

УДК 612.111+615.224.03

*Н.В. Акулич, В.В. Зинчук, В.Э. Сяхович<sup>1</sup>*

**ОЦЕНКА ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ МОНООКСИДА АЗОТА В ЭРИТРОЦИТАХ И РЕТИКУЛОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ**

**Аннотация.** В статье методом проточной цитофлуориметрии проведен анализ содержания монооксида азота в эритроцитах и ретикулоцитах периферической крови. Выявлены различия между эритроцитами и ретикулоцитами свежей крови в содержании NO.

**Ключевые слова:** монооксид азота, эритроциты, ретикулоциты, DAF-FM.

*N.V. Akulich, V.V. Zinchuk, V.E. Syakhovich*

**ESTIMATION OF THE INTRACELLULAR CONTENT OF NITROGEN MONOXIDE IN ERYTHROCYTES AND RETHYTHROCYTES OF PERIPHERAL BLOOD**

**Abstract.** The article analyzes the content of nitrogen monoxide in erythrocytes and reticulocytes of peripheral blood by the method of flow cytometry. Differences in the content of NO between erythrocytes and reticulocytes of fresh blood were found.

**Key words:** nitrogen monoxide, erythrocytes, reticulocytes, DAF-FM.

**Введение.** Монооксид азота – одна из ключевых сигнальных молекул, которая продуцируется различными типами клеток, являясь предметом изучения не только физиологии, но и патофизиологии [1]. Активность монооксида азота определяется скоростью его образования, локальной концентрацией, биологическими мишенями и их близостью к источнику NO [2]. Общеизвестно, что эритроциты периферической крови – терминально дифференцированные клетки, а их непосредственными предшественниками являются ретикулоциты. Ретикулоциты костного мозга, не покидая его пределов, в течение 70-120 часов продолжают синтезировать

гемоглобин. Затем они поступают в периферическое русло, где через 3 суток утрачивают базофильную сетчатую субстанцию и превращаются в зрелые клетки эритроидного ряда – эритроциты. Главными отличительными признаками ретикулоцитов периферической крови являются остатки РНК в цитоплазме и рецепторы трансферрина на цитоплазматической мембране, что отличает их от красных кровяных телец. Полный цикл эритропоэза у взрослого человека происходит в красном костном мозге, который отличается сложной структурной, включающей гранулопоэтические локусы, эритробластные островки и лимфоцитарные узелки. Важным фактором, определяющим пролиферацию и дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников, является напряжение кислорода ( $pO_2$ ) [3]. По мнению [4], для покоящихся клеток ниш костного мозга характерно низкое давление кислорода, что подтверждается уровнем экспрессии HIF-1. В экспериментах *in vivo* на мышах показано, что, несмотря на очень высокую плотность сосудов, среднее значение  $pO_2$  костного мозга составляет 22 мм рт. ст., что ниже чем нормальное значение  $pO_2$  для венозной крови этого вида животных [4].

Основным гормоном, участвующим в регуляции эритропоэза является эритропоэтин (ЭПО), представляющий собой гликопротеин, состоящий из 166 аминокислот с N- и O-гликановыми фрагментами. Известно, что нормальный диапазон концентраций ЭПО в сыворотке относительно низок (4-26 мЕд/мл), и в физиологических условиях линейное снижение гематокрита приводит к экспоненциальному увеличению его концентрации в сыворотке. Основной точкой приложения ЭПО является ЭПО-рецептор клеток эритроцитарного ростка, через который эритропоэтин защищает клетки от апоптоза [1]. Эритропоэтин, циркулирующий в крови, оказывает влияние и на эритроциты и ретикулоциты периферической крови, модулируя сродство гемоглобина к кислороду [2]. Поскольку, монооксид азота эритроцитов и ретикулоцитов является одним из модуляторов сродства гемоглобина к кислороду, то целью исследования является сравнительная оценка содержания NO в эритроцитах и ретикулоцитах в свежееотобранной и хранящейся крови.

### Методика

Забор крови производился у добровольцев мужского пола 41-45 лет, антикоагулянт – ЭДТА К<sub>2</sub>. Аликвоты эритроцитов и ретикулоцитов для анализа получали путем внесения цельной крови в буферный раствор до конечной концентрации  $5 \times 10^6$  клеток в 100 мкл. Из каждой аликвоты отбирали объем приготовленной суспензии эритроцитов и ретикулоцитов, и дважды отмывали буферным раствором для удаления плазмы. Количество клеток в исследуемом образце измеряли на автоматическом гематологическом анализаторе Sysmex XT2000i (Sysmex Corporation, Япония). В процессе отмывки эритроциты и ретикулоциты осаждали центрифугированием в течение 4-х минут при 400 g. Для хранения крови в анаэробных условиях при температуре 5°C использовался консервант глюгигир, пробы крови анализировались спустя 7 дней. Пробы крови окрашивались моноклональными антителами к CD 45 (панлейкоцитарный антиген), конъюгированным с хлорангидрид сульфородамино, полиметином и диацетильным производным 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлуоресцеина (DAF-FM DA) (Molecular Probes) для выявления внутриклеточного NO. Определяли интенсивность флуоресценции DAF-FM на цитофлуориметре FACS ARIA (BD Bioscience, США). Для пробоподготовки использовали фосфатный буфер FACS Flow (BD Bioscience, США). Для статистического анализа использовались непараметрические методы. Изменения считались значимыми при  $p < 0.05$ .

### Результаты и обсуждение

Анализ внутриклеточного содержания монооксида азота был начат с корректного выделения клеток, являющихся предметом исследования. Для этого использовали последовательное «логическое гейтирование» с применением CD 45 и полиметина. Эритроциты и ретикулоциты не имели флуоресценции хлорангидрид сульфородамина. Дальний ход анализа представлен на рисунке 1. В верхней части рисунка содержится регион, обозначенный Leuk, который характеризуется наличием ДНК/РНК в цитоплазме (окрашиваются полиметином) клеток и содержанием панлейкоцитарного рецептора CD 45 на мембране, а эритроциты (RBC) и ретикулоциты (Ret) такого рецептора не имеют. В свою очередь ретикулоциты содержат остатки РНК и окрашиваются полиметином. Красные кровяные

тельца расположены на той области графика, где находятся клетки, не окрашенные ни одним из красителей. На нижней части рисунка представлен пример гистограммы распределения клеток с использованием логарифмической шкалы и статистические данные, касающиеся средней интенсивности (M) и среднеквадратического отклонения (SD) флуоресценции DAF-FM. Этот краситель позволяет оценивать только внутриклеточный NO, поскольку его флуоресцентная форма образуется под действием внутриклеточных эстераз.

Диаграмма распределения клеток периферической крови по внутриклеточному содержанию ДНК/РНК (ось Y) и наличию рецепторов лейкоцитов (ось X)

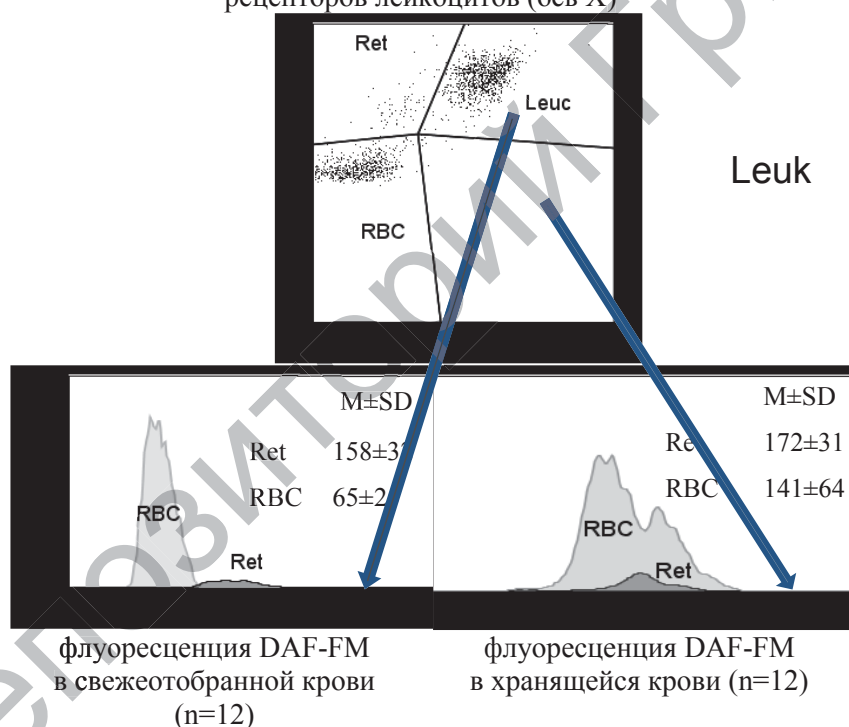


Рис. 1. Тактика гейтирования ретикулоцитов и эритроцитов

Абсолютное количество ретикулоцитов на протяжении всего периода наблюдения практически не изменялось, а количество ретикулоцитов с низким уровнем флуоресценции, которые являются

зрелыми формами эритроцитарных предшественников, нарастало. Уровень внутриклеточного монооксида азота в эритроцитах свежесобранной крови был значительно ниже и составил  $65 \pm 25$  относительных единиц средней интенсивности флуоресценции (MFI).

При хранении крови различия в MFI DAF-FM между ретикулоцитами и эритроцитами практически нивелировались, а ее уровень составил 172 и 141 относительных единиц DAF-FM, соответственно. Обращает на себя внимание как значение среднеквадратического отклонения (SD) флуоресценции DAF-FM эритроцитов (64 единицы MFI), так и появление второго пика на гистограмме распределения эритроцитов. Это свидетельствует об увеличении гетерогенности эритроцитов по содержанию монооксида азота, причем доля клеток с высокими значениями этого параметра при хранении крови увеличивается, что и является причиной появления второго пика. Важно отметить, что в популяции ретикулоцитов таких изменений зарегистрировано не было. Отличия в содержании монооксида азота между эритроцитами и их предшественниками свежесобранной крови, на наш взгляд, связано с различным парциальным давлением кислорода в зоне эритропоза и периферическими венами, меньшим временем их пребывания в кровеносном русле после выхода из костного мозга, причем юные формы ретикулоцитов характеризуются меньшими значениями флуоресценции DAF-FM.

Таким образом, в ходе проведенного исследования проанализирован уровень монооксида азота в эритроцитах и ретикулоцитах периферической крови. Установлено, что между эритроцитами и ретикулоцитами свежей крови существуют различия в содержании NO, которые нивелируются по мере ее хранения.

#### **Библиографический список**

1. Зинчук В.В., Степура Т.Л.. Коррекция кислородтранспортной функции крови при патологии сердечно-сосудистой системы: монография / (под ред. В.В. Зинчука). – Гродно: ГрГМУ, 2016. – 176.
2. Зинчук В.В., Степура Т.Л.. NO-зависимые механизмы внутриэритроцитарной регуляции сродства гемоглобина к кислороду: монография / (под ред. В.В. Зинчука). – Гродно: ГрГМУ, 2016. – 176.

3. Chow D. C. et al. Modeling pO<sub>2</sub> Distributions in the Bone Marrow Hematopoietic Compartment. I. Krogh's Mode. Biophysical Journal. – 2001. – Vol. – 81. – P. 675-684.

4. Spencer J. A. et al. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. Nature. – 2014. – Vol. 508. – P. 269-273.

УДК 616.12 – 008.313 – 06 – 074

*Т.И. Балабанович, В.И. Шишко<sup>2</sup>*

**РОЛЬ ГИПОКСИЕЙ ИНДУЦИРУЕМОГО ФАКТОР-1 $\alpha$   
В ПРОГНОЗИРОВАНИИ РЕЦИДИВА ФИБРИЛЛЯЦИИ  
ПРЕДСЕРДИЙ**

**Аннотация.** Изучен диагностический потенциал HIF-1 $\alpha$  как прогностического биомаркера рецидива фибрилляции предсердий в однолетний период наблюдения после успешно выполненной электрической кардиоверсии у пациентов с персистирующей формой фибрилляции предсердий на фоне ишемической болезни сердца и/или артериальной гипертензии, ассоциированной с синдромом обструктивного апноэ/гипопноэ сна.

**Ключевые слова:** фибрилляция предсердий, синдром обструктивного апноэ/гипопноэ сна, гипоксия, HIF-1 $\alpha$ , кардиоверсия.

*T. I. Balabanovich, V. I. Shishko*

**THE ROLE OF HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR -1 $\alpha$  IN PREDICTION OF ATRIAL FIBRILLATION RECURRENCE**

**Abstract.** In this article has been studied the prediction role of HIF-1 $\alpha$  in the development of atrial fibrillation (AF) recurrence after successful electrical cardioversion in one-year follow-up period in persistent AF patients with ischemic heart disease and/or arterial hypertension, suffering from obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome.