взрослой особи: у головастика  $P_{50}$  равно 4,6 мм рт. ст., а у взрослой лягушки – 13,2 мм рт. ст. Кровь взрослой лягушки обнаруживает прямой эффект Бора вплоть до pH 6,2; у головастика эффект Бора отсутствует.

Связывание кислорода тесно сопряжено с выдыханием двуокиси углерода. Это обратимое явление, известное как эффект Бора – свойство тетрамерного гемоглобина и определяется гем-гемовым взаимодействием, лежащим в основе кооперативных эффектов. В ходе метаболизма диффузия  $CO_2$  в ткани способствует снижению сродства гемоглобина к  $O_2$  и кривая равновесия сдвигается вправо (прямой эффект Бора). При высоком значении  $P_{CO_2}$  или низком pH  $P_{O_2}$ , необходимом для насыщения гемоглобина, выше, чем при нормальных условиях. Эффект Бора отражает взаимосвязь между кислородным равновесием и отдачей протонов, т. е. кислотностью гемоглобина. При низких величинах pH (значительно ниже физиологических) эффект Бора может обращаться, сродство возрастает – таким образом, при некоторых значениях pH  $P_{50}$  имеет максимальную величину.

Количественной мерой эффекта Бора служит изменение величины  $P_{50}$  на единицу pH и отношение –  $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$  характеризует количество протонов, освобождаемых одним молекул гема. Для гемоглобина человека

изменение  $P_{50}$  составляет 1,1 на единицу рН в диапазоне рН от 6,5 до 9,5. Протоны, освобождаемые при оксигенации, принадлежат преимущественно имидазольным группам С-концевых гистидинов  $\beta$ -цепи, а также аминок группам  $\alpha$ -цепей. В осуществлении эффекта Бора бóльший вклад имеют  $\beta$ -цепи.

Величина эффекта Бора падает с уменьшением концентрации гемоглобина, с повышением температуры и увеличением ионной силы раствора за счет солей. У мелких животных эффект Бора выражен в большей степени, чем у крупных. У человека  $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$  составляет  $-0,62$ ; у мыши  $-0,96$ ; свиньи  $-0,57$ ; тюленя  $-0,66$ ; у утки  $-0,40$  [147].

Отдаче кислорода способствует 2,3-дифосфоглицерат, синтез которого возрастает при гипоксии и интенсификации окислительного процесса в тканях. В эритроцитах взрослого человека концентрация 2,3-ДФГ составляет  $5 \cdot 10^{-3}$  ммоль, т. е. на каждую молекулу гемоглобина приходится  $\sim 1$  молекула 2,3-ДФГ, что составляет около 64% всех органических фосфатов эритроцита. Как было отмечено ранее, 2,3-ДФГ снижает сродство гемоглобина к кислороду, вклиниваясь между  $\beta$ -цепями тетрамера, взаимодействуя при этом с лизином, гистидином, валином каждой  $\beta$ -цепи. Полагают, что молекула двуокиси углерода конкурирует за участок связывания и частичное освобождение ДФГ при оксигенации [147].

Установлено, что 2,3-ДФГ вступает во взаимодействие с дезоксигенированным гемоглобином активнее, чем с оксиформой [250], и выявлена обратная корреляция между количеством связанного 2,3-ДФГ и насыщением гемоглобина кислородом [225].

2,3-ДФГ влияет на сродство гемоглобина к кислороду путем снижения внутриэритроцитарной рН [285], что с коммуляцией внутри клетки отрицательно заряженных анионов (снижение рН) приводит к уменьшению сродства гемоглобина к кислороду. Величина эффекта Бора в присутствии 2,3-ДФГ возрастает при сохранении рН в пределах физиологических значений, что облегчает отдачу гемоглобином кислорода [116].

Сравнительные исследования содержания 2,3-ДФГ и АТФ в эритроцитах млекопитающих показали, что оно высокое в клетках человека, кролика, дельфина и свиньи и низкое – коров и кошки. В эритроцитах лошади и собаки высокое содержание 2,3-ДФГ и предельно низкое – АТФ; в красных клетках крови коз не выявлены 2,3-ДФГ и фермент 2,3-ДФГФ, в связи с чем выдвинуто предположение, что дифосфоглицератный шунт у взрослых коз не всегда функционирует [116].

В эритроцитах птиц и черепах вместо 2,3-ДФГ присутствует инозитгексафосфат (ИГФ); у рыб функцию 2,3-ДФГ выполняет АТФ (концентрация от 1 до  $2 \cdot 10^{-3}$  моля). В 2,3-ДФГ и АТФ сосредоточено до 45% всего фосфора эритроцитов; они снижают сродство гемоглобина и кислорода в 30 раз, облегчая таким образом отдачу кислорода. Не обнаружены органические фосфаты в эритроцитах круглоротых и их гемоглобин не чувствителен к 2,3-ДФГ и АТФ.

*2.2.4.4. Транспорт двуокиси углерода.* Гемоглобин ускоряет транспорт конечного продукта окислительного метаболизма – двуокиси углерода – от тканей к легким. До 15%  $\text{CO}_2$ , присутствующего в крови, переносится молекулами гемоглобина. В этом процессе ведущую роль играет карбоангидраза эритроцита.

Растворенный  $\text{CO}_2$  диффундирует по градиенту напряжения из тканей в кровь. В капиллярах некоторое количество двуокиси углерода остается в плазме в растворенном состоянии и играет важную роль в стимуляции центрального дыхательного механизма. Большая часть  $\text{CO}_2$  поступает в эритроцит, где осуществляется его гидратация с образованием угольной кислоты, мгновенно диссоциирующей на протон и гидрокарбонат-ион:



В плазме эта реакция протекает очень медленно, в эритроцитах – ускорена в 10 тыс. раз благодаря эффектам карбоангидразы [81].

Накопление  $\text{HCO}_3^-$  в эритроцитах приводит к тому, что между его внутренней средой и плазмой крови создается диффузионный градиент.

Одновременно с выходом из эритроцита каждого  $\text{HCO}_3^-$ -иона взамен в эритроцит поступает ион  $\text{Cl}^-$ . Этот обменный процесс называется хлоридным сдвигом.

По мере диффузии  $\text{CO}_2$  в эритроците накапливается  $\text{H}^+$ , что не приводит к сдвигам pH вследствие буферной мягкости гемоглобина (гемоглобин связывает два  $\text{H}^+$ -иона на каждые четыре освобожденные молекулы  $\text{O}_2$ , и определяет буферную емкость крови).

Двуокись углерода может связываться также посредством присоединения к аминогруппам белкового компонента гемоглобина. Реакция протекает без участия ферментов, т. е. не нуждается в катализе. При этом образуется остаток карбаминовой кислоты (карбамат) и высвобождается  $\text{H}^+$ :



В ходе образования карбаминных комплексов снижается сродство гемоглобина к кислороду. Эффект сходен с действием низкого значения pH. В тканях, как известно, оно потенцирует высвобождение кислорода из оксигемоглобина при высокой концентрации  $\text{CO}_2$  (эффект Бора); связывание гемоглобина снижает сродство его аминогруппы к кислороду (эффект Холдена) [116].

Один литр крови поглощает около 1,8 ммоль  $\text{CO}_2$ ; из 50 %  $\text{CO}_2$ , содержащейся в венозной крови, 12% сохраняются в физически растворенном виде, 11% – образуют карбаминные соединения с гемоглобином, 27% – транспортируются в виде  $\text{HCO}_3^-$ -ионов плазмой крови.

Насыщение крови двуокисью углерода при различных значениях его парциального давления отражают сатурационные кривые (saturation – насыщение). Общее содержание углекислого газа крови складывается из концентраций физически растворённого и химически связанного углекислого газа, карбамата и гидрокарбоната [59].

С увеличением  $P_{\text{CO}_2}$  количество связанного  $\text{CO}_2$  постоянно возрастает, так как образование гидрокарбоната в крови практически не лимитировано (в сопоставлении с оксигенацией крови).

К тканевым капиллярам обычно притекает полностью оксигенированная кровь. По мере прохождения через капилляры кислород диффундирует в ткани, а способность крови поглощать  $\text{CO}_2$  увеличивается. В лёгких  $\text{CO}_2$  из крови легко выделяется в альвеолы, т. к. молекулярный  $\text{CO}_2$  легче проникает через биологические мембраны, чем  $\text{O}_2$ . По этой причине  $\text{CO}_2$  легко проникает в ткани и кровь; в эритроцитах связывание  $\text{CO}_2$  ускоряется карбоангидразой. Ткани обладают большой буферной емкостью, но не защищены от дефицита  $\text{O}_2$ , поэтому нарушение газообмена  $\text{CO}_2$  встречается реже и менее болезненно для организма, чем нарушение транспорта  $\text{O}_2$  [8, 9, 14, 62, 82, 147, 207].

*2.2.4.6. Эволюция дыхательной функции крови.* Эволюционные изменения дыхательной функции крови наиболее изучены у позвоночных животных. У наземных при переходе от низших форм к высшим, наряду с увеличением количества эритроцитов, происходит уменьшение их объема и увеличение суммарной поверхности. Такая же закономерность наблюдается и у рыб: наиболее крупные эритроциты у круглоротых и хрящевых; наиболее мелкие и в значительно большем количестве – у филогенетически более молодых – костистых рыб.

Приспособления к условиям существования в водной и воздушной среде привели к тому, что и у водных, и у наземных позвоночных животных появилась особенность, повышающая эффективность дыхательной функции крови, – увеличение кислородпереносящей поверхности эритроцитов за счет увеличения количества и уменьшения габаритов красных клеток крови. Концентрация гемоглобина в крови у наземных животных в целом отличается незначительно, а если внести поправку на объем ядра эритроцита, то она у низших представителей становится равной или несколько превышает таковую у млекопитающих.

Представители высших групп животных характеризуются сложной организацией и более высокой активностью, что обусловило появление механизмов, обеспечивающих увеличение поступления кислорода

посредством изменения свойств пигмента, увеличением его концентрации в крови и более высокого сродства к кислороду, а также в улучшение условий аэрации за счет повышения скорости передвижения крови, при этом дыхательный пигмент не изменяется количественно и качественно.

В филогенезе наземных животных усиление дыхательной функции крови было достигнуто за счет: 1) повышения дыхательной поверхности легких и кислородпереносящей функции крови; 2) уменьшения габаритов эритроцитов; 3) ускорения движения крови по сосудам.

Одна из важнейших особенностей, характеризующих процесс эволюции животных, – чувствительность/устойчивость к гипоксии и всевозрастающая потребность в кислороде, обусловленная высоким обменом веществ и энергии.

Специфика механизмов адаптации дыхательной функции крови к гипоксии разной природы определяется уровнем филогенетического развития животных и особенностями их экологии. Степень изученности этого вопроса недостаточна даже у млекопитающих животных. Как выяснилось, гипоксии не всегда сопутствует эритроцитоз, а эритроцитоз, как правило, приводит к сгущению крови и изменению гемодинамики. Адаптации к гипоксии у аборигенов горной местности и при индивидуальной адаптации (например, при подъеме с уровня моря в горы) протекает неоднозначно. Однако, как правило, высокая степень гипоксического воздействия приводит к формированию приспособительных реакций в системе крови, смысл которых – увеличение КЕК и облегчение захвата кислорода, его транспорта и отдачи тканям. Так, у человека, а также у лабораторных, домашних и многих диких животных это достигается полицитемией в единице объема крови, но последняя не может быть беспредельной, т. к. приводит к сгущению крови, «не выгодному» для организма с точки зрения гемодинамики. К этому механизму подключаются изменения свойств эритроцитов и гемоглобина, направленные на улучшение условий захвата, транспорта и отдачи кислорода.



В других случаях у типично горных животных (лам) улучшение транспорта кислорода и повышение КЕК достигаются путем резкого увеличения числа мелких эритроцитов, что, не повышая вязкости крови, способствует возрастанию поглотительной поверхности для захвата кислорода. К тому же гемоглобин у них обладает очень высоким сродством к кислороду и способностью легко отдавать его при низких значениях  $P_{O_2}$ .

Наконец, улучшение условий транспорта кислорода может произойти при одновременном разжижении крови и повышении эритропоэтической функции костного мозга. В этом случае КЕК будет выше только при расчете на единицу массы тела (но не на единицу объема крови), что в данном варианте не принципиально. Такой тип реагирования живой системы отмечен, например, у горных сусликов в период летней биологической активности [8, 9].

Не исключаются и другие способы адаптации дыхательной функции крови к гипоксии. Так, микроцитоз и низкий гематокрит препятствуют повышению вязкости крови – это наиболее благоприятная (для устранения гипоксии) адаптивная реакция организма, направленная на повышение поглотительной поверхности для контакта гемоглобина с кислородом и повышения КЕК.

При гипоксии существенным фактором адаптации становятся изменения свойств эритроцитов и гемоглобина:

- 1) более энергично протекают обменные процессы;
- 2) изменяется/повышается активность эритроцитарных ферментов;
- 3) повышается осмотическая резистентность;
- 4) укорачиваются срок созревания эритроцитов и цикл формирования, распада и элиминации красных клеток крови;
- 5) увеличивается забуференность живой системы;
- 6) повышается концентрация гемоглобина в единичном эритроците.

Помимо дыхательных пигментов крови, выполняющих функцию транспорта кислорода от органов дыхания к тканям, миоглобин,

локализованный в мышцах, способен запасать кислород, когда этот газ имеется в достатке и отдавать его в условиях дефицита, например, при нарушении доставки  $O_2$  извне. Миоглобином богаты клетки, обладающие интенсивным метаболизмом (сердечная мышца, особенно у видов с высокими значениями ЧСС). Миоглобин благодаря высокому сродству к кислороду, может забирать  $O_2$  из крови и служить его переносчиком к клеточным ферментам. В виде исключения мышечный гемоглобин встречается у некоторых беспозвоночных (см. 2.2.4.1.). Оксимиоглобин важен в дыхании для животных, у которых поступление кислорода происходит прерывисто.

У всех беспигментных видов основной путь проникновения  $O_2$  в организм – диффузия через поверхность тела. Эта форма сохранила свою актуальность также у животных, имеющих дыхательные пигменты (диффузия газов через стенку капилляров). Таким образом, древнейший способ поступления кислорода в организм сохранил свое значение на всем протяжении эволюционного процесса, включая высших млекопитающих животных.

Дыхательные пигменты – гемоцианин и хлорокруорин растворены в плазме; гемеритрин локализован в эритроцитах; гемоглобин у беспозвоночных и позвоночных, как правило, встречается в эритроцитах, повышая таким образом кислородпереносящую поверхность крови.

В эволюции животных с появлением дыхательных пигментов в циркулирующих по организму жидкостях особое значение приобретает сохранение этих веществ в сосудистом русле. Предотвращение выхода пигмента через стенку сосуда возможно двумя путями: увеличение молекул пигмента до гигантских размеров (пигмент растворен в плазме) или уменьшение молекул пигментов при одновременном включении их в специальные кровяные тельца. Следовательно, включение гемоглобина в кровяные тельца имеет важное биологическое значение именно для удержания в сосудистом русле гемоглобинов с малой молекулярной массой.

Еще в начале XX столетия Рейхарт и Браун (1909 г.) опубликовали данные изученных ими гемоглобинов более чем 200 видов животных. Эти исследования показали строжайшую специфичность гемоглобинов, которая может быть использована как признак при классификации животных [67].

Гемоглобины зародышей отличаются по свойствам от гемоглобинов материнских форм: в щелочном растворе гемоглобин зародыша денатурируется значительно быстрее, быстрее растворяется в концентрированном фосфатном буфере, менее стоек и более склонен к распаду на субмолекулы; различаются гемоглобины также по способу кристаллизации, что во многом зависит от аминокислотного состава глобина.

Гемоглобины пойкило- и гомойотермных животных различаются по отношению к температурному фактору: гемоглобины первых крайне чувствительны к малейшим колебаниям температуры и это отражается на архитектуре диссоциационных кривых; вторых – мало чувствительны к температурным колебаниям. Различные дыхательные пигменты, а также гемоглобины имеют отличные спектры поглощения [67].

Эволюционные изменения дыхательной функции крови у животных отражены в монографиях, многочисленных обзорах и статьях (Е.М. Крепс, 1935-1954; П.А. Коржуев, 1946-1973; Х.С. Каштоянц, 1950; З.Н. Барбашова, 1970-1981; Л.И. Иржак, 1983-1985; Л. Проссер, 1977).

## ГЛАВА 3. ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ЭРИТРОЦИТОВ.

### КИНЕТИКА ЭРИТРОНА

Поддержание эритроцитарного равновесия на физиологическом уровне осуществляется посредством механизмов продукции и деструкции красных клеток крови через образование в организме специфических веществ и гормонов, стимулирующих эритропоэз.

В физиологических условиях эритроциты человека находятся в кровообращении около 120 суток. На первой фазе, ретикулоцита, они не несут полную нагрузку гемоглобина, созревание завершается за 1-3 сут, в течении которых клетка выполняет функцию транспорта кислорода. На второй фазе, зрелого (функционального) эритроцита, клетка полностью выполняет газотранспортную функцию; на третьей фазе, дефицитного (не полноценного) эритроцита с уменьшенной эффективностью, утраченной гибкостью и сниженным метаболизмом, вследствие изнашиваемости ферментов без какой-либо возможности замены, эритроцит стареет. Лишенные способности переносить кислород красные клетки крови теряют свою функциональную ценность. На этой стадии они легко распознаются макрофагами, устраняются из кровообращения, тем самым, открывая путь молодым клеткам, вступающим в функциональный цикл.

Поступление эритроцитов в кровоток осуществляется активными движениями, наподобие процесса диапидеза лейкоцитов и таким образом клетки проходят среди расщелин, образованных фибробластами и эндотелиальными клетками в синусы, откуда поступают в венозную кровь. Полагают, что выталкивание эритроцитов из костного мозга происходит в порядке собственной непрерывной клеточной пролиферации. Выявленные способности ретикулоцитов самостоятельно передвигаться подтвердило наличие диапидеза и у молодых эритроцитов.

Процесс диапидеза начинается отделением оксифильного эритробласта эритробластического островка, за которым следует выталкивание ядра и

переход в кровеносную систему. Изгнание ядра может осуществляться одновременно с диапидезом. Диапидез достаточно изучен у ретикулоцита.

Ретикулоцит, который не прошел барьер, образованный стенкой сосудистого эндотелия, созревает в паренхиме, утрачивает способность диапидеза, остается заблокированным и фагоцитируется макрофагами. Эти эритроциты входят в состав неэффективного эритропоэза.

### **3.1. Методы определения продолжительности жизни эритроцитов**

Первоначально для количественного определения длительности жизни эритроцитов применялась методика переливания животному морфологически гетерогенной крови. Так, Марфелс и Молешот (1856) вводили овечьи эритроциты лягушке и находили в течение нескольких месяцев эти клетки в крови реципиента. Год спустя Броунсекар (1857) перелил птицам кровь различных млекопитающих животных и в течение месяца после переливания выявлял в организме реципиента клетки донорской крови. При переливании птичьих эритроцитов млекопитающим донорские клетки исчезали из циркуляции в течение нескольких часов. Эти наблюдения показали несостоятельность метода: перелитые (пересаженные) эритроциты быстро выводились из циркуляции вследствие возникновения гетероантител в крови реципиента [цит. по: 118, с.7-8].

В 1938 г. Вишер произвел переливание овалоцитов реципиенту с нормальной красной кровью и наоборот. Наблюдая уменьшение числа овалоцитов или нормальных эритроцитов, он построил эритрограммы, отражающие количественную динамику перелитых клеток. Этими исследованиями было установлено, что продолжительность жизни эритроцитов составляет от 13 до 36 суток.

В двадцатых годах двадцатого столетия широкое распространение получил метод дифференциальной агглютинации для определения выживаемости циркулирующих эритроцитов, а начиная с 50-х годов –

радиоизотопные методы, позволившие одновременно определять продолжительность жизни и костномозговую продукцию эритроцитов [57, 233, 294], а также провести сканирование печени и селезенки и, соответственно уточнить место преимущественного разрушения красных клеток крови [6].

Существуют два методических подхода при изотопной метке эритроцитов: 1) метится вся популяция клеток *in vivo* или *in vitro*; 2) метится популяция клеток одного возраста (когорты) *in vivo*. В качестве изотопной метки используются  $^{32}\text{P}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{55}\text{Fe}$ ,  $^{14}\text{C}$ , но в основном  $^{59}\text{Fe}$  и  $^{51}\text{Cr}$ . После маркировки определенного объема популяции эритроцитов подсчитывают через определенные промежутки времени ритм исчезновения индикатора из кровообращения, строят эритрограммы понижения радиоактивности по системе полулогарифмических координат и на основе процента к максимальной циркулирующей дозе через сутки после введения изотопа [57, 294].

Нормальная продолжительность жизни выражается либо в соответствии с периодом полураспада использованного изотопа, либо в зависимости от фактической продолжительности жизни. При изотопе  $^{51}\text{Cr}$  в первом случае показатель равен 22-25 сут, во втором – 120 суток.

Методу присущи три недостатка: 1) техническая сложность;

2) опасность введения в организм радиоактивных веществ, что ограничивает возможности применения метода у детей и абсолютно исключает – у беременных женщин. Однако этот барьер может быть преодолен заменой метки эритроцитов нерадиоактивным стабильным изотопом хрома –  $^{50}\text{Cr}$ , биологически идентичным  $^{51}\text{Cr}$  [3, 304];

3) не позволяет абсолютно точно установить момент прекращения продукции новых меченых эритроцитов, а следовательно, возникают затруднения в определении времени отчета длительности жизни клеток.

В целях определения темпов разрушения эритроцитов и органов, в которых этот процесс протекает наиболее интенсивно, используется определение коэффициента изгнания изотопа из кровообращения.

Из не прямых (ориентировочных) методик количественной оценки разрушения эритроцитов в организме, основанных на изучении продуктов распада эритроцитов, наиболее распространен метод определения величины экскреции уробилиногена и стеркобелина с мочой и калом. Первые опыты по изучению гемолиза и отсчету продолжительности жизни эритроцитов по количеству продуктов их распада были выполнены Эппингером (1920). Измеряя количество выделяемого билирубина у людей с желчной фистулой пузыря, он пришел к выводу, что продолжительность жизни эритроцитов составляет около 40 сут. Метод обладает тем преимуществом, что измеряемые величины продуктов распада (гемолизата эритроцитов) непосредственно зависят от числа разрушающихся эритроцитов, однако эта зависимость нелинейная, более того – было установлено, что количество уробилиногена не может служить абсолютной количественной мерой разрушения эритроцитов, поскольку часть его реутилизируется кишечником. [цит. по: 118, с.17].

После того, как было установлено, что ретикулоциты представляют собой молодые эритроциты, в течение короткого времени превращающиеся в нормоциты, начали разрабатываться методы, основанные на использовании подсчета ретикулоцитов (количество в кровяном русле и время их созревания) для определения суточной продукции эритроцитов, а таким образом и длительности жизни красных клеток крови.

Впервые это сделали Хит и Доланд (1930). Сущность метода заключалась в определении *in vitro* времени созревания ретикулоцитов до стадии нормоцитов и числа ретикулоцитов приходящихся на 1000 эритроцитов просчитанных на мазках крови, т. е. определяли количество ретикулоцитов, созревающих за сутки (на каждую тысячу клеток). Разделив 1000 на суточное количество созревающих эритроцитов, определяли

среднюю длительность их жизни: она оказалась равна 50 суткам. Первое детальное исследование продолжительности жизни эритроцитов, основанное на изучении процесса созревания ретикулоцитов выполнено Сейпом (1953) [цит. по: 118, с. 20].

Е.Н. Мосягина [118], анализируя известные методы исследования продолжительности жизни эритроцитов, приходит к следующим выводам:

1) методы, основанные на искусственном увеличении или уменьшении количества эритроцитов в организме, принципиально непригодны для определения длительности их жизни;

2) методы, основанные на определении в крови, моче и кале количества продуктов распада красных клеток, служат объективным качественным показателем гемолиза, но не отражают количественную меру интенсивности распада эритроцитов;

3) методы, основанные на переливании биологически или радиоактивно меченных эритроцитов, содержат ряд неточностей, снижающих надежность получаемых результатов. К тому же достаточно трудоемки и небезопасны;

4) из методов, основанных на подсчете ретикулоцитов принципиально правильным является определение количества ежедневно созревающих клеток этой популяции.

Определение продолжительности жизни эритроцитов – важный диагностический тест. При кровопотерях, экстремальных воздействиях жизненный цикл эритроцитов сокращается до 75 – 70 дней, а через 6 ч после острой массивной кровопотери сроки полужизни ( $T_{1/2}$ ) эритроцитов сокращаются до 27 дней [63].

### **3.2. Основные понятия клеточной кинетики**

Клетки крови представляют собой разнородную цитологическую систему, состоящую из элементов, различающихся как в функциональном и морфологическом, так и в кинетическом отношении; но их объединяет



общность гистогенеза; совместная циркуляция в периферической крови, участие в транспорте веществ и в выполнении защитных и регуляторных функций.

Нормальное кроветворение – сбалансированная клеточная система со сложной регуляцией постоянства количественного и качественного состава отдельных ее звеньев. Закономерности жизненного цикла отдельных клеточных поколений, переход клеток из одного цитологически однородного пула в другой, из костного мозга в кровь, из крови в ткань, резервация клеток, регуляция их рождения, движения по жизненному пути, старение и разрушение – составляет сущность процессов клеточной кинетики [68, 194].

В основе кинетических процессов в системе кроветворения лежат общебиологические закономерности жизни клеток. Клетка крови может находиться в одной из 3-х фаз жизненного цикла: деления (митотический цикл), временного обратимого покоя и фазе конечной дифференцировки (необратимого покоя). С созданием метода автордиографии в митотическом цикле стали вычленять 4 периода: M, G, S, G<sub>2</sub> [224].

Кинетика клеточной популяции характеризуется временными параметрами жизни клеток – время кругооборота, генерационное и транзитное время. Время, необходимое для замещения клеток какой-либо цитологической группы новыми, называют временем кругооборота одной популяции. Генерационное время – время, протекающее от завершения одного митоза до завершения следующего, то есть сумма времен, занимаемых интерфазой и митозом. Генерационное время клеток равно времени их кругооборота, но при условии, что каждая смена генерации сопровождается переходом из одной цитологической группы в другую.

Групповое транзитное время определяется как среднее время, прошедшее от вхождения клетки в цитологическую группу до выхода ее потомка из этой группы (время появления новой клеточной характеристики). Его можно рассчитать, зная размер группы, скорость поступления клеток и митотическую скорость внутри группы:

для группы предшественников –  $K_{\text{ВХ}}=0$ ;  $СТВ=N/K_{\text{М}}$ ;

для размножающихся клеток группы –

$СТВ_{\text{МАХ}}=N/K_{\text{ВЫХ}}$ ,  $СТВ_{\text{МИН}}=N/K_{\text{М}}+K_{\text{ВХ}}$ ;

для неразмножающейся группы –  $СТВ=N/K_{\text{ВЫХ}}$ ,

где СТВ – среднее транзитное время, N – число клеток в группе,  $K_{\text{ВХ}}$  – число клеток входящих в группу в единицу времени,  $K_{\text{ВЫХ}}$  – число клеток выходящих из группы в единицу времени,  $K_{\text{М}}$  – число митозов, происходящих в группе в единицу времени.

В начале 60-х годов прошлого столетия была предложена другая кинетическая модель стволовых кроветворных клеток (СКК), согласно которой основная их масса находится в фазе  $G_0$ . После деления СКК одна клетка пополняет группу клеток митотического цикла, а другая – потенциально способна к дифференцировке [цит по: 119, с. 11].

Эритропоэтический росток костного мозга состоит из элементов, основная функция которых – синтез гемоглобина. Количество гемоглобина в цитоплазме в сочетании с определенными признаками зрелости ядра и величиной клетки являются теми признаками, которые позволяют выделить основные стадии дифференцировки эритропоэтических элементов.

Модель эритрона, не утратившая своего значения и в наши дни была создана в 1960 г. английскими учеными L.G. Lajtha. Новые экспериментальные и клинические данные укладываются в предложенную ими схему (рис. 34).

Стадия	1a	1b	1c	II (РПн)	III (СПн-ППн)	IV (КР)								
	20 ч	20 ч	20 ч	30 ч	50ч	40 ч								
Скорость (2n пг/ч)	0,5	0,5	0,5	0,33	0,25   0,2									
Содержание Hb в клетке	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10*	11*	12*	13*	14*

**Рис. 34. Кинетическая модель эритрона (по L.G. Lajtha (1962) цит. по 119)**

*Примечание: Содержание гемоглобина в клетке (пг) 1\* – 14,40, 2\* – 7,20, 3\* – 21,60, 4\* – 10,80, 5\* – 25,20, 6\* – 12,60, 7\* – 27,0, 8\* – 13,50, 9\* – 24,50, 10\* – 0,1, 11\* – 0,15, 12\* – 0,12, 13\* – 0,10, 14\* – 30,0.*

Сущность ее заключается в следующем. Одна стволовая клетка дифференцируется без деления в родоначальную клетку красного ростка – пронормобласт (номенклатура авторов модели). В этой стадии развития клетка проходит два митотических цикла (1a и 1b), каждый из которых занимает 20 ч. Синтез гемоглобина в этой стадии идет с достаточно высокой скоростью – 0,5 пг на одну клетку в час. К концу второго митотического цикла перед делением клетка содержит 21,6 пг гемоглобина, дочерняя ее генерация – 10,8 пг гемоглобина и по своей морфологии является базофильным нормобластом (стадия 1 c). В этой стадии скорость синтеза гемоглобина, РНК и ДНК остается высокой, транзитное время соответствует генерационному циклу и занимает 20 ч. К концу митотического цикла базофильный нормобласт содержит 25,2 пг гемоглобина, количество гемоглобина у его дочерних клеток – ранних полихроматофильных нормобластов составляет 12,6 пг. При таком количестве гемоглобина синтетические процессы в клетке замедляются (II стадия): скорость синтеза гемоглобина на клетку в час 0,33 пг, генерационное время 30 ч. Средний полихроматофильный нормобласт (III стадия) содержит 13,5 пг гемоглобина. Такая концентрация специфического белка является критической, при которой синтез ДНК прекращается, что ведет к значительному замедлению синтеза гемоглобина в полихроматофильном нормобласте – 0,2 пг на одну клетку в час, а в стадии костномозгового ретикулоцита – 0,17-0,1 пг. Переход среднего полихроматофильного нормобласта в поздний полихроматофильный нормобласт происходит без деления, занимает 50 ч (III стадия) и связан с накоплением гемоглобина. В этой стадии пикнотическое ядро выталкивается из клетки или растворяется в ней, и клетки переходят в стадию костномозгового ретикулоцита (IV стадия) [цит. по: 119, с.106].

Однако, у части клеток во II стадии синтез гемоглобина может происходить быстрее и клетка подходит к митозу с достаточно высоким количеством гемоглобина (27 пг) и не может разделиться. Развитие такой тетраплоидной клетки происходит без деления; она переходит в

ортохромный нормобласт, из которого образуются более крупный ретикулоцит и эритромакроцит, содержащий более 30 пг гемоглобина. Такой тип развития эритроцитов был назван терминальным делением.

У части клеток количество гемоглобина достигает критической массы (более 27 пг) еще в стадии 1 с. Такое несинхронное развитие ядерно-цитоплазматических отношений приводит к ранней гибели клеток (в стадии синтезирующих гемоглобин ядросодержащих форм) и, не заканчивая свой цикл дифференцировки до нормоцита, разрушаются в костном мозге. Этот вид эритропоэза получил название неэффективного. Его можно оценить методом подсчета ретикулоцитов в периферической крови. Увеличение числа эритроидных клеток в костном мозге и отсутствие ретикулоцитов в периферической крови – характерные проявления неэффективного эритропоэза; на костномозговом уровне он может быть выявлен методом цитохимического определения полисахаридов в эритроидных клетках (PAS-реакция). Установлено, что терминальный эритропоэз составляет 5%, а неэффективный – 5-10% нормальной эритроидной продукции [63, 161]. Неэффективный эритропоэз – один из физиологических механизмов регуляции нормального баланса клеток в системе эритрона в условиях постоянно изменяющихся потребностей организма в продукции эритроцитов.

Ритмичность и закономерность гемолитических и эритропоэтических процессов послужили основанием для применения математических методов в изучении эритроцитарного равновесия в организме. Математический анализ и теоретические расчеты динамики уровня эритроцитов способствуют пониманию сущности явлений, при различных формах анемий, а также позволяют предвидеть ход развития гемолитических и эритропоэтических процессов [118].

Базовое уравнение эритроцитарного баланса было сформулировано E. Ponder (1944): количество эритроцитов в единицу времени равно разности между продукцией и деструкцией их в единицу времени. В дифференциальной форме уравнение выглядит следующим образом:

$$\frac{dN_t}{dt} = pt - qt,$$

где  $N_t$  – количество эритроцитов в момент времени  $t$ ;  $pt$  – интенсивность эритропоэза: количество эритроцитов, образующихся в единицу времени;  $qt$  – интенсивность гемолиза: количество эритроцитов, разрушающихся в единицу времени.

В современной клинической лабораторной практике в качестве показателя напряженности эритропоэза нашли широкое применение методики определения относительного содержания ретикулоцитов в периферической крови.

Е.Н. Мосягиной [118, 119, 211] разработан метод определения продолжительности жизни эритроцитов по скорости созревания ретикулоцитов *in vitro*. В основу метода положено допущение: равновесный эритроцитарный баланс, обеспечивающий постоянный уровень эритроцитов в крови, характеризуется одинаковым количеством поступающих в кровотоки и разрушающихся за равный промежуток времени эритроцитов. Динамика в каком-либо звене кинетики (снижение или усиление пролиферативной активности, ускорение или замедление дифференцировки эритропредшественников, изменение длительности жизни эритроцитов) приводит к нарушению равновесного состояния, что выражается в увеличении или снижении содержания эритроцитов в периферической крови. Количественной мерой эритропоэза служит количество ретикулоцитов, созревающих в единицу времени. Разница в содержании ретикулоцитов до и после инкубации крови позволит судить о количестве эритроцитов, поступивших в кровотоки или разрушившихся за этот отрезок времени.

Для определения длительности созревания ретикулоцитов наибольшее распространение получил метод изучения кривых созревания ретикулоцитов *in vitro*. Он заключается в следующем: цельную кровь инкубируют в термостате при температуре тела ( $37^{\circ}\text{C}$ ) и через определенные временные интервалы рассчитывают количество содержащихся в инкубированной крови

ретикулоцитов. На основе полученных данных строят гистограмму созревания ретикулоцитов.

Сложность анализа полученных гистограмм заключается в следующем:

1) ретикулоциты даже одной и той же классификационной группы поступают в кровотоки на разных стадиях зрелости (следовательно, созревают они неодновременно); 2) в пробах крови присутствуют ретикулоциты, имеющие не только разную скорость созревания, но и разную длительность пребывания в циркулирующей крови от момента вымывания из костного мозга до превращения в зрелые клетки [119].

При использовании различных методических подходов установлено, что уменьшение количества всех форменных элементов крови подчиняется экспоненциальной зависимости. На основе этой закономерности было высказано предположение [58] о том, что уменьшение количества ретикулоцитов происходит со скоростью, пропорциональной имеющемуся количеству ретикулоцитов, то есть имеет место зависимость:

$$-\frac{dN_p}{dt} = \lambda N_p = \frac{0,693}{T_{1/2p}} \cdot N_p,$$

где  $T_{1/2p}$  – период полувыведения ретикулоцитов из пробы, обусловленный их созреванием.

Из этого уравнения следует экспоненциальный закон изменения числа ретикулоцитов во времени:

$$N_p = N_{p0} \cdot e^{-\frac{0,693}{T_{1/2p}} \cdot t}$$

Период полувыведения ретикулоцитов вычисляют по формуле:

$$T_{1/2p} = \frac{0,301 \cdot t}{\lg \frac{N_{pt}}{N_{p0}}},$$

где  $t$  – время инкубации;  $N_{p0}$  – количество ретикулоцитов в пробе до инкубации, %;  $N_{pt}$  – количество ретикулоцитов в пробе после инкубации, %.

Продукцию ретикулоцитов в 1 мкл крови за 24 ч определяют по формуле:

$$P_{p/cym} = \frac{0,693 \cdot N_{p0} \cdot N_{ep} \cdot 24}{T_{1/2p} \cdot 1000}.$$

Исходя из экспоненциального закона уменьшения количества эритроцитов в кровотоке, величину суточной продукции их на 1 мкл крови определяют по уравнению:

$$P_{ep/cym} = \frac{0,693}{T_{1/2ep}} \cdot N_{ep},$$

где  $T_{1/2ep}$  – период полувыведения эритроцитов из кровотока (в сутках).

В условиях эритроцитарного равновесия, приравнивая продукцию ретикулоцитов и эритроцитов, можно получить оценку периода полувыведения эритроцитов:

$$T_{1/2ep} = \frac{T_{1/2p} \cdot 1000}{N_{p0} \cdot 24}$$

В условиях нормального эритроцитарного равновесия кинетические показатели эритроцитов – эритропоэз  $p_э$ , интенсивность гемолиза  $q_э$  и средняя длительность жизни эритроцитов  $T_э$  связаны между собой. При стабильном количестве эритроцитов эритропоэз равен гемолизу, а средняя длительность жизни эритроцитов – их количеству ( $N_э$ ), деленному на эритропоэз или гемолиз:  $T_э = N_э : q_э = N_э : p_э$ . [119].

Для математического анализа эритроцитарного баланса при различных состояниях организма необходимо принимать некоторые допущения, связанные длительностью жизни эритроцитов: 1) длительность жизни наиболее долговечных эритроцитов, то есть наибольшая потенциальная продолжительность их жизни; 2) среднее значение потенциальной длительности жизни всех эритроцитов; 3) средняя длительность жизни всех эритроцитов, обусловленная сочетанием их случайного разрушения и гибели вследствие старения. Поскольку вследствие случайного разрушения часть

эритроцитов не доживает до предельного по старению срока, средняя продолжительность их жизни меньше потенциальной.

С точки зрения эритрокинетики наибольший интерес представляет средняя продолжительность жизни эритроцитов, которая отражает интенсивность их разрушения и продукции. В связи с этим величину  $t$  можно представить следующим образом [84, 86]:

$$qt = (q_{cm}) \cdot t + (q_{cl}) \cdot t$$

где  $(q_{cl}) \cdot t$  – количество эритроцитов, разрушающихся в единицу времени из-за старения;  $(q_{cm}) \cdot t$  – количество эритроцитов, подвергающихся в единицу времени случайному разрушению.

При этом основное уравнение эритроцитарного баланса принимает вид:

$$\frac{dN_t}{dt} = pt - (q_{cm}) \cdot t - (q_{cl}) \cdot t$$

Величину  $(q_{cl}) \cdot t$  легко определить, исходя из того, что под влиянием случайного разрушения в единицу времени выбывает некоторая  $a$  часть всех эритроцитов, то есть  $(q_{cl}) \cdot t = at \cdot N_t$ .

В зависимости от соотношения между  $pt$  и  $qt$  количество эритроцитов может уменьшаться, увеличиваться или оставаться неизменным.

Если  $pt > qt$ , то  $\frac{dN_t}{dt} > 0$  – количество эритроцитов увеличивается.

Если  $pt < qt$ , то  $\frac{dN_t}{dt} < 0$  – количество эритроцитов уменьшается.

Если  $pt = qt$ , то  $\frac{dN_t}{dt} = 0$  – устанавливается эритроцитарное равновесие

[119].

### **3.3. Цитокинетики двух эволюционных ростков эритроцитарного ряда: ядерных и безъядерных форм эритроцитов**

Цитокинетические характеристики эритроцитарного баланса служат показателями функциональной активности, резервного потенциала или патогенеза в системе эритрона.



Цитокинетические показатели эритронов у здоровых доноров представлены в табл. 10 [58].

Таблица 10

**Показатели эритрокинетики у здоровых людей [58]**

Обследу- емый	N <sub>эр</sub> , млн/ мкл	N <sub>р0</sub> , ‰	N <sub>р4</sub> , ‰	ΔN <sub>р</sub>	T <sub>р</sub> , ч	N <sub>р</sub> /N <sub>р0</sub>	T <sub>1/2р</sub> , ч	T <sub>1/2эр</sub> , сут	P <sub>эр</sub> , тыс. · мкл · сут <sup>-1</sup>
				по Е. Н. Мосягиной					
М-ов	5,00	16,37	11,54	4,83	13,5	0,705	8,2	20,9	166,0
А-ев	4,52	11,42	8,30	3,12	14,6	0,725	11,3	41,2	76,0
П-ов	4,46	13,68	10,66	3,02	18,1	0,780	10,8	32,9	94,0
Г-ов	4,80	6,26	4,47	1,79	14,4	0,710	8,0	53,3	62,5
С-ко	4,69	8,57	6,52	2,05	16,7	0,760	7,7	37,5	86,1
Н-ев	4,50	12,74	7,59	5,15	9,9	0,595	5,2	17,0	183,4
С-ин	5,00	13,28	7,53	5,75	9,2	0,570	5,3	16,6	208,4
С-ов	4,51	9,80	8,40	1,40	28,0	0,84	10,3	43,8	71,4
М-ев	4,64	9,83	6,11	3,72	10,5	0,620	8,1	34,3	93,6
Г-ин	4,54	8,73	6,25	2,48	14,0	0,715	7,2	34,7	91,5
К-ов	4,68	15,85	12,05	3,80	16,7	0,790	7,2	16,8	193,0
Ш-ов	5,10	16,70	9,51	7,19	9,3	0,570	5,3	13,2	267,2
О-ов	5,00	6,24	3,32	2,92	8,6	0,530	4,7	29,6	110,4
Ф-ов	4,69	12,56	8,55	4,01	12,6	0,680	7,3	34,9	135,1
М	4,62	–	–	3,65	13,3	0,680	7,6	29,6	130,0
σ	0,19	–	–	1,7	5,7	0,076	1,90	11,7	60,0
m	0,03	–	–	0,47	1,6	0,021	0,53	3,2	16,7

Примечания: N<sub>эр</sub> – количество эритроцитов; N<sub>р0</sub> – количество ретикулоцитов до инкубации; N<sub>р4</sub> – количество ретикулоцитов после инкубации; T<sub>1/2р</sub> – период полувыведения ретикулоцитов из пробы, обусловленный их созреванием; T<sub>1/2эр</sub> – период полувыведения эритроцитов из кровотока; P<sub>эр</sub> – продукция эритроцитов.

Как видим у взрослых мужчин время созревания ретикулоцитов составляет 7,60±0,53 ч, выведения эритроцитов – 29,60±3,20 сут, а продукция эритроцитов – 130,0±16,7 тыс. · мкл · сут<sup>-1</sup>.

Цитокинетических характеристик для животных, имеющих ядерные эритроциты, в доступной изучению литературе нами не обнаружено. Унифицированные клинические методы количественного определения ретикулоцитов у человека в применении к ядерным эритроцитам птиц оказались неприемлемыми. Поскольку функциональное состояние эритроидного ростка кроветворения можно оценить по количеству ретикулоцитов в крови, нами усовершенствован и адаптирован для птиц

принятый в клинической гематологии способ определения количества ретикулоцитов в инкубированной крови (см. 5.3; [139]).

Модифицированный нами суправитальный способ окраски мазков основным красителем (1%-ный бриллиантовый крезоловый синий) позволил выявить органеллы, содержащие РНК и рибонуклеопротеиды, образующие в эритроцитах (ретикулоцитах) различные структуры из гранул и нитей, часто в виде сети, представляющей собой остатки базофильной субстанции протоплазмы (рис. 35). В крови птиц нами обнаружены ретикулоциты различной степени зрелости:

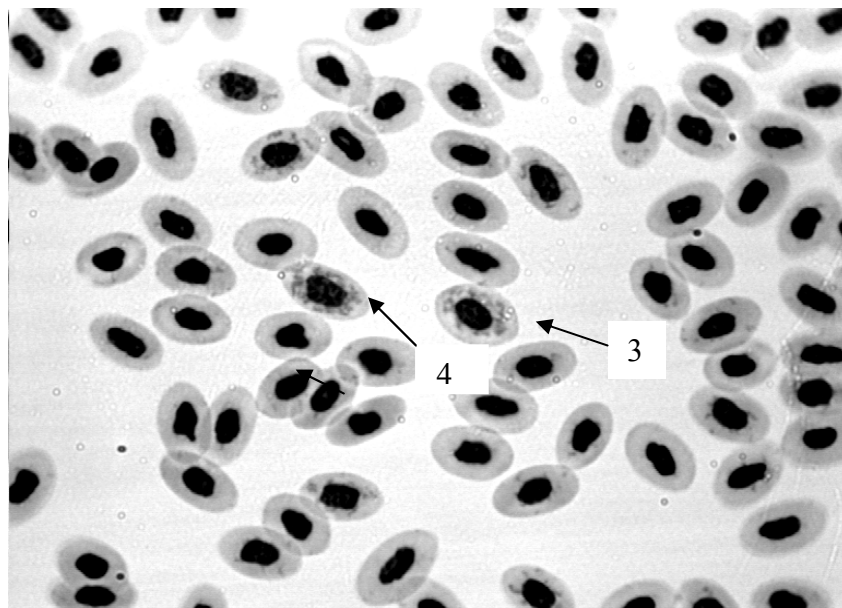
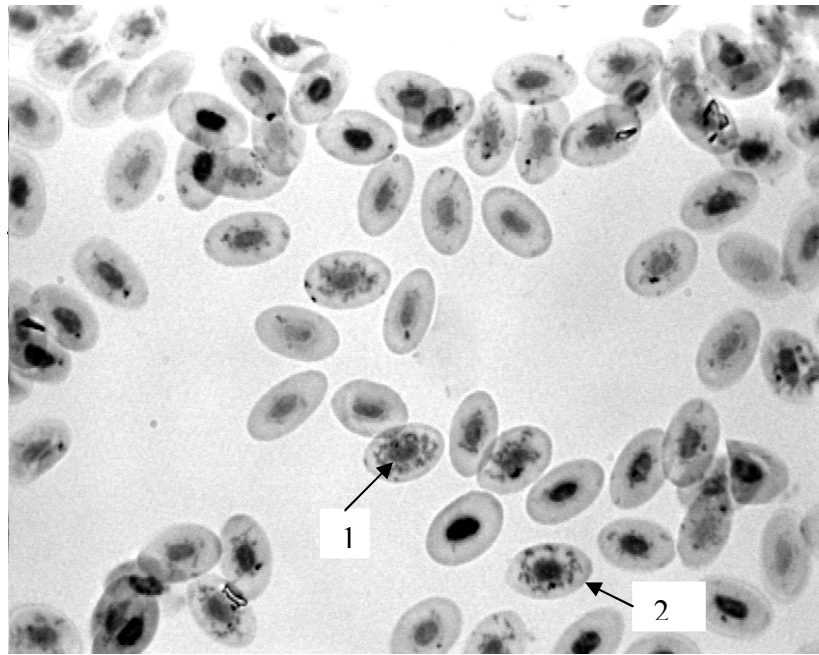
- ретикулоциты 1 класса – сеточка заполняет всю цитоплазму и накладывается на ядро;

- ретикулоциты 2 класса – сеточка густо заполняет всю цитоплазму и не накладывается на ядро;

- ретикулоциты 3 класса – сеточка расположена преимущественно вокруг ядра, иногда в виде эксцентрично лежащих клубков;

- ретикулоциты 4 класса – сеточка в виде нитевидных образований и отдельных включений, рассеянных по всей цитоплазме,

Эритроциты на мазке окрашены в бледно-зелёный цвет с интенсивно-синим ядром без внутриклеточных включений.



**Рис. 35. Эритроциты периферической крови петухов:**

1 – ретикулоцит 1 класса; 2 – ретикулоцит 2 класса;  
3 – ретикулоцит 3 класса; 4 – ретикулоцит 4 класса  
(увеличение 1600)

Идентификация ретикулоцитов позволила вычислить цитокинетические показатели эритроцитарного баланса у птиц (петухи, кросс «Иза Браун») в физиологических условиях [103]: оптимальное время инкубации пробы крови – 4 ч; период полувыведения ретикулоцитов из

кровотока –  $2,58 \pm 0,25$  ч; период полувыведения эритроцитов из кровотока –  $43,24 \pm 4,54$  сут; продукция эритроцитов –  $89945,1 \pm 12,03$  тыс. ·мкл·сут<sup>-1</sup>.

Хронофизиологическая (см. 2.2.2.) нагрузка инициировала эритропоэз у подопытных птиц (табл. 11).

Таблица 11

**Показатели эритрокинетики у петухов  
после хронофизиологической нагрузки, n=30; M±m**

Условия опыта	N <sub>эр</sub> , млн/мкл	N <sub>р0</sub> , %	N <sub>р4</sub> , %	T <sub>½р</sub> , ч	T <sub>½эр</sub> , сут	P <sub>эр</sub> , тыс. ·мкл·сут <sup>-1</sup>
Контроль	4,83± 0,19	2,54± 0,15	0,63±0,06	2,04±0,15	34,58± 3,48	105012,10± 16305,50
1-е сут	5,74± 0,29*	7,58± 0,60***	1,77±0,38*	1,93±0,25	11,09± 1,68***	428360,20± 63974,10***
3-е сут	5,57± 0,33	5,76± 0,56***	1,73±0,30*	2,46±0,32	19,94± 3,77*	244373,91± 39235,30*
7-е сут	6,20± 0,18***	6,03± 0,41***	1,05±0,19*	1,68±0,23	12,95± 2,91***	438300,00± 74788,50***
15-е сут	4,82± 0,37	3,34± 0,20*	0,83±0,07*	2,03±0,13	26,54± 3,01	138994,90± 23463,60
23-е сут	3,83± 0,12***	1,50± 0,15***	0,83±0,13	7,42±0,22*	165,20± 44,42*	23240,10± 5794,60***
29-е сут	3,80± 0,13*	3,14± 0,35	0,98±0,12*	2,78±0,54	46,07± 16,03*	86343,89± 14070,40

Примечания. Здесь и в табл. 11: N<sub>эр</sub> – количество эритроцитов; N<sub>р0</sub> – количество ретикулоцитов до инкубации; N<sub>р4</sub> – количество ретикулоцитов после инкубации; T<sub>½р</sub> – период полувыведения ретикулоцитов из пробы, обусловленный их созреванием; T<sub>½эр</sub> – период полувыведения эритроцитов из кровотока; P<sub>эр</sub> – продукция эритроцитов.

Статистическая значимость достоверности различия с исходными данными при \* – p < 0,05; \*\* – p < 0,002; \*\*\* – p < 0,001.

Как видим, через сутки после перевода птиц на естественный режим освещенности продукция эритроцитов возросла на 75,50% (p < 0,001) по сравнению с контролем (см. табл. 11). Стрессорное усиление катаболических процессов и гипоксия способствовали сокращению времени созревания ретикулоцитов – до  $1,93 \pm 0,25$  ч против  $2,04 \pm 0,15$  ч в контроле. Мощный выброс молодых форм эритроцитов с пониженной резистентностью (см. 2.2.2) обусловлен включением физиологических механизмов, контролирующих не только количественный уровень, но и физиологическую зрелость продуцируемых клеток. На 23-29-е сутки адаптационного периода

происходит омоложение эритроцитарной популяции. Замедление эритропоэза и снижение костномозговой продукции на 23-и сутки (на 77,87%;  $p < 0,001$ ) обусловлены накоплением в кровотоке молодых форм клеток, которые, как известно, по механизму обратной связи могут ингибировать процессы кроветворения [187].

Таким образом, адаптированный нами к исследованиям на птице способ определения интенсивности цитокинеза [137] позволил установить усиление функциональной активности эритроидного ростка костного мозга, проявляемое в сокращении периода полувыведения эритроцитов из кровотока на 67,93% ( $p < 0,05$ ) и времени созревания ретикулоцитов на 5,39%, ( $p > 0,05$ ).

В условиях хронического стресса в первые две недели отмечалось усиление эритропоэза, сменяющееся далее угнетением, вследствие истощения компенсаторно-приспособительных возможностей системы красной крови. При этом отчетливо прослеживались индивидуальные реакции на стрессирование (табл. 12).

Таблица 12

**Показатели эритрокинетики у петухов при хроническом стрессе,  $n=27$ ;  $M \pm m$**

Сутки	Условия опыта	$N_{эр}$ , млн/мкл	$N_{p0}$ , %	$N_{p4}$ , %	$T_{1/2 p}$ , ч	$T_{1/2 эр}$ , сут	$P_{эр}$ , тыс.·мкл·сут <sup>-1</sup>
2	Контроль	4,06±0,34	1,94±0,18	1,08±0,10	4,72±0,74	102,99±23,27	29938,00±5100,81
	Опыт	3,46±0,04	3,02±0,22**	1,37±0,07*	3,64±0,30	52,78±7,73	50614,20±7189,30*
3	Контроль	3,77±0,18	2,26±0,33	1,53±0,19	8,39±1,30	179,21±41,00	19517,50±5064,74
	Опыт	3,14±0,17*	2,82±0,27	1,21±0,11	3,5±0,49*	56,24±13,85*	45232,90±6684,41*
	Особь № 13	3,30	1,67	1,39	15,05	375,50	6090,28
7	Контроль	3,49±0,17	2,43±0,40	1,47±0,16	6,77±1,50	142,87±42,38	28763,80±9252,37
	Опыт	3,30±0,16	3,93±0,51*	1,84±0,29	3,60±0,13*	39,97±3,82*	55838,30±4939,53*
10	Контроль	3,87±0,21	2,59±0,20	1,32±0,11	4,13±0,21	69,14±9,09	41505,30±5160,46
	Опыт	3,61±0,10	2,39±0,06	1,07±0,06	3,51±0,20*	61,46±4,75	40950,20±2870,34

15	Контроль		3,97±0,31	2,46±0,04	1,48±0,06	5,57±0,37	94,57±6,60	29484,10±2447,23
	Опыт	I	3,33±0,52	1,24±0,04 <sup>***</sup>	0,65±0,05 <sup>**</sup> *	4,39±0,52	148,49±19,78 <sup>*</sup>	16934,00±3923,25 <sup>*</sup>
		II	3,99±0,11	1,63±0,03 <sup>***</sup>	0,59±0,00 <sup>**</sup> *	2,77±0,03 <sup>**</sup>	70,85±2,07 <sup>*</sup>	39091,90±2218,07 <sup>*</sup>
23	Конт-роль	I	4,22±0,43	1,59±0,04	0,83±0,03	4,25±0,05	110,83±2,99	26370,70±2448,08
		II	4,56±0,22	2,07±0,15	0,96±0,03	3,69±0,39	75,71±12,73	43623,90±5673,86
	Опыт	I	4,02±0,15	1,19±0,11 <sup>**</sup>	0,59±0,08 <sup>*</sup>	4,00±0,48	141,07±16,70	20550,7±3347,03
		II	3,24±0,15 <sup>**</sup> *	1,86±0,12	0,71±0,01 <sup>**</sup> *	2,85±0,32	63,64±3,46	35467,40±2729,15
29	Конт-роль	I	4,25±0,13	1,69±0,22	0,92±0,17	4,47±0,50	110,853±11,13	27184,30±3251,28
		II	3,92±0,24	2,17±0,24	1,03±0,18	3,66±0,32	70,57±1,49	38461,20±1605,91
	Опыт	I	4,32±0,36	1,42±0,06	0,76±0,08	4,49±0,56	131,64±12,29	23381,70±3559,07
		II	3,74±0,31	1,79±0,09	0,84±0,04	3,65±0,00	84,97±4,49 <sup>*</sup>	30806,10±4158,22 <sup>***</sup>

На основе показателей костномозгового кроветворения были вычленены три типа реакций: первую группу составили особи с резко выраженным угнетением эритропоэза, вторую – с умеренно выраженным, а реакция птиц третьей группы на стрессирование не отличалась существенно от контрольной.

Более подробно проанализируем выраженность эритропоэза у особей первых двух групп. Через две недели стрессирования у петухов первой группы (№ 1, 10, 18, 23) отмечалось снижение по сравнению с контролем количества ретикулоцитов (на 49,59%;  $p < 0,001$ ), укорачивался период их созревания (на 1,8 ч) и сокращалась костномозговая продукция (на 42,57%;  $p < 0,05$ ).

У петухов второй группы (№ 3 и 5) количество ретикулоцитов понижалось на 33,74% ( $p < 0,001$ ), время их созревания укорачивалось до  $2,77 \pm 0,03$  ч (в контроле –  $5,57 \pm 0,37$  ч), а костномозговая продукция увеличивалась на 24,58% ( $p < 0,05$ ).

На 23-и сутки стрессирования отмечалось дальнейшее угнетение эритропоэза у всех животных первой группы, но особенно значительно у трех особей (№ 1, 3, 10): понижалась продукция ретикулоцитов на 25,16% ( $p < 0,05$ ), эритроцитов – на 22,07% ( $p > 0,05$ ); костномозговая реакция эритрона проявлялась в резком увеличении (до 141,07 сут) времени циркуляции зрелых клеток.

Во второй группе подопытных птиц (петухи № 5, 18, 23) снижение продукции ретикулоцитов и вымывание в кровотоки эритроцитов составило соответственно на 14,29 и 18,69% ( $p > 0,05$ ). Сокращалось по сравнению с контролем время созревания ретикулоцитов и циркуляции зрелых форм эритроцитов (на 12,07 сут), что можно объяснить повреждающим действием метаболитов, выбрасываемых в кровотоки в ходе реализации стресс-реакции в условиях скученности (зоосоциальный стресс).

На 29-е сут у подопытной птицы продолжалось затухание эритропоэза. У животных первой группы (петухи № 1, 3, 10) количество ретикулоцитов и костномозговая продукция были ниже, чем у контрольных, соответственно на 15,98 и 13,99% ( $p > 0,05$ ); время созревания ретикулоцитов в опытной и контрольной группах отличалось незначительно – соответственно  $4,49 \pm 0,56$  и  $4,47 \pm 0,50$  ч. Во второй группе птиц (№ 5, 18, 23) снижение продукции ретикулоцитов было на 17,51% ( $p > 0,05$ ), эритроцитов – на 19,90% ( $p < 0,01$ ); время созревания ретикулоцитов в контрольной и подопытной группах составило соответственно  $3,66 \pm 0,32$  и  $3,65 \pm 0,002$ .

Таким образом, регенерация крови и сохранение/восстановление гомеостаза при напряженном эритропоэзе в процессе адаптации к постоянному действию стрессора, достигается у особей подопытной группы неоднозначно. При общей однонаправленности реакций – количественное снижение эритропоэза и сокращение функциональной разнородности эритроцитарной популяции – ритм регенераторных реакций в системе эритрона обуславливается лабильностью и адаптационными возможностями регуляторных механизмов, интенсивность функционирования которых

находятся в зависимости не только от потребностей организма птицы, но и ее индивидуальных особенностей.

Как известно, у млекопитающих животных гипоксия (и гипокинезия) сопровождается развитием дыхательного алкалоза (повышение рН крови и снижение  $PCO_2$ ), что приводит к повышению сродства гемоглобина к кислороду. В этих условиях повышается концентрация в крови эритропоэтина – индуктора эритроидной дифференцировки не только эритропоэтинчувствительных клеток, но и всех клеток эритроидного ряда, время созревания которых укорачивается, и скорость эритропоэза возрастает. Увеличение концентрации 2,3-ДФГ в эритроците облегчает отдачу гемоглобином кислорода и его диффузию в ткани [11, 12, 196, 197]. При остром стрессе (фотодесинхроноз) описанная реакция включается уже в первые сутки адаптивного периода; при хроническом стрессе (зоосоциальный) и разбалансированности регуляторных механизмов – на 15-е сутки.



## **ГЛАВА 4. ЭРИТРОН – ЦЕЛОСТНАЯ ГОМЕОСТАТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА**

Эритроциты – гомеостатическая система, отражающая сложнейшие интеграции клеток кроветворных органов, эритроидных клеток и их микроокружения, а также эритроцитов, циркулирующих в крови и депонированных. Развитие клеток эритрона из плюрипотентной стволовой клетки – генетически предопределенный процесс, его регуляция возможна лишь на определенных этапах.

### **4.1. Основы регуляции кроветворения**

Характерная черта системы гемопозитических элементов – их пространственная рассредоточенность, что предопределяет существование в организме нескольких уровней регуляции кроветворения. Эволюционно древними и наиболее эффективными являются наследуемые внутриклеточные гомеостатические механизмы регуляции митотической активности.

Часть регуляторов (челоны, античелоны) образуются и выделяются самими клетками крови, другие (эритро-, грануло- и тромбопоэтины) – иными тканями, при этом все они – дистантные, дальнедействующие гуморальные регуляторы [119]. В отношении клеток крови установлено, что разрушение зрелых эритроцитов стимулирует образование новых клеточных форм. В этом процессе большое значение имеет переход клетки из одной клеточной популяции в другую [40, 187].

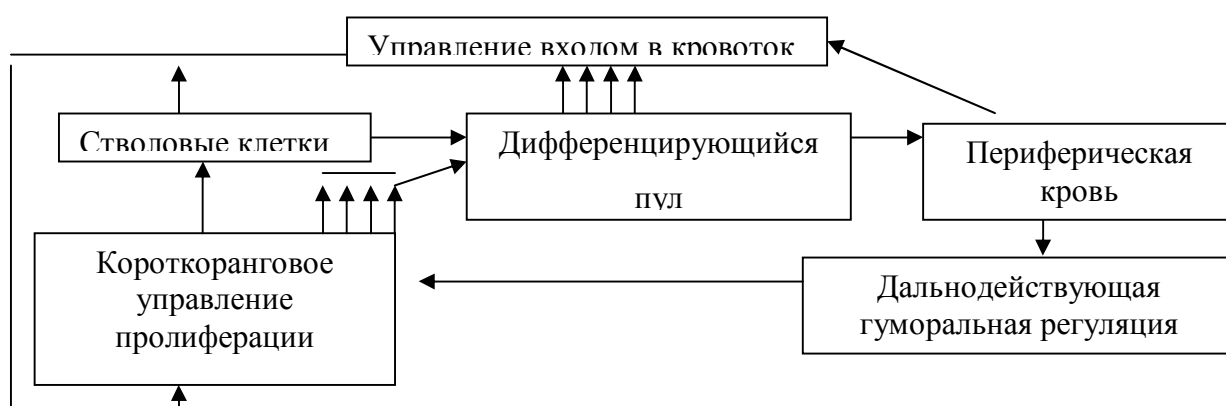
Для полипотентных стволовых клеток характерна близкодействующая регуляция посредством внутрисистемных регуляторных факторов: молекул гемопозитических цитокинов, нейромедиаторов, компонентов экстрацеллюлярного матрикса, формирующего стромальные клетки костного мозга и микроокружения в ЭО, создаваемого центральными макрофагами островка, что обеспечивает ответы кроветворения, адекватные воздействиям среды на организм. Следовательно, полипотентная стволовая клетка получает дифференцирующую информацию от ближайших стромальных

элементов либо посредством прямого контакта, либо через их микроокружение. В строме кроветворных органов мозаично расположены локусы («ниши»), каждая из которых индуцирует дифференцировку стволовой клетки только в одном направлении: эритроидном, миелоидном или мегакариоцитарном. Смешанные колонии могут образовываться в результате «захвата» двух ближайших «ниш». Соотношение между тремя микроокружениями составляет постоянную величину [48, 49, 51, 199].

Количественная регуляция кроветворения на уровне стволовых клеток разработана с учетом теории «критической массы»: дифференцирующие стимулы, достигнув определенной концентрации, вызывают дерепрессию мест транскрипции мРНК и связанный с этим синтез рибосом, тРНК и протеина. Это приводит к гипертрофии цитоплазмы клетки; при достижении ее размеров до «критической массы», включается синтез ДНК, и в интервале времени, равного протяженности S-фазы и фазы G<sub>2</sub>, клетка начинает делиться. Содержание «критическая масса» следует понимать как цитоплазматический сигнал ядру о том, что клетка стала биологически не полноценной из-за несоответствия между площадью поверхности и объемом в результате того, что процесс диффузии оказался неэффективным, либо в силу ряда других нераскрытых еще причин [119].

Пространственная гетерогенность гемопоэтических клеток предполагает существование гуморальных факторов, координирующих и регулирующих скорость образования зрелых клеток крови [206]. Такая гуморальная регуляция на внутриклеточном уровне возникает на стадии коммитированных стволовых клеток и носит характер дальнедействующей. Это позволяет подотделу коммитированных стволовых клеток выполнять «немедленные требования периферии» по увеличению интенсивности гемопоэза. Регуляция на этом уровне осуществляется гормонами – поэтинами – по принципу отрицательной обратной связи. Регуляция гемопоэза в стадии активно пролиферирующих эритропоэтических и гранулоцитарнопоэтических элементов также гуморальная.

В современной гематологии описана кинетическая модель кроветворения [51, 199]. Функции стволовой клетки выражены в процессах: пролиферации, дифференцировки и миграции. Каждый из процессов регулируется определенным фактором, динамически связывающим пул стволовых клеток с другими отделами гемопоэтической системы (рис. 36). В процессах количественной регуляции гемопоэза основное место занимают межклеточные взаимодействия. Как видим, кровь – одна из наиболее мобильных, быстро обновляемых систем в организме.



**Рис. 36.** Динамическая схема кроветворения [51].

В эволюции у животных сформировались системы регуляции, в том числе местная, независящая от эфферентной иннервации и действия приносимых с кровью веществ, получившая название ауторегуляции [158]. Первичны механизмы поддержания внутриклеточной митотической активности посредством активаторов и ингибиторов деления (челонов и античелонов), действующих в фазе перехода  $G_1$  в S. Челон предотвращает, а античелон стимулирует выход делящихся клеток в фазу синтеза ДНК. Их эффекты, основанные на обратных изменениях в синтезе короткоживущей РНК, включаются в механизм репрессии и дерепрессии транскрипции РНК.

Механизмы нейрогуморального воздействия, приобретаемые в процессе развития, вторичны. Они являются внутрисистемными регуляторными факторами, приводящими продукцию кровяных клеток в соответствие к запросам организма, в зависимости от условий жизни.

## 4.2. Механизмы ауторегуляции эритрона

Одна из важнейших функций живого организма – обеспечение кислородом тканей для осуществления молекулярных окислительно-восстановительных процессов. Оптимальный для метаболизма уровень дыхательных характеристик в организме поддерживается специальной функциональной системой [182].

Саморегуляция эритропoэтической системы достигается за счет обратных связей, реализующихся посредством нервных и гуморальных механизмов. В регуляции эритрона важную роль играет также межклеточное (креаторное) взаимодействие через микроокружение тканей. Креаторное взаимодействие – эволюционно древний способ регуляции в организме, осуществляется макромолекулами (кейлонами), несущими информацию, необходимую для регулирования внутриклеточного синтеза специфических молекул белка для облегчения дифференцировки, развития и объединения клеток в ткани. В физиологических условиях эритрона характеризуется ритмичностью, благодаря чему количество эритроцитов сохраняется практически неизменным [116].

Кислородтранспортная емкость крови и обеспечивающие ее количество и качественные характеристики эритроцитов – признаки предконечных результатов в функциональной системе, определяющей уровень газовых показателей в тканях [182].

В процессе эволюции у животных выработалась совершенная регуляторная система, поддерживающая гомеостаз, ее характерная особенность – точный ответ на все возмущающие воздействия. К управляющим структурам функциональной системы, определяющей уровень эритроцитов в организме, относятся: костный мозг, почки, печень, макрофаги (костного мозга и селезенки) и гипоталамус [158].

Влияние вегетативной нервной системы (ВНС) на систему крови осуществляется по пути перераспределения крови или активации/ингибиции гемопoэтических органов. Непосредственная регуляция гемопoэза

осуществляется симпатическим отделом ВНС с участием  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторов, обнаруженных на колониеобразующих единицах гранулоцитарно-эритроцитарно-моноцитарно-мегакариоцитарных, бурст-образующих и колониеобразующих эритроцитарных единицах (БОЕ-э и КОЕ-э), на макрофагах и фибробластах. Симпатические нервные окончания в ткани костного мозга при стимуляции гемопоэза активируют секрецию адреналина, норадреналина, дофамина [182]. Альфа- и бета-адренорецепторы эритроцитарных мембран участвуют в осуществлении контроля за морфофункциональным состоянием клеток. В частности, установлена зависимость природной гетерогенности популяции красных клеток крови и их резистентности от состояния  $\beta$ -адренорецепторов мембран, контролируемая активностью симпатического отдела ВНС [201].

Стимулирующее действие на эритропоэз оказывает гипофиз (через секрецию гипофизарного эритропоэтина). Из гормонов надпочечников выраженным активирующим действием на кроветворение обладают гидрокортизон, кортизон, кортикостерон, продукция которых находится под контролем АКТГ [64].

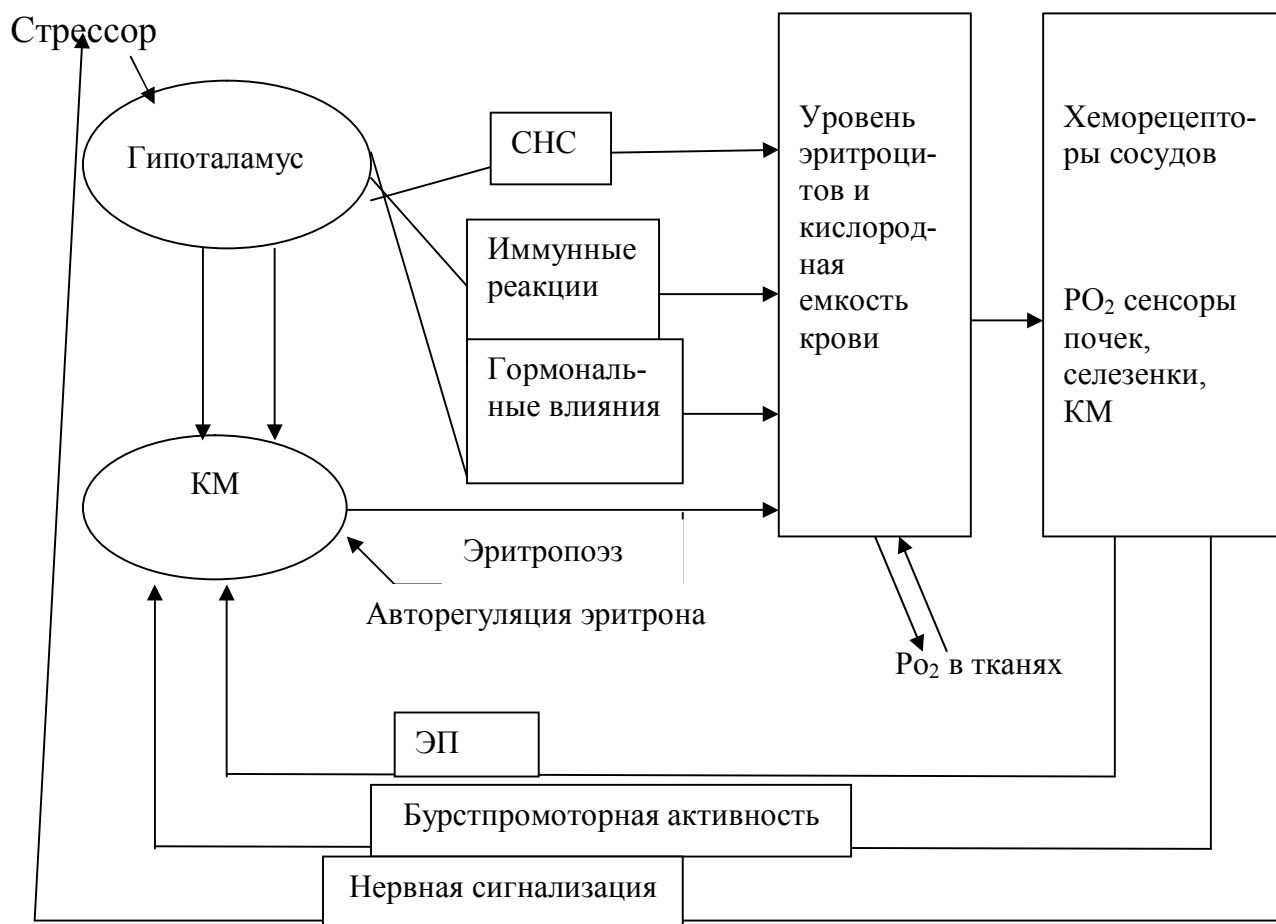
Одним из физиологических механизмов регуляции нормального клеточного равновесия в системе эритрона выступает неэффективный эритропоэз, связанный с процессом апоптоза. Апоптоз – процесс физиологической гибели клеток – является общебиологическим механизмом регуляции клеточной численности, наиболее широко представленный в быстро пролиферирующих популяциях гемопоэтических клеток. Регуляция гемопоэза во многом основана на способности клеток самоуничтожаться. В костном мозге здоровых людей разрушается от 5 до 20% эритроидных предшественников, при анемиях различного происхождения неэффективный эритропоэз возрастает до 50% и более [63, 161]

Морфологический состав периферической крови существенно изменяется при экстремальных воздействиях на организм. Среди регуляторов эритропоэза особую роль играет гипоксия, вызванная, например,

кровопотерей, гипобарическим фактором, недостаточностью функции дыхания и кровообращения, нарастанием метаболических потребностей организма. Изменение кислородтранспортной функции крови в условиях гипоксии установлено на клеточном уровне. Выявлена положительная корреляция между процессами ПОЛ и антиоксидантной системой с ухудшением деформируемости эритроцитов [52].

Гипоксия приводит к изменению среды функционирования гемоглобина в циркулирующих эритроидных элементах [178]. В частности, показана перестройка углеводного обмена в эритроцитах на более ранних этапах развития гипоксии, сопровождающаяся накоплением в них 2,3-ДФГ, что, как отмечалось нами ранее (см. 2.2.3), обеспечивает высокую степень дезоксигенации гемоглобина в тканях из-за снижения его сродства к кислороду. Оказалось, что 2,3-ДФГ уменьшает сродство гемоглобина к кислороду при различных видах гипоксии [116, 179], и таким образом все системные процессы настраиваются на оптимизацию стимулируемого гипоксией эритропоэза.

Механизм функциональных систем, поддерживающих кислородтранспортную емкость крови, включают связанные саморегулирующимися процессами компоненты: результат деятельности системы; обратную афферентацию; центр и исполнительные механизмы (рис. 37).



**Рис .37. Схема функциональной системы, поддерживающей оптимальный для метаболизма уровень эритроцитов и кислородтранспортной емкости крови [182]**

Под влиянием гипоксических состояний активируются кислородные сенсоры почки, печени, селезенки, костного мозга, хеморецепторы сосудов инициируется продукция эритропоэтина и других эритропоэтических гуморальных факторов (например, глюкозаминогликанов), усиливается бурстпромоторная активность (суммарный эффект ИЛ-3, КСФ-ГМ – грануломоноцитарный колониестимулирующий фактор, фактор стволовой клетки). В итоге активируются пролиферация и дифференциация КОЕ-ГМЭ, БОЕ-э, КОЕ-э, возрастают эритропоэтический эффект микроокружения эритроидных клеток в эритробластических островках и афферентная сигнализация, поступающая в ЦНС от сосудистых хеморецепторов. Эти процессы в рассматриваемой функциональной системе составляют звено обратной афферентации. Эритропоэтин, в свою очередь, воспринимается

рецепторами кроветворных клеток – клетками-предшественниками и эритробластами.

Экспериментально установлены тесная генетическая связь эритродиереза с эритропозом, возможность стимуляции эритропоза продуктами распада зрелых эритроцитов [187]. Явление эритродиереза обнаружено, в различных модельных опытах, например, при регенерации крови после кровопотери или гипоксической гипоксии [40, 187, 211]. Существует мнение, согласно которому эритропозитический эффект продуктов распада эритроцитов опосредуется через набор фагоцитирующих мононуклеаров, что подтверждается исследованиями эритропозитической функции макрофагов. Установлены стимулирующие эффекты на эритропоз микровезикул из плазмолеммы эритроцитов, образующихся в процессе старения клеток [182].

Существенный вклад в разработку вопросов ауторегуляции в системе эритрона внесли исследования, выполненные под руководством Я.Г. Ужанского [187]. Показана роль гипоксии в усилении катаболических процессов в организме и развитии эритродиереза, при этом стимуляция регенерации красной крови наступает вторично и опосредованно действием высвобождающихся при лизисе эритроцитов биологически активных веществ и синтезом эритропозина. Установлено, что интенсивное функционирование структур в дифференцированных клетках всегда сопровождается нарастанием скорости их распада. Предполагают, что так называемый «метаболизм изнашивания» или прямо воздействует на генетический аппарат клетки, или выступает в роли фактора-эффектора, снимающего репрессию регуляторных генов при синтезе белка. После увеличения массы функционирующего органа снижается интенсивность функционирующей структуры, что ведет к обратному процессу – снижению образования «метаболитов изнашивания», подавлению активности синтеза белка и инволюции гипертрофированной структуры. Следовательно, процессы эритропоза и эритродиереза представляют собой физиологически



единый процесс образования эритроцитов [187]. В момент стимуляции эритропоэза усиливаются гемолитические свойства крови и аутоиммунные процессы.

### **4.3. Эритропоэтин – гуморальный регулятор эритропоэза**

Эритропоэз (на уровне родоначальных клеток) – процесс двухэтапный:

1) плюрипотентные стволовые клетки трансформируются в коммитированные клетки и 2) коммитированные эритропоэтинчувствительные клетки дифференцируются в проэритробласты. Все последующие изменения, включая лимитированное число делений еще пролиферирующих клеток эритрона, и синтез гемоглобина отражают процесс созревания, заканчивающийся образованием эритроцитов. Следовательно, объектом регулирования является пул эритропоэтинчувствительных клеток. При увеличении или уменьшении ЭПЧК, способных вступить на путь эритроидной дифференцировки, изменяется и число вновь образованных красных клеток крови [197]. При этом эритропоэтин рассматривается и как индуктор эритроидной дифференцировки, и как стимулятор пролиферации эритропоэтинчувствительных клеток, т. е. активно влияет на «плацдарм» эритропоэза.

Эритропоэтин (ЭП) представляет собой термостабильный эфиронерастворимый гликопротеин с молекулярной массой 34 кД, содержит сиаловую группу и мигрирует при электрофорезе с  $\alpha_2$ -глобулином; содержит полипептидные группы. До 85-90% гормона образуется в перитубулярных клетках почки в области перехода кортикального вещества почек в медулярный слой. Гемсодержащий белок перитубулярных клеток, связывающий молекулу кислорода, высокочувствителен к гипоксии [119]. Следовательно, почки обладают свойством кислородного сенсора. Установлено, что кислородный сенсор клеток почек улавливает изменения  $P_{O_2}$  между 25 и 50 мм рт. ст. По некоторым данным, почечный порог  $P_{O_2}$ , ниже которого начинает увеличиваться продукция ЭП, лежит между 20 и

40 мм рт. ст. Уменьшение гематокрита периферической кров с 40 до 15-20 в 300 раз увеличивает образование эритропоэтиновой иРНК в почках. Механизм, позволяющий гипоксии резко усиливать воспроизводство ЭП, (т. е. чувствительность эритропоэтинчувствительных клеток почек и печени к изменению  $P_{O_2}$ ), исследован на молекулярном уровне [51].

По современным представлениям, процесс эритропоэза у человека и животных эритропоэтинзависимый. Посредством стимуляции или ингибиции продукции эритропоэтина почки могут участвовать как в повышении синтеза эритроцитов, так и в его подавлении. Образующийся в почках эритропоэтин соединяется со своим ингибитором и становится неактивным. «Связанный» эритропоэтин депонируется в почечной ткани и поступает (по мере необходимости) в кровяное русло, где специфический плазменный фактор отщепляет ингибитор ЭП – гормон становится активным [117].

У нефрэктамированных животных не установлено полного прекращения в организме синтеза эритропоэтина, поскольку в экстраренальном образовании гормона участвуют также печень, селезенка и подчелюстные слюнные железы; наиболее изучена роль печени в этих процессах. Методом культивирования тканей печени, полученных от плодов мышей, в течение месяца в среде, содержащей 20% лошадиной сыворотки, были получены доказательства участия печени в продукции эритропоэтина. Эритропоэтин, выявленный в культуральной среде, терял активность после добавления в среду антисыворотки. Биологическую эффективность вновь образовавшегося гормона оценивали по его влиянию на включение радиоактивного железа в эритроциты полицитемичных мышей и на рост эритроидных колоний в селезенке облученных мышей. Известно, что в эмбриональном периоде печень и селезенка млекопитающих обладают кроветворной функцией, поэтому закономерно участие этих органов в продукции эритропоэтина (в определенных условиях) [цит. по: 117, с.140].

Важное значение в экстраренальном образовании эритропоэтина имеют также подчелюстные слюнные железы. Их удаление, денервация или

перерезка протоков снижают (у крыс) экстраренальную продукцию эритропоэтина в ответ на стимулирующие воздействия (гипоксия, кровопотеря). Вероятно, одна из причин ингибиции синтеза эритропоэтина в этих опытах – снижение сосудистого тонуса.

Эксперименты, выполненные М.А. Медведевым с соавт. [110] на белых крысах, по изучению количественных показателей периферического звена эритрона в условиях гипер- и гипосальвации, также показали, что динамика функциональной активности слюнных желез сопровождается изменениями со стороны системы красной крови. В условиях сниженной функциональной активности слюнных желез наблюдается развитие регенераторной анемии через 2-4 недели после начала эксперимента. В условиях гиперактивности слюнных желез через 2 недели после начала эксперимента повышается эритропоэтическая функция костного мозга, о чем свидетельствуют рост числа ретикулоцитов в периферической крови, эритроцитоз, повышенное содержание гемоглобина.

Следовательно, функциональное состояние системы красной крови в условиях различного уровня функциональной активности слюнных желез зависит от количества эритропоэтина, продуцируемого (наряду с почками и печенью) слюнными железами. При дефиците гормона происходит угнетение процессов кроветворения. В условиях же гиперсальвации через две недели после удаления резцов нарастает количество эритроцитов в периферической крови, что связано с увеличением синтеза эритропоэтина, вследствие повышенной функциональной активности слюнных желез [110].

Роль селезенки в гипоксической стимуляции эритропоэза показана Л.С. Горожаниным. Удаление селезенки, согласно его наблюдениям, приводит к значительному угнетению эритропоэтической реакции в условиях прерывистой гипоксии. Гипоксия любой природы увеличивает в клетках этого органа экспрессию эритропоэтиновой иРНК и биосинтез эритропоэтина [42].

Следовательно, в онтогенезе в организме формируется эритропоэтинообразующая система. В эмбриональном периоде печень не только кроветворный, но и эритропоэтинообразующий орган. В постнатальный период печень утрачивает эту функцию и почки становятся основным органом синтеза ЭП.

Эритропоэтин ингибирует апоптоз, инициирует деление и укорачивает время созревания эритроидных клеток-предшественниц; при этом скорость эритропоэза возрастает. Под влиянием больших доз ЭП в циркулирующую кровь поступают макроцитарные ретикулоциты. Они ускоренно образуются из полихроматофильных эритробластов, перескакивая через митотическое деление [134, 135, 161, 162].

Выделяют несколько механизмов действия ЭП на клеточном уровне:

- 1) стимуляция пролиферации и созревания ранних и промежуточных ЭЧК в отделе ЭКП;
- 2) индукция терминальной дифференциации поздних ЭЧК в проэритробласты;
- 3) укорочение интермитотического периода генерализационного времени, повышение количества митозов в единицу времени у делящихся клеток эритрона;
- 4) ускорение созревания неделящихся клеток (нормобласты и костномозговые ретикулоциты);
- 5) исключение одного или нескольких промежуточных (обязательных) митотических делений («перескоки делений»);
- 6) уменьшение величины «неэффективного эритропоэза» (гибель эритроидных клеток в костном мозге).

В основе этих влияний лежит ускорение процесса синтеза гемоглобина. Первые два механизма – основные, остальные – дополнительные, включающиеся при эритропоэтическом стрессе [S. Fischer, 1962; цит. по: 135, с. 120].

На молекулярном уровне эффект эритропоэтина на клетки-мишени связан с ускорением синтеза РНК. Эритропоэтин *in vivo* стимулирует пролиферацию и терминальную дифференциацию ЭЧК, а также пролиферацию ранних ядросодержащих клеток эритрона. Эритроидная дифференциация и пролиферация, индуцированные эритропоэтином, сопровождаются интенсивным транспортом активированных аминокислот к полирибосомам, где специфические мРНК программируют синтез белков, входящих в состав клеток эритрона, в частности гемоглобина [135].

Модель эритроидной дифференцировки ЭЧК (на молекулярном уровне) включает несколько стадий: а) сенсбилизацию – образование в ЭЧК рецептора для эритропоэтина; б) индукцию – изменение транскрипции мРНК, специфичных для синтеза гемоглобина и других белков эритрона; в) специализацию – осуществление всех биохимических и морфологических модификаций, необходимых для синтеза ферментов, участвующих в процессе гемоглобинообразования. Эти процессы участвуют в транспорте железа, а также образовании ферментов синтетического пути гема, цепей глобина и гемоглобина, мембранных белков и эритроцитарных антигенов. В ходе специализации некоторые функции, характерные для ранних эритроидных клеток (синтез ДНК и РНК, митозы), утрачиваются [134].

ЭП взаимодействует с высокочувствительными рецепторами – интегральными белками мембраны эритроидных клеток-предшественниц. Активация эритропоэтина надмембранной части рецептора на клетке реализуется после взаимодействия одной молекулы эритропоэтина с двумя его рецепторами. Рецептор эритропоэтина состоит из двух субъединиц (массой 10 и 120 кД), т. е. из двух связывающих ЭП участков – высоко- и низкоэффективного к ЭП на поверхности эритроидной клетки-предшественницы. Связывание ЭП высокочувствительными рецепторами необходимо для полного биологического эффекта гормона. Количество рецепторов на мембране эритроидных клеток колеблется от 100 до 1000, сродство рецепторов к ЭП и масса ЭП варьирует от 10 пмоль до 10 нмоль.

В физиологических количествах гормон связывается с клетками, имеющими высокоаффинные рецепторы эритропоэтина [182].

Рецептор ЭП относится к «новой суперсемье рецепторов цитокинов». Надмембранная их часть, включает также рецепторы ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-7, колониестимулирующего фактора гранулоцитарно-моноцитарного, тромбоцитопоэтина, пролактина, гормона роста и обеспечивает связывание лиганда (цитокинов, гормонов) с рецептором гемопоэтической клетки. Цитоплазматическая часть этих рецепторов богата пролином, серином и кислыми остатками, а также имеет в проксимальном районе консервативные последовательности – box-1 и box-2, содержащие 20 аминокислотных последовательностей. Карбоксильное окончание рецептора ответственно за сигнализацию, предотвращающую апоптоз клетки. Нарушение функции рецепторов цитокинов может вызвать тяжелые негативные изменения в системе крови [51].

Эритропоэтин посредством передачи сигнала от рецептора к геному клетки активирует транскрипцию гена глобина, его  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей, усиливает пролиферацию и дифференциацию эритропоэтин-чувствительных клеток, воздействуя на транскрипционные факторы, находящиеся в цитозоле эритроидных клеток в неактивном состоянии. К ним относятся ядерные факторы NF-E<sub>1</sub> (обозначаемые так же, как GF-1, Eryf-1, GATA-1), NF-E<sub>2</sub>, NF-KB/REL и STAT-5:

NF-E<sub>1</sub> – ответствен за регуляцию транскрипции генов  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей глобина, рецепторов ЭП в эритроидных клетках. При нарушении функции NF-E<sub>1</sub> развитие эритроидных клеток-предшественниц обрывается на стадии проэритробластов, которые при этом дефекте быстро погибают;

NF-E<sub>2</sub> – лицинсодержащий фактор транскрипции, связывается с ДНК в районе локуса, контролирующего синтез  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей глобина. NF-E<sub>2</sub> экспрессируется в мультипотентных гемопоэтических клетках-предшественницах до их коммитирования в эритроидную линию;

NF- $\kappa$ B/REL – относится к семье факторов транскрипции, реализующих ответ генома гемопоэтических клеток на цитокины – опухольнекротизирующий фактор –  $\alpha$  (ОНФ- $\alpha$ ), ИЛ-1, 2, 6, 10, эритропоэтин;

STAT-5 – латентный цитоплазматический транскрипционный фактор, так называемый сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции в гемопоэтических клетках. Выявлены 6 членов этой семьи STAT- 1 – STAT-6 [51, 182].

Уровень ЭП теснейшим образом связан с транспортом кислорода и метаболическими потребностями тканей, при этом эритроциты не только переносят кислород связанный гемоглобином, но и модулируют сродство гемоглобина и кислорода. Возможность повышения количества доставляемого кислорода тканям обеспечивают также органы кровообращения (без изменения общего содержания гемоглобина), но только функциональное взаимодействие систем крови, дыхания и кровообращения, участвующих в транспорте кислорода, определяют кислородтранспортную емкость крови, и если она оказывается не достаточной для обеспечения физиологических функций, происходит запуск повышенной продукции ЭП [197], тем самым проявляется механизм экономизации функций организма.

Регуляция образования эритропоэтина осуществляется при участии нейрогуморальных механизмов, обеспечивающих оптимальное приспособление организма к постоянно изменяющимся условиям существования. Основным стимулом, вызывающим образование эритропоэтина, служит гипоксия [41]. В процессе образования гормона выделяют две фазы: программную и синтетическую [232]. В первой фазе клетки почек воспринимают эритропоэтический стимул и «определяют» уровень продукции эритропоэтина; во второй – синтезируют гормон (или его предшественника); в этот период клетки уже не способны воспринимать новые стимулы и изменять уровень продукции, запрограммированный в первой фазе [117].

Роль почечного «сенсора», реагирующего на изменения парциального давления, выполняют  $\beta$ -адренергические рецепторы метаболического типа. Блокада рецепторов этой группы тормозит образование эритропоэтина в ответ на гипоксию [238].

При стрессах помимо рефлекторных реакций (перераспределения крови) органов кровообращения и дыхания, направленных на увеличение количества доставляемого кислорода и модуляции сродства гемоглобина к кислороду важную роль в изменениях газотранспортной функции гемоглобина играет внутриэритроцитарная среда, в частности внутриклеточная концентрация физиологически активных лигандов гемоглобина:  $H^+$ ,  $CO_2$ , 2,3-ДФГ, рассматриваемых как адаптивный механизм, облегчающий транспорт кислорода к тканям.

Непосредственное влияние на органы, секретирующие ЭП, оказывает гипоталамус. Стимуляция заднего гипоталамуса у крыс и кроликов инициирует эритропоэз, происходят быстрое поступление эритроцитов в кровотоки и увеличение объема крови. Для получения положительного эритропоэтического эффекта заднего гипоталамуса необходима целостность холинэргической иннервации [117, 236, 277]. Введение атропина снижает ответ на гипоксию. При повреждении заднего гипоталамуса крысы реагируют на анемию более высоким подъемом ЭП [69, 125]; разрушение переднего гипоталамуса сопровождается развитием анемии, но без повышения уровня ЭП [69]. Кратковременная электростимуляция различных отделов гипоталамуса не сопровождается какими-либо изменениями эритропоэтических свойств плазмы; продолжительная стимуляция может сопровождаться повышением концентрации ЭП в плазме у нормальных и нефрэктомизированных животных [253, 279].

У крыс и кроликов гипофизэктомия снижает эритропоэтический ответ на гипоксию. Такое же влияние оказывает и разрушение вентральной (средней) части гипоталамуса у кроликов. Однако введение перед моделированием гипоксии АКТГ сопровождается появлением у



оперированных животных эритропоэтической реакции. В то же время у животных с поврежденным задним гипоталамусом введение АКТГ не восстанавливало эритропоэтический ответ на гипоксию. Следовательно задний отдел гипоталамуса обладает самостоятельным, не опосредованным через гормоны гипофиза влиянием на продукцию эритропоэтина. Повреждение ядер переднего гипоталамуса приводит к торможению эритропоэтического ответа [182].

При гипоксии происходит генерализованное усиление эфферентной симпатической импульсации; угнетение почечного кровотока и повышение активности ренина в плазме наблюдается при электростимуляции нервов почек. При денервации почки сохраняют способность реагировать повышением ЭП на кровопотерю и гипоксическую гипоксию. Многоконтурность регуляции внутрипочечного кровообращения позволяет обеспечить адекватную реакцию микроциркуляторного русла почки на гипоксию при ее денервации.

Стимуляция отдельных участков гипоталамуса вызывает у экспериментальных животных множественные изменения, т. е. гипоталамус может непосредственно влиять на секрецию ЭП.

В регуляции эритропоэтинообразующей системы организма принимают участие гормоны. Получено экспериментальное подтверждение участия гормонов гипофиза, щитовидной железы, надпочечников и половых желез в изменении уровня продукции эритропоэтина. При этом большинство гормональных препаратов оказывало на процессы эритропоэтинообразования стимулирующее воздействие, тогда как эстрадиол его тормозил. Андрогены и эстрогены оказывают противоположное влияние на продукцию эритропоэтина в организме, с чем в значительной мере связаны половые различия эритроцитарного состава крови. Имеются данные, что наряду со стимулирующим влиянием на образование эритропоэтина они ингибируют образование эритропоэтинчувствительных клеток из клеток-предшественниц эритропоэза [248, 278].

АКТГ, глюкокортикоиды (кортизол, преднизолон), соматотропин, тиреоидные гормоны ( $T_3$  и  $T_4$ ) стимулируют синтез ЭП у постгипоксических полицетимичных мышей и гипофизэктамированных крыс; у последних значительно редуцирован эритропоэтический ответ на гипоксию [41, 161].

В настоящее время детально разрабатываются молекулярные и клеточно-клеточные механизмы регуляции эритропоэза. В результате возникла возможность охарактеризовать физиологию таких процессов, как: дифференциация эритроидных клеток и их регуляция; механизмы, регулирующие продукцию ЭП в организме; рецепция ЭП клеткой-мишенью; передача эритропоэтического сигнала от рецептора к геному клетки; клеточно-клеточные взаимодействия, регулирующие эритропоэз [28, 51].

## **ГЛАВА 5. СПОСОБЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ ПТИЦ И НИЗШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ**

Количественный состав, морфология и биохимия клеток крови в норме, в условиях совершенных гомеостатических регуляторных механизмов отличаются высокой стабильностью. Динамика крови при измененных условиях (заболевания, экологические факторы, стрессорные воздействия, эмоциональная нагрузка, снижение общей реактивности организма и т.д.) крайне разнообразна, и исследования клеток крови приобретают первостепенное значение для характеристики физиологического статуса организма, дифференциальной диагностики возникших отклонений и последующего наблюдения развития в организме адаптационно-компенсаторного или патологического процессов.

### **5.1. Современные методологические подходы к анализу клеток крови**

Современный этап развития клинической гематологии связан с использованием новейших методов морфометрического и функционального исследования крови, основанных на достижениях медико-биологических наук. Наряду с клиническими цитоморфологическими анализами крови и кроветворных органов широкое распространение получили цитохимические методы исследования метаболизма клеток [183, 193], радиоизотопные методы изучения цитокинетики и обмена веществ [119, 194, 195], а также молекулярно-биохимические методы [63, 74].

Теоретические исследования в области обработки данных лабораторного обследования привели к созданию гематологических счетчиков разного уровня – от полуавтоматических одноканальных счетчиков до многопараметровых анализаторов, способных определять до 26 и более гематологических показателей со скоростью до 120 проб в час.

Современные компьютеризированные цитологические методы, применяемые в области исследования клеточной физиологии, дают возможность

изучить морфологию клеток на качественно новом уровне, с более высокой точностью и воспроизводимостью, чем при мануальных методах. Позволяют оценить состояние кроветворной системы, динамику изменения красной крови в процессе проводимой терапии и определить направление дальнейших исследований и т. д. [2, 53, 72, 90].

Совершенствование цитобиологических знаний позволило установить соответствие между формой клетки и типом воздействия на нее [114, 130], причем независимо от природы дезорганизации и трансформации клеток крови нарушение рельефа поверхности и формы приводит к функциональной неполноценности клетки. Идея об однозначном соответствии распределения клеток по размерам и форме в зависимости от источника клеточного материала и функционального состояния клеток, легла в основу разработки нового направления диагностики заболеваний по размерам и форме клеток [127] – дифференциальной диагностики с последующим наблюдением за результатом развития патологического процесса.

Данные многомерного анализа клеток могут быть положены в основу создания моделей, позволяющих раскрывать фундаментальные аспекты патогенеза многих функциональных состояний и нарушений в системе крови. В современной гематологической практике для определения количества и формы клеток используют анализаторы, работающие по принципу кондуктометрического подсчета клеток. На более сложных приборах используются оптические и радиочастотные детекторы [75, 79].

В трехмерном изображении, полученном с помощью сканирующей электронной микроскопии, заложены сведения об особенностях строения поверхностной цитоархитектоники мембраны, позволяющие структурно охарактеризовать различные формы эритроцитов, определить их функциональные особенности и процентное содержание [119, 133].

В последнее время в области гематологии и трансфузиологии возникло новое направление – гемоагрегатология крови, ставшая составной частью современной теории системной организации функций биологических структур

и фундаментальной базой для хирургии крови [30]. В рамках этого направления посредством использования новых экспериментальных и теоретических методов анализа интенсивно изучаются реологические свойства эритроцитов: вязкость, деформируемость, агрегационная способность, а также молекулярная структура эритроцитарных мембран [52, 93, 120, 121, 156]. Нарушения реологических свойств красных клеток крови играют важную роль в патогенезе самых распространенных заболеваний, таких как, гипертоническая болезнь [120, 228, 297], лейкемия [174], сахарный диабет [21, 77], гемолитическая анемия [160, 209].

Современная методология и методы клинической гематологии ориентированы на изучение крови человека и млекопитающих животных. Кровь птиц и низших позвоночных исследована значительно в меньшей степени. Основной морфологический маркер красной крови этих животных – наличие ядерных эритроцитов и присутствие в периферической крови наряду со зрелыми также дозревающих форм эритроцитарной популяции. Морфофункциональные особенности крови этих групп животных делают автоматический перенос методов клинической и ветеринарной гематологии не правомочным. Предлагаем разработанные и усовершенствованные нами некоторые способы исследования крови птиц и низших позвоночных [107, 137, 138, 139].

## **5.2. Способ визуализации форменных элементов крови птиц на одном мазке \***

В пробирку вносят 0,1 мл краски 1% бриллианткрезилблау, приготовленного на физиологическом растворе (рН 2,95-3), добавляют 0,1 мл крови и перемешивают в течение 30 с при температуре 18-20 °С, осторожно прокручивая пробирку, не допуская при этом резких движений и встряхиваний.

---

\* Патент на изобретение С2 2224235 RU G 01N 1/30. Способ визуализации форменных элементов крови птиц на одном мазке / Е.А. Липунова, М.Ю. Скоркина. (Белгородский гос. ун-т). – № 2002112129; заявл. 06.05.02 // БИПМ № 5, Ч. IV. – 2004. – С. 905.

Окраску производят при комнатной температуре (18-20<sup>0</sup>С) в течение 20-40 мин. Делают мазок на предметном стекле и подсушивают на воздухе, затем фиксируют в течение 3 мин в концентрированном растворе красителя-фиксатора по Лейшману. Не промывая, мазок помещают для докрасивания на 10 мин уже в разбавленный раствор красителя по Лейшману, приготовленный на буферном растворе (рН 6,8-7,2). После докраски мазок промывают тем же буферным раствором, подсушивают и проводят микрофотографирование под иммерсией. Для буфера готовят два раствора:

1. 9,5 г натрия фосфорнокислого двузамещенного безводного или 22,7 г натрия фосфорнокислого двузамещенного 12-водного доводят в мерной колбе до 1000 мл дистиллированной водой;

2. 9,07 г калия фосфорнокислого однозамещенного доводят до 1000 мл дистиллированной водой.

В мерную колбу на 1000 мл вносят 63 мл первого раствора и 37 мл второго и доводят до 1000 мл дистиллированной водой (рН полученного раствора должно находиться в пределах 6,8-7,2).

Данные по микрофотографированию мазков птиц (петухи кросса «Иза Браун») представлены в таблицах 13–16.

Таблица 13

#### Лейкограмма петухов

№ птицы	Псевдоэозинофилы				Эозинофилы	Базофилы	Моноциты	Лимфоциты
	Метамиелоциты	юные	Палочко-ядерные	Сегментоядерные				
1	1,5	5	13	31,5	6,5	5	4	33,5
2	–	3	16,5	23,5	2	10	5,5	39,5
3	–	3,5	17	26,5	3,5	4	9	36,5
4	–	4,5	9,5	22,5	6	6	6,5	45
5	–	2	12,5	26	2	5,5	7	45

Таблица 14

#### Концентрация тромбоцитов и ретикулоцитов в крови

№ птицы	% кол-ва тромбоцитов на 1000	Кол-во тромбоцитов в 1 мкл	% кол –ва ретикулоцитов на 1000	Кол-во ретикулоцитов в 1 мкл крови	Кол-во эритроцитов в 1 мкл крови

	эритроцитов	крови	эритроцитов		
1	1,221	37996,09	1,181	35314,961	2990000
2	1,312	58388,004	1,812	81298,07	4450000
3	1,760	56480,938	1,069	34314,869	3210000
4	1,385	71038,576	1,969	100984,252	5130000
5	1,406	50046,860	1,894	67437,687	3560000

Таблица 15

### Кариометрия эритроцитов

№ петуха	1	2	3	4	5
	4,097	4,198	4,226	4,279	4,305

Таблица 16

### Морфологические характеристики эритроцитов (эритроцитометрия)

№	Имя класса	Среднее	% Кол-ва	Гемато-крит, л/л	Объём клетки, мкм <sup>3</sup>	Толщина, мкм	Сферичность
1	Микроциты	7,274	5,714	0,425	142,140	2,394	3,038
	Нормоциты	9,125	89,61	0,425	142,140	2,394	3,811
	Макроциты	10,343	4,156	0,425	142,140	2,394	4,320
	Всего	9,090	100	0,425	142,140	2,394	3,796
2	Микроциты	7,272	4,519	0,435	122,191	2,205	3,298
	Нормоциты	8,819	94,892	0,435	122,191	2,205	4,000
	Макроциты	10,363	0,393	0,435	122,191	2,205	4,700
	Мегалоциты	12,600	0,196	0,435	122,191	2,205	5,714
	Всего	8,763	100	0,435	122,191	2,205	3,974
3	Микроциты	7,052	1,558	0,400	124,611	2,005	3,518
	Нормоциты	9,215	91,429	0,400	124,611	2,005	4,596
	Макроциты	10,373	6,494	0,400	124,611	2,005	5,173
	Мегалоциты	13,843	0,519	0,400	124,611	2,005	6,904
	Всего	9,281	100	0,400	124,611	2,005	4,629
4	Микроциты	7,239	2,133	0,490	95,517	1,631	4,437
	Нормоциты	9,140	92,800	0,490	95,517	1,631	5,602
	Макроциты	10,306	5,067	0,490	95,517	1,631	6,317
	Всего	9,158	100	0,490	95,517	1,631	5,614
5	Микроциты	7,317	4,918	0,530	119,101	2,061	3,550
	Нормоциты	8,991	92,272	0,530	119,101	2,061	4,362
	Макроциты	10,520	2,810	0,530	119,101	2,061	5,104
	Всего	8,952	100	0,530	119,101	2,061	4,343

Таким образом, на одном мазке крови, приготовленном по предлагаемому нами способу, можно провести ряд исследований, что позволит не только сократить время, но и сэкономить расход красителей и реактивов. Одновременно достоверность результатов повышается за счет исключения

травмирования и повреждения клеток крови. Фиксация суправитально окрашенных мазков дает возможность длительно их хранить и многократно исследовать.

### **5.3. Способ определения ретикулоцитов в инкубированной крови птиц\***

Ретикулоциты – молодые эритроциты; в них при специальной окраске выявляется так называемая ретикулофиламентозная субстанция, представленная остатками РНК и митохондрий. У человека и млекопитающих животных время созревания ретикулоцитов оставляет 4,5 сут, из них 3 сут – в периферической крови.

В пробирку внести 0,1 мл 3,8% цитрата натрия и 0,4 мл крови, осторожно, но тщательно перемешать и инкубировать в биологическом термостате при 39<sup>0</sup> С в течение 4 ч.

В пробирку налить 0,1 мл 1% раствора бриллиантового крезилового синего, приготовленного на физиологическом растворе (0,9% хлорида натрия) и 0,3 мл инкубированной крови, осторожно перемешать в течение 30 с. Окрашивать при рН 2,95-3,0 в течение 40 мин при комнатных условиях (t = 18 – 20<sup>0</sup>С). Сделать мазки на чистых обезжиренных стёклах и зафиксировать двумя-тремя каплями метанола до полного растекания спирта по поверхности стекла; высушить на воздухе. Микроскопировать под иммерсией. Подсчет ретикулоцитов (по степени зрелости) вести на 1000 эритроцитов, используя анализатор изображений, например ВидеоТест-Мастер-Морфология.

Способ позволяет выявлять одновременно ретикулоциты и эритроциты (табл. 17). Ретикулоциты – в виде вытянутых эллипсоидов, окрашенных в

---

\* Патент на изобретение С2 2227280 RU G 01N 1/28 1/30 33/48 33/49. Способ определения ретикулоцитов в инкубированной крови птиц / Скоркина М.Ю., Липунова Е.А. (Белгородский гос. ун-т). – № 2002119253; заявл. 16.07.02 // БИПМ № 11, Ч. III. – 2004. – С. 557.



бледно-зелёный цвет с ядром от светло-синего до фиолетового цвета, и синей сеточкой, имеющей различную конфигурацию в ретикулоцитах разной степени зрелости:

в ретикулоцитах 1 класса сеточка заполняет всю цитоплазму и накладывается на ядро (рис. 38);

в ретикулоцитах 2 класса сеточка густо заполняет всю цитоплазму, но не накладывается на ядро (рис. 39);

в ретикулоцитах 3 класса сеточка расположена в основном вокруг ядра, иногда в виде эксцентрично лежащих клубков (рис. 40);

ретикулоцитах 4 класса сеточка в виде нитевидных образований и отдельных включений рассеяна по всей цитоплазме (рис. 41).

Эритроциты – бледно-зелёного цвета с интенсивно синим ядром, без внутриклеточных включений.

В современных гематологических исследованиях относительное количество ретикулоцитов в периферической крови используется в качестве показателя активности эритропоэза. При определении количества ретикулоцитов мы получаем возможность оценить общую функциональную эритропоэтическую деятельность костного мозга. Проследить отдельные этапы этой деятельности можно с помощью исследования пунктатов костного мозга.

Таблица 17

**Показатели эритрокинетики у петухов в физиологических условиях**

№ ПТИЦЫ	$N_{эр}$ , млн/мкл	Классы ретикулоцитов, %	$Np_0$ , %	$Np_4$ , %	$T_{1/2 p}$ , ч	$T_{1/2 эр}$ , сут	$N$ , тыс. · мкл · сут <sup>-1</sup>
3	5,2	I – 0	2,7	0,8	2,28	35,18	102433,2
		II – 0					
		III – 1,2					
		IV – 1,5					
7	4,96	I – 0	2,6	0,4	1,48	23,71	137080,1
		II – 0					
		III – 1,8					
		IV – 0,8					
9	5,55	I – 0	3,4	0,5	1,45	17,77	216440,6
		II – 0,1					
		III – 1,6					
		IV – 1,7					
		I – 0					

10	3,7	II – 0	2	0,7	2,64	55	46620,0
		III – 0,9					
		IV – 1,1					

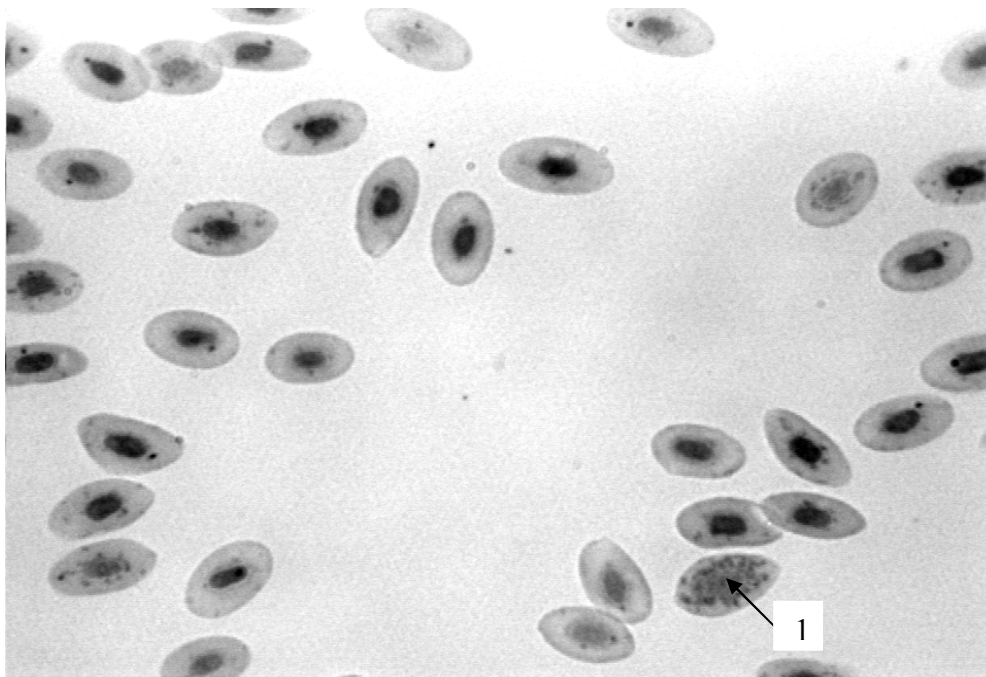
Примечания. Здесь и в табл. 16:  $N_{эр}$  – количество эритроцитов в 1 мкл крови;  $N_{p0}$  – количество ретикулоцитов до инкубации;  $N_{p4}$  – количество ретикулоцитов после 4 ч инкубации;  $T_{\frac{1}{2}p}$  – период полувыведения ретикулоцитов из пробы, обусловленный их созреванием;  $T_{\frac{1}{2}эр}$  – период полувыведения эритроцитов из кровотока;  $N$  – продукция эритроцитов.

Как видим, в условиях физиологической регенерации крови у птиц при нормобластическом типе кроветворения в периферическую кровь поступают недозревшие формы эритроцитов, где завершается процесс их формирования – ретикулоциты третьего и четвертого классов (см. табл. 17). При этом ритм регенераторных процессов системы эритрона (интенсивность эритропоэза) у отдельных особей зависит от лабильности и адаптационных возможностей нервных структур, а также функционального резерва костного мозга птицы. Скорость созревания ретикулоцитов изменяется в условиях напряженного эритропоэза вызванного разнообразными факторами внешней среды (табл. 18).

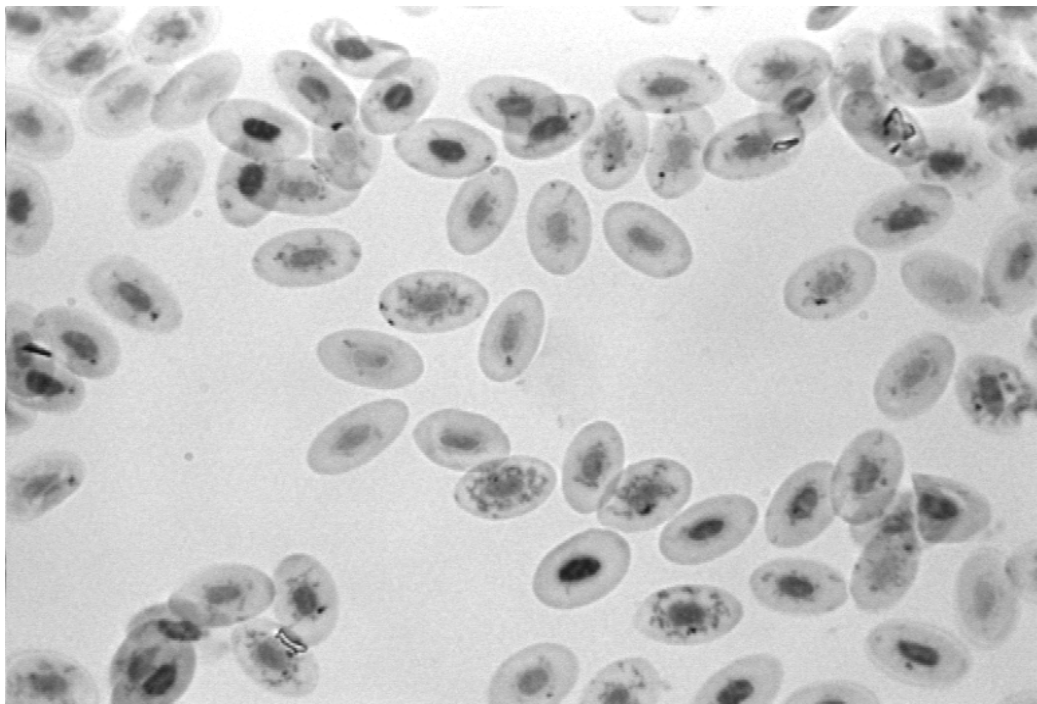
Таблица 18

**Показатели эритрокинетики у петухов при экстремальных воздействиях**

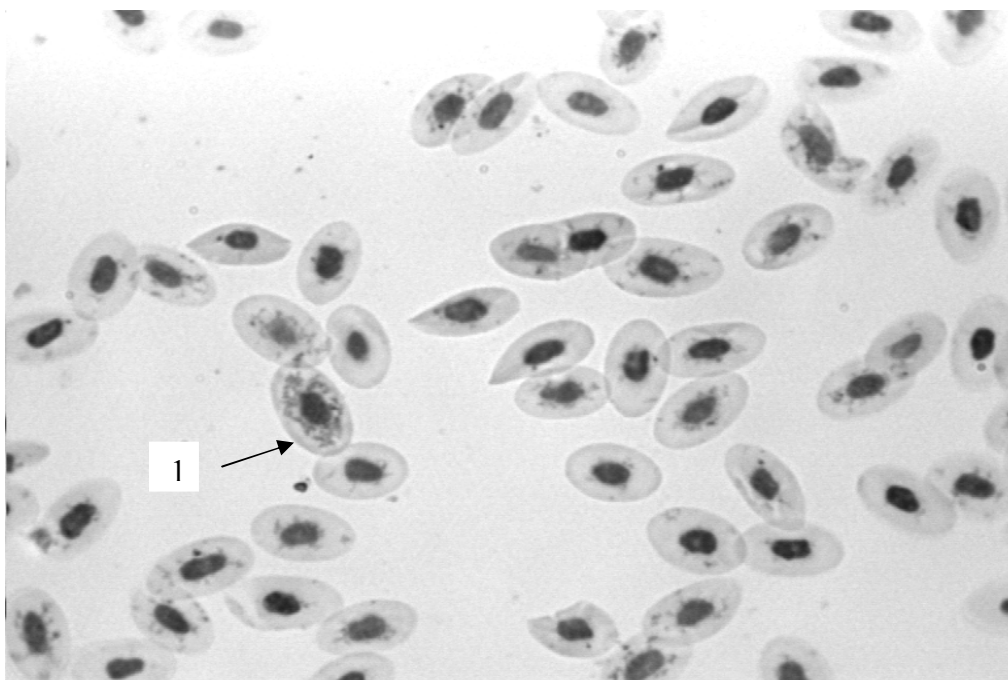
№ птицы	$N_{эр}$ , млн/мкл	Классы Ретикулоцитов, %	$N_{p0}$ , %	$N_{p4}$ , %	$T_{\frac{1}{2}p}$ , ч	$T_{\frac{1}{2}эр}$ , сут	$N$ , тыс. мкл·сут <sup>-1</sup>
3	4,81	I – 0,1	8,1	1,2	1,45	7,47	446288,7
		II – 1,5					
		III – 2,9					
		IV – 3,6					
7	5,88	I – 0,1	8,2	2,4	2,25	11,45	355788,0
		II – 0,6					
		III – 3,1					
		IV – 4,4					
9	6,86	I – 0	9,8	2,5	2,03	8,63	550866,7
		II – 1,1					
		III – 3,1					
		IV – 5,6					
10	6,71	I – 0,2	8,2	1,3	1,5	7,26	61024,02
		II – 0,5					
		III – 1,4					
		IV – 6,1					



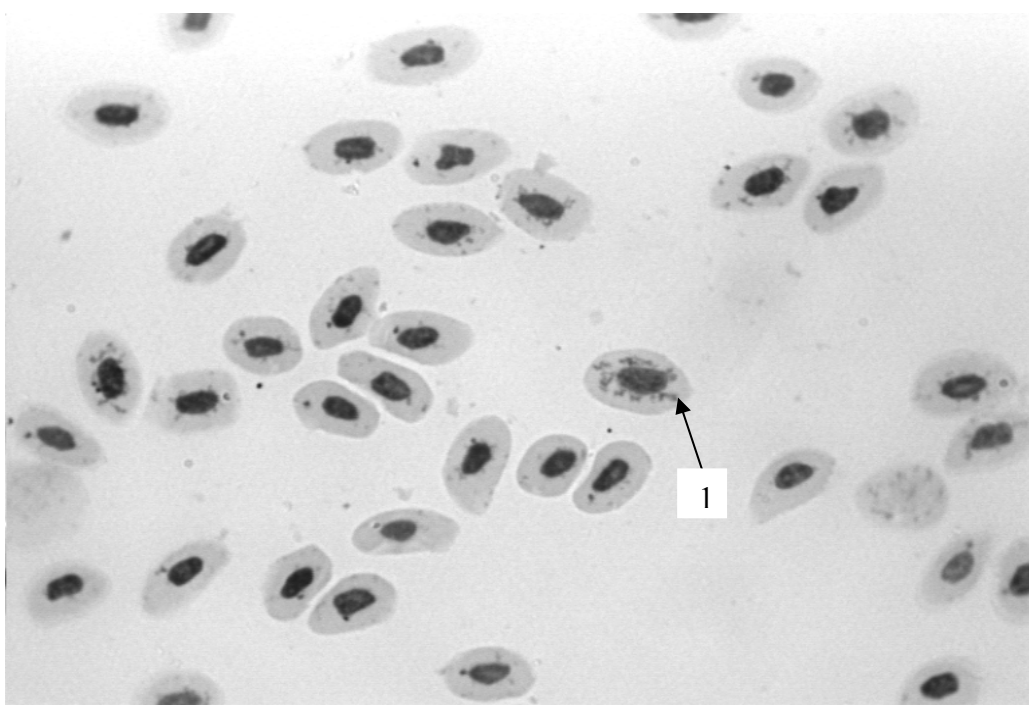
**Рис. 38. Эритроциты периферической крови петухов):**  
1 – ретикулоцит 1 класса. Увеличение 1600



**Рис. 39. Эритроциты периферической крови петухов:**  
1– ретикулоцит 2 класса, 2 – ретикулоцит 3 класса. Увеличение 1600



**Рис. 40. Эритроциты периферической крови петухов:**  
1 – ретикулоцит 3 класса. Увеличение 1600



**Рис. 41. Эритроциты периферической крови птиц:**  
1 – ретикулоцит 4 класса. Увеличение 1600

При возмущающих воздействиях активируется костномозговое кроветворение и в кровотоке вымываются молодые популяции клеток. Усиление катаболических процессов при стрессе, состоянии гипоксии и высокой повреждаемости клеток эритроцитарной популяции под воздействием стресс-гормонов приводит к сдвигам в скорости созревания ретикулоцитов – сокращается время их созревания и укорачивается период полувыведения эритроцитов из кровотока. В соответствии с этим изменяется интенсивность эритропоэза, выражающаяся в увеличении костномозговой продукции и появлении ретикулоцитов первого и второго классов.

#### **5.4. Способ идентификации субпопуляций эритроцитарной системы\***

В гематологии для описания формы эритроцита (промеры диаметров клеток) используют математическую модель цилиндрического тела. Однако величина диаметра клетки не дает представления об истинном увеличении или уменьшении размера эритроцита: оно обуславливается изменением всех размеров, то есть объема клетки. Классификация клеток по классам основывается на основе построения кривых Прайс-Джонса, которые представляют собой эритрограммы распределения эритроцитов по их диаметру. Они не способны в полной мере отражать кинетику, происходящих в эритроцитарной популяции процессов, поскольку сдвиг вершины кривой в сторону бóльших или мёньших диаметров не обязательно будет означать изменение качественного состава популяции. Для характеристики увеличения и уменьшения диаметра эритроцитов без изменения объема клетки были предложены обозначения «микро-» и «макроплатии». Физиологическими

---

\* Патент на изобретение С1 2234701 RU G 01N 33/48 А 61В 10/00. Способ идентификации субпопуляций эритроцитарной системы / Липунова Е.А., Никитин В.М., Чеканов Н.А., Скоркина М.Ю. (Белгородский гос. ун-т). – № 2002134029; заявл. 17.12.02 // БИПМ № 23, Ч. III. – 2004. – С. 573.

признаками эритроцитов птиц являются форма (в виде эллипса на плоскости) и наличие ядра в клетке, что отражается на функциональных свойствах клетки и реологических параметрах крови в целом.

Эритроцитометрические измерения на клетках с такими особенностями должны строиться на иной модели, в качестве которой нами был использован эллипсоид вращения. Поскольку ядра по своей форме напоминают клетку, то возможно применение единой модели для цито- и кариометрии.

Мазки крови, взятые у птицы в физиологических условиях и после воздействия на птицу экстремальных факторов, окрашивают по Лейшману, промеряют продольные и поперечные оси каждого эритроцита и рассчитывают морфометрические индексы по следующим формулам:

коэффициент конфигурации (числовой эксцентricности)  $\varepsilon_{ij} = \sqrt{1 - \left(\frac{b_i}{a_j}\right)^2}$ ,

объём  $V_{ij} = \frac{4}{3} \pi a_j b_i^2$ ,

площадь поверхности  $S_{ij} = 2\pi b_i \left( b_i + \frac{a_j}{\varepsilon_{ij}} \arcsin \varepsilon_{ij} \right)$ ,

толщину  $T_i = \frac{\pi b_i}{4}$ ,

где  $a_j$  – продольная полуось эллипса,  $b_i$  – поперечная полуось эллипса.

Идентификацию субпопуляций осуществляют следующим образом:

а) определяют средние значения морфометрических индексов в физиологических условиях для каждой субпопуляции. Например, у одной из исследованных птиц:

$$\bar{V}_{ij}^M = 172,17 \text{ мкм}^3, \bar{S}_{ij}^M = 152,11 \text{ мкм}^2, \bar{T}_i^M = 2,45 \text{ мкм (микроциты);}$$

$$\bar{V}_{ij}^H = 302,75 \text{ мкм}^3, \bar{S}_{ij}^H = 224,74 \text{ мкм}^2, \bar{T}_i^H = 2,83 \text{ мкм (нормоциты);}$$

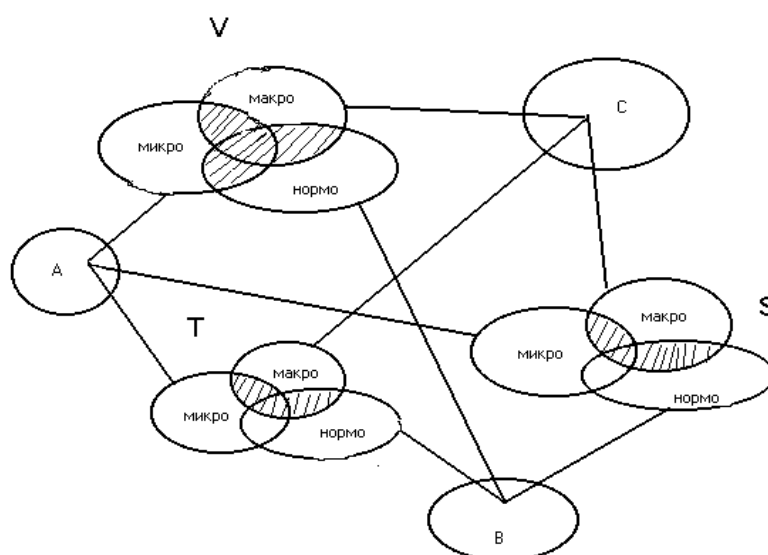
$$\bar{V}_{ij}^M = 500,85 \text{ мкм}^3, \bar{S}_{ij}^M = 313,29 \text{ мкм}^2, \bar{T}_i^M = 3,37 \text{ мкм (макроциты);}$$

б) для птиц определены следующие минимальные и максимальные значения морфометрических индексов в физиологических условиях:

микроциты  $151 \langle \bar{V}_{ij}^M \rangle 180$  мкм<sup>3</sup>,  $131 \langle \bar{S}_{ij}^M \rangle 158$  мкм<sup>2</sup>,  $2,32 \langle \bar{T}_i^M \rangle 2,45$  мкм;  
нормоциты  $200 \langle \bar{V}_{ij}^H \rangle 317$  мкм<sup>3</sup>,  $196 \langle \bar{S}_{ij}^H \rangle 232$  мкм<sup>2</sup>,  $2,6 \langle \bar{T}_i^H \rangle 2,88$  мкм,  
макроциты  $350 \langle \bar{V}_{ij}^M \rangle 583$  мкм<sup>3</sup>,  $264 \langle \bar{S}_{ij}^M \rangle 319$  мкм<sup>2</sup>,  $3,0 \langle \bar{T}_i^M \rangle 3,76$  мкм.

Изображение трехмерной модели областей значений индексов (V, S, T) для каждой субпопуляции, где A, B, C – области значений индексов для микро-, нормо- и макроцитов соответственно приведены на рис. 42;

в) задают величины отклонений  $\Delta\mu^M$ ,  $\Delta\mu^H$ ,  $\Delta\mu^M$  исходя из заданной вероятности правильной идентификации, например, для объема и площади поверхности  $\Delta\mu^M = \pm 2$ ,  $\Delta\mu^H = \pm 3$ ,  $\Delta\mu^M = \pm 3,1$ , для толщины  $\Delta\mu^M = \pm 0,01$ ,  $\Delta\mu^H = \pm 0,008$ ,  $\Delta\mu^M = \pm 0,008$ .



**Рис.42. Схема соотношения субпопуляций эритроцитарной системы**

Полученную модель можно использовать для идентификации субпопуляций эритроцитарной системы при исследовании крови птиц в ветеринарной диагностике. Принадлежность клетки к определенной субпопуляции устанавливают при попадании каждого индекса в непересекающуюся (незаштрихованную) область трехмерной модели, а если

хотя бы один из индексов попадает в пересекающуюся (заштрихованную) область трехмерной модели, то такая клетка не может быть отнесена к соответствующей субпопуляции.

Предлагаемый способ позволяет оперативно выявлять качественные изменения эритроцитарных субпопуляций, происходящие при физиологической и репаративной (патологической) регенерации системы красной крови, что дает возможность прогнозировать развитие адаптационных и патологических процессов в организме.

### **5.5. Способ оценки активности эритропоэза\***

Современная наука располагает достаточно широким арсеналом средств диагностики отклонения функций от гомеостатических параметров. Особого внимания заслуживают способы оценки функционального состояния организма по степени резистентности клеток крови к гемолитикам различной природы, основанные на скорости вовлечения в гемолитический процесс разновозрастных субпопуляций эритроцитарной системы. Установлено, что скорость клеточного ответа на воздействия будет зависеть от функционального состояния системы кроветворения и отдельных ее звеньев. Использование точных математических параметров, отражающих клеточную морфологию, позволяет создавать в области биологии клетки высокоспецифичные и информативные способы оценки функционального состояния эритропоэза, а следовательно, и организма в целом.

1 мл периферической крови лягушки стабилизируют гепарином в соотношении 0,1 часть антикоагулянта и 1 часть крови; готовят опытную и контрольную пробы стабилизированной крови. Опытную пробу инкубируют в течение часа в 0,2%, а контрольную – в 0,65% растворе хлорида натрия в

---

\* Способ оценки активности эритропоэза / Е.А. Липунова, В.М. Никитин, М.Ю. Скоркина, А.С. Зеленцова. – Заявка № 2004111098 на выдачу патента на изобретение, дата приоритета 12.04.04.



соотношении кровь / инкубационная среда 1:50. Затем из опытной и контрольной проб формируют однослойные монопрепараты и через каждые 30 с в течение 10 мин, а затем дополнительно через каждые 10 мин в течение одного часа в каждой из двух ортогональных плоскостей регистрируют на анализаторе изображений с программным обеспечением «ВидеоТест» временную последовательность групп проекций изображений эритроцитов  $N_{k\perp}, N_{o\perp}; N_{k\parallel}, N_{o\parallel}; M_{k\perp}, M_{o\perp}; M_{k\parallel}, M_{o\parallel}$ , содержащих по  $n_{k\perp}, n_{o\perp}; n_{k\parallel}, n_{o\parallel}; m_{k\perp}, m_{o\perp}; m_{k\parallel}, m_{o\parallel}$ . Полученные изображения сохраняют в базе данных. Измеряют габаритные размеры  $A_m$  и  $B_n$  всех эритроцитов, содержащихся в сохраненных изображениях временных последовательностей групп проекций  $N_{k\perp}, N_{o\perp}; N_{k\parallel}, N_{o\parallel}; M_{k\perp}, M_{o\perp}; M_{k\parallel}, M_{o\parallel}$ . По измеренным габаритным размерам эритроцитов всех зарегистрированных групп вычисляют соответствующие временные последовательности значений морфометрических индексов по формулам:

$$\text{а) объем: } V_{m,n(t)} = \frac{4}{3} \pi a_{m(t)} b_{n(t)}^2;$$

$$\text{б) толщину: } T_{n(t)} = \frac{\pi b_{n(t)}}{4},$$

где  $a_m = A_m/2$  – значение длинной полуоси эллипса,  $b_n = B_n/2$  – значение короткой полуоси эллипса.

По найденным значениям находят соответствующее значение биометрического индекса для каждой клетки из соответствующей им временной группы  $N_{k\perp}, N_{o\perp}; N_{k\parallel}, N_{o\parallel}; M_{k\perp}, M_{o\perp}; M_{k\parallel}, M_{o\parallel}$ , по формуле:

$$RVK_{(t)} = \frac{V_{(t)ин} / T_{(t)ин}}{V_{физ} / T_{физ}},$$

где  $V_{(t)ин} / T_{(t)ин}$  – отношение объема клетки к толщине при инкубации в 0,2%

растворе хлорида натрия;

$V_{физ} / T_{физ}$  – отношение объема клетки к толщине в 0,65% растворе хлорида

натрия.

Эритроцитарную популяцию классифицируют на две функциональные группы для каждой временной группы по рассчитанному значению биометрического индекса:

– recytus (рециты) при  $0,845 < RVK < 1,002$ , (клетки с биометрическим индексом  $[RVK]_t^r$ );

– letaliocytus (леталиоциты) при  $1,0021 < RVK < 1,211$ , (клетки с биометрическим индексом  $[RVK]_t^l$  (табл. 19). Оценку активности эритропоэза лягушки проводят по величине временного интервала, в течение которого происходит переход большей части клеток в класс леталиоцитов, начиная с момента времени, соответствующего началу процедуры инкубации, при этом применяют следующее решающее правило:

$$\sum_{t_{n-1,m-1}}^{t_{m,n}} [RVK]_t^l / \sum_{t_{n-1,m-1}}^{t_{m,n}} [RVK]_t^r > 1$$

при  $t_{m,n} \leq 30$  с – затухание эритропоэза,

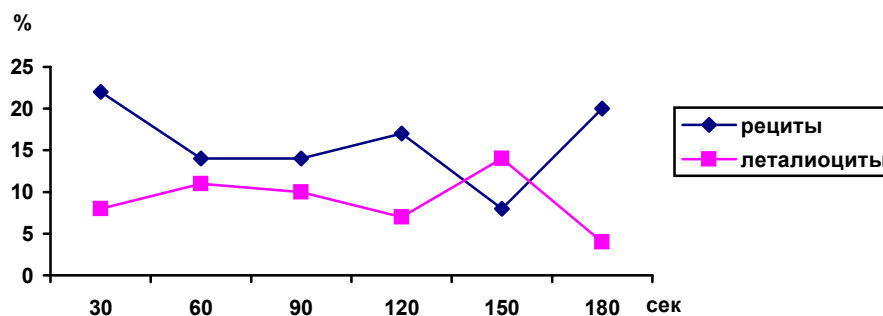
при  $30$  с  $< t_{m,n} \leq 60$  с – равновесное состояние эритропоэза,

при  $t_{m,n} > 60$  с – активация эритропоэза.

При исследовании крови лягушки по предложенному нами способу установлено, что через 30 с инкубации соотношение леталиоцитов к рецитам составило 8:22 ( $RVK < 1$ ); соответственно через 60 с инкубации количество рецитов уменьшилось, но соотношение составило 8:14 ( $RVK < 1$ ), а к 150 с инкубации – 14:9, т.е. выполняется решающее правило ( $RVK > 1$ ).

Таким образом, система кроветворения находится в состоянии активации эритропоэза, так как смещение пика (рис. 43) (характеризует повышение процентной доли леталиоцитов над рецитами) относительно равновесного состояния (от 30 до 60 с) наблюдалось на 150-й секунде. Смещение пика вправо свидетельствует о наличии более стойких функционально молодых клеток (имеющих достаточный резерв мембранного материала), а следовательно, об активации эритропоэза. При смещении пика на 30 с инкубации можно говорить о наличии функционально изношенных или

неполноценных клеток (более старых) с ограниченными регуляторными способностями.



**Рис. 43. Процентное соотношение функциональных групп клеток лягушки**

Высокая точность предлагаемого способа допускает применение этих диагностических показателей для оценки степени адаптированности животных к условиям среды обитания, а также функциональных резервов организма.

Способ технически прост и экономичен. Используя его, можно охарактеризовать активность эритропоэза, в частности в гематологии и экологии животных.

Таблица 19

**Функциональные группы эритроцитарной популяции лягушек, выделенные по биометрическому индексу (RVK)**

Продолжительность инкубации, с											
30		60		90		120		150		180	
Функциональные группы популяций											
г	L	г	L	г	L	г	L	г	L	г	L
0,99	1,11	0,96	1,09	0,92	1,17	0,93	1,04	0,92	1,09	0,92	1,05
0,97	1,14	0,93	1,06	0,93	1,00	0,94	1,08	0,98	1,13	0,88	1,06
0,86	1,16	0,96	1,00	0,90	1,11	0,85	1,10	0,92	1,08	0,87	1,12
0,95	1,09	0,94	1,12	0,94	1,11	0,93	1,12	0,94	1,14	0,91	1,03
0,90	1,08	0,97	1,07	0,94	1,11	0,89	1,14	0,85	1,06	0,89	
0,97	1,11	0,97	1,02	0,86	1,01	0,92	1,17	0,85	1,04	0,98	
0,92	1,01	0,93	1,06	0,90		0,98	1,05	0,97	1,16	0,93	
0,90	1,06	0,92	1,03	0,89		0,98		0,85	1,19	0,97	
0,96		0,91		0,88		0,86		0,89	1,15	0,85	
0,84		0,90		0,94		0,92			1,14	0,96	
0,91		0,98		0,93		0,93			1,04	0,98	
0,89		0,97		0,92		0,89			1,09	0,92	
0,89		0,97		0,92		0,93			1,10	0,86	
0,93		0,91		0,98		0,97			1,12	0,94	
0,87						0,94				0,93	

0,93						0,86				0,89	
0,94						0,96				0,92	
0,96										0,91	
0,95										0,89	
0,99										0,99	
0,93											
0,87											

Примечание: r – ретициты, L -леталиоциты

## **5.6. Лабораторные тесты исследования системы красной крови**

Для оценки функциональной полноценности и диагностики дефектности центрального и периферического звеньев системы эритрона необходимы специальные клинические и лабораторные методы исследования. Особенно важным является разработка экспресс-тестов для системы мониторинга состояния красной крови на системном, клеточном и субклеточном уровнях ее функционирования. Основные лабораторные тесты, имеющие важное диагностическое значение представлены в табл. 20.

Таблица 20

## Лабораторные исследования системы красной крови птиц и низших позвоночных

Уровень	Аспект исследования	Название тестов	Количество крови для анализа, мл	Срок получения информации, мин	Оборудование
Системный	Определение количественного состава клеточных субпопуляций системы крови	Подсчет эритроцитов и лейкоцитов в камере Горяева	0,02	20	Микроскоп, камера Горяева
	Определение объемной массы эритроцитов	Измерение гематокритной величины	0,1	5	Гематокритная центрифуга
	Определение уровня гемоглобина в крови	Унифицированный гемиглобинцианидный метод определения концентрации гемоглобина в цельной крови	0,04	20	Фотоэлектроколориметр
	Определение коэффициента внутреннего трения крови	Определение вязкости крови	0,5	15	Вязкозиметр
Клеточный	Определение возраста эритроцитов	Способ определения ретикулоцитов в инкубированной крови	2	600-680	Анализатор изображений с программным обеспечением
	Исследование морфологии эритроцитов	Способ идентификации субпопуляций эритроцитарной системы. Способ визуализации форменных элементов крови птиц на одном мазке			Анализатор изображений с программным обеспечением

	Определение устойчивости эритроцитов к гемолизикам различной природы	Тесты на кислотную, осмотическую, мочевиновую и перекисную резистентность	0,2 1,5 2 (эр. масса) 2 (эр. масса)	15 40 15 30	Фотоэлектроколориметр
	Определение мембранного резерва эритроцитов	Вычисление биометрических индексов эритроцитов. Способ определения активности эритропоэза	0,2 (эр. масса)	120	Камера Горяева, анализатор изображений с программным обеспечением
	Определение вязкости клеток крови и плазмы	Расчет вязкости суспензии эритроцитов и внутреннего содержимого эритроцита	0,5 (эр. масса)	30	Вязкозиметр
Субклеточный	Исследование гетерогенной системы гемоглобина	Реакция Клейхауэра на фетальный гемоглобин	0,001	20	Микроскоп
		Пероксидазная реакция Лепена	0,001	30	Микроскоп
	Выявление железа в клетках гемопоэза	Реакция Перльса	0,001	90	Микроскоп
	Выявление гликогена в эритроидных клетках*	Шифф-иодная реакция	0,001	90	Микроскоп

\* В физиологических условиях гликоген не выявляется, однако при патологии эритропоэза эритроциты дают положительную реакцию.

Оценка кислородтранспортной функции крови предполагает дифференцированную характеристику функциональной активности красных клеток крови – их возрастную и цитокинетическую гетерогенность. Для этого разработан и внедрен в клиническую практику ряд тестов.

По относительному количеству ретикулоцитов в периферической крови как показателя активности эритропоэза, возможно оценить эритропоэтическую деятельность костного мозга. Показателем репродуктивной способности костного мозга является общее количество эритроцитов в периферической крови. Используя его в качестве индикатора регенераторной активности эритробластической части костного мозга и экспериментально определив полупериод гибели эритроцитов, рассчитывают общую возмещенную потерю эритроцитов, которая информирует о том, какое количество клеток поступило в кровотоки, что, по сути, определяет костномозговую продукцию эритроцитов.

Особого внимания заслуживают способы оценки функционального состояния организма по степени резистентности красных клеток крови к гемолитикам различной природы, основанные на установлении скорости с которой вовлекаются в гемолитический процесс разновозрастные субпопуляций эритроцитарной системы.

Зрелость и полноценность клеток эритроидного ряда могут быть определены по эффективности функционирования гетерогенной системы гемоглобина и ферментных систем клетки.

Таким образом, интегральным показателем функционирования системы эритронов выступают количественная оценка эритроцитов крови, а также состояние их ферментных систем.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

---

Достижения биохимии, цитофизиологии, автоматизированных методов микроанализа и визуализации форменных элементов крови позволяют определять до 500 важнейших параметров, объективно отражающих состояние всех видов интермедиарного обмена, активность важнейших ферментных систем, морфологии и геометрии клеточного состава, т. е. получать специфическую информацию о физиологическом состоянии и патологических отклонениях во внутренних органах и системах и, таким образом, оценить физиологическое состояние (здоровье) человека (и животных).

В настоящее время наиболее активно (и продуктивно) предваряются научные разработки в области кроветворения. Изучение структурно-функциональных свойств крови представлено в меньшей степени, но значимость этих работ исключительно велика. Так, изучение дыхательной функции крови и свойств гемоглобина актуально для разработки крупнейшего научного проекта современной физиологии и биохимии «Искусственная кровь» [136. 166. 167. 282. 302]. Гемотрансфузия цельной консервированной донорской крови – сложнейшее комплексное воздействие на организм реципиента. Кровь, заготовленная на искусственных консервантах, в процессе даже недлительного хранения подвергается существенным изменениям. Физико-химические процессы, протекающие в ней, приводят к гипернатриемии, калиемии, гемолизу, повышению содержания аммиака, глюкозы, фосфатов, изменению



морфофункциональных свойств эритроцитов, увеличению сродства гемоглобина и кислорода [167]. Кровь и ее компоненты могут быть опасными биологическими продуктами, способными стать источниками гемотрансмиссионных болезней.

В последние годы успешно разрабатываются два направления поиска кровезаменителей переносчиков кислорода (КЗПК): на основе модифицированного гемоглобина (МГ) и перфторуглеродов (ПФУ) – способных заменить основную, кислородтранспортную функцию крови. КЗПК нового поколения имеют ряд преимуществ: они универсальны, не требуют изосерологического подбора, безопасны в логике переноса инфекции, имеют длительный срок годности. ПФУ и МГ благодаря малым размерам способны обеспечивать доставку кислорода тканям и проникать сквозь стенку капилляров в условиях нарушенного (например, при ишемии сердца) микрокровотока. Частицы перфторуглеродов не только облегчают диффузию кислорода из эритроцита в ткани, но и защищают мембрану красных клеток от процессов перекисного окисления липидов.

Получение КЗПК на основе растворов МГ достигается моделированием внутриэритроцитарного гемоглобина. Единственный в мире кровезаменитель переносчик кислорода, прошедший клинические испытания, – отечественный препарат геленпол, синтезированный на основе полимеризованного гемоглобина человека. Геленпол оказался эффективным при коррекции интраоперационной кровепотери и трансгеморрагической анемии.

Отечественный препарат «Перфторан» создан на основе эмульсий ПФУ. В качестве ПФУ в нем представлены (в соотношении 2:1) перфтордекалин и перфторметилциклогексилпиперидин, роль эмульгатора выполняет проксанол П-268. Экспериментальные и клинические исследования показали, что применение перфторана в условиях кровепотери и гиповолемии способствует обеспечению тканей кислородом,

оказывает положительное влияние на центральную и периферическую гемодинамику, микроциркуляцию, иммунную систему.

Использование КЗПК геленпола и перфторана выдвинуло в число ведущих изыскания композиций МГ с ферментами антиоксидантной защиты (супероксиддисмутаза, каталаза) и препаратов на основе ПФУ, устойчивых, при комнатной температуре [166, 167].

Решение проблемы создания кровезаменителей переносчиков кислорода стало мощным стимулом для расширения исследований по физиологии и биофизике крови и, прежде всего, роли эритроцитов в выполнении важнейших функций крови [54]^ изучение количественных аспектов роли эритроцитов в функциях крови; выявление уровня гематокрита, обеспечивающего оптимальные условия для функций кровообращения и дыхания; создание искусственного эритроцита и глубокое изучение функциональных свойств гемоглобина, в частности его нативных свойств; расшифровка функционального значения отдельных элементов гемоглобина – свойств каждой из 287 аминокислот, входящих в его состав [282]; количественное изучение процессов репарации гемоглобина. Решение этих вопросов имеют также прикладное значение, например, для разработки методов и условий длительного сохранения функциональных свойств донорской крови.

Актуальны также исследования по реологии и микроциркуляции и о порожденных ими взаимовлияниях и взаимодействиях клеток крови [150, 287]. Повышенный интерес исследователей к эритроциту, и в частности, к мембране, продиктован ее ключевой ролью в детерминации гомеостаза и функциональной активности клетки. Более того, ей присущи принципы молекулярной организации плазматических мембран [187], поэтому выявление закономерностей структуры и функционирования мембран эритроцитов, с определенной долей коррекции на видовую специфику клетки, могут быть экстраполированы на другие мембранные системы.

Разработка поименованных и других проблем общей физиологии крови и ее клеточного состава будет более успешным при их комплексном эколого-морфофизиолого-биохимическом изучении у позвоночных животных. Целесообразность такого подхода в разработке важнейших биологических задач пропагандировал еще А.Н. Северцов (1914-1938 гг.).

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Аврутина А.Я., Реакция адреналовой системы кур-несушек на стресс-голодание / А.Я. Аврутина, В.П. Шинкарева, Г.О. Вольпе, Е.Г. Фролова // Докл. ВАСХНИЛ. – 1976. – № 4. – С. 33-34.
2. Автоматическая эритроцитометрия в работизированном микроскопе МЕКОС-Ц 1 / Л.В. Байдун, С.А. Кашнар, С.А. Плясунова, и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 10. – С. 6.
3. Антонов В.Ф., Биофизика мембран / В.Ф. Антонов // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 6. – С. 4-12.
4. Антонов В.Ф., Липидные поры: стабильность и проницаемость мембран / В.Ф. Антонов // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 10. – С. 10-17.
5. Арманд А.Д., Иерархия информационных структур мира / А.Д. Арманд // Вестник РАН. – 2001. – Т. 71, № 9. – С. 797-805.
6. Ашкинази И.Я., Разрушение эритроцитов / И.Я. Ашкинази // Физиология системы крови. Физиология эритропоэза: Руководство по физиологии. – Л.: Наука, 1979. – С. 274-334.
7. Балакирева С.Ю., Внутривидовые и межвидовые различия кислотной резистентности эритроцитов мышей / С.Ю. Балакирева, М.М. Яшина // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 1969. – № 1. – С. 49-54.
8. Барбашова З.Н., Новые аспекты изучения дыхательной функции крови при адаптации к гипоксии / З.Н. Барбашова // Успехи физиологических наук. – 1977. – Т.8, № 1. – С.3-18.
9. Барбашова З.И., Дыхательная функция крови / З.Н. Барбашова // Экологическая физиология животных. Ч. II. Физиологические системы в процессе адаптации и факторы среды обитания: Руководство по физиологии. – Л.: Наука, 1981. – С. 68-91.
10. Баркова Э.Н., Активность дегидрогеназ в процессе дифференцировки эритробластических элементов костного мозга / Э.Н. Баркова, А.В. Петров

- // Механизмы управления размножением и дифференцировкой клеток животных. – Красноярск, 1973. – С. 191-192.
11. Баркова Э.Н., Ультраструктура эритрона / Э.Н. Баркова, А.В. Петров // Физиология системы крови. Физиология эритропоэза: Руководство по физиологии. – Л.: Наука, 1979. – С. 41-71.
  12. Баркова Э.Н., Роль эритропоэтина в регуляции эритропоэза / Э.Н. Баркова // Физиология системы крови. Физиология эритропоэза: Руководство по физиологии. – Л.: Наука, 1979. – С. 97-117.
  13. Бессонова С.В., Чувствительность эритроцитов человека и некоторых видов животных к коллоидно-осмотическому лизису / С.В. Бессонова, Б.А. Ташмухамедов, Р.З. Сабилов // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2004. – Т. 40, № 1. – С. 87-89.
  14. Биохимия человека / Р. Марри, Д. Грениер, П. Мейес и др. – В 2-х т. Т.1. – М.: Мир, 1993. – 381 с.
  15. Бойтлер Э, Нарушение метаболизма эритроцитов и гемолитическая анемия / Э. Бойтлер. Пер с англ. – М.: Медицина, 1981. – 256 с.
  16. Болдырев А.А., Биологические мембраны и транспорт ионов / А.А. Болдырев. – М.: Изд-во МГУ. – 1985. – 93 с.
  17. Болдырев А.А., Биологические мембраны и транспорт ионов / А.А. Болдырев. – М.: Изд-во МГУ. – 1990. – 208 с.
  18. Болотников И.А., Гематология птиц / И.А. Болотников, Ю.В. Соловьев. – Л.: Наука, 1980. – 116 с.
  19. Болотников И.А., Стресс и иммунитет у птиц / И.А. Болотников, В.С. Михниева, Е.К. Олейник. – Л.: Изд-во Наука, 1983. – 118 с.
  20. Бондаренко В.П., Состояние осмотической резистентности лимфоцитов у больных туберкулезом легких / В.П. Бондаренко, А.К. Герман, Л.А. Коструб // Врачебное дело. – 1985. – № 5. – С. 80-82.
  21. Бондарь Т.П., Морфофункциональное состояние эритроцитов периферической крови при поздних сосудистых осложнениях сахарного

- диабета типа 2 (обзор литературы) / Т.П. Бондарь, Г.И. Козинец // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – № 12. – С.22-34.
22. Бриллиант М.Д., Роль липидов в распределении эритроцитов на кислотной эритрограмме / М.Д. Бриллиант, А.И. Воробьев // Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов / Под ред. Г.М. Франка, В.Т. Поэтовой. – М.: Наука, 1967. – С. 123-131.
23. Бродовская З.И., Развитие костного мозга у птиц / З.И. Бродовская // Птицеводство. – 1962. – № 11. – С. 13-17.
24. Васильев Н.В., Система крови и неспецифическая резистентность в экстремальных климатических условиях / Н. В. Васильев, Ю.М. Захаров, Т.И. Коляда. – Новосибирск: Наука, Сиб. отд-е, 1992. – 257с.
25. Владимиров Ю.А., ПОЛ в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. – М.: Наука, 1972. – 259 с.
26. Владимиров Ю.А., Биологические мембраны и патология клетки / Ю.А. Владимиров. – М.: Знание, 1979. – 47 с.
27. Воробьев А.И., Схема кроветворения / А.И. Воробьев, Н.И. Дризе, И.Л. Чертков // Проблемы гематологии. – 1995. – Т. 1, № 1. – С. 7-14.
28. Ворогова Л.В., Об изменении эритробластических островков костного мозга у животных при сочетании тепловых и мышечных нагрузок / Л.В. Ворогова, Ю.М. Захаров // Физиологический журнал СССР им. И.М. Сеченова. – 1990. – Т.76, №.2. – С. 200-205.
29. Гаврилов О.К., Клетки костного мозга и периферической крови (структура, биохимия, функция) / О.К. Гаврилов, Г.И. Козинец, Н.Б. Черняк. – М.: Медицина, 1985. – 288 с.
30. Гаврилов О.К., Гемоагрегатология и хирургия крови / О.К. Гаврилов, А.О. Гаврилов // Вестник РАМН. – 2001. – № 12. – С. 7-12.
31. Галенок В.А., Гемореология при нарушениях углеводного обмена / В.А. Галенок, Е.В. Гостинская, В.Е. Динкер. – Новосибирск: Наука, 1987. – 261 с.

32. Геннис Р., Биомембраны. Молекулярная структура и функции / Р. Геннис. – М.: Мир, 1997. – 624 с.
33. Гистология, цитология, эмбриология / Под ред. Ю.И. Афанасьева. – М.: Медицина, 2001. – 744 с.
34. Гительзон И.И., Исследование эритрона как управляемой организмом клеточной системы / И.И. Гительзон, И.А. Терсков // Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов / Под ред. Г.М. Франка, В.Т. Поэтовой. – М.: Наука, 1967. – С. 48-62.
35. Гительзон И.И., Эритрограммы как метод клинического исследования крови / И.И. Гительзон, И.А. Терсков. – Красноярск: СО АН СССР, 1959. – 247 с.
36. Гительзон И.И., Накопление метгемоглобина и возраст эритроцитов / И.И. Гительзон, Н.В. Гомзякова // Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов / Под ред. Г.М. Франка, В.Т. Поэтовой. – М.: Наука, 1967. – С. 132-134.
37. Гольдберг Д.И., Гематология животных / Д.И. Гольдберг, Е.Д. Гольдберг, Н.Г. Шубин. – Томск: Изд-во ТГУ, 1973. – 182 с.
38. Гольдберг Е.Д., Роль лимфоцитов в регуляции гемопоэза / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, Г.В. Карпова. – Томск: ТГУ, 1983. – 160 с.
39. Гончаренко М.С., Возрастные особенности калиевой проницаемости эритроцитов человека / М.С. Гончаренко, О.М. Бродская // Физиология и биохимия онтогенеза: Сб. науч. тр. / Под ред. В.Н. Никитина. – Киев: Наук. думка, 1983. – С. 106-107.
40. Горбунова Н.А., Эритродиерез при экстремальных воздействиях и его роль в регенерации крови / Н.А. Горбунова // Гематология и трансфузиология. – 1985. – № 2. – С. 23-27.
41. Горизонтов П.Д., Стресс и система крови / П.Д. Горизонтов. – М.: Медицина, 1983. – 823 с.
42. Горожанин Л.С., Гипоксическая реакция эритроцитарной системы собак, подвергшихся в разном возрасте денервации селезенки / Л.С. Горожанин,

- А.Н. Бульгин // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 1971. – Т. VII, № 4. – С.398-403.
43. Заварзин А.А., Очерки эволюционной гистологии крови и соединительной ткани / А.А. Заварзин. – М-Л.: АН. СССР, 1953. – 716 с.
44. Заварзин А.А., Основы сравнительной гистологии / А.А. Заварзин. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1985. – 400 с.
45. Загускин С.Л., Биоритмологическое управление / С.Л. Загускин // Хронобиология и хрономедицина. 2-е издание/ Под ред. Ф.И. Комарова, С.И. Рапопорта. – М.: «Триада-Х», 2000. – С. 140-167.
46. Задарновская Г.Ф., Сравнительные материалы по эмбриогенезу домашних птиц: Автореф дис. ... д-ра биол. наук. - Краснодар, 1966. - 40 с.
47. Закс М.Г., О роли блуждающих нервов в регуляции желудочной секреции у степных черепах / М.Г. Закс, Е.А. Липунова, О.Ф. Танасийчук // Физиология и патология органов пищеварения: Материалы XI Всесоюзной конференции по физиологии и патологии пищеварения. – М: Наука, 1971. – С 150-151.
48. Захаров Ю.М., О роли межклеточных взаимодействий в регуляции эритропоэза / Ю.М. Захаров, И.Ю. Мельников // Успехи современной биологии. – 1984. – Т. 88, № 4. – С. 60-72.
49. Захаров Ю.М., Эритробластический островок – функционально-анатомическая единица эритропоэза / Ю.М. Захаров, И.Ю. Мельников // Гематология и трансфузиология. – 1984. – Т. 29, № 10. – С. 51-56.
50. Захаров Ю.М., Современные взгляды на регуляцию кроветворения / Ю.М. Захаров // Физиологический журнал СССР им. И.М. Сеченова. – 1991. – Т. 77, № 12. – С. 91-101.
51. Захаров Ю.М., Черты информационной сигнализации, регулирующей гемопоэз / Ю.М. Захаров // Вестник РАМН. – 2002. – № 6. – С. 58-60.
52. Зинчук В.В., Деформируемость эритроцитов: физиологические аспекты – В.В. Зинчук // Успехи физиологических наук. – 2001. – Т. 32, № 3. – С. 66-78.



53. Зуфаров А.К., Ультраструктурная характеристика эритроидных клеток костного мозга при хронической почечной недостаточности / А.К. Зуфаров, К.Р. Тухтаев // Клеточные механизмы приспособительных процессов. – Сб. науч. тр. – Ташкент: ТашМи, 1984. – С. 20-23.
54. Иванов К.П., Физиология системы крови и иммунной системы / К.П. Иванов // Успехи физиологических наук. – 1994. – Т. 25, № 2. – С. 75-82.
55. Игнатенко Т.В., Изменение гемоглобина при старении эритроцитов / Т.В. Игнатенко, В.Т. Поэтова, П.Д. Пономаренко // Анализ регуляций в системе красной крови. – Красноярск, 1975. – С. 168-174.
56. Изменение ультраструктуры эритроцитов человека и уровня свободных жирных кислот в них при инкубации с перекисью водорода и ионами кальция *in vitro* / В.И. Сороковой, Г.М. Никитина, А.Г. Лапинский, и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1994. – №8. – С. 207-211.
57. Илюхин А.В., Применение радиоактивного хрома для одновременного определения продолжительности жизни и костномозговой продукции эритроцитов / А.В. Илюхин // Проблемы гематологии и переливания крови. – 1972. – Т. 17, № 2. – С. 53-55.
58. Илюхин А.В., Некоторые методические вопросы исследования эритроцитарного баланса по данным подсчета инкубированных ретикулоцитов / А.В. Илюхин, Т.Е. Бурковская, А.В. Шафиркин, Н.В. Ключанская // Космическая биология и авиакосмическая медицина. – 1982. – Т. 16, № 3. – С. 86-88.
59. Иржак Л.И., Газотранспортная функция эритроцитов в онтогенезе / Л.И. Иржак // Физиология системы крови. Физиология эритропоэза: Руководство по физиологии. – Л.: Наука, 1979. – С. 233-255.
60. Иржак Л.И., Перенос углекислоты и буферные системы крови / Л.И. Иржак // Экологическая физиология животных. Ч. II

- Физиологические системы в процессе адаптации и факторы среды обитания: Руководство по физиологии. – Л.: Наука, 1981. – С. 92-111.
61. Иржак Л.И., Эволюция системы крови / Л.И. Иржак // Эволюционная физиология / Под ред. Е.М. Крепса. – Ч. 2. – Л.: Наука, 1983. – С. 262-300.
62. Иржак Л.И., Дыхательная функция крови в условиях гипероксии / Л.И. Иржак, В.В. Гладилов, Н.А. Моисеенко. – М.: Медицина, 1985. – 176 с.
63. Исследование системы крови в клинической практике / Под ред. Г.И. Козинца, В.А. Макарова. – М.: Триада-Х, 1997. – 480 с.
64. Истаманова Т.С., Функциональная гематология / Т.С. Истаманова, В.А. Алмазов, С.В. Канаев. – Л.: Медицина, 1973. – 310 с.
65. Кагава Я., Биомембраны / Я. Кагава: пер. с яп. А.А. Семищевой; Под ред. В.Е. Кагана. – М.: Высшая школа, 1985. – 303 с.
66. Казенов А.М., Структурно-биохимические свойства мембран безъядерных эритроцитов / А.М. Казенов, М.Н. Маслова // Физиологический журнал СССР им. И.М. Сеченова. – 1987. – Т. LXXXIII, № 12. – С. 1587-1598.
67. Каштоянц Х.С., Основы сравнительной физиологии в 2 т. – М-Л.: Изд-во АН СССР, 1950. – Т.1. – 523 с.
68. Кинетические аспекты гемопоэза / Под ред. Г.И. Козинца, Е.Д. Гольдберга. – Томск: ТГУ, 1982. – 307 с.
69. Киракосян Э.В., Об участии супраоптических ядер гипоталамуса в регуляции эритропоэза / Э.В. Киракосян // Биологический журнал Армении. – 1969. – №. 9. – С. 85-86.
70. Клиорин А.И., Функциональная неравнозначность эритроцитов / А.И. Клиорин, Л.А. Тиунов. – Л.: Наука, 1974. – 148 с.
71. Ковров Б.Г., Свойства гемоглобина как функция его возраста / Б.Г. Ковров // Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов. – Красноярск, 1961. – С. 65-75.
72. Козинец Г.И., Применение компьютеров в гематологических, цитологических исследованиях / Г.И. Козинец, В.М. Котельников, В.М. Погорелов // Лабораторное дело. – 1990. – №3. – С. 21-24.

73. Козлов В.А., Эритроцит как саморегулирующаяся гомеостатическая система / В.А. Козлов // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2001. – № 3. – С. 9-11.
74. Колб В.Г., Клиническая биохимия / В.Г. Колб, В.С. Камышников. – Минск: Беларусь, 1976. – 311 с.
75. Коленкин С.М., Автоматизация исследования крови с использованием гематологической системы GEN – S1 / С.М. Коленкин, А.А. Кишкун // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 9. – С. 15-16.
76. Коломиец С.М., Способ анализа взвешенных частиц / С.М. Коломиец. Пат. РФ 2054652. Бюллетень «Открытия, изобретения». – 1996. – № 5.
77. Колосова М.В., Состав липидов мембран эритроцитов и их биофизические характеристики у детей с инсулинзависимым сахарным диабетом в процессе терапии / М.В. Колосова, В.В. Новицкий, Е.А. Стеновая // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 1. – С. 10-12.
78. Конев С.В., Структурная лабильность биологических мембран и регуляторные процессы / С.В., Конев. – Минск: Наука и техника, 1987. – 240 с.
79. Конева М.К., Современные методы анализа клеток крови / М.В. Конева, М.Е. Федотова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 11. – С. 17-18.
80. Коржуев П.А., Эволюция дыхательной функции крови / П.А. Коржуев. – М.-Л.: АН СССР, 1949. – 182 с.
81. Коржуев П.А., Гемоглобин. Сравнительная физиология. / П.А. Коржуев. – М.: Наука, 1964. – 286 с.
82. Коржуев П.А., Проблема оксигенации гемоглобина / П.А. Коржуев // Успехи физиологических наук. – 1973. – Т.4, № 3. – С.69-112.
83. Кребс Х., Активность ферментов и клеточная структура // Горизонты биохимии. – М.: Мир, 1964. – С. 218-224.
84. Крепс Е.М., Очерк по эволюции дыхательной функции крови / Е.М. Крепс // Журнал общей биологии. – 1943. – Т. 4, № 3. – С.159-172.

85. Крепс Е.М., Липиды клеточных мембран / Е.М. Крепс. – Л.: Наука, 1981. – 144 с.
86. Кровь и кроветворение у позвоночных животных в онтогенезе / А.Т. Акилов, Л.М. Заринская, М.А. Нишанбаева, и др. // Цитологические механизмы гистогенезов. – Ташкент: Фан, УзССР, 1983. – С. 10-12.
87. Кружецкая З.И., Биофизика мембран / З.И. Кружецкая, А.В. Лонский. – СПб.: Изд-во СПб ун-та, 1994. – 288 с.
88. Крыжановский Г.Н., Дизрегуляторная патология / Г.Н. Крыжановский. – М.: Медицина, 2002. – 632 с.
89. Кульминская А.С., Изучение механизма инактивации генома эритроцитов птиц / А.С. Кульминская, Е.Г. Корвин-Павловская, К.Г. Газарян // Онтогенез. – 1980. – № 3. – С. 222-228.
90. Левин Г.Г., Новые возможности оптической микроскопии при исследовании клеток системы крови / Г.Г. Левин, Г.И. Козинец // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – № 10. – С. 14-16.
91. Левтов В.А., Реология крови / В.А. Левтов, С.А. Регирер, И.Х. Шаурина. – М.: Медицина, 1982. – 272 с.
92. Лейси А., Световая микроскопия в биологии: методы / А. Лейси. – М.: Мир, 1992. – 462 с.
93. Лисовская И.Л., Фильтрационно-осмотический метод оценки распределения эритроцитов по реологическим параметрам. Обоснование и практические предложения / И.Л. Лисовская, Е.С. Шурхина, Ф.И. Атауллаханов // Гематология и трансфузиология. – 1999. – № 3. – С. 20-24.
94. Липунова Е.А., О механизмах действия инсулина на секрецию желудочного сока у кур / Е.А. Липунова // Физиологический журнал СССР им. И.М. Сеченова. – 1972. – Т. 58, № 2. – С. 1603-1608.
95. Липунова Е.А., О роли блуждающих нервов в регуляции желудочной секреции у лягушек / Е.А. Липунова // Журнал биологические науки. Депониров. ВИНТИ, № 1328-77.

96. Липунова Е.А., Изменение картины крови птиц и млекопитающих под влиянием инсулина / Е.А. Липунова, П.В. Полетаев. – VII научное совещание по эволюционной физиологии, посвященное памяти Л.А. Орбели. – Л.: Изд-во АНССР, 1978. – С. 139.
97. Липунова Е.А., Реактивность системы крови на введение инсулина в ряду позвоночных животных / Е.А. Липунова, П.В. Полетаев // Проблемы общей и возрастной физиологии педагогических вузов страны. Материалы Всесоюзной 4 конференции. – Ставрополь: Изд-во СГПИ, 1983. – С. 153-154.
98. Липунова Е.А., Центральный и периферический нервные механизмы влияния инсулина на работу сердца / Е.А. Липунова, П.В. Полетаев // Нейроэндокринные механизмы адаптации. Межвузовский сборник научных трудов. – Ставрополь: Изд-во СГПИ, 1985. – С. 61-67.
99. Липунова Е.А., Роль адренергических систем в угнетении инсулином секреции желудочного сока у птиц / Е.А. Липунова // Физиология пищеварения и всасывания: Тезисы докладов XV Всесоюзной конференции (27-29 сентября 1990 г, Краснодар). – Краснодар, 1990. – С. 164.
100. Липунова Е.А., Влияние инсулина на работу сердца у стрессируемых кур / Е.А. Липунова, Т.А. Погребняк // Фармакологические токсикологические аспекты применения лекарственных веществ в животноводстве. Сборник научных трудов Московской Ордена трудового красного знамени ветеринарной академии им. К.Н. Скрябина. – М., 1992. – С. 43-44.
101. Липунова Е.А., Динамика адаптивных реакции по данным ЭКГ у птиц в условиях десинхроноза / Е.А. Липунова, Т.М. Воробьева, Т.А. Погребняк // Достижения и перспективы сравнительной электрокардиологии. Тезисы III Международного симпозиума по сравнительной электрокардиологии. – Сыктывкар: Изд-во КомиАНССР. – 1993. – С. 42.

102. Липунова Е.А., Влияние многократного введения инсулина на динамику содержания глюкозы в крови и гликогена в тканях кур / Е.А. Липунова // Актуальные проблемы экологии на рубеже третьего тысячелетия. Международная научно-практическая конференция, Брянск 15-17 июня. – Брянск: Изд-во Брянского ГСХА, 1999. – С. 248-253.
103. Липунова Е.А., Цитокинетические показатели эритроцитарного баланса у птиц в физиологических условиях / Е.А. Липунова, М.Ю. Скоркина // Физиология организмов в нормальном и экстремальном состояниях: Сб. ст. / Под ред. В.И. Гридневой. – Томск, 2001. – С. 31-33.
104. Липунова Е.А., Динамические сдвиги в системе эритрона у птиц при экстремальных воздействиях / Е.А. Липунова, М.Ю. Скоркина // Научные ведомости БелГУ. Серия. Медицина. – № 1 (16). – 2002. – С. 101-106.
105. Липунова Е.А., Регенерация системы красной крови у птиц при стрессировании / Е.А. Липунова, М.Ю. Скоркина, А.А. Беяева // Актуальные проблемы медицины и биологии: Сб. науч. тр. / Под ред. Н.И. Ильинских. – Томск, 2003. – Вып. 2. – С. 25-30.
106. Липунова Е.А., Оценка функционального состояния эритроцитарных мембран у птиц в условиях напряженного эритропоэза / Е.А. Липунова, М.Ю. Скоркина // Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии / Под ред. Н.Н. Ильинских. – Томск: СГМУ, 2004. – № 1-3. – С. 142-144.
107. Липунова Е.А., Способ оценки активности эритропоэза / Е.А. Липунова, В.М. Никитин, М.Ю. Скоркина, А.С. Зеленцова. – Заявка № 2004111098 на выдачу патента на изобретение, дата приоритета 12.04.04.
108. Марачев А.Г., Взаимосвязь процессов эритропоэза, эритродиереза и перекисного окисления липидов мембран эритроцитов / А.Г. Марачев, А.В. Корнев, Г.Н. Дегтева, Р.И. Данилова // Вестник АМН СССР. – 1983. – № 11. – С. 65-74.

109. Марку И., Метаболизм эритроцита / И. Марку // Клиническая гематология / Под ред. Шт. Берчано. – Бухарест: Медицинское изд-во, 1985. – С. 92-99.
110. Медведев М.А., Выяснение роли слюнных желез в функциональном состоянии системы красной крови / М.А. Медведев, Ю.А. Коноваленко, А. М. Кротенко // Физиология организмов в нормальном и экстремальном состояниях / Под ред. В.М. Гридневой. – Томск, 2001. – С. 100-103.
111. Медведев Ж.А., О некоторых особенностях эритропоэза и старения эритроцитов лягушки // Онтогенез. – 1972. – Т. 3, № 4. – С. 394-404.
112. Метод сканирующей электронной микроскопии эритроцитов периферической крови в диагностике и лечение гемморагического васкулита у детей / Т.А. Нагаева, И.И. Балашова, А.С. Саратиков, и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 5. – С. 12-14.
113. Мецлер Д., Биохимия: Химические реакции в живой клетке в 3 т. Пер. с англ. Под ред. А.Е. Браунштейна / Д. Мецлер. – Т. 2. – М.: Мир, 1980. – 606 с.
114. Миклеев А.М., Морфологические особенности эритроцитов крыс в норме и при экспериментальном сальмонеллезе / А.М. Миклеев, У.Д. Джилалов // Клеточные механизмы приспособительных процессов. – Ташкент: ТашМи, 1984. – С. 81-84.
115. Моженок Т.П., Распределение активности некоторых дегидрогеназ в процессе эритропоэза у голубей / Т.П. Моженок, В.Л. Немчинская // Цитология. – 1975 – № 10.
116. Моисеева О.И., Физиологические механизмы регуляции эритропоэза / О.И. Моисеева. – Л.: Наука, 1985. – 183 с.
117. Моисеева О.И., Эритропоэтинообразующая функция почек / О.И. Моисеева // Физиология системы крови. Физиология эритропоэза: Руководство по физиологии. – Л.: Наука, 1979. – С. 118-158.
118. Мосягина Е.Н., Эритроцитарное равновесие в норме и патологии / Е.Н. Мосягина. – М.: Медгиз, 1962. – 271 с.

119. Мосягина Е.Н., Кинетика форменных элементов крови / Е.Н. Мосягина, Е.Б. Владимировская, Н.А. Торубарова, Н.В. Мызина. – М.: Медицина, 1976. – 270 с.
120. Муравьев А.В., Гемореологические профили у лиц с нормальным и повышенным артериальным давлением / А.В. Муравьев, Л.Г. Зайцев // Физиология человека. – 1998. – Т. 24, № 3. – С. 63-66.
121. Муравьев А.В., Анализ реологических изменений крови на основе концепции гемореологического профиля / А.В. Муравьев, В.В. Якусевич, А.В. Замышлеев // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 7. – С. 43-45.
122. Мэдди Э., Биохимическое исследование мембран / Э. Мэдди. – М.: Мир, 1979. – 460 с.
123. Натан Д.Г., Регуляция кроветворения / Д.Г. Натан, К. А. Зифф // Гематология и трансфузиология. – 1994. – № 2. – С. 3-10.
124. Немчинская В.Л., Некоторые особенности энергетического метаболизма эритроцитов голубей и их ядер / В.Л. Немчинская, Т.П. Моженко, А.Д. Браун // Цитология. – 1974. – № 10.
125. Нечаев Н., Роль гипоталамуса в осуществлении эритропоэтического эффекта / Н. Нечаев, А. Логофетов // Проблемы физиологии гипоталамуса. – Киев: Изд-во КГУ. – 1971. – С. 39-43.
126. Никитин В.Н., Гематологический атлас сельскохозяйственных и лабораторных животных / В.Н. Никитин. – М.: Сельхозгизд., 1956. – 191 с.
127. Новый подход к исследованию патофизиологии клетки: изучение распределения клеток по размерам и форме как метод диагностики и мониторинга заболеваний / А.В. Сыроешкин, Т.В. Гребенникова, В.Н. Байкова, и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – № 5 – С. 35-40.
128. Овчинников В.В., Эритрограммы метгемоглобиновых эритроцитов / В.В. Овчинников // Вопросы биофизики, биохимии и патологии



- эритроцитов / Под ред. Г.М. Франка, В.Т. Поэтовой. – М: Наука, 1967. – С. 292-295.
129. Озернюк Н.Д., Перспективы исследований биологии стволовых клеток / Н.Д. Озернюк // Вестник РАН. – 2001. – Т. 74, № 4. – С. 366-367.
130. О корреляции размеров эритроцитов и субпопуляций лимфоцитов у здоровых детей / А.Д. Шмаров, О.А. Кизенко, Л.В. Соболевская, и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 11. – С. 23.
131. Орбели Л.А., Основные задачи и методы эволюционной физиологии / Л.А. Орбели // Эволюционная физиология: Руководство по физиологии. – Л.: Наука, 1979. – С. 12-23.
132. Орлов С.Н. Са-насос плазматической мембраны. Механизм функционирования и регуляции / С.Н. Орлов // Кальций – регулятор метаболизма. – Томск, 1987. – С. 74-76.
133. Особенности поверхностного рельефа эритроцитов периферической крови у больных шизофренией (по данным сканирующей эл. микроскопии) / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Н.М. Антоненко, И.Р. Семин, и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 4. – С. 43-46.
134. Павлов А.Д., Регуляция эритропоэза: физиологические и клинические аспекты / А.Д. Павлов, В.М. Морщакова. – М.: Медицина, 1987. – 272 с.
135. Павлов А.Д., Эритроидная дифференциация и механизмы действия эритропоэтина / А.Д. Павлов // Успехи современной биологии. – 1988. – Т. 105, Вып. 1. – С. 117-133.
136. Патент на изобретение 1833548 RU Солевой раствор полимерного гемоглобина/ Е.А. Селиванов, И.М. Быстрова, Н.П. Кузнецова и др. (Военно-медицинская академия МОРФ, НИИ гематологии и трансфузиологии), СПб от 13.10.1992 СССР.
137. Патент на изобретение С2 2227280 RU G 01N 1/28 1/30 33/48 33/49. Способ определения ретикулоцитов в инкубированной крови птиц /

- Скоркина М.Ю., Липунова Е.А. (Белгородский гос. ун-т). – № 2002119253; заявл. 16.07.02 // БИПМ № 11, Ч. III. – 2004. – С. 557.
138. Патент на изобретение C1 2234701 RU G 01N 33/48 A 61B 10/00. Способ идентификации субпопуляций эритроцитарной системы / Липунова Е.А., Никитин В.М., Чеканов Н.А., Скоркина М.Ю. (Белгородский гос. ун-т). – № 2002134029; заявл. 17.12.02 // БИПМ № 23, Ч. III. – 2004. – С. 573.
139. Патент на изобретение C2 2224235 RU G 01N 1/30. Способ визуализации форменных элементов крови птиц на одном мазке / Е.А. Липунова, М.Ю. Скоркина. (Белгородский гос. ун-т). – № 2002112129; заявл. 06.05.02 // БИПМ № 5, Ч. IV. – 2004. – С. 905.
140. Погребняк Т.А., Центральные нервные механизмы адаптации кур к стрессовым воздействиям / Т.А. Погребняк, Е.А. Липунова, Т.М. Воробьева // Диагностика, патогенез, лечение и профилактика болезней животных в условиях промышленной технологии. Межвузовский сборник научных трудов. – Белгород: Изд-во БГСХА. – 1991. – С. 110-117.
141. Погребняк Т.А., Методика изучения центральных нервных механизмов адаптации кур к стрессовым воздействиям / Т.А. Погребняк, Е.А. Липунова, Т.М. Воробьева // Депонирована в Укр. НИИНТИ № 290. – Вк. 91.6.0991.
142. Погребняк Т.А., Биоэлектрическая активность различных структур мозга птиц при их стрессировании / Т.А. Погребняк, Е.А. Липунова // Физиология организмов в нормальном и экстремальном состояниях: Сборник статей / Под ред. В.И. Грідневой. – Томск: Изд-во ТГУ, 2001. – С. 158-160.
143. Полетаев П.В., Дифференцированная реакция отдельных структур вегетативной нервной системы на введение инсулина / П.В. Полетаев, Е.А. Липунова // XII съезд Всесоюзного физиологического общества

- им. И.П. Павлова. Тезисы научных сообщений. – Тбилиси, 1975. – Т. 3. – Л.: Изд-во АН СССР. – С. 262-263.
144. Полетаев В.П., Влияние и механизм действия инсулина на сердце лягушки *R. esculenta* L. / В.П. Полетаев, Е.А. Липунова, Т.А. Погребняк // Вопросы эволюционной физиологии. Восьмое совещание по эволюционной физиологии. – Ленинград, 27-29 октября, 1982. – Л.: Наука. – 249-250 с.
145. Практикум по биофизике / В.Г. Артюхов, М.А. Наквасина, С.Г. Резван, и др. – Воронеж: ВГУ, 2001. – 244 с.
146. Прилуцкий В.И., О формах морфофизиологической перестройки коры надпочечников при действии сильного стрессора и больших доз АКТГ / В.И. Прилуцкий // Фармакология и токсикология. – 1964. – Т.27, № 3. – С. 339-342.
147. Проссер Л., Сравнительная физиология животных в 3-х т. Т.2 / Л. Проссер / Под ред. Т.М. Турпаева. – М.: Мир, 1977. – 571 с.
148. Пухова Я.И., Механизм взаимодействия АБОН с эритроцитами в аутоиммунном гемолизе / Я.И. Пухова, И.А. Терсков, Л.Д. Пономаренко, А.Я. Аникина // Механизмы регуляции в системе крови. – Красноярск, 1978. – С. 72-74.
149. Пухова Я.И., Механизм и природа гемолиза в норме и при экстремальных воздействиях / Я.И. Пухова // Успехи физиологических наук. – 1980. – Т. 11, № 2. – С. 84-104.
150. Редчиц Е.Г., Реологические свойства лейкоцитов и их участие в микроциркуляции крови / Е.Г. Редчиц, А.С. Парфенова // Гематология и трансфузиология. – 1989. – №. 2. – С. 40-45.
151. Редфильд С., Эволюция дыхательной функции крови. Пер. с англ. П.А. Коржуева / Успехи современной биологии. – Т.3, вып. 3. – 1934. – С. 332-356.
152. Редфильд С., Гемоцианины. Пер. с англ. П.А. Коржуева / С. Редфильд // Успехи современной биологии. – 1936. – Т. 5, вып. 6. – С. 992-1024.

153. Резван С.Г., Анализ молекулярных механизмов структурных превращений эритроцитов при нефропатиях у детей / С.Г. Резван, В.Г. Артюхов, Н.А. Стародубцева, Г.А. Вашанов // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – 2001. – №. 1. – С. 5-8.
154. Резван С.Г., Исследование структурного состава эритроцитов крови при нефропатиях у детей / С.Г. Резван, И.Е. Попова, В.Г. Артюхов, и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – Т. 134, № 8. – С. 205-208.
155. Резистентность тканей и клеток у крыс адаптированных к гипоксии, глубокой гипотермии и гиперкапнии / Г.Н. Акоева, Н.В. Коростовцева, Е.Д. Черникова, Л.Г. Залкинд // Физиологический журнал СССР им. И.М. Сеченова. – 1977. – Т. LXIII, № 4. – С. 577-581.
156. Ройтман Е.В., Биореология. Клиническая гемореология. Основные понятия, показатели, оборудование (лекция) / Е.В. Ройтман // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 5. – С. 25-32.
157. Романова А.Ф., Справочник по гематологии / А.Ф. Романова. – Ростов н/Д: Феникс, 2000. – 384 с.
158. Росин А.Я., Регуляция функций / А.Я. Росин. – М.: Наука, 1984. – 171 с.
159. Рубина Х.М., Биохимия эритроцитов / Х.М. Рубина // Физиология системы крови. Физиология эритропоэза: Руководство по физиологии. – Л: Наука, 1979. – С. 211-232.
160. Румянцева Ю.В., Влияние спленэктомии на реологические свойства крови у больных наследственной сфероцитарной гемолитической анемией /  
Ю.В. Румянцева, Н.Н. Фирсов, Н.С. Сметанина // Гематология и трансфузиология. – 2003. – № 5. – С. 28-34.
161. Рябов С.И., Основы физиологии и патологии эритропоэза / С.И. Рябов. – Л.: Медицина, 1971. – 255 с.
162. Рябов С.И., Молекулярно-генетические аспекты эритропоэза / С.И. Рябов, Г.Д. Шостка. – Л.: Медицина, 1973. – 278 с.

163. Рязанцева Н.В., Типовые нарушения молекулярной организации мембраны эритроцита при соматической и психической патологии / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий // Успехи физиологических наук. – 2004. – Т. 35, № 1. – С.53-65.
164. Санников А.Г., Кальций и деформационный стресс эритроцитов / А.Г. Санников, С.А. Сторожок, И.А. Бродер // 2-й Междунар. симпозиум «Медицина и охрана здоровья». Тез. докл. – Тюмень, 1996. – С. 86.
165. Саркисов Д.С., Очерки по структурным основам гомеостаза / Д.С. Саркисов. – М.: Медицина, 1977. – 351с.
166. Сафронов Г.А., Стратегия поиска искусственных заменителей крови / Г.А. Сафронов, Е.А. Селиванов, М.Д. Ханевич // Вестник РАМН. – 1999. – № 10. –С. 13-15.
167. Сафронов Г.А., Новые кровезаменители полифункционального действия / Г.А. Сафронов, Е.А. Селиванов // Вестник РАМН. – 2003. – № 10. – С. 48-51.
168. Скоркина М.Ю., К методике оценки морфометрических параметров эритроцитарной популяции у птиц / М.Ю. Скоркина, Е.А. Липунова // Приспособления организмов к действию экстремальных экологических факторов: Материалы VII Международной научной практической экологической конференции г. Белгород, 5-6 ноября. – Белгород: Изд-во БелГУ, 2002. – С. 86-89.
169. Скоркина М.Ю., Биометрические параметры эритроцитов амфибий при гипоосмотической нагрузке / М.Ю. Скоркина, А.С. Зеленцова, М.Н. Гончаренко, В.В. Чернышев // Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии. – Томск: СГМУ, 2004. – № 1-3. – С. 180-182.
170. Скоркина М.Ю., Разновозрастная гетерогенность эритроцитарной популяции лягушек в физиологических условиях / М.Ю. Скоркина // Биология – наука XXI века. Материалы 8 международной научной конференции молодых ученых. 17-21 мая, г. Пущино. – Пущино, 2004. – С. 129.

171. Славинский А.А., Компьютерный анализ изображения нейтрофильных лейкоцитов: щелочная фосфатаза / А.А. Славинский, Г.В. Никита // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – № 1. – С. 40-43.
172. Смирнова Е.А., Устойчивость разных типов клеток к действию гипотонии / Е.А. Смирнова, Н.Н. Казачкина, В.И. Гребенщикова, Ю.С. Ченцов // Цитология. – 1987. – Т. XXIX, № 1. – С. 47-53.
173. Сойфер В.А., Компьютерная обработка изображений / В.А. Сойфер // Вестник РАН. – 2001. – Т. 71, № 2. – С. 119-129.
174. Соколинский Б.З., Количественная морфология эритроцитов периферической крови и эритроцитов костного мозга при острых лейкозах и депрессиях кроветворения / Б.З. Соколинский, А.М. Пятницкий // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – № 2. – С. 39-41.
175. Соловьев С.В., О роли цитоскелета эритроидных клеток в механизмах ответа системы эритрона на возмущающее воздействие. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Челябинск, 1989. – 21 с.
176. Стайер Л., Биохимия в 3-х т. / Под ред. С.Е. Северина / Л. Стайер. – М.: Мир, 1985. – 308 с.
177. Стародуб Н.Ф., Гетерогенная система гемоглобина. Регуляция синтеза в норме и при патологии: Автореф. дис. ... д-ра. биол. наук. – М., 1982. – 46 с.
178. Стародуб Н.Ф., Гетерогенная система гемоглобина. Синтез гемоглобина отдельных типов в онтогенезе и при патологии организма / Н.Ф. Стародуб, Ю.Н. Токарев // Успехи современной биологии. – 1986. – Т. 101, вып. 3. – С. 374-389.
179. Стародуб Н.Ф., Гетерогенная система гемоглобина: структура, свойства, синтез, биологическая роль / Н.Ф. Стародуб, В.И. Назаренко. – Киев: Наук. думка, 1987. – 200 с.
180. Сторожок С.А., Молекулярная структура мембран эритроцитов и их механические свойства / С.А. Сторожок, А.Г. Санников, Ю.М. Захаров. – Тюмень: Изд-во ТГУ, 1997. – 140 с.

181. Сторожок С.А., Структурные и функциональные особенности цитоскелета мембраны эритроцита / С.А. Сторожок, С.В. Соловьев // Вопросы медицинской химии. – 1992. – № 2. – С. 14-17.
182. Судаков К.В., Функциональная система, определяющая оптимальный уровень эритроцитов в организме / К.В. Судаков, Ю.М. Захаров // Клиническая медицина. – 2002. – № 4. – С. 4-11.
183. Терентьева Э.И., Цитологические аспекты заболеваний системы крови / Э.И. Терентьева, Г.И. Козинец. – М.: Наука, 1978. – 223 с.
184. Тодоров Й., Клинические лабораторные методы исследования в педиатрии / Й. Тодоров. – София: Медицина и физкультура. – 1961. – 783 с.
185. Томилов А.Ф., Эритроцит, ретикулоцит, нормоцит: их место в схеме эритропоэза / А.Ф. Томилов, Т.Я. Колкер // Лабораторное дело. – 1991. – № 6. – С. 26-29.
186. Троицкая Н.А., Изменение кислотной стойкости эритроцитов при введении инсулина и адреналина / Н.А. Троицкая // Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов / Под ред. Г.М. Франка, В.Т. Поэтовой. – М.: Наука, 1967. – С. 304-309.
187. Ужанский Я.Г., Физиологические механизмы регенерации крови / Я.Г. Ужанский. – М.: Медицина, 1968. – 264 с.
188. Фридман Л.М., Осмотическая и механическая резистентность эритроцитов при анемических состояниях // Сборник трудов научно-исследовательского института переливания крови им. Мухадзе. – 1957. – Т.V. – С. 121-133.
189. Фултон А., Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки / А. Фултон. – М: Мир, 1987. – 120 с.
190. Хаитов Р.М., Иммунология / Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатова, И.Г. Сидорова. – М.: Медицина, 2000. – 432 с.
191. Хамидов Д.Х., Кровь и кроветворение у позвоночных животных / Д.Х. Хамидов, А.Т. Акилов, А.А. Турднева. – Ташкент: Фан, 1978. – 168 с.

192. Хамидов Д.Х., Электронно-микроскопический атлас элементов гемопоэза позвоночных животных / Д.Х. Хамидов. – Ташкент: Фан, 1979. – 166 с.
193. Хейхоу Ф.Г., Гематологическая цитохимия / Ф.Г. Хейхоу, Дж.Д. Кваглино: Пер. с англ. Е.В. Самочатовой. – М.: Медицина, 1983. – 319 с.
194. Цитокинетика и морфология кроветворения при хроническом облучении / А.В. Илюхин, В.С. Шашков, Т.Е. Бурковская, Э.С. Зубеннова. – М.: Энергоиздат, 1982. – 136 с.
195. Цитологические особенности эритрона при анемиях / Г.И. Козинец, Я. Хакимова, И.А. Быков. – Ташкент: Медицина, Уз. ССР, 1988. – 131 с.
196. Черниговский В.Н., Регуляция эритропоэза / В.Н. Черниговский, С.Ю. Шехтер, А.Я. Ярошевский. – Л.: Наука, 1967. – 101 с.
197. Черниговский В.Н., Регуляция эритропоэза / В.Н. Черниговский, О.И. Моисеева // Успехи физиологических наук. – 1982. – Т. 13, № 4. – С. 27-44.
198. Черницкий Е.А., Структура и функции эритроцитарных мембран / Е.А. Черницкий, А.В. Воробей. – Минск: Наука и техника, 1981. – 214 с.
199. Чертков И.Л., Клеточные основы кроветворения / И.Л. Чертков, А.Я. Фриденштейн. – М.: Наука, 1977. – 270 с.
200. Чертков И.Л., Стволовая кроветворная клетка, ее дифференцировка в эритроидном направлении, кроветворное микроокружение / И.Л. Чертков, А.Я. Фриденштейн // Физиология системы крови. Физиология эритропоэза: Руководство по физиологии. – Л.: Наука, 1979. – С. 72-96.
201. Чертков И.Л., Стволовая кроветворная клетка и ее микроокружение / И.Л. Чертков, О.А. Гуревич. – М.: Медицина, 1984. – 238 с.
202. Чертков И.Л., Нормальное кроветворение / И.Л. Чертков // Гематология и трансфузиология. – 1990. – Т. 35, № 2. – С. 30-33.
203. Чижевский А.Л., Биофизические механизмы РОЭ / А.Л. Чижевский. – Новосибирск: Наука СО, 1980. – 175 с.



204. Чизмаджев Ю.А., Мембранная биология: от липидных бислоев до молекулярных машин / Ю.А. Чизмаджев // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 8. – С. 12-17.
205. Шалабодов А.Д., Биологические мембраны и мембранный транспорт / А.Д. Шалабодов. – Тюмень: Изд-во Тюмен. гос. ун-та, 1999. – 156 с.
206. Шашкин А.В., Продукция и деструкция эритроцитов в организме / А.В. Шашкин, И.А. Терсков. – Новосибирск: Наука. СО, 1986. – 89 с.
207. Шмидт-Ниельсен К., Физиология животных: Приспособление и среда. В 2-х книгах. Кн. I / Под ред. Е.М. Крепса. – М.: Мир, 1982. – 414 с.
208. Шубникова Е.А., Функциональная морфология тканей / Е.А. Шубникова. – М.: МГУ, 1981. – 326 с.
209. Шурхина Е.С., Плотность и деформируемость эритроцитов больного аутоиммунным синдромом в разные периоды течения болезни / Е.С. Шурхина, Н.В. Цветаева, С.В. Колодей // Гематология и трансфузиология. – 2003. – № 3. – С. 19-23.
210. Эмерсон С.Дж., Гемопоз. Развитие клеток крови // Патофизиология крови / Под ред. Ф.Дж. Шиффман; Пер с англ. Н.Б. Серебрянная, В.И. Соловьев. – М - СПб.: «Бином» - «Невский-Диалект», 2000. – С. 17-42.
211. Эритропоз / Е.Н. Мосягина, Н.А. Федоров, В.И. Гудим, и др. // Нормальное кроветворение и его регуляция. – М.: Медицина, 1976. – С. 341-457.
212. Atland P.D., Red cell life span in the turtle and toad / P.D. Atland, K.C. Brace // Amer. J. Physiol. – 1962. – V. 203, № 6. – P. 1188-1190.
213. Allison A.C., Turnover of erythrocyte and plasma proteins in mammals / A.C. Allison // Nature. – 1960. – V. 188, № 4744. – P. 47-50.
214. Fisher S., The binding of hemoglobin to membranes of normal and sickle erythrocytes // S. Fisher, R.L. Nagece, R.M. Boochim // Biochim et biophys acta. – 1975. – V. 375, № 3. – P. 422-433.
215. Bartels H., Oxygen affinity of chicken blood / H. Bartels, Y. Heller, W. Reinhardt // Respir. Physiol. – 1966. – V. 1. – P. 345-356.

216. Basserga R., Biochemistry of the cell cycle: a review / R. Basserga // Cell Tiss. Kinet. – 1968. – V. 1. – P. 167.
217. Bennett V., The membrane skeleton of Human erythrocytes and its implications fore more complex cells / V. Bennet // Ann. Rev. Biochim. – 1985. – V. 54. – P. 273-304.
218. Bennett V., Brain adducin: a protein kinase C substrate that may mediate site-directaed assembly at the spectrin-actin junction / V. Bennett, K. Garden, J. Steiner // J. Biol. Chem. – 1988. – V. 263. —P. 5860-5869.
219. Berridge M.J., Inositol triphosphat and calcium signaling / M.J. Berridge // Natur. – 1993. – V. 361. – P. 315-325.
220. Bessis M., Aspect de la molécule ferritine et d'appoferritine an microscope électronique / M. Bessis, J. Breton-Gorius // Compt. Rend. Acad. Sci. – 1960. – V. 250. – P.1360-1362.
221. Bessis M., Living blood cells and their ultrastructure / M. Bessis. – Berlin-Heidelbery. - N.Y., 1973. – 767 p.
222. Bolton W., Three dimensional fourier synthesis of horse deoxy haemoglobin at 2.8 Å resolution / W. Bolton, M.F. Perutz // Nature. – 1970. – V. 228, №. 5271. – P. 551-552.
223. Bremer E.G., Ganglioside-mediated modulation of cell growth in specific effects of GM<sub>3</sub> on tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor / E.G. Bremer, J. Schlessinger, S. Hakomeri // J. Biol. Chem. – 1986. – V. 261. – P. 2430-2440.
224. Breton-Gorius J., Fine structural and cytochemical identification of microperoxisomes in developing human erythrocyte cells / J. Breton-Gotius, J. Guichard // Amer. J. Pathol. – 1975. – V. 79. – P. 523-536.
225. Brigitte F., Structure and erythroid cell-restricted expression of a chicken cDNA encoding a novel zinc finger protein of the Cyst His class / F. Brigitte, W. Torsten, R. Nicole, A. Marianne, B. Hartmut, N. Jürgene // Gene. – 1997. – V. 195, № 2. – P. 277-284.

226. Caldwell P.R.B., The binding of 2, 3 -diphosphoglycerate as a conformational probe of human hemoglobin / P.R.B. Caldwell, R.L. Nagel // J. Molec. Biol. – 1973. – V. 74, №. 4. – P. 605-611.
227. Chen T., Role of water and electrolyte influxes in anoxic plasma membrane disruption / T. Chen, L.J. Mandel // Amer. j. of physiol. – 1997. – V. 273, № 4. – P. 1341-1348.
228. Cooper R.A., Lipids of human red cell membrane: normal composition and variability in disease / R.A. Cooper // The red cell membrane / Ed. R.I. Weed, E.R. Jaffe. – Miescher. - N.Y. - L., 1970. – P. 48-74.
229. Cuifetti G., Blood rheology in men with essential hypertension and capillary rare fraction / G. Cuifetti, L. Pasqualini, M. Pirro // J. Hum Hypertens. – 2002. – V. 16, № 8. – P. 529-531.
230. Dantschakoff V., Untersuchungen über die Entwicklung des Blutes und Bidegewebes bei den Vögeln. I. Die erste Entstehung der Blutzellen beim Hühnerembryo und der Dottersack als blutbildendes Organ / V. Dantschakoff // Anat. Hefte. – 1908. – Bd. 37. – S. 471.
231. Dantschakoff V., Haemopoiesis in the embryonic-mesenchym of chick / V. Dantschakoff, M. Richter // Anat. record. – 1920. – Bd. 18. – S. 231.
232. Emerson S.G., Purification fo fetal hematopoietic progenitors and demanstration of recombinant multipotential colony stimulating activity / S.G. Emerson, C.A. Sieff, E.A. Wang // J. Clin. Invest. – 1985. – V. 76. – P. 1286.
233. Erslev A.J., The effect of erythropoietic agents on the synthesis of erythropoietin in vitro / A.J. Erslev // Erythropoiesis. – Baltimore, 1975. – P. 295-302.
234. Eschbach J.W., <sup>14</sup>C cyanate as a tag for red cell survival in normal and uremic man / J.W. Eschbach, D. Korn, C. Finch // J. Lab. Clin. Med. – 1977. – V. 89. – P. 823-828.

235. Fattoum A., Isolation properties and some structural and functional properties of macrophage tropomyosin / A. Fattoum, J. Hartwig, T. Stossel // *Biochemistry*. – 1983. – V. 22. – P. 1187-1193.
236. Feizi T., Carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids as differentiations antigene, tumour-associated antigens and components of receptor systems / T. Feizi, R.A. Childs // *TIBS*. – 1985. – V. 10. – P. 24-29.
237. Feldman S., The effect of central nervous system stimulation on erythropoiesis in rats with chronically implanted electrodes / S. Feldman, E.A. Kachmilewitz, Y. Jsak // *J. Lab. Clin. Med.* – 1966. – V. 67. – P. 713-725.
238. Fettiplace R., Water permeability of lipid membranes / R. Fettiplace, D.A. Haydon // *Physiol. Rev.* – 1980. – V. 60. – P. 510-550.
239. Fischer S., The binding of hemoglobin to membranes of normal and sickle erythrocytes / S. Fischer, R.M. Boochim // *Biochim et biophys. Acta.* – 1975. – V. 375, № 3. – P. 422-433.
240. Fischer S. W., The kidney and erythropoietin production: a review / J.W. Fischer, R. Busuttie, G.M. Rodgers, et al. // *Erythropoiesis*. – Baltimore, 1975. – P. 315-336.
241. Finch J.T., Structure of sickled erythrocytes and of sickle-cell hemoglobin fibers / J.T Finch, M.F. Perutz, J.F. Bertles, J. Döbler // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1973. – V. 70. – P. 718-722.
242. Fowler V.M., Erythrocyte membrane tropomyosin: purification and properties / V.M. Fowler, V. Bennett // *J. Biol. Chem.* – 1984. – V. 259. – P. 5978-5989.
243. Fowler V.M., Identification and purification of a novel Mr 43000 tropomyosin binding protein from human erythrocyte membranes / V.M. Fowler // *J. Biol. Chem.* – 1987. – V. 262. – P. 12792-12800.
244. Françoise D.L., Plusieurs vagues de cellules souches se succèdent-elles pendant le développement hématopoïétique? / D.L. Françoise // *Cr. seances Soc. biol.* – 1995. – V. 189, № 4. – P. 591-596.

245. Freeman M.B., Respiratory properties of blood of chickens / M.B. Freeman, B.H. Misson // *Comp. Biochem Physiol.* – 1970. – V. 33. – P. 763-772.
246. Fujii J., Role of membrane lipids and proteins in discocytes / J. Fujii // *Acta. Biol. Med. Yerm.* – 1981. – V. 40. – P. 361-367.
247. Gardner K., A new erythrocyte membrane-associated protein with calmodulin binding activity: identification and purification / K. Gardner, V. Bennett // *J. Biol. Chem.* – 1986. – V. 261. – P. 1339-1348.
248. Goldman R., Concahavalin A mediated attachment and ingestion of red blood cells by macrophages / R. Goldman, R.A. Cooper // *Exp. Cell. Res.* – 1975. – V. 95. – P. 223-231.
249. Gordon A.S., Androgen action on erythropoiesis / A.S. Gordon, E.A. Mirand, J. Weing, et al. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1968. - V. 149. – P.318-335.
250. Granger B.L., Membrane skeletal protein 4.1 of avian erythrocytes is composed of multiple variants that exhibit tissue-specific expression / B.L. Granger, E. Lazarides // *Cell.* – 1984. – V. 37. – P. 595-607.
251. Groth T., The molecular function of hemoglobin as reflected in ligand binding data analysis of data on erythrocytes / T. Groth, C.H. de Verdier, L. Garby // *Acta biol med germ.* – 1977. – Bd. 36, H 314. – S. 523-529.
252. Grasso J.A., Cytoplasmic microtubules in mammalian erythropoietic cells / J.A Grasso // *Anat. Record.* – 1966. – V. 156. – P. 397-414.
253. Haest C.W.M., Interactions between membrane skeleton proteins and erythrocyte membrane / C.W.M. Haest // *Biochim. Biophys. Act.* – 1982. – V. 694. – P. 331-352.
254. Halvorsen S., Effect of hypothalamic stimulation erythropoiesis and on the production of erythropoiesis-stimulating factors in intact and nephrectomized rabbits / S. Halvorsen // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1968. – V. 149. – P. 88-93.
255. Hansen J.C., An elastic network model based on the structure of the red blood cell membrane skeleton / J.C. Hansen, R. Skalak, S. Chien, A. Hoger // *Boophys.* – 1996. – V. 70. – P. 461-467.

256. Hanspal M., Synthesis and assembly of membrane skeletal proteins in mammalian red cell precursors / M. Hanspal, J.S. Hanspal // *J. Cell. Biol.* – 1987. – V. 105. – P. 1417-1424.
257. Hanspal M., Asynchronous synthesis of membrane skeletal proteins during terminal maturation of murin erythroblasts / M. Hanspal, J.S. Hanspal, R. Kalraiya, S-C. Liu, et al. // *Blood.* – 1992. – V. 80. – P. 530-539.
258. Hemmaplardh D., The effects of inhibitors of microtubule and microfilament function on transferring and iron uptake by rabbit reticulocytes and bone marrow / D. Hemmaplardh, S.G. Kailis, E.H. Morgan // *Brit. J. Hematol.* – 1974. – V. 28. – P. 53-66.
259. Holt G.D., Erythrocytes contain cytoplasmic glycoproteins / G.D. Holt, R.S. Haltiwanger, C.R. Torres, G.W. Hart // *J. Biol. Chem.* – 1987. – V. 262. – P. 14847-14850.
260. Holland R.A.B., Effects of case of erythrocyte on their rate of oxygen release / R.A.B. Holland, S. Piper, P. Schied, H. Shibata // *J. Physiol. (G. Brit.)*. – 1982. – V. 324. – P. 46.
261. Howard A., Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage / A. Howard, S.R. Pele // *Heredity.* – 1953. – V. 6. – P. 261.
262. Jackson J.D., Interleukin-12 enhances peripheral hematopoiesis in vivo / J.D. Jackson, Y. Yan, M.S. Brenda, L.S. Kelsey, J.S.E. Talmadge // *Blood.* – 1995. – V. 85, № 9. – P. 2371-2376.
263. Kiefer C.R., Hemoglobin spectrin complexes: interference with spectrin tetramer assembly as a mechanism for compartmentalization of band band 2 complexes / C.R. Kiefer, J.F. Trainor, J.B. Mckenney, C.R. Valeri, K.M. Snyder // *Blood.* – 1995. – V. 86. – P. 366-371.
264. Kennedy W.L., Regulation of red blood cell production by erythropoietin normal mouse marrow in vitro / W.L. Kennedy, E.L. Alpen, J.F. Garcia // *Exp. Hemat.* – 1986. – V. 8. – P. 1114-1122.

265. Khodadad J.K., Remodeling the shape of the skeleton in the intact red cell / J.K. Khodadad, R.E. Waugh, J.L. Podolski, R. Josephs, T.L. Stack // *Biophys. S.* – 1996. – V. 70. – P. 1036-1044.
266. Lemez L., The number of erythrocyte recirculations in chick embryo and hen with a note of embryonic heart efficiency / L Lemez, M. Kopecky // *Physiol. Bohemoslov.* – 1962. – V. 11, №. 1. – P. 93-99.
267. Lionetti F.J., Pentose phosphate pathway in human erythrocytes / F.J. Lionetti // *Cellular and molecular biology of erythrocytes.* – Tokyo, 1974. – P. 143-166.
268. Lipovae V., Hematology in diabetes mellitus / V. Lipovae // *Diab. Yroat.* – 1982. – V. 11. – P. 27-34.
269. Lipton J.M., Cell-cell interaction in the regulation of erythropoiesis / J.M. Lipton, D.G. Natha // *Brit. J. Haematol.* – 1983. – V. 53, № 3. – P. 361-367.
270. Lombardo C.R., Calmodulin modulates protein 4.1. binding to human erythrocyte membranes / C.R. Lombardo, P.S. Zow // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1994. – V. 1196, № 2. – P. 139-144.
271. Manwell C., Survey of hemoglobins in wild birds / C. Manwell, C.M. Baker // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 1963. – V. 49. – P. 496-504.
272. Maximov A.A., Über die Entwicklung der Blut und Bindegewebzellen bei Säugtierebrejion / A.A. Maximov // *Fol. Haematol. Arch.* – 1907. – Bd. 4. – S. 611.
273. Maximov A.A., Der lymphocyte als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embrionalen. Eutwicklung und in postfactalen Steden der Zengetiere / A.A. Maximov // *Fol. Haematol. Arch.* – 1909. – Bd. 8. – S. 125.
274. Maximov A.A., Untersuchungen über Blut und Bindegewebe. VI. Über Blutmastzellen / A.A. Maximov // *Arch. F. Micr. Anat.* – 1913. – Bd. 83. – S. 247.

275. Maximov A.A, Bindegewebe und blutbildende Gewebe / A.A. Maximov // Handb. d. mikr. Ana. d. Nenschen. herausg. V. W. Möllendorff. – 1927. – Bd. 11, T. 1. – S. 232-583.
276. McCulloch E.A., Repression of colony-forming ability of C 57 BL hematopoietic cells transplanted into non-isologous hosts / E. A. McCulloch, J.E. Till // J. cell comp. physiol. – 1963. – V. 61. – P. 301.
277. McLough A.M., On the structure of erythrocyte spectrin in partially expended membrane skeletons / A.M. McLough, R. Josephs // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1990. – V. 87, № 13. – P. 5208-5212.
278. Medado P., The effect of electrical stimulation of the central nervous system on erythropoiesis on the rat. II. Localisation of specific brain structure capable enhancing red cell production / P. Medado, J. Izak, S. Feldman // J. Lab. Clin. Med. – 1967. – V. 69. – P. 776-786.
279. Mirand E.A., Mechanism of estrogen action in erythropoiesis / E.A. Mirand, A.S. Gordon // Endocrinology. – 1966. – V. 78. – P. 325-329.
280. Mirand E.A., Extra-renal and renal control of erythropoietin production / E.A. Mirand // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1968. – V. 149, art 1. – P. 94-106.
281. Mische S., Erythrocyte adducih: a calmodulin-regulated actin-binding protein that stimulated spectrin-actin-binding / S. Mische, M. Mooseker, S. Morrow // J. Cell. Biol. – 1987. – V. 105. – P. 2837-2849.
282. Nagura H., Role of electrone surface charge of cell membrane in phagocytosis / H Nagura, Y. Katsumata, K. Kojima // Acta. Pathol. Jap. – 1973. – V. 23. – P. 279-290.
283. Pagnier J., Le “Sang” artificiel / J. Pagnier, C. Poyart // Recherche. – 1993. – № 254. – P. 640-649.
284. Presti F.T., Cholesterol-phospholipid interactions in membranes. 2. Stoichiometry and molecular packing of cholesterol-rich domains / F.T. Presti, R.J. Pace, S.I. Chan // Biochemistry. – 1982. – V. 21. – P. 3831-3835.
285. Robak T., Czynniki wzrostowe komórek pina (SCF) / T. Robak // Acta. haematol. pol. – 1994. – V. 25, № 3. – P. 205-214.



286. Samaja M., The separate effects of  $H^+$  and 2, 3 -DPG on the oxygen equilibrium curve of human blood / M. Samaja, R.M. Winslow // Brit. J. Haematol. – 1979. – V. 41, № 3. – P. 373-381.
287. Schmidt-Schoenbein Y.W., White cell volume and dynamics / Y.W. Schmidt-Schoenbein // Federat. Proc. – 1987. – V. 222. – P. 95-102.
288. Schmidtke J.R., Augmented uptake of neurominidase-treated sheep red blood cell: participation of opsonic factors / J.R. Schmidtke, R.L. Simmons // J. Natl. Cancer Inst. – 1975. – V. 54. – P. 1379-1383.
289. Scott H.L., Lipid chains and cholesterol in model membranes: a Monte Carlo study / H.L. Scott, S. Kaluskar // Biochemistry. – 1989. – V. 28. – P. 3687-3691.
290. Seidler N.W.,  $Ca^{2+}$  transport activities of inside-out vesicles prepared from density-separated erythrocytes from rat and human / N.W. Seidler, N.I. Swislocki // Molec. Cell. Biochem. – 1991. – V. 105. – P. 159-169.
291. Shonet S.B., Red cell membrane shape and stability: relation to cell lipid renewal pathways and cell ATF / S.B. Shonet, J.E. Haley // Red cell shape / Ed. M. Bessis. – N.Y., 1973. – P. 41-50.
292. Simons J.A., Embryonic development of hemoglobin in chicken / J. A. Simons // J. Exp. Zool. – 1966. – V. 162. – P. 219-230.
293. Smith J.E., Erythrocyte membrane: structure, function and pathophysiology / J.E. Smith // Vet. Pathol. – 1987. – V. 24, № 6. – P. 471-476.
294. Steck T.L., The organization of proteins in the human red blood cell membrane / T.L. Steck // J. Cell. Biol. – 1974. V. 62. – P. 1-19.
295. Tocantins L.M., Modern methods for quantitation: of red blood cell production and destruction: erythrokinetics / L.M. Tocantins // Blood. – 1961. – V. 18. – P. 225.
296. Tsai S., Stromal cell associated erythropoiesis / S. Tsai, C.A. Sief // Blood. – 1986. – V. 67. – P. 1418.

297. Vazecka Z., Vanadate changes  $\text{Ca}^{2+}$  influx pathway properties in human red blood cells / Z. Vazecka, E. Peterojova, J. Sevcik // *Jen. Physiol. Biophys.* – 1997. – V. 16, № 4. – P. 359-372.
298. Vicaut E., Microcirculation and arterial hypertension / E. Vicaut // *Drugs.* – 1999. – V. 59. – P. 1-10.
299. Waugh R.E., Physical measurements of bilayer-skeletal separation forces / R.E. Waugh, R.G. Bauserman // *Ann. Biomed. Eng.* – 1995. – V. 23. – P. 308-321.
300. Weiss L.P., The structure of hematopoietic tissue/ L.P. Weiss // *Blood: Principles and Practice of Hematology* /Ed. R.I. Handin. S. E. Lux, T.P. Stossel. – Philadelphia: J.B. Lippincott, 1995. – P. 155-169.
301. Williams H., Chemical structure of the red blood cell / H. Williams, B. Erickson, J. Macy // *Quart. Rev. Biol.* – 1941. – V. 16. – P. 80-89.
302. Williams D.A., The stem cell model of hematopoiesis / D.A. Williams // *Hematology: Basic Principles and Practice* / Ed. R. Hoffman. E. Benz, S. Shattil, B. Furie, et al. – Baltimore: Williams and Wilkins, 1995. – P. 92-180.
303. Winslow R.M. Hemoglobin – based red cell substitutes / R.M. Winslow. – N.Y.: Jonsons Hopkins University Press, 1992. – 400 p.
304. Yeagle P.L., Membranes of cells / P.L. Yeagle. – Academic Press. Inc. Orlando. Florida, 1987. – P. 120-138.
305. Ylonski C.A., Erythrocyte survival in children as studied by labelling with stable  $^{50}\text{Cr}$  / C.A. Ylonski, K.K.S. Pillay, L.Y. Macdongall // *Amer. J. Dis. Child.* – 1976. – V. 130. – P. 1228-1230.
306. Yndi S.R.P., Membrane skeleton – bilayer interaction is not the major determinant of membrane phospholipid assymetry in human erythrocytes / S.R.P. Yndi, A. Kumar, V. Bhakuni, et al. // *Biochim. Biophys. Acta: Biomembranes.* – 1990. – V. 1023, № 1. – P. 63-72.

Научное издание

**Липунова Елена Андреевна  
Скоркина Марина Юрьевна**

**СИСТЕМА КРАСНОЙ КРОВИ**  
(СРАВНИТЕЛЬНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ)

**Монография**

Редактор З.М. Лычева  
Корректор З.М. Лычева  
Компьютерная верстка Н.А. Гапоненко