

СОДЕРЖАНИЕ МОНООКСИДА АЗОТА И КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ГИПОКСИИ/РЕОКСИГЕНАЦИИ

Акулич Н. В.¹, Походня Ю. Г.¹, Костин Д. Г.¹, Сяхович В. Э.¹, Зинчук В. В.²

*¹Учреждение здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория»,
аг. Лесной, Республика Беларусь;*

*²Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь*

Реферат. В статье проведен анализ содержания монооксида азота (NO), спектров поглощения и оптико-морфологических характеристик эритроцитов при гипоксии/реоксигенации. Определение внутриклеточного NO проводили с использованием диацетильного производного 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлуоресцеина (DAF). Площадь и оптическую плотность эритроцитов измеряли методом морфоденситометрии. Выявлен рост NO в эритроцитах и повышение плотности упаковки гемоглобина при гипоксии/реоксигенации. Обсуждается участие NO-эритроцитов в механизмах поддержания тканевой микроциркуляции при гипоксических состояниях.

Ключевые слова: монооксид азота, эритроциты, гипоксия, реоксигенация, проточная цитометрия.

Введение. При различных вирусных инфекциях, например коронавирусной, имеются значительные различия в симптоматике: у большинства пациентов заболевание протекает с минимальными проявлениями, у других развивается тяжелая дыхательная недостаточность, осложненная развитием острого респираторного дистресс-синдрома с быстро прогрессирующей гипоксемией [1]. Имея диагностируемые признаки гипоксии, некоторые пациенты с COVID-19 не предъявляют жалоб в отношении функции дыхания [1]. Использование стандартных методов контроля для диагностики повреждений не всегда позволяет выявлять их в ранние сроки заболевания, в связи с чем необходимо углубленное изучение причин и последствий гипоксии. Не вызывает сомнений, что ранняя диагностика гипоксических повреждений органов является пер-

спективным направлением для предупреждения развития опасных последствий гипоксемии.

Эритроциты являются (RBC) терминально дифференцированными клетками, которые, с одной стороны, осуществляют транспорт кислорода, с другой — подвергаются изменениям при воздействии гипоксии [2]. При высоких напряжениях кислорода, преобладающих в ацинусах легких, кровь полностью насыщается кислородом и гемоглобин (Hb) имеет «relaxed» R-состояние. Когда кровь поступает в микроциркуляторное русло, парциальное напряжение кислорода (PO_2) снижается, способствуя переходу в «tense» T-форму и отщеплению кислорода от гемоглобина. В последнее время в развитии гипоксических состояний активно исследуется роль газотрансммиттера монооксида азота, который проявляет свою активность по-

средством механизмов, отличающихся от других сигнальных молекул.

Цель работы — оценка содержания монооксида азота и фракций гемоглобина при моделировании гипоксии/реоксигенации.

Материалы и методы. Исследования проводилось на базе УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория». Исследование выполнено на образцах крови добровольцев ($n = 17$) с использованием вакуумных систем с K_2 ЭДТА. Исследование одобрено комитетом по этике УЗ «Национальная антидопинговая лаборатория».

Оценку спектров суспензии эритроцитов и расчет фракций гемоглобина суспензии эритроцитов и раствора гемоглобина производили по формулам (1–3):

$$[HbO_2] = 29,8 \cdot A577 - 9,8 \cdot A630 - 22,2 \cdot A560; \quad (1)$$

$$[Hb] = -1,6 \cdot A577 + 2,5 \cdot A630 - 0,33 \cdot A560; \quad (2)$$

$$[MetHb] = 0,2 \cdot A577 - 0,4 \cdot A630 + 0,33 \cdot A560, \quad (3)$$

где $[HbO_2]$, $[Hb]$ и $[MetHb]$ — окси-, дезокси- и метгемоглобин соответственно; $A577$, $A630$ и $A560$ — значения поглощения при соответствующих длинах волн.

Проверку правильности произведенных измерений и подсчетов осуществляли при параллельном измерении спектров поглощения и оценки фракций гемоглобина на газоанализаторе ABL 800 Flex (Radiometer).

Оценка влияния гипоксии/реоксигенации *in vitro* (экспозиция 90 мин) реализована с использованием модуля контроля газов планшетного спектрофлуориметра Synergy H1 (Biotek). В перчаточном боксе, подключенном к генератору азота и баллону с углекислым газом, концентрация CO_2 была постоянной и составляла 4,7–5,3 %, парциальное давление кислорода варьировало в соответствии с условиями эксперимента: 1, 7 и 16 %. Реоксигенация (в течение 30 мин) включала в себя установление 7 % парциального давления кислорода, соответствующее напряжению (pO_2) 36–40 мм рт. ст. венозной крови. По окончании реоксигенации в лунку планшета вносили деионизированную воду и получали спектр раствора гемоглобина.

Морфоденситометрический анализ препаратов крови производили с использованием микроскопа Olympus BX-53 (Olympus, Япония). Приготовление и фиксация мазков осуществлялась в гипо- и/или гипероксических условиях. В 1-й серии (*группа Vox*) приготовление, сушка и фиксация метанолом проводилась в

перчаточном боксе в условиях гипоксии ($n = 17$). Во 2-й серии (*группа Hypoxia*) — инкубированная в условиях гипоксии суспензия эритроцитов помещалась в вакутайнер с крышкой, затем в условиях лабораторного помещения вакутайнер вскрывали, готовили мазки, высушивали и фиксировали ($n = 17$). В 3-й группе (*группа Control*) приготовление и фиксация мазков осуществлялась в условиях лабораторного помещения ($n = 17$).

Определение содержания внутриклеточного NO и морфоденситометрических параметров эритроцитов проводили методом проточной цитометрии (FACS ARIA, США) и световой микроскопии. Для гейтирования эритроцитов пробы крови окрашивались моноклональными антителами к линейному маркеру эритроцитов (гликофору A, CD 235 a), для оценки NO использовали 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлуоресцеин (DAF, 10 μ M) и его диацетильное производное (DAF DA, 10 μ M) (все реагенты Molecular Probes). Для подготовки проб при проведении исследований на проточном цитометре использовали фосфатный буфер FACS Flow (BD Bioscience). Анализировали в каждой пробе не менее 40 тыс. клеток. Микрочастицы эритроцитов оценивали по низким значениям прямого светорассеяния и сильной экспрессии на цитоплазматической мембране линейного маркера эритроцитов (CD 235a).

Для возбуждения флуоресцентных красителей использовали лазеры проточного цитометра с длиной волны 488 и 632 нм. Регистрацию флуоресценции производили с использованием узкополосных фильтров. Для анализа применяли логарифмическую шкалу с 4 декадами. В ходе анализа производили настройку флуоресценции проточного цитометра таким образом, чтобы в 1-й декаде флуоресценции двух используемых каналов находились клетки изотипического контроля.

Полученные значения представлены в виде медианы (Me) и 25-й и 75-й процентиля и проанализированы при помощи дисперсионного анализа с применением программы для персонального компьютера Statistica 10.0.

Результаты и их обсуждение. Результаты спектрофотометрических исследований крови здоровых добровольцев при парциальном давлении (напряжении) кислорода 36–40 мм рт. ст. (соответствует pO_2 венозной крови) представлены на рисунке 1. Все представленные на рисунке спектры имеют характерные пики 540 и 576 нм и специфический минимум при 560 нм.

Проведенная оценка спектров поглощения крови показала, что при этом уровне содержания кислорода в атмосфере бокса (7 %) выявлено снижение фракции оксигемоглобина с 37,2 % (32,9; 41,5) до 35,4 % (31,1; 39,7), при этом пропорционально выросла доля дезоксигемоглобина с 52,9 % (47,3; 58,5) до 55,96 % (52,2; 59,7), $p < 0,05$. При добавлении в суспензию эритроцитов DAF фракция HbO_2 выросла до 43,1 % (41,1; 47,4), что свидетельствует об увеличении сродства гемоглобина к кислороду.

Процесс реоксигенации сопровождался значительным ростом фракции оксигемоглобина до 46,7 % (42,3; 50,5), при этом доля HHb составляла 44,4 % (41,8; 47,1), $p < 0,05$. DAF ослаблял этот эффект и доля оксигемоглобина на фоне введения зонда была 45,1 % (43,3; 46,9), $p < 0,05$. Моделирование гипоксии привело к сдвигу вправо максимума поглощения в области полосы Soret .

Во 2-й группе инкубация крови в течение 90 мин в условиях 1%-го содержания кислорода в атмосфере привела к снижению фракции оксигемоглобина до 24,2 % (18,2; 29,9) (рисунок 2).

Фракция HHb выросла до 65,6 % (61,1; 70,2), $p < 0,05$. Как и в случае применения газовой смеси с 7 % кислорода, использование в условиях эксперимента газовой смеси с 1 % O_2 сопровождалось сдвигом вправо максимума в области полосы Soret . Необходимо отметить феномен роста оптической плотности в условиях острой гипоксии во всем исследуемом диапазоне. Реоксигенация сопровождалась резким повышением фракции оксигемоглобина до 51,3 % (46,4; 56,2), $p < 0,05$ и метгемоглобина (MetHb) до 11,1 % (7,7; 14,4), $p < 0,05$, снижением фракции HHb до 34,7 % (31,3; 38,2), $p < 0,05$.

Поскольку в наших исследованиях при измерениях спектров поглощения использовались суспензии клеток, то в ходе фотометрии возможное изменение оптической плотности пробы могло быть вызвано отражением и рассея-

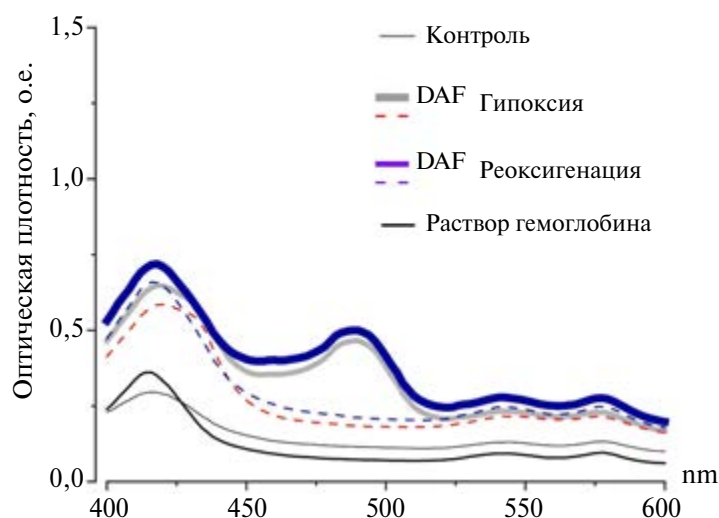


Рисунок 1 — Спектры поглощения эритроцитов крови при 7 % кислорода в модельной смеси

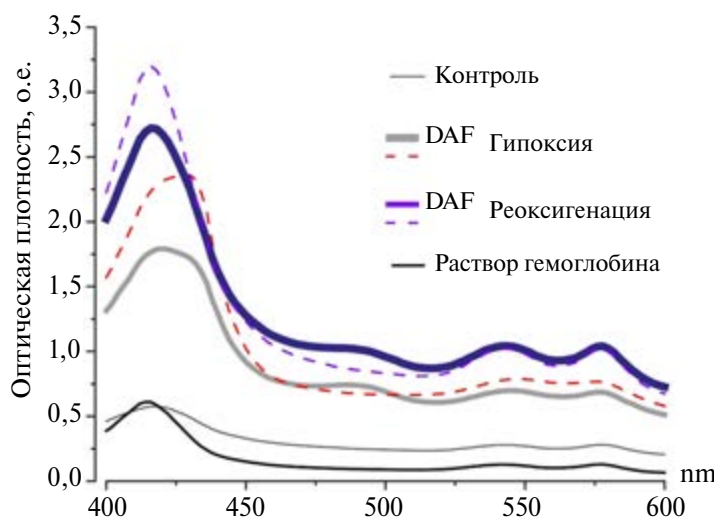


Рисунок 2 — Спектры поглощения эритроцитов крови при 1 % кислорода в модельной смеси

нием света на клетках и в результате эффекта «сита». Следовательно, для оценки этого вклада в изменение светопропускания и светорассеивания в суспензии необходимо оценить морфологические и дифрактометрические характеристики клеток при моделировании гипоксии. Для проверки этого предположения были проведены исследования морфоденситометрических параметров эритроцитов в условиях гипоксии и реоксигенации (рисунок 3, а, б).

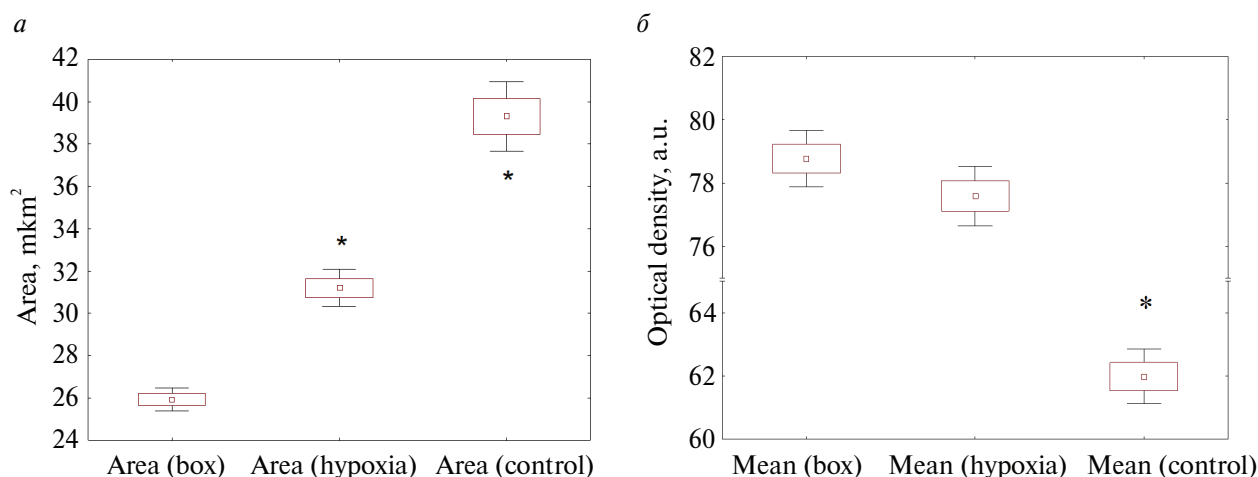


Рисунок 3 — Оптико-морфологические характеристики эритроцитов крови исследуемых групп: а — гипоксия; б — реоксигенация (*Достоверные изменения в сравнении с контролем.)

Наибольшая площадь эритроцитов 39,3 (26,3; 47,7) мкм² была зарегистрирована в группе контроля, в группе Нурохиа — 31,2 (24,1; 31,9) мкм², а в группе Вох — 25,9 (22,5; 27,7) мкм². При этом по мере снижения процентного содержания кислорода увеличилась однородность эритроцитов, о чем свидетельствует значение среднеквадратического отклонения (рисунок 3). Среднее значение оптической плотности (Mean) при моделировании гипоксии *in vitro* выросло с 61,9 (55,5; 68,2) о.е. до 78,7 (71,3; 85,2) о.е., $p < 0,05$ в группе Вох.

При инкубации в условиях гипоксии суспензии эритроцитов, а затем при приготовлении и высушивании мазков в условиях лабораторного помещения (Нурохиа) средняя оптическая плотность также достоверно была выше, чем в группе контроля, и составляла 77,6 (69,1; 86,2) о.е., $p < 0,05$.

Таким образом, рост среднего значения оптической плотности эритроцитов при гипоксии может являться причиной увеличения оптической плотности при фотометрии суспензии красных кровяных телец. В работе В. В. Ревина и др. [4] методом спектроскопии комбинационного рассеяния показано, что гипоксия сопровождается конформационными изменениями гемопорфирина, приводящими к росту плотности упаковки гемоглобина в эритроците более чем в 1,5 раза.

При максимальной концентрации кислорода (16 %) фракция гемоглобина не снижалась при инкубировании крови, а, напротив, росла (рисунок 4). Так, рост фракции оксигемоглобина был более 6 % ($p < 0,05$) и HbO₂ составлял 48,3 % (45,4; 51,2). Реоксигенация пробы до 6 % O₂ характеризовалась значительным снижением фракции HbO₂ до 36,3 % (34,1; 38,8). При оксигенации и особенно реоксигенации без использования DAF выявлен сдвиг вправо максимума в области полосы Core.

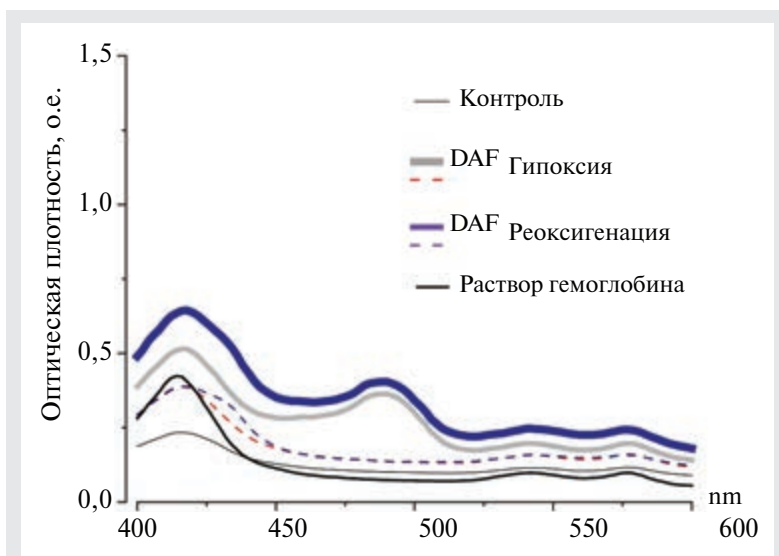


Рисунок 4 — Спектры поглощения эритроцитов крови при 16 % кислорода в модельной смеси

Известно, что Hb в анаэробных условиях восстанавливает нитрит до оксида азота, что подтверждается образованием нитрозогемоглобина (SNO-Hb) и сдвигом полосы Core влево [5]. Согласно нашим данным о положении максимума полосы Core, содержание SNO-Hb при гипоксии снижено, что ука-

зывает, в том числе на преимущественную T-конформацию гемоглобина красных кровяных телец.

На заключительном этапе исследования (рисунок 5) был проведен анализ содержания монооксида азота в суспензии эритроцитов и в отдельных клетках.

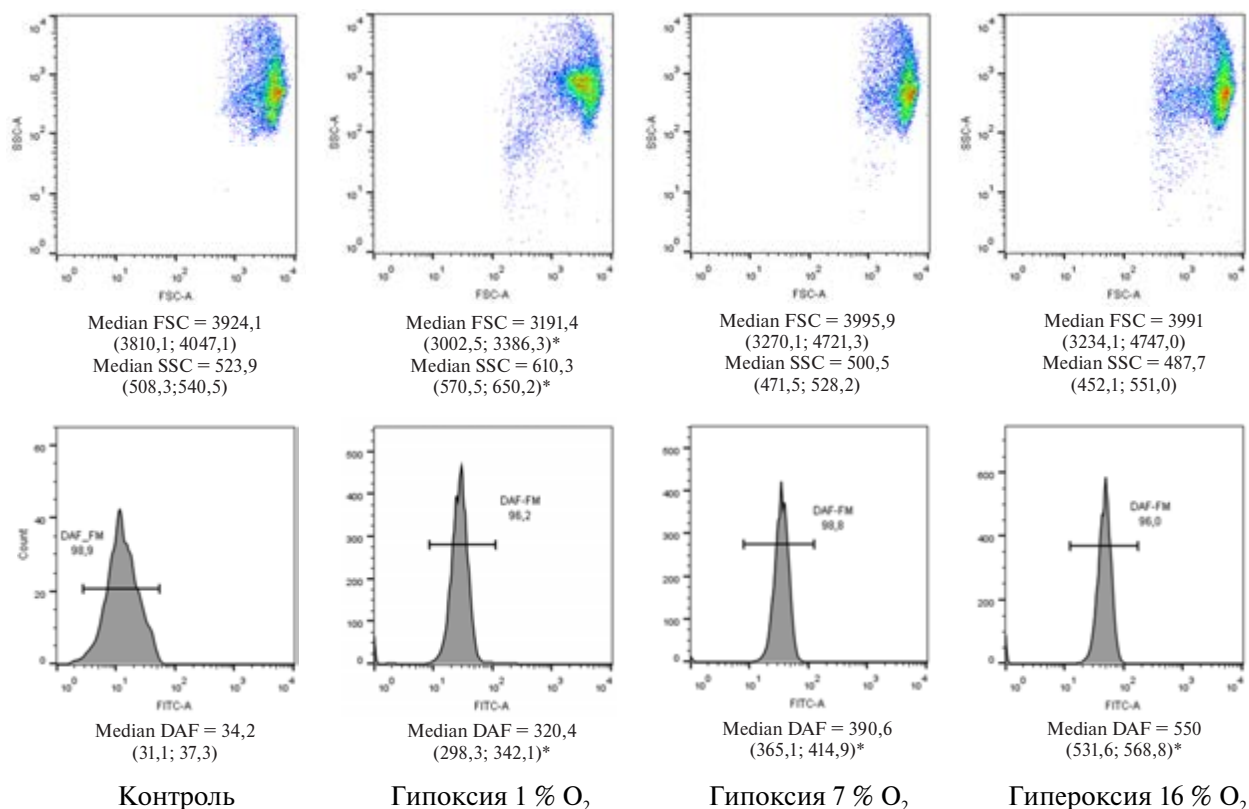


Рисунок 5 — Оценка содержания монооксида азота в суспензии эритроцитов исследуемых групп (*Достоверные изменения в сравнении с контролем.)

В первом случае (анализ в суспензии) использовали планшетный спектрофлуориметр, а для второго способа (анализ в отдельных клетках: эритроцитах) использовали проточную цитометрию. При этом целевые клетки отделяли от лейко- и тромбоцитов при помощи линейного маркера CD 235a. Затем оценивали субпопуляционный состав по параметрам прямого светорассеяния и интенсивности флуоресценции DAF DA. Его форма в виде диацетата способна проникать через цитоплазматическую мембрану. До вступления в реакцию с NO и его производными DAF DA практически не флуоресцирует, но при взаимодействии с монооксидом азота и производными NO флуоресценция значительно возрастает.

Значение прямого (FSC) и бокового светорассеяния (SSC) в группе контроля и при моделировании гипоксии *in vitro* было сход-

ным, за исключением условий острой гипоксии, характеризующейся 1 % содержанием кислорода. При других экспериментальных условиях отличий в показателях светорассеяния по сравнению с контролем (до помещения крови в экспериментальные условия) выявлено не было.

Проведенная оценка содержания NO показала, что в условиях гипоксии и реоксигенации *in vitro* уровень внутриклеточного NO статистически значимо выше, чем в контроле ($p < 0,05$). Сравнительный анализ продемонстрировал прямо пропорциональную зависимость между содержанием кислорода в модельной смеси и внутриклеточным содержанием NO.

Таким образом, гипоксическое состояние при моделировании гипоксии *in vitro* сопровождается активацией L-аргинин NO-системы

эритроцитов, которая выполняет адаптивную функцию к воздействию гипоксии. Можно предположить, что определенную роль в генерации NO и его производных в экспериментальных условиях играет нитритредуктазная система, особенно при создании нами острой (1 % O₂) гипоксии.

Для выяснения механизмов изменения кислородтранспортной функции крови при гипоксии важным является оценка влияния газо-

трансммиттеров, в частности монооксида азота. Условия, создаваемые в планшетном спектрофлуориметре, позволяют оценить кинетику содержания внутриклеточного NO при гипоксии/реоксигенации (рисунок 6).

Наибольший прирост монооксида азота (практически в 4 раза) выявлен при 16 % O₂ (90 мин экспозиция) в воздушной смеси. Реоксигенация сопровождалась дальнейшим приростом NO, скорость которого снижалась.

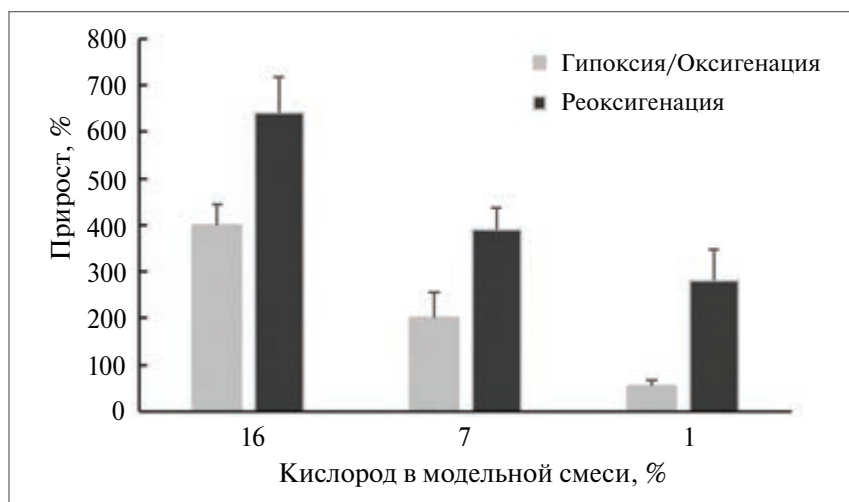


Рисунок 6 — Процент прироста интенсивности флуоресценции DAF при гипоксии/оксигенации в зависимости от содержаний кислорода

При применении 7 % O₂ в модельной смеси происходил равномерный рост (в 4 раза) содержания монооксида азота на протяжении всего периода наблюдения. Минимальное содержание кислорода также приводило к росту содержания NO, но темп его прироста был ниже, чем при других экспериментальных условиях. Реоксигенация в течение 30 мин сопровождалась резким приростом содержания монооксида азота, причем 30-минутная инкубация после острой гипоксии привела к большему приросту NO, чем 90-минутная экспозиция крови при 7 % кислорода.

Таким образом, рост содержания монооксида азота при гипоксии можно рассматривать как адаптивную реакцию. В свою очередь рост NO и его производных в эритроцитах может менять кривую диссоциации оксигемоглобина, снижая сродство гемоглобина к кислороду [2]. Подтверждением этого феномена является рост тканевого pO₂ после использования нитроглицерина в модели *in vivo* [6]. Кроме того, гипоксия, запуская механизмы клеточного стресса, активирует NOS эритроцитов, что приводит к высвобождению NO и вазодилатации сосудов

в этих условиях. В совокупности это подтверждает важную роль NO эритроцитов в регуляции местного кровотока при гипоксических состояниях.

Заключение. В ходе выполнения исследования уточнены представления о механизмах адаптации к гипоксии с участием L-аргинин-NO системы эритроцитов. Установлено, что гипоксия сопровождается ростом фракции Hb и сдвигом вправо максимума в области полосы Core. Реоксигенация приводит к резкому повышению фракции оксигемоглобина и метгемоглобина, снижению фракции Hb. Выявлен феномен снижения линейных размеров и повышение плотности упаковки гемоглобина в эритроците.

Обнаруженный нами рост содержания NO и его производных в эритроцитах является одним из возможных механизмов поддержания тканевой микроциркуляции, что объясняет отсутствие дыхательного дискомфорта (одышки) у пациентов при гипоксии. Использование данных о содержании монооксида азота и изменении морфооптических характеристик эритроцитов периферической крови

может являться дополнительным диагностическим признаком, определяющим прогноз течения заболеваний, сопровождающихся гипоксией.

Источник финансирования. Работа выполнялась в рамках программы ГПНИ 4 «Трансляционная медицина», Подпрограмма 4.1 «Экспериментальная медицина».

Список цитированных источников

1. Дони́на, Ж. А. Причины гипоксемии при COVID-19 / Ж. А. Дони́на // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. — 2022. — Т. 108. — № 1. — С. 3–12.
2. Akulich, N. V. Role of the L-Arginine / NO System in Red Blood Cells at Different Values of Oxygen Partial Pressure / N. V. Akulich, V. V. Zinchuk // J. of Evolutionary Biochemistry and Physiology. — 2022. — Т. 58, № 2. — С. 548–557.
3. A broad diversity in oxygen affinity to haemoglobin / B. Balcerек [et al.] // Scientific Reports. — 2020. — Т. 10, № 1. — С. 16920.
4. Сравнительная характеристика липидного состава и морфофункциональных показателей ядерных и безъядерных эритроцитов в условиях гипоксии / В. В. Ревин [и др.] // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. — 2020. — Т. 106, № 5. — С. 631–653.
5. Glutathione oxidation under the action of sodium nitrite on hemoglobin / I. Stepuro [et al.] // Polish J. Pharmacology. — 1994. — Т. 46, № 6. — С. 601–607.
6. Effects of Nitroglycerin on Erythrocyte Rheology and Oxygen Unloading / J.-P. Bin [et al.] // Circulation. — 2006. — Т. 113, № 21. — С. 2502–2508.

Nitrogen monoxide content and oxygen-binding properties of erythrocytes during hypoxia/reoxygenation

Akulich N. V.¹, Pakhadnia Y. G.¹, Kostsin D. G.¹, Syakhovich V. E.¹, Zinchuk V. V.²

¹ National Anti-Doping Laboratory, Minsk region Lyasny, Republic of Belarus;

² Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

Nitrogen monoxide content, absorption spectra, and optical and morphological characteristics of erythrocytes under hypoxia/reoxygenation were analyzed. Intracellular NO was measured using a diacetyl derivative of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein (DAF). The area and optical density of erythrocytes were evaluated by morphodensitometry. It was found increase in NO in erythrocytes and hemoglobin packing density during hypoxia/reoxygenation. The role of erythrocyte NO in the mechanisms of tissue microcirculation maintaining under hypoxic state.

Keywords: Nitric oxide, red blood cells, hypoxia, reoxygenation, flow cytometry.

Поступила 29.06.2022