

©Акулич, Зинчук

## ВКЛАД ГАЗОТРАНСМИТТЕРА МОНООКСИДА АЗОТА В СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ЭРИТРОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ/РЕОКСИГЕНАЦИИ

*Н.В. Акулич<sup>1\*</sup>, В.В. Зинчук<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Национальная антидопинговая лаборатория,  
223040, а/г Лесной 31, Республика Беларусь; \*эл. почта: akulichn@gmail.com

<sup>2</sup>Гродненский государственный медицинский университет,  
230009, Гродно, ул. М. Горького, 80, Республика Беларусь

Гипоксия сопровождается изменениями в метаболизме и функции клеток. Гемоглобин эритроцитов может принимать участие в адаптации к гипоксии, выступая сенсором кислорода, обеспечивая взаимосвязь между содержанием кислорода и кровотоком. Механизмы, обеспечивающие эту функцию, окончательно не установлены. В данной работе исследовали влияние NO на структурно-функциональную организацию эритроцитов в условиях гипоксии/реоксигенации. Установлено, что NO принимает участие в адаптивных реакциях при моделировании гипоксии/реоксигенации, меняя конформацию гемоглобина, что обуславливает изменение спектральных характеристик гемопотеина и сродства гемоглобина к кислороду на фоне роста анизоцитоза, увеличения объёма и площади поверхности клеток. Увеличение внутриклеточной концентрации NO в условиях гипоксии обеспечивается за счёт нитритов внеклеточной жидкости. Молсидомин (донор NO) при моделировании гипоксии/реоксигенации вызывает более высокий прирост NO без включения нитритредуктазного механизма, приводит к росту среднего объёма эритроцита, анизоцитозу, увеличению площади клеточной поверхности.

**Ключевые слова:** эритроциты; гипоксия/реоксигенация; монооксид азота; проточная цитометрия; спектроскопия; молсидомин

**DOI:** 10.18097/PBMC20236905315

### ВВЕДЕНИЕ

Необходимым условием функционирования большинства клеток, работы их ферментов, наличия мембранной асимметрии, синтетических процессов и др. является поддержание кислородного гомеостазиса. В условиях физиологического покоя, а также при отсутствии патологии, более 90% доступного кислорода потребляется митохондриями для получения АТФ посредством окислительного фосфорилирования [1]. Ограничение, или отсутствие кислорода сопровождается изменениями в метаболизме и функции клеток. В частности, в результате нарушения усвоения O<sub>2</sub> в ходе биологического окисления и/или недостаточного обеспечения кислородом тканей организма [2–4] возникает состояние гипоксии. При этом, в системных механизмах регуляции сродства крови к кислороду у млекопитающих принимают участие клетки эритрона (зрелые эритроциты и их предшественники — ретикулоциты), а рост концентрации NO при гипоксии и увеличение величины р50 (50% насыщения кислородом) [5–7], можно рассматривать как адаптивную реакцию.

Гемоглобин (Hb) эритроцитов может принимать участие в адаптации к гипоксии, выступая сенсором кислорода [8] и обеспечивать взаимосвязь между содержанием кислорода и кровотоком. Механизмы, обеспечивающие эту функцию, окончательно не установлены. Предполагается, что они включают в себя высвобождение АТФ, образование S-нитрозогемоглобина (SNOHb) [9] и нитритредуктазную активность дезоксигемоглобина [10].

Молсидомин (MC) представляет собой соединение с молекулярной массой 242,23 Да (C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>), являющееся производным сиднониминов, которое применяется при кардиоваскулярной патологии. Терапевтический эффект молсидомина связан с образованием монооксида азота (NO) из его активного метаболита SIN-1 (CAS 16142-27-1). NO, активизируя NO-зависимую гуанилатциклазу, способствует повышению cGMP, что приводит к расслаблению миоцитов стенки сосудов. Кроме NO, SIN-1 образует пероксинитрит (ONOO<sup>-</sup>), который ингибирует агрегацию тромбоцитов [11], влияет на водно-ионный гомеостаз клеток, вызывая зависимое от его концентрации изменение как пассивного потока ионов через плазматическую мембрану с участием ионных обменников и каналов, так и потока воды через аквапорины и дефекты мембраны; пероксинитрит изменяет основные физико-химические параметры клеток крови (концентрацию протонов и молекул АТФ в цитозоле, величину трансмембранного потенциала) и инициирует различные механизмы гибели клеток [12].

Установлено, что образование активного метаболита молсидомина происходит преимущественно в печени, что подтверждается фактом неизменяемой концентрацией молсидомина и отсутствием фармакологических эффектов у гепатэктомированных крыс [9]. Показано, что применение молсидомина на модели суспензии эритроцитов крыс приводит к образованию NO [13]. Инкубирование суспензии эритроцитов в присутствии нитроглицерина

не приводит к росту активных форм азота, но увеличивает концентрацию метгемоглобина (MetHb) и индуцирует перекисное окисление липидов [14].

В связи с этим, целью работы была оценка влияния NO на структурно-функциональную организацию эритроцитов в условиях гипоксии/реоксигенации.

## МЕТОДИКА

Исследования проводили на суспензии эритроцитов добровольцев мужского пола 41-47 лет ( $n=22$ ). Забор венозной крови проводили в вакуумированные пробирки с использованием ЭДТА  $K_2$  в качестве антикоагулянта. Суспензию эритроцитов с гематокритом 5% получали после центрифугирования крови (400 g) в течение 10 мин и добавления  $Ca^{2+}$ -сбалансированного буферного раствора (pH 7,2), не имеющего фоновой флуоресценции. Клеточную взвесь подвергали воздействию гипоксии (30 мин) (1 группа); гипоксии (30 мин)/реоксигенации в течение 60 мин (2 группа).

Для оценки механизмов влияния гипоксии/реоксигенации на фоне введения MC использовали эксперименты *in vitro* в условиях 5%  $CO_2$  и 4%  $O_2$  (гипоксия) и 5%  $CO_2$  и 14%  $O_2$  (реоксигенация), 37°C, которые были созданы в перчаточном боксе.

Для оценки активности L-аргинин-NO системы эритроцитов в суспензию клеток при моделировании гипоксии/реоксигенации вносили донор NO молсидомин ("ПРОСНЕМ", Польша) в количестве 2 мМ (3 и 4 группы). Концентрацию NO в клетках определяли с использованием 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлуоресцеина (DAF-FM DA). Этот флуоресцентный зонд проникает через цитоплазматическую мембрану и подвергается воздействию эстераз. Продукт этой реакции взаимодействует с NO, в результате образуется диаминофлуоресцеин-триазол (DAF-2T), который остаётся в клетке. DAF-2T обладает эмиссией в диапазоне 500–520 нм при возбуждении лазером с длиной волны 488 нм. Контрольные пробы не содержали молсидомина и DAF-FM DA.

Оценку спектров суспензии эритроцитов и расчёт фракций гемоглобина суспензии эритроцитов и раствора гемоглобина производили по формулам [15] с уточнениями:

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

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

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

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

Сродство гемоглобина к кислороду определяли по показателю  $p50$ , (50% степени насыщения её кислородом) при температуре, pH,  $pCO_2$  и  $pO_2$  крови, соответствующих реальным экспериментальным условиям этих показателей и определяли по формуле J.W. Severinghaus [15].

Интенсивность флуоресценции DAF-FM DA и одновременная регистрация спектров поглощения эритроцитарной суспензии реализована на планшетном спектрофлуориметре Biotek Synergy H1 ("BioTek Instruments", США). Параллельно спектрофлуориметрии проводилась оценка внутриклеточного NO на цитофлуориметре FACS ARIA ("BD Biosciences", США). Определяли внутриэритроцитарную интенсивность флуоресценции DAF-FM DA в нормоцитах (субпопуляция эритроцитов, несущих на поверхности гликофорин A и имеющие линейные размеры, соответствующие эритроцитам) каждой клетке [16]. Для логического гейтирования нормоцитов использовали моноклональные антитела к CD 235a. Анализировали в каждой пробе не менее 40000 клеток.

Оптико-морфометрический анализ фиксированных метанолом и окрашенных эозин-метиленовым синим препаратов крови проводили с использованием микроскопа Olympus BX-53 ("Olympus Corporation", Япония), дополненным монохроматическим фильтром с длиной волны 540 нм. С каждого препарата создавали архивы полутоновых (8-битных) изображений не менее 300 эритроцитов с разных (случайных) участков мазка, содержащих монослой клеток. Для оценки площади поверхности эритроцитов использовали алгоритмы программного обеспечения Диаморф-ЦИТО ("Диаморф", Россия).

Гематологические параметры (средний объём эритроцита и показатель ширины распределения эритроцитов по объёму) определяли на гематологическом анализаторе Sysmex 2000i ("Sysmex Corporation", Япония).

Оценку нитритов проводили с использованием Measure-iT™ High-Sensitivity Nitrite Assay Kit ("Molecular Probes", США). Количественный анализ осуществляли после калибровки при титровании 11 мМ нитрита натрия на планшетном спектрофлуориметре Biotek Synergy H1.

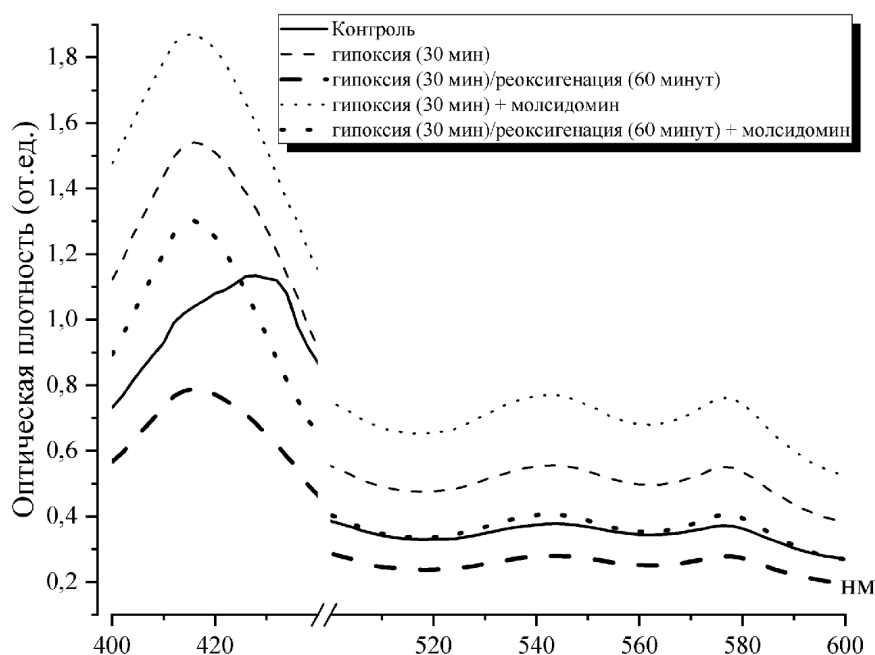
Оценку флуоресценции набора проводили при возбуждении с длиной волны 365 нм, эмиссию регистрировали на длине волны 450 нм.

Полученные данные были обработаны методами вариационной статистики с использованием программы Statistica 10.0. Результаты представлены в виде медианы (Me) и 25-й и 75-й процентиля.

Все показатели проверяли на соответствие признака закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. Достоверность дисперсионного анализа множественных сравнений оценивалась с использованием критерия Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента корреляции Спирмена.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты спектрофотометрических исследований суспензии эритроцитов здоровых добровольцев при гипоксии/реоксигенации представлены на рисунке 1. Все спектры на рисунке



**Рисунок 1.** Спектры поглощения эритроцитов крови при гипоксии/реоксигенации и аппликации молсидомина.

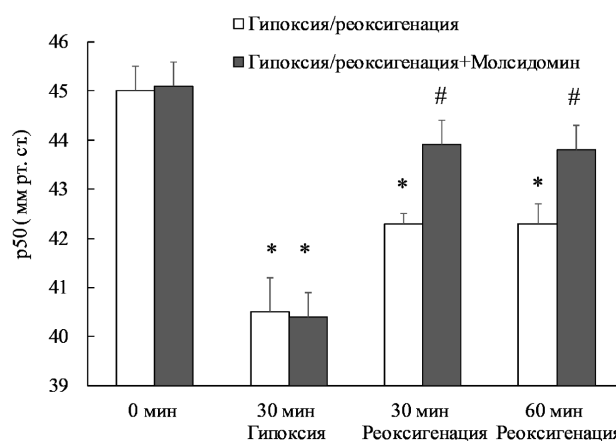
имеют характерные пики 540 и 576 нм, соответствующие оксигемоглобину, и специфический для дезоксигемоглобина минимум на 560 нм.

Оценка спектров поглощения показывает, что при гипоксии (4%  $O_2$ ) происходит снижение фракции оксигемоглобина ( $HbO_2$ ) на 9,3% в группе контроля; на 8,1% и 7,2% в 1 и 2 группах соответственно ( $p < 0,05$ ). Доля дезоксигемоглобина (HHb) при 4%  $O_2$  в атмосфере бокса возрастает во всех группах ( $p < 0,05$ ); различий между группами выявлено не было. Фракция метгемоглобина (MetHb) и в контроле, и в основных группах наблюдения снижается на 1,0–1,5% ( $p < 0,05$ ).

Процесс реоксигенации в группе контроля сопровождается ростом фракции оксигемоглобина на 26,5%, достигая 51,6% (46,2; 58,4) ( $p < 0,05$ ). Также отмечается снижение фракции дезоксигемоглобина на 9,0% ( $p < 0,05$ ) и рост MetHb на 4,7% ( $p < 0,05$ ).

В основных группах наблюдения реоксигенация приводит к приросту фракции  $HbO_2$ . Её увеличение составляет 5,1% ( $p = 0,07$ ) и 12,5% в 1 и 2 группах ( $p < 0,05$ ) соответственно. Фракция MetHb в основных группах при реоксигенации в отличие от контроля не возрастает, а снижается. Так, при моделировании гипоксии/реоксигенации снижение фракции MetHb составляет 2,4%, а при внесении молсидомина — 1,8% ( $p < 0,05$ ). Регистрируется смещение влево максимума поглощения полосы Core при моделировании гипоксии/реоксигенации во всех основных группах наблюдения.

В контрольной группе давление  $O_2$  при 50% десатурации крови (показатель  $p50$ ), суспензии эритроцитов составляет 45,1 (41,8; 36,4) мм рт. ст. В условиях 30-минутной гипоксии (5%  $CO_2$  и 4%  $O_2$ ) установлено снижение показателя  $p50$  до 40,5 (39,3; 41,7) мм рт. ст. в 1-й группе ( $p < 0,05$ ) и

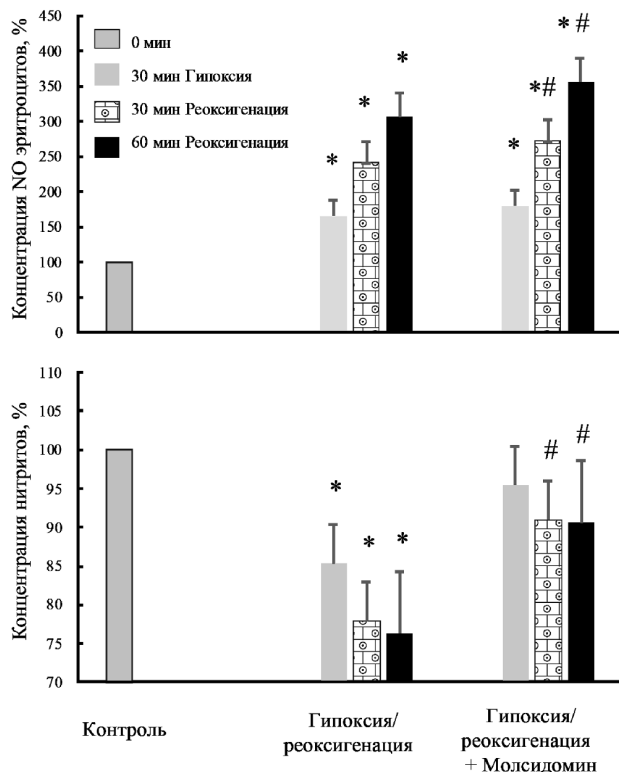


**Рисунок 2.** Значение  $p50$  при гипоксии/реоксигенации и аппликации молсидомина (Me и 75-й процентиль). \* —  $p < 0,05$  по сравнению с исходным уровнем; # —  $p < 0,05$  по сравнению с гипоксией/реоксигенацией.

до 40,4 (39,2; 41,6) мм рт. ст. ( $p < 0,05$ ) при применении молсидомина (3 группа), то есть, при моделировании гипоксии дополнительное применение донора NO не влияет на сродство гемоглобина к кислороду (рис. 2).

Реоксигенация в течение 30 мин сопровождается снижением сродства гемоглобина к кислороду: параметр  $p50$  возрастает до 42,3 (41,0; 43,6) мм рт. ст. во 2 группе и до 43,9 (42,6; 45,2) мм рт. ст. при аппликации молсидомина (3 группа), ( $p < 0,05$ ). Эти же величины  $p50$  сохраняются и при 60-минутной реоксигенации (рис. 2). При этом достоверные различия величины  $p50$  между исходным состоянием и моделированием гипоксии/реоксигенации выявлены только в 3 группе. Применение донора монооксида азота на этапе реоксигенации приводит к снижению сродства гемоглобина с кислородом по сравнению с 3 группой ( $p < 0,05$ ).

Концентрация NO эритроцитов, измеренная по интенсивности флуоресценции DAF-FM DA (RFU\_DAF), при моделировании гипоксии в первой группе вырастает (рис. 3) на 15,7%, ( $p<0,05$ ), динамика роста при реоксигенации сохраняется, и на 60-й минуте прирост концентрации NO в эритроцитах составляет 106,4% ( $p<0,05$ ).



**Рисунок 3.** Динамика изменения концентрации NO в эритроцитах и нитритов внеклеточной жидкости при гипоксии/реоксигенации и аппликации молсидомина (Me и 75-й процентиль). \* –  $p<0,05$  по сравнению с исходным уровнем; # –  $p<0,05$  по сравнению с гипоксией/реоксигенацией.

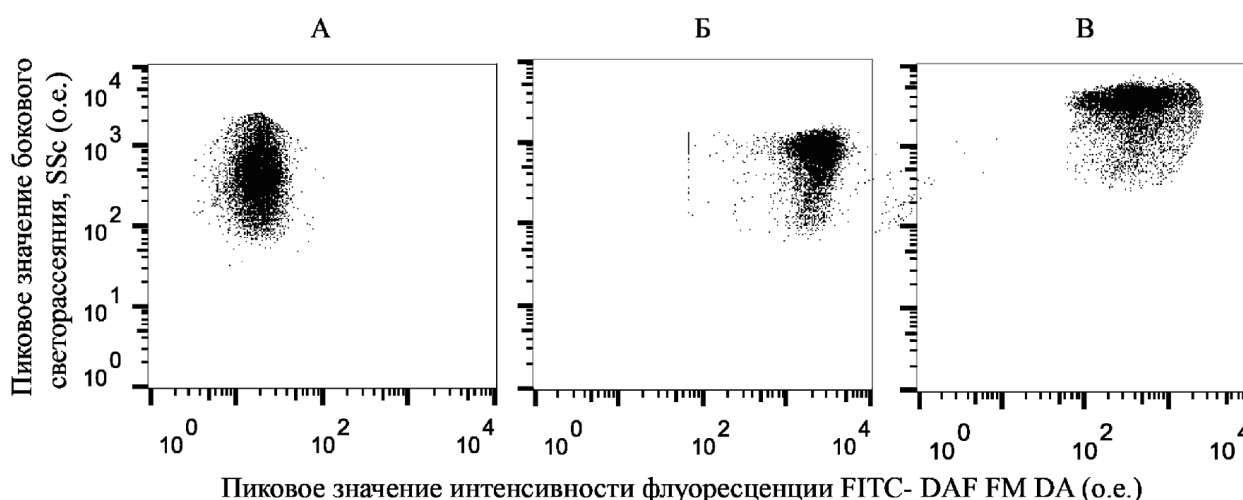
Применение молсидомина сопровождается более высоким ростом концентрации NO. В частности, при гипоксии (3 группа) прирост NO составил 29,1% ( $p<0,05$ ), а при реоксигенации (4 группа) — 155,5% ( $p<0,05$ ).

Анализ концентрации нитритов в пробах показывает, что моделирование гипоксии/реоксигенации приводит к снижению их концентрации (рис. 3). Так, при гипоксии концентрация нитритов во внеклеточной жидкости снижается на 15,3% ( $p<0,05$ ), а при реоксигенации — на 22,5% ( $p<0,05$ ).

При гипоксии/реоксигенации на фоне аппликации молсидомина снижение концентрации нитритов не выявлено; различия были обнаружены только между 2 и 4 группами на этапе реоксигенации ( $p<0,05$ ). Это позволяет предположить, что процесс адаптации эритроцитов к гипоксии заключается в повышении внутриэритроцитарного уровня NO, а основным механизмом его роста являются нитритредуктазные реакции с участием нитритов плазмы. В случае наличия экзогенных источников NO, он, вероятно, включается в механизмы адаптации эритроцитов к гипоксии без участия нитритредуктазного механизма, поскольку потребление нитритов не выявляется.

Проведение корреляционного анализа показывает, что между концентрацией NO в эритроцитах и нитритов внеклеточной жидкости существует отрицательная корреляционная связь ( $r=-0,71$ ,  $p<0,05$ ).

Согласно нашим данным, концентрация NO в субпопуляции эритроцитов (нормоцитах) при моделировании гипоксии/реоксигенации повышается, при этом молсидомин не оказывает дополнительного влияния на рост NO (рис. 4) в эритроцитах. Можно предположить наличие внутриэритроцитарных гомеостатических механизмов поддержания концентрации монооксида азота и его производных в норме и при гипоксии.



**Рисунок 4.** Скатерограмма дифрактометрических параметров и содержания NO эритроцитов при гипоксии/реоксигенации и аппликации молсидомина. А (Контроль) – Медиана SSC = 323,4 (308,2; 339,1); Медиана DAF-FM DA = 134,2 (120,2; 147,4); Б (Гипоксия/реоксигенация) – Медиана SSC = 400,2 (368,9; 531,1); Медиана DAF-FM DA = 512,6 (460,8; 563,2)\*; В (Гипоксия/реоксигенация + Молсидомин) – Медиана SSC = 687,7 (641,3; 719,5)\*#; Медиана DAF-FM DA = 491,0 (431,9; 550,8)\*. \* –  $p<0,05$  по сравнению с исходным уровнем; # –  $p<0,05$  по сравнению с гипоксией/реоксигенацией.

Оценка структурно-функциональных параметров эритроцитов показывает, что внесение молсидомина приводит к росту бокового светорассеяния (SSC) нормоцитов (ось Y на графике), которое превышает как контрольные значения, так и величину, зафиксированную во 2 группе. Следует обратить внимание на высокую неоднородность значения величины SSC в 4 группе. При этом, роста неоднородности эритроцитов по внутриклеточной концентрации NO (ось X) не выявлено. Адаптационные реакции эритроцитов при моделировании гипоксии/реоксигенации состоят в изменении размеров и денситометрических свойств эритроцитов (таблица). Установлено, что применение донора NO приводит к росту среднего объема эритроцита в сочетании с ростом анизцитоза, увеличению площади клеточной поверхности.

В группе без использования молсидомина на фоне гипоксии/реоксигенации (2 группа) отмечается снижение площади поверхности эритроцитов, уменьшение объема и увеличение однородности клеточной популяции как по сравнению с 4 группой, так и с контролем.

Изучению адаптационных реакций на гипоксию посвящён ряд исследований. Наиболее частой системной реакцией на гипоксию является вазодилатация, которая обеспечивает достижения соответствия кровотока и доставки кислорода тканям с использованием механизма обратной связи, в котором целевыми параметрами являются  $O_2$  или pH [6]. У млекопитающих вазодилатация возникает при снижении сатурации гемоглобина с 60% до 40% при парциальном давлении кислорода в пределах 40–20 мм рт. ст. [7].

В литературе есть данные об участии эритроцитов в системных механизмах регуляции кровотока к кислороду [17, 18]. При этом гемоглобин является сенсором кислорода, а его эффекторная функция состоит в аллостерическом структурном переходе оксигенированной (R-состояние) конформации гемоглобина в деоксигенированную (T-состояние) [19]. Не менее обосновано участие NO в системной адаптации к гипоксии [2–4, 8–10, 20–23]. В частности, дезоксигенация гемоглобина приводит к высвобождению NO из эритроцита и последующей NO-зависимой вазодилатации, однако предполагаемые механизмы принципиально различны.

Первый предполагаемый механизм заключается в том, что S-нитрозированный гемоглобин (SNO-Hb) высвобождает S-нитрозотиолы во время дезоксигенации с последующим образованием NO и расширением сосудов [2, 3, 11, 24, 25]. Гемоглобин, представляя собой аллостерически регулируемую нитритредуктазу, восстанавливает нитрит до NO с помощью дезоксиформы Hb по мере его дезоксигенации [4], — второй возможный механизм реакции на гипоксию. В нашей работе было показано [16], что при применении 7%  $O_2$  в модельной смеси происходил равномерный рост (в 4 раза) концентрации NO в эритроцитах на протяжении всего периода наблюдения. Минимальная (менее 2%) концентрация кислорода в экспериментальной газовой смеси также приводит к росту NO, но нарастание концентрации ниже, чем при других экспериментальных условиях. Реоксигенация в течение 30 мин сопровождается резким приростом концентрации монооксида азота, причём 30-минутная инкубация после острой гипоксии привела к большему приросту NO, чем 90-минутная экспозиция крови к 7% кислороду.

Как следует из приведённых выше данных, рост концентрации монооксида азота при гипоксии можно рассматривать как адаптивную реакцию, при которой рост NO и его производных в эритроцитах в этих условиях может менять кривую диссоциации оксигемоглобина, снижая сродство гемоглобина к кислороду [19]. Подтверждением этого феномена является рост тканевого  $pO_2$  после использования нитроглицерина в модели *in vivo* [20]. Кроме того, гипоксия, запуская механизмы клеточного стресса, активирует синтазу оксида азота (NOS) эритроцитов, что приводит к высвобождению NO и вазодилатации сосудов. В совокупности это подтверждает важную роль L-аргинин-NO-системы эритроцитов в регуляции местного кровотока при гипоксических состояниях.

Рост внутриклеточной концентрации NO при моделировании гипоксии *in vitro* сопровождается снижением нитритов внеклеточной жидкости. В то же время, применение молсидомина на фоне роста NO эритроцитов не приводит к изменению концентрации нитритов. Возможным объяснением этого феномена является экзогенный NO, образующийся при внесении молсидомина, то есть для адаптации эритроцитов к гипоксии

**Таблица.** Оптико-морфометрические характеристики эритроцитов при гипоксии/реоксигенации и аппликации молсидомина (Me (25, 75))

Параметр	Контроль	Гипоксия/реоксигенация	Гипоксия/реоксигенация + Молсидомин
Площадь поверхности, $\mu m^2$	141,1 [126,9; 155,1]	120,0 [108,1; 132,1]*	151,2 [135,9; 166,1]#
Средний объем эритроцита, фл	92,1 [82,9; 101,3]	84,1 [75,6; 92,4]*	113,1 [101,7; 124,3]*.#
Распределение эритроцитов по объёму, %	12,1 [10,9; 13,3]	11,3 [10,2; 12,4]*	21,0 [18,9; 23,1]*.#

Примечание: \* – достоверные изменения в сравнении с контролем,  $p < 0,05$ , # – в сравнении с гипоксией/реоксигенацией,  $p < 0,05$ .

необходим NO, а его источник может иметь как эндо-, так и экзогенное происхождение. Рассматривая роль NO-синтазы (eNOS) эритроцитов в качестве такого источника монооксида азота, важно отметить, что этот фермент осуществляет окисление L-аргинина до NO [23], зависимое в условиях гипоксии от парциального давления кислорода.

Возможной причиной роста неоднородности величины SSC при аппликации молсидомина является изменение конформации и плотности упаковки цитоплазматического и, что более вероятно, гемоглобина мембраны эритроцита. Ранее нами было показано [16], что гипоксия приводит к конформационным изменениям гемопорфирина, вызывающим рост плотности упаковки гемоглобина в эритроците.

Таким образом, в ходе проведённого экспериментального исследования выявлено участие L-аргинин-NO-системы эритроцитов в адаптации к гипоксии/реоксигенации. Полученные данные и проведённая оценка влияния газотрансмиттера монооксида азота на структурно-функциональную организацию эритроцитов в условиях гипоксии/реоксигенации позволяет утверждать, что рост внутриклеточной концентрации монооксида азота в условиях гипоксии обеспечивается за счёт нитритов внеклеточной жидкости. Процесс адаптации к гипоксии/реоксигенации включает в себя изменение сродства гемоглобина к кислороду на фоне роста анизоцитоза, увеличения объёма и площади поверхности эритроцитов.

## ВЫВОДЫ

Моделирование гипоксии характеризуется повышением сродства гемоглобина к кислороду, реоксигенация — его уменьшением. Применение донора NO в этих условиях не меняет сродство гемоглобина к кислороду, что свидетельствует об истощении данного адаптационного механизма.

Рост внутриклеточной концентрации монооксида азота в условиях гипоксии/реоксигенации обеспечивается за счёт нитритов внеклеточной жидкости: что подтверждается отрицательными корреляционными связями между этими параметрами. Применение молсидомина на фоне гипоксии/реоксигенации сопровождается более высоким приростом NO без включения нитритредуктазного механизма.

Адаптационные реакции эритроцитов при моделировании гипоксии/реоксигенации проявляются в изменении размеров и денситометрических свойств эритроцитов. Применение донора NO приводит к росту среднего объёма эритроцита, анизоцитозу, увеличению площади клеточной поверхности.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Финансирование работы осуществлялось за счёт программы ГПНИ 4 “Трансляционная медицина”, Подпрограмма 4.1 “Экспериментальная медицина”.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено комитетом по этике УЗ “Национальная антидопинговая лаборатория”, протокол заседания комитета № 065/19 от 27.12.2019 г.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Shephard R.J.* (1973) Physical activity and metabolism. The role of exercise biochemistry in sports medicine. *J. Sports Medicine Physical Fitness*, **13**(1), 45-53.
2. *Galkin A., Higgs A., Moncada S.* (2007) Nitric oxide and hypoxia. *Essays Biochem.*, **43**, 29-42.
3. *Allen B.W., Stamler J.S., Piantadosi C.A.* (2009) Hemoglobin, nitric oxide and molecular mechanisms of hypoxic vasodilation. *Trends Mol. Med.*, **15**(10), 452-460. DOI: 10.1016/j.molmed.2009.08.002
4. *Zhao Y., Wang X., Noviana M., Hou M.* (2018) Nitric oxide in red blood cell adaptation to hypoxia. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, **50**(7), 621-634.
5. *Stamler J.S., Jia L., Eu J.P., McMahon T.J., Demchenko I.T., Bonaventura J., Gernert K., Piantadosi C.A.* (1997) Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science*, **276**(5321), 2034-2037. DOI: 10.1126/science.276.5321.2034
6. *Tune J.D., Gorman M.W., Feigl E.O.* (2004) Matching coronary blood flow to myocardial oxygen consumption. *J. Appl. Physiol.*, **97**(1), 404-415. DOI: 10.1152/japplphysiol.01345.2003
7. *Tsai A.G., Johnson P.C., Intaglietta M.* (2003) Oxygen gradients in the microcirculation. *Physiol. Rev.*, **83**(3), 933-963. DOI: 10.1152/physrev.00034.2002
8. *González-Alonso J., Olsen D.B., Saltin B.* (2002) Erythrocyte and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery: Role of circulating ATP. *Circulation Res.*, **91**(11), 1046-1055. DOI: 10.1161/01.RES.0000044939.73286.E2
9. *Huang Z.* (2005) Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. *J. Clin. Invest.*, **115**(8), 2099-2107. DOI: 10.1172/JCI24650
10. *Gladwin M.T., Crawford J.H., Patel R.P.* (2004) The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: Role in blood flow regulation. *Free Rad. Biol. Med.*, **36**(6), 707-717. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.032
11. *Darius H., Ahland B., Rücker W., Klaus W., Peskar B.A., Schrör K.* (1984) The effects of molsidomine and its metabolite SIN-1 on coronary vessel tone, platelet aggregation, and eicosanoid formation *in vitro* – inhibition of 12-HPETE biosynthesis. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **6**(1), 115-121.
12. *Starodubtseva M.N., Tattersall A.L., Kuznetsova T.G., Yegorenkov N.I., Ellory J.C.* (2008) Structural and functional changes in the membrane and membrane skeleton of red blood cells induced by peroxynitrite. *Bioelectrochemistry (Amsterdam)*, **73**(2), 155-162. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2008.01.008
13. *Kita Y., Hirasawa Y., Maeda K., Nishio M., Yoshida K.* (1994) Spontaneous nitric oxide release accounts for the potent pharmacological actions of FK409. *Eur. J. Pharmacol.*, **257**(1-2), 123-130. DOI: 10.1016/0014-2999(94)90703-X

14. Doyle M.P., Pickering R.A., deWeert T.M., Hoekstra J.W., Pater D. (1981) Kinetics and mechanism of the oxidation of human deoxyhemoglobin by nitrites. *J. Biol. Chem.*, **256**(23), 12393-12398.
15. Severinghaus J.W. (1966) Blood gas calculator. *J. Appl. Physiol.*, **21**(3), 1108-1116. DOI: 10.1152/jappl.1966.21.3.1108
16. Akulich N.V., Zinchuk V.V. (2022) Role of the L-Arginine/NO system in red blood cells at different values of oxygen partial pressure. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **58**(2), 548-557. DOI: 10.1134/S0022093022020223
17. Ullrich T., Oberle S., Abate A., Schröder H. (1997) Photoactivation of the nitric oxide donor SIN-1. *FEBS Lett.*, **406**(1-2), 66-68. DOI: 10.1016/S0014-5793(97)00239-1
18. Liu X., Miller M.J., Joshi M.S., Sadowska-Krowicka H., Clark D.A., Lancaster J.R. (1998) Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, **273**(30), 18709-18713. DOI: 10.1074/jbc.273.30.18709
19. Hanson E.K., Ballantyne J. (2010) A blue spectral shift of the hemoglobin soret band correlates with the age (time since deposition) of dried bloodstains. *PLoS One*, **5**(9), e12830. DOI: 10.1371/journal.pone.0012830
20. Marković S., Ognjanović B., Štajn A., Žikić R., Saičić Z., Radojičić R., Spasić M.B. (2006) The effects of nitroglycerine on the redox status of rat erythrocytes and reticulocytes. *Physiol. Res.*, **55**(4), 389-396. DOI: 10.33549/physiolres.930801
21. d'Alessandro A., Xia Y. (2020) Erythrocyte adaptive metabolic reprogramming under physiological and pathological hypoxia. *Curr. Opin. Hematol.*, **27**(3), 155-162.
22. Rogers S.C., Said A., Corcuera D., McLaughlin D., Kell P., Doctor A. (2009) Hypoxia limits antioxidant capacity in red blood cells by altering glycolytic pathway dominance. *FASEB J.*, **23**(9), 3159-3170. DOI: 10.1096/fj.09-130666
23. Zhuge Z., Haworth S., Nihlén C., Carvalho L.R.R.A., Heuser S.K., Kleschyov A.L., Nasieff J., Cortese-Krott M.M., Weitzberg E., Lundberg J.O., Carlström M. (2023) Red blood cells from endothelial nitric oxide synthase-deficient mice induce vascular dysfunction involving oxidative stress and endothelial arginase I. *Redox Biology*, **60**, 102612. DOI: 10.1016/j.redox.2023.102612
24. Ellsworth M.L., Forrester T., Ellis C.G., Dietrich H.H. (1995) The erythrocyte as a regulator of vascular tone. *Am. J. Physiol.*, **269**(6 Pt 2), H2155-H2161. DOI: 10.1152/ajpheart.1995.269.6.H2155
25. Han T.H., Qamirani E., Nelson A.G., Hyduke D.R., Chaudhuri G., Kuo L., Liao J.C. (2003) Regulation of nitric oxide consumption by hypoxic red blood cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **100**(21), 12504-12509. DOI: 10.1073/pnas.2133409100

Поступила в редакцию: 28. 07. 2023.  
 После доработки: 14. 09. 2023.  
 Принята к печати: 14. 09. 2023.

## CONTRIBUTION OF THE GASOTRANSMITTER NITRIC OXIDE TO THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ORGANIZATION OF ERYTHROCYTES UNDER CONDITIONS OF HYPOXIA/REOXYGENATION

N.V. Akulich<sup>1\*</sup>, V.V. Zinchuk<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Anti-Doping Laboratory,

31 Lyasny, Minsk Region, 223040 Belarus; \*e-mail: akulichn@gmail.com

<sup>2</sup>Grodno State Medical University, 89 Gorky str., Grodno, 230009 Belarus

Hypoxia is accompanied by changes in metabolism and cell functioning. Erythrocyte hemoglobin can be involved in adaptation to hypoxia by acting as an oxygen sensor, providing a link between oxygen content and blood circulation. The mechanisms providing this function have not been completely established. The purpose of this study was to evaluate the effect of the gasotransmitter nitric oxide on the structural and functional organization of erythrocytes under conditions of hypoxia/reoxygenation. NO participated in adaptive reactions under hypoxia/reoxygenation conditions by changing hemoglobin conformation, followed by changes in hemoprotein spectral characteristics and hemoglobin affinity to oxygen together with increasing anisocytosis, volume and cell surface. The increase in intracellular NO concentrations under hypoxic conditions was provided by extracellular fluid nitrites. Molsidomine (a NO donor) induced a higher NO increase without involvement of the nitrite reductase mechanism, it caused an increase in the average erythrocyte volume, anisocytosis, and an increase in the cell surface.

*The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.*

**Key words:** erythrocytes; hypoxia/reoxygenation; nitric oxide; flow cytometry; spectroscopy; molsidomine

**Funding.** This work was performed within the State Program of Scientific Research 4 “Translational Medicine”, subprogram 4.1 “Experimental Medicine”.

Received: 28.07.2023; revised: 14.09.2023; accepted: 14.09.2023.