УДК 612.111+ 612.23

# ДЕФОРМИРУЕМОСТЬ И ОКСИГЕНАЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ГИПО- И ГИПЕРОКСИИ

*Акулич Н. В.[1,2], Зинчук В. В.[2]*

*[1]Республиканский научно-практический центр спорта, г.Минск, Республика Беларусь;*
*[2]Учреждение образования «Гродненский государственный медицинский университет», г. Гродно, Республика Беларусь*

**Реферат.** В статье проведен анализ деформируемости и оксигенации эритроцитов при гипоксии/реоксигенации. Деформируемость определяли с использованием проточной цитофлуориметрии, применяя пошаговое снижение давления потока обжимающей жидкости, что позволяло менять воздействие потока на эритроциты. Степень сфероцитоза оценивали с использованием эозин-5 малеимида, уровень флуоресценции которого снижается при дефектах цитоскелета эритроцитов, связанных с белком полосы 3 мембран клеток. Спектрофотометрию и исследование оксигенации эритроцитов после сортировки проводили на планшетном спектрофлуориметре, укомплектованным модулем поддержания концентрации газов. Выявлена взаимосвязь между деформируемостью эритроцитов и их сродством к кислороду в условиях гипо- и гипероксии.

**Ключевые слова:** сфероцитоз, эритроциты, гипоксия, гипероксия, проточная цитометрия.

**Введение.** Способность эритроцитов реагировать на изменение внутренней среды является важнейшим свойством красных кровяных телец. В свою очередь, на эту функцию способны оказывать влияние газотрансмиттеры, например, NO, а реакции гемоглобина с монооксидом азота будут различаться в зависимости от значений парциального напряжения кислорода.

Показано, что образование, депонирование и элиминация NO-производных гемоглобина будут определять кислородтранспортную функцию крови [1].На уровне микроциркуляторного русла в поддержании гомеостазиса принимают участие и эндотелиальные клетки, которые, как и эритроциты содержат синтазу монооксида азота (eNOS3) и участвуют в выработке монооксида азота.

Ранее было установлено [2], что хранение крови сопровождается ростом внутриклеточного содержания монооксида азота в эритроцитах и изменением оптико-морфометрических параметров красных кровяных телец. На ранних этапах хранения эритроцит-содержащие компоненты крови были представлены дискоцитами, на поздних этапах преобладали сфероциты при возрастании микроцитов, накапливающих монооксид азота и имеющих сниженный уровень внутриклеточного гемоглобина. Поскольку в крови могут встречаться клетки с различной формой, то можно предположить, что они имеют и различия в функции, в частности в их сродстве к кислороду.

Поскольку образование NO в эритроцитах зависит от напряжения сдвига, и NOS эритроцитов активируется при деформации эритроцита, вызванной сдвиговым напряжением, то исследование их сродства к кислороду в зависимости от деформируемости эритроцитов позволит уточнить функции красных кровяных телец в сосудах различного диаметра. Кроме того, известно, что сосудистое русло кровеносной системы различается парциальным напряжением кислорода [3].

**Цель работы** – определение взаимосвязи между деформируемостью эритроцитов и их сродством к кислороду в условиях гипо- и гипероксии.

**Материалы и методы.** Исследования проводилось на базе учреждения здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория» в рамках подпрограммы 4.1 «Экспериментальная медицина» государственной программы научных исследований 4 «Трансляционная медицина».

Каждая доза эритроцитов (440 мл ± 5 %, гематокрит 70 – %) на протяжение 4 недель хранилась в пластиковом пакете, предварительно заполненном гемоконсервантом PAGGSM (Фрезениус Каби АГ, Германия), в состав которого входят раствор хлорида натрия, аденин, глюкоза, гуанозин и маннитол.

Забор крови добровольцев производился с использованием ЭДТА К2. Кровь была подвергнуты лейкофильтрации при сборе, после чего были получены суспензии эритроцитов в соответствии со стандартными процедурами подготовки. Контролем служила кровь добровольцев до хранения. Всего проведено 14 серий исследований. Исследование одобрено комитетом по этике учреждения здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория».

Определения деформируемости (использовали значения малоуглового рассеяния луча лазера (FSc)) проводили методом проточной цитометрии (цитофлуориметр-сортер FACS ARIA, США). Для этого пробы крови окрашивались моноклональными антителами к линейному маркеру эритроцитов (гликофорину А, CD 235 a, Beckman Coulter, США), конъюгированному с флуорохромом PerCP/Cyanine 5.5. Настройка цитометра проводилась с использованием частиц CST (Cytometer Setup and Tracking, BD Bioscience, США). Для пробоподготовки использовали фосфатный буфер FACS Flow (BD Bioscience, США). Анализировали в каждой пробе не менее 40000 клеток. При попадании эритроцита в проточную ячейку происходит его деформация, вызванная различиями в скорости жидкостей. Ввод клеток в ячейку осуществляется с меньшим давлением, а рекомендуемое производителем давление составляет 70 Psi при установке сопла 70 мкм. Для оценки деформируемости клеток нами производилось пошаговое снижение давления потока обжимающей жидкости, что позволяло менять воздействие потока на эритроциты. Ниже приведена схема, на которой показаны примеры формирования сигнала от эритроцитов с разной способностью к деформации.

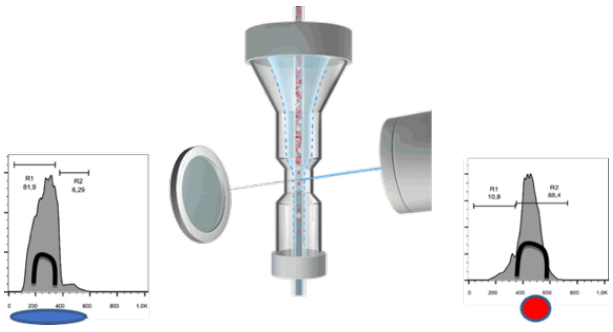

**Рисунок 1 – Принципиальная схема определения деформируемости эритроцитов методом проточной цитометрии**

После проведения цитометрического анализа проводили сортировку эритроцитов, различающихся по прямому светорассеянию и деформируемости в отдельные пробирки для последующего анализа спектров поглощения и оценки сфероцитоза.

Настройка отрыва капли проводилась с использованием частиц Accudrop BD (Bioscience, США). В качестве положительного контроля использовались образцы хранящейся крови. Сортировка проводилась в режиме Purity (обеспечивает наибольшую чистоту целевой популяции) в две круглодонные пробирки объемом 5 мл. После сортировки клетки осаждались мягким центрифугированием, отбиралась надосадочная жидкость для получения эритроцитарной суспензии с необходимым гематокритом для последующей инкубации в условиях нормо-, гипо- и гипероксии, создаваемых в перчаточном боксе. Использовали сопло с диаметром 70 мкм, скорость потока и сортировки были минимальными. Чистота выделенных фракций превышала 97 %.

Для спектрофотометрии готовили образцы крови с гематокритом 5 %, разводя цельную кровь физиологическим раствором (Sigma-Aldrich, pH – 7,3) с сывороточным альбумином. Для создания различных значений содержания кислорода в атмосфере (4 и 12 % O2) использовали перчаточный бокс, подключенный к генератору азота и баллону с углекислым газом (концентрация CO2 была постоянной и составляла 4,7–5,3 %), в котором проводили исследования in vitro. Дополнительно планшетный спектрофлуориметр был укомплектован модулем поддержания концентрации газов (BioTek, Gas Controller), который в режиме реального времени автоматически поддерживал заданные значения газов (O2 и CO2).

Оценку степени сфероцитоза проводили с использованием эозин-5 малеимида (Eosin-5-Maleimide, Molecular Probes, (E5-M)), уровень флуоресценции которого снижается при дефектах цитоскелета эритроцитов, связанных с белком полосы 3 мембран клеток [4].

Полученные данные были обработаны методами вариационной статистики с использованием программы для персонального компьютера (JASP 0.18.3, Нидерланды). Полученные значения представлены в виде среднего и среднеквадратического отклонения. Все показатели проверяли на соответствие признака закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка. Достоверность полученных результатов оценивалась с использованием дисперсионного анализа. Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента корреляции Спирмена. Схема исследования представлена на рисунке 2.

| Этапы исследования | Нормоксия (8%$O_2$) | | Гипоксия (4%$O_2$) | | Гипероксия (14%$O_2$) |
|---|---|---|---|---|---|
| Продолжительность | 30 минут | → | 180 минут | → | 60 минут |

**Рисунок 2 – Схема исследования**

Оценку спектров и расчет фракций гемоглобина суспензии эритроцитов производили по формулам [5] с уточнениями:

$$[HbO2] = 29.8\times A577 - 9.8\times A630 - 22.2\times A560. \quad 1,$$
$$[HHb] = -1.6\times A577 + 2.5\times A630 - 0.33\times A560. \quad 2,$$
$$[MetHb] = 0.2\times A577 - 0.4\times A630 + 0.33\times A560. \quad 3,$$

где [HbO2], [HHb] и [MetHb] – окси-, дезокси- и метгемоглобин, соответственно;

A577, A630 и A560 – значения поглощения при соответствующих длинах волн.

**Результаты и их обсуждение.** Анализ данных, полученных при помощи проточной цитометрии показал, что эритроциты здоровых добровольцев на всех режимах давления, создаваемого компрессором проточного цитометра (от 0,5 до 5,0 Бар), имеют два пика распределения красных кровяных телец по значению прямого светорассеяния. Левый пик (R1) характерен для клеток (рисунок 1), имеющих максимальные способности к деформации под влиянием напряжения сдвига.

Через 3 дня хранения эритроциты с высокой степенью к деформируемости практически не регистрируются на гистограмме распределения, скатерограмма распределения клеток по прямому и боковому светорассеянию представлена одной популяцией клеток (рисунок 3).

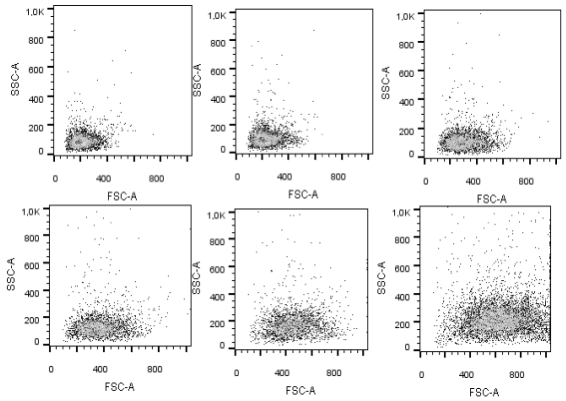


**Рисунок 3 – Морфологические характеристики клеток, хранящихся 28 дней при разных скоростях сдвига**

*Примечание*: * – гистограмма рассеяния клеток по малоугловому и боковому рассеянию луча лазера, FSc-A – малоугловое, SSc-A – боковое.

Хранящиеся эритроциты (рисунок 3) при всех режимах анализа характеризовались монофазным распределением величины прямого светорассеяния, при этом величина SSc на всех режимах потока обжимающей жидкости не изменялась.

Гистограмма распределения малоуглового рассеяния света луча лазера клетками «свежей» и хранящейся крови при разных скоростях сдвига показала (рисунок 4), что эритроциты в обеих группах анализа различались высокой неоднородностью, что указывает на присутствие в кровотоке клеток с различной способностью к деформации.

Важно отметить, что наличие двух пиков распределения света лучами лазера было характерно только для проб «свежей» крови.

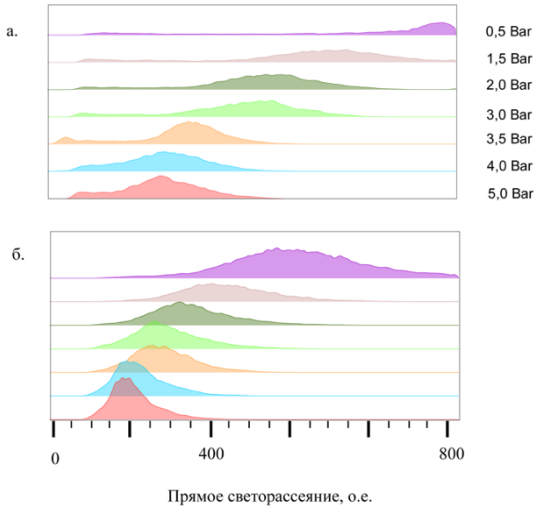


**Рисунок 4 – Гистограмма распределения малоуглового рассеяния света луча лазера клетками крови при разных скоростях сдвига:**
**а – «свежей»;б – хранящейся**

При проведении сравнительного анализа деформируемости эритроцитов установлено (рисунок 5), что между группами наблюдения различия не выявляются только на больших скоростях сдвига. Так, в хранящейся крови деформируемость эритроцитов с 5,0 до 3,5 Bar составляла 154,3 ± 31,3, 293,7 ± 43,8 и 418,2 ± 74,8 о.е. соответственно.

Красные кровяные тельца «свежей» крови при сопоставимых режимах анализа имели более высокие значения прямого светорассеяния: 172,3 ± 31,7, 352,4 ± 76,7 и 541,2 ± 81,2 о.е.На режимах потока с меньшим давлением обжимающей жидкости, особенно при наименьшей скорости сдвига, в эритроцитах хранящейся крови способность к деформируемости была на 20 ($p<0,05$) и

25 % (p<0,05) меньше, чем у клеток «свежей» крови при 0,5 и 1,5 Бар, соответственно.

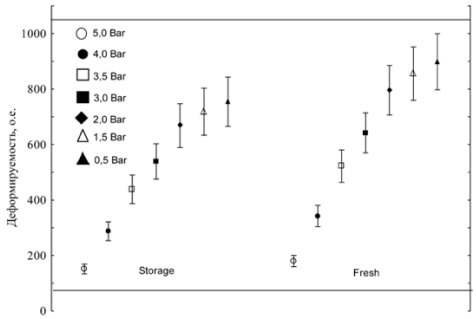


**Рисунок 5 – Деформируемость эритроцитов крови при разных скоростях сдвига: а – «свежей»; б – хранящейся**

Анализ сферичности эритроцитов, измеренный по интенсивности флуоресценции Е5-М, показал (рисунок 6), что все эритроциты образцов хранящейся крови имели сниженное значение флуоресценции зонда. В цельной крови здоровых добровольцев также присутствовали клетки с пониженным уровнем флуоресценции Е5-М. Установлена прямо пропорциональная зависимость между деформируемостью красных кровяных телец и количеством белка полосы 3 мембран клеток r=0,86, p<0,05.На заключительном этапе исследования для анализа спектров поглощения двух различающихся популяций по деформируемости и содержанию белка полосы 3 клеток эритроцитарной суспензии проведена сортировка красных кровяных телец здоровых добровольцев, имеющих различия в флуоресценции эозин-5 малеимида.

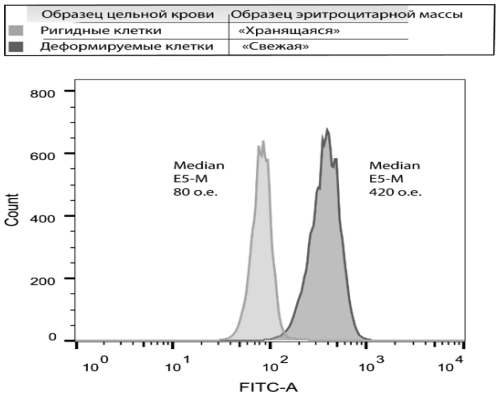


**Рисунок 6 – Анализ сферичности эритроцитов, измеренный по интенсивности флуоресценции Е5-М**

*Примечание:* ось Y – количество клеток, ось X – интенсивность флуоресценции Е5-М

Анализ спектров поглощения крови показал (рисунок 7), что при нормоксии клетки с высокой деформируемостью при 8 %-ном содержании кислорода в атмосфере имели долю фракции HbO2 43,9 ± 1,3 %, в то же время ригидные эритроциты характеризовались более высокой долей оксигемоглобина – 45,1 ± 1,6 %, p<0,05.

Инкубация эритроцитарной взвеси в течение 180 минут при 4 % O2 в атмосфере спектрофлуориметра приводила к снижению доли оксигемоглобина до 36,6 ± 2,2 % и 43,1 ± 2,0 %, у хранящейся и «свежей» крови, соответственно, p<0,05.

При максимальной концентрации кислорода (14 %) фракция гемоглобина выросла в обоих типах клеток, различающихся по деформируемости (рисунок 4). Так, доля фракции оксигемоглобина в популяции ригидных клеток составляла 52,6 ± 1,6 %. Эритроциты с высокой способностью к деформации при гипероксии имели большую долю HbO2 (66,8 ± 2,2 %), p<0,05. Фракция дезоксигемоглобина в процессе гипоксии/реоксигенации изменялась в зависимости от доли HbO2, при этом величина фракции метгемоглобина зависела в основном от принадлежности к типу изучаемых клеток. В частности, в эритроцитах с высокой способностью к деформации процентное содержание MetHb было выше (8,2 ± 0,3 %, p<0,05) в условиях нормоксии, а при гипероксии его доля возрастала до 11,1 ± 0,7 %, p<0,05. Ригидные клетки характеризовались более низкой долей метгемоглобина в начале эксперимента (7,3 ± 0,6 %, p<0,05) и при реоксигенации (8,4 ± 0,8 %, p<0,05). В условиях гипоксии различий между популяциями клеток в содержании MetHb не выявлено.

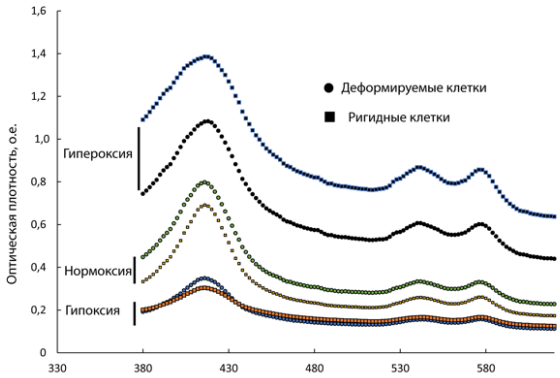


**Рисунок 7 – Спектры поглощения эритроцитов крови при различном парциальном напряжении кислорода**

Одной из основных характеристик, определяющих функции эритроцитов, является их деформируемость, которая проявляется в способности клеток адаптировать свою форму к динамически изменяющимся условиям потока, минимизируя сопротивление к нему. Это необходимо для пассажа клеток по капиллярам, имеющим внутренний диаметр меньший, чем эритроциты и снижение деформируемости может приводить к нарушению перфузии и доставки кислорода к периферическим тканям, поскольку «жесткие» эритроциты способны блокировать капилляры.

В нормальных физиологических условиях деформируемость эритроцитов обеспечивает адекватный кровоток. При увеличении продолжительности нахождения эритроцитов в кровотоке, при переливании хранящейся эритромассы сниженная способность клеток к деформации может влиять на посттрансфузионную функцию крови. Поскольку в организме могут находиться клетки, значительно различающиеся по продолжительности циркуляции в кровотоке, можно предположить наличие у части из них механизмов, обеспечивающих поддержание способности функционирования при снижении способности к деформации. Одним из таких механизмов, вероятно, является изменение функционирования L-аргинин-NO системы красных кровяных телец в ходе процесса превращения эритроцита от ретикулоцита до сфероэхиноцита, подвергающегося эриптозу. При этом образующийся в разных количествах в зависимости от возраста эритроцита NO способен защищать мембраны эритроцитов от окислительного повреждения, обеспечивая их эластичность.

Нами показано, что и диета, богатая нитратами, и нормобарическая гипоксия приводят к росту содержания NO эритроцитов, что способно повысить деформируемость эритроцитов. Выявленные нами различия в оксигенации клеток при гипо- и гипероксии вероятно связаны как с особенностями морфофункционального состояния эритроцитов, так и с участием L-аргинин-NO системы красных кровяных телец. В работе A. Iolascon [6] показано, что при сфероцитозе отмечается изменение сродства гемоглобина к кислороду в сочетании с изменениями объема клетки и ее внутренними структурными перестройками. Повышение оксигенации гемоглобина ригидных клеток при нормоксии вероятно связано с образованием нитрозилгемоглобина, поскольку при этих условиях в эритроцитах выявлено более низкое количество MetHb, повышающего сродство к кислороду, а HbFe2+-NO сдвигает кривую диссоциации вправо. При повышении парциального давления кислорода в условиях эксперимента зарегистрирован рост доли оксигемоглобина в клетках, имеющих большую способность к деформации по сравнению с ригидной популяций эритроцитов. Если предположить, что шеддинг эритроцитарной мембраны при старении клеток сопровождается постепенным уплотнением внутриэритроцитарного гемоглобина, то такой характер изменений может приводить к снижению сродства гемоглобина к кислороду и ухудшению его способности к деформации.

**Заключение.** В ходе выполнения работы проведена оценка взаимосвязи между деформируемостью эритроцитов и их сродством к кислороду в условиях гипо- и гипероксии. Деформируемость красных кровяных телец прямо пропорционально зависит от интенсивности флуоресценции эозин-5 малеимида (используется для выявления клеток, дефицитных по белку полосы 3 мембран).

Установлено, что эритроциты образцов хранящейся крови имели сниженную деформируемость, особенно при небольших значениях напряжения сдвига.

В популяции эритроцитов практически здоровых добровольцев присутствуют клетки с различной деформируемостью и степенью оксигенации. Это необходимо учитывать при оценке газового состава и оксиметрии (особенно интегрального показателя сродства гемоглобина к кислороду – p50) крови пациентов.

**Список цитированных источников**

1. D'Alessandro, A. Erythrocyte adaptive metabolic reprogramming under physiological and pathological hypoxia / A. D'Alessandro, Y. Xia // Curr. Opin. Hematol. – 2020. – Vol. 27, N 3. – P. 155–162.

2. Akulich, N. V. A Comparative Analysis of the Nitrogen Monoxide Content and Optical-Morphometric Characteristics of Erythrocyte-Containing Blood Components during Storage / N. V. Akulich, V. V. Zinchuk // Biophysics. – 2023. – Vol. 68, N 1. – P. 63–69.

3. McKeown, S. R. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response / S. R. McKeown // BJR. – 2014. – Vol. 87, N 1035 (20130676).

4. Nitric oxide bioavailability for red blood cell deformability in the microcirculation: A review of recent progress / J. Kobayashi [et al.] // Nitric Oxide. – 2022. – Vol. 129 – P. 25–29.

5. Severinghaus, J. W. Blood gas calculator. / J. W. Severinghaus // Journal of Applied Physiology. – 1966. – Vol. 21, N 3. – P. 1108–1116.

6. Iolascon, A. Red blood cell membrane defects / A. Iolascon, S. Perrotta, G. W. Stewart // Rev. Clin. Exp. Hematol. – 2003. – Vol. 7, N 1. – P. 22–56.

7. Effects of Nitroglycerin on Erythrocyte Rheology and Oxygen Unloading / J.-P. Bin [et al.] // Circulation. – 2006. – Vol. 113, N 21. – P. 2502–2508.

## Erythrocyte deformability and oxygenation in hypoxia and hyperoxia

*N. V. Akulich [1,2], V. V. Zinchuk[2]*

*[1]Republican Scientific and Practical Center of Sports, Republic of Belarus;*

*[2] Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus*

The analysis of deformability and oxygenation of erythrocytes in hypoxia/reoxygenation was carried out. Deformability was determined by flow cytofluorometry, reducing the pressure of the compression fluid flow, changing the effect of the flow on red blood

**Keywords:** spherocytosis, red blood cells, hypoxia, hyperoxia, flow cytometry.

*Поступила 05.06.2024*