

8. Sprague R.S., Ellsworth M.L. Erythrocyte-derived ATP and perfusion distribution: role of intracellular and intercellular communication // *Microcirculation*. 2012. V.19, № 5. 430–439.

9. Adderley S.P. Sprague R.S., Stephenson A.H. Regulation of cAMP by phosphodiesterases in erythrocytes. *Pharmacol. Rep.* 2010. V. 62. 475-482.

10. Wang L., Olivecrona G., Gotberg M. ADP acting on P<sub>2</sub>Y<sub>13</sub> receptors is a negative feedback pathway for ATP release from human red blood cells // *Circ. Res.* 2005. V. 96. 189–196.

11. Ellis C.G., Milkovich S., Goldman D. What is the efficiency of ATP signaling from erythrocytes to regulate distribution of O<sub>2</sub> supply within the microvasculature? // *Microcirculation*. 2012. V. 19. 440–450.

12. Hamlin S.K., Benedik P.S. Basic concepts of hemorheology in microvascular hemodynamics. *Crit. Care Nurs. Clin. North Am.* 2014. Vol. 26, № 3. P. 337–344.

13. Bor-Kucukatay M., Wenby B., Meiselman H.J., Baskurt O.K. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003. V. 284(5). 1577–1584.

14. Kleinbongard P., Schulz R., Rassaf T., et al. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase // *Blood*. 2006. V.107. 2943-2951.

УДК. 612.1;591.11;577.353

*А.В. Муравьев, И.А. Тихомирова, Е.П. Петроченко, С.В. Булаева, Е.Л. Волкова, А.В.Замышляев*

### **КОРРЕКЦИЯ МИКРОРЕОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭРИТРОЦИТОВ ДОНОРАМИ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ**

**Аннотация.** Стимулирование клеток с помощью  $\alpha$ -1-агониста, фенилэфрина (ФЭ) широко применяется в экспериментальной практике. Поскольку основной механизм действия ФЭ на клетки связан с открытием Ca<sup>2+</sup> каналов мембран, в том числе и эритроцитов, то целью данной работы было исследование, на модели микрореологических ответов эритроцитов на ФЭ, возможности коррекции их микрореологии с помощью газотрансмиттеров (ГТ) - оксид азота (NO) и сульфид водорода (H<sub>2</sub>S).

---

© А.В. Муравьев, И.А. Тихомирова, Е.П. Петроченко, С.В. Булаева, Е.Л. Волкова, А.В.Замышляев, 2022

Для решения этой задачи отмытые эритроциты инкубировали с ФЭ (1,0 мкМ), донором NO, нитропруссидом натрия (НПН, 100 мкМ), донором H<sub>2</sub>S (NaHS, 100 мкМ) и с их комбинациями: «ФЭ+НПН» и «ФЭ+ NaHS». После инкубации регистрировали деформируемость эритроцитов (ДЭ) и их агрегацию (ПАЭ). Результаты исследования показали, что ФЭ умеренно снижал ДЭ, на 4-5% (p<0,05) и выражено повышал ПАЭ (на 63-91%, p<0,01). Опыты подтвердили, что оба донора ГТ положительно влияют на микрореологию эритроцитов, повышая их деформируемость, и выражено снижая их агрегацию. При сочетании «ФЭ+НПН» или «ФЭ+ NaHS» наблюдалось полное восстановление оптимальных величин микрореологических характеристик эритроцитов.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности коррекции негативных микрореологических сдвигов с помощью доноров ГТ. Основным механизмом положительного влияния NO и H<sub>2</sub>S является их способность стимулировать активность гуанилатциклазы, что в свою очередь ингибирует вход Ca<sup>2+</sup> в клетки. **Ключевые слова:** эритроциты, микрореология, фенилэфрин, газотрансмиттеры, оксид азота, сульфид водорода

*A.V. Muravyov, I.A. Tikhomirova, E.P. Petrochenko, S.V. Bulaeva, E.L. Volkova, A.V. Zamyshlyayev*

## **CORRECTION OF MICRORHEOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ERYTHROCYTES BY GASOTRANSMITTER DONORS**

**Abstract.** Cell stimulation with the  $\alpha$ -1-agonist phenylephrine (PE) is widely used in experimental practice. Since the main mechanism of action of PE on cells is associated with the opening of Ca<sup>2+</sup> channels of membranes, including erythrocytes, the purpose of this work was to study, on the model of microrheological responses of erythrocytes to PE, the possibility of correcting their microrheology using gasotransmitters (GT) - nitric oxide (NO) and hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S). To solve this problem, washed erythrocytes were incubated with PE (1.0  $\mu$ M), NO donor, sodium nitroprusside (SNP, 100  $\mu$ M), H<sub>2</sub>S donor (NaHS, 100  $\mu$ M) and with their combinations: "PE+SNP" and "PE+ NaHS". After incubation, the erythrocyte deformability (DE) and their aggregation (AE) were recorded. The results of the study showed that PE moderately reduced DE by 4-5% (p<0.05) and significantly increased AE (by 63-91%, p<0.01). Experiments have confirmed that both GT donors have a positive effect on

the erythrocyte microrheology, increasing their deformability and significantly reducing aggregation. With the combination of "PE + SPN" or "PE + NaHS", a complete recovery of the optimal values of the erythrocyte microrheological characteristics was observed. Taken together, the obtained data indicate the possibility of correcting negative microrheological changes with the help of GT donors. The main mechanism of the positive effect of NO and H<sub>2</sub>S is their ability to stimulate the activity of guanylate cyclase in erythrocyte, which in turn inhibits the entry of Ca<sup>2+</sup> into cells.

**Keywords:** erythrocytes, microrheology, phenylephrine, gasotransmitters, nitric oxide, hydrogen sulfide

### **Введение**

Гормональное управление метаболизмом включает как регуляцию процессов ассимиляции и накопления вещества и энергии, так и их расход. При этом процессы использования энергии в клетках регулируют катехоламины. Поскольку на зрелых эритроцитах имеются функционально активные α- и β-адренорецепторы [1-3], то можно ожидать регуляторного изменения микрореологических свойств этих клеток при связывании рецепторами соответствующего агониста. Так, например, агонист α-1-адренорецепторов фенилэфрин в концентрации 1,0 μM проявлял выраженный проагрегационный эффект и заметно влиял на деформируемость эритроцитов [4]. С другой стороны известно, что газотрансмиттеры – оксид азота (NO) и сульфид водорода (H<sub>2</sub>S) позитивно влияют микрореологию эритроцитов [5]. Следовательно, инкубация эритроцитов с фенилэфрином с последующим негативным изменением их микрореологического ответа может быть удобной моделью для изучения коррекции этих нарушений с помощью доноров газотрансмиттеров. Сказанное выше и показывает основную цель настоящего исследования.

### **Методика**

Образцы цельной крови (9 мл) получали венопункцией у здоровых доноров (n=24) в вакуумные пробирки (вакутайнеры с EDTA). Исследование было одобрено местным этическим комитетом университета и было получено информированное согласие всех субъектов. Эритроциты отделяли от плазмы центрифугированием (15 мин, 3000 об/мин), трижды отмывали в изотоническом растворе NaCl. Суспензию эритроцитов (в растворе Рингера) делили на несколько

аликвот и клетки инкубировали при 37°C в течение 30 мин с каждым из перечисленных ниже соединений:

- 1) с донором NO – нитропропруссидом натрия (НПН, в концентрациях 100 мкМ);
- 2) с донором H<sub>2</sub>S – гидросульфидом натрия (NaHS, в концентрациях 100 мкМ);
- 3) с агонистом альфа-1-адренорецепторов – фенилэфрином (ФЭ, в концентрации 1,0 мкМ).
- 4) В каждом опыте в качестве контроля использовали суспензию эритроцитов, инкубируемых в растворе Рингера, без добавления указанных выше препаратов.

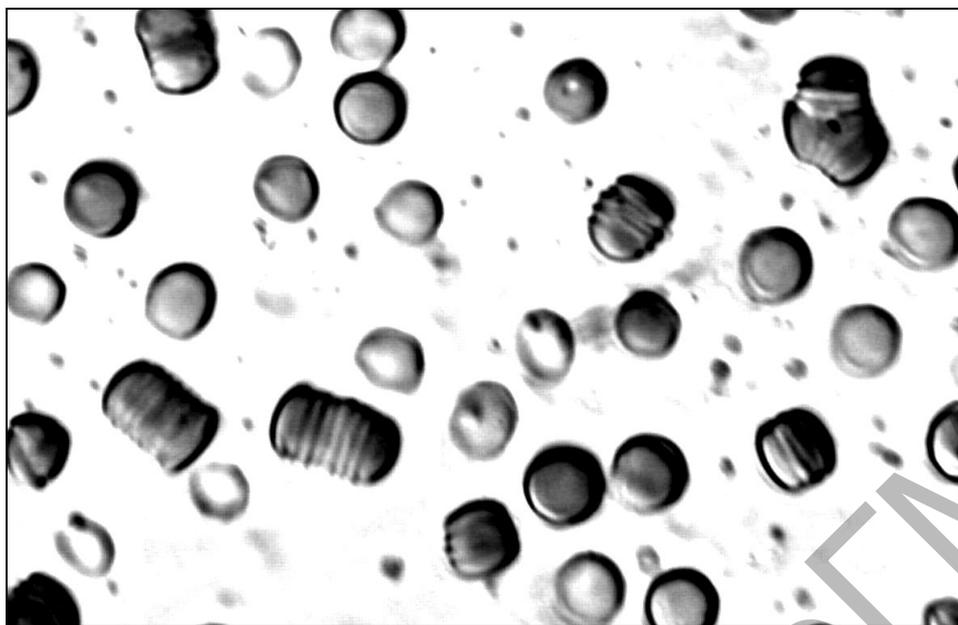
В опытах с исследованием агрегации эритроцитов (ПАЭ), (агрегометр Myrenne M1), для ее стимулирования, добавляли к изотоническому раствору Рингера декстран-200 (10% ХАЕС-стерил, Fresenius Kabi, Германия) в соотношении объемов 7:3. Для оценки деформируемости эритроцитов (ДЭ) определяли индекс их удлинения (ИУЭ) в проточной микрокамере [4]. Регистрировали индекс АЭ и ДЭ после инкубации с препаратами и сравнивали с их с данными контрольных опытов (инкубация эритроцитов без препаратов).

#### *Статистическая обработка*

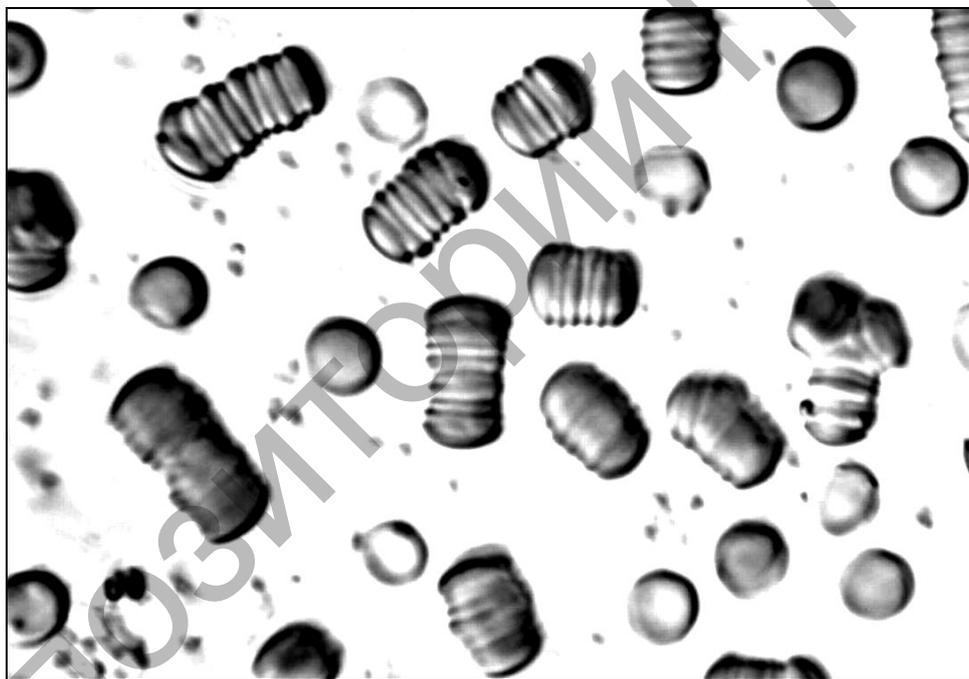
Весь цифровой материал обработан статистически с определением выборочной средней величины (M) и стандартного отклонения (σ). Полученные данные проверяли на соответствие признака закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. С учетом этого была использована непараметрические методы с применением программы “Statistica 10.0”. Достоверность полученных данных, с учетом размеров малой выборки, множественных сравнений, оценивалась с использованием U-критерия Манна-Уитни. При проведении парных сравнений уровней показателей внутри групп при повторных измерениях, использовали критерий Вилкоксона. За уровень статистически значимых принимали изменения при  $p < 0,05$  и  $0,01$ .

#### **Результаты и обсуждение**

Результаты исследования показали, что инкубация эритроцитов с фенилэфрином (ФЭ) выражено повышала агрегацию эритроцитов на 63% (табл. 1). При этом формировались более крупные агрегаты, чем в контрольных пробах (рис. 1).



А



Б

Рис. 1. Различие агрегации эритроцитов в контрольной суспензии (А) эритроцитов (без препаратов) и после инкубации с фенилэфрином (Б).

Тогда как инкубация эритроцитов с ФЭ несколько снизила деформируемость эритроцитов, в среднем на 0,09 отн. ед., что составило 4% ( $p < 0,05$ ). Как видно из данных, приведенных в таблице 1, NaHS, повысил достоверно ИУЭ, на 9% ( $p < 0,01$ ) и существенно снизил ПАЭ, на 38% ( $p < 0,05$ ).

Таблица 1

Изменение микрореологии эритроцитов под влияние инкубации с гидросульфидом натрия (NaHS), фенилэфрином (ФЭ) и их совместным воздействием (ФЭ+NaHS; n= 24, M±σ)

Показатели	Контроль	NaHS (100 мкМ)	Фенилэфрин (ФЭ, 1,0 мкМ)	ФЭ+NaHS
ИУЭ, отн. ед.	2,05±0,04	2,24±0,03**	1,96±0,04*	2,20±0,05**
ПАЭ, отн. ед.	12,65±2,08	7,88±2,16*	20,65±1,19*	7,72±1,38*

**Примечание:** \* – различия по сравнению с показателями контроля достоверны при  $p < 0,05$ ; \*\* при  $p < 0,01$ ; ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов.

Добавление к эритроцитам, инкубированным с ФЭ, донора сульфида водорода практически не только восстановила их деформируемость до уровня контроля, но и существенно превысило его. При этом разница ИУЭ эритроцитов, обработанных ФЭ и сочетанным воздействием «ФЭ+ NaHS» составила 12% и была статистически значимой ( $p < 0,01$ , табл. 1). Такая же картина наблюдалась и в отношении агрегации эритроцитов, которая тоже не только снизилась до уровня контроля, а даже ниже его (табл. 1).

Поскольку газотрансмиттеры NO и H<sub>2</sub>S проявляют сходные эффекты на клетки и реализуют кросс-общение, то важно было проанализировать влияние донора оксида азота на микрореологию эритроцитов, на фоне действия фенилэфрина. В этой серии опытов микрореологические ответы эритроцитов не отличались от таковых первой серии наблюдений (табл. 1 и 2). Инкубация с НПН также сопровождалась приростом ИУЭ на 11% и уменьшением агрегации клеток на 45% ( $p < 0,01$ ).

Таблица 2

Изменение микрореологии эритроцитов под влияние инкубации с нитропруссидом натрия (НПН), фенилэфрином (ФЭ) и их совместным воздействием (ФЭ+НПН; n= 24, M±σ)

Показатели	Контроль	НПН (100 мкМ)	Фенилэфрин (ФЭ, 1,0 мкМ)	ФЭ+НПН
ИУЭ, отн. ед.	2,02±0,04	2,25±0,04**	1,93±0,04*	2,24±0,06**
ПАЭ, отн. ед.	14,32±1,64	7,88±2,16*	25,29±2,37**	8,02±1,58*

**Примечание:** \* – различия по сравнению с показателями контроля достоверны при  $p < 0,05$ ; \*\* при  $p < 0,01$ ; ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов.

При добавлении к суспензии эритроцитов, инкубированных с ФЭ донора NO, деформируемость клеток превысила уровень контроля на 11%, а по сравнению с действием одного ФЭ оказалась выше на 16% ( $p < 0,01$ , табл. 2). Что касается агрегации, то ее прирост под влиянием фенилэфрина, не только полностью устранялся, но величина ПАЭ была близкой к той, что наблюдали после инкубации клеток с НПН (табл. 2).

Основной механизм изменений микрореологических характеристик эритроцитов (деформируемости и агрегации) под влиянием фенилэфрина, вероятно, связан с обменом  $Ca^{2+}$ . Известно, что  $\alpha$ -1-адренорецептор связан с  $Ca^{2+}$  сигнальным путем [6] и при его стимуляции происходит усиление входа кальция в клетку [7]. Кроме того, было показано, что фенилэфрин в концентрации 1,0  $\mu$ M проявлял выраженный проагрегационный эффект и заметно влиял на деформируемость эритроцитов [5]. С другой стороны, известно, что активация газотрансмиттерами гуанилатциклазы сопровождается снижением входа  $Ca^{2+}$  в клетки [8].

**Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и БРФФИ в рамках научного проекта №20-515-00019\20-А**

#### **Библиографический список**

1. Bree F., Gault I., P. d'Athis and Tillement J. P. Beta adrenoceptors of human red cells, determination of their subtypes // Biochem. Pharmacol. – 1984. – Vol. 33. – P. 4045–4050.

2. Sundquist J., Bias D.S., Hogan J.E. The  $\alpha$ -1-adrenergic receptor in human erythrocyte membranes mediates interaction in vitro of epinephrine and thyroid hormone at the membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase // Cellular Signalling. – 1992. - Vol. 4. - 795-799.
3. Tuvia S., Moses A., Gulayev N. Beta-adrenergic agonists regulate cell membrane fluctuations of human erythrocytes // J. Physiol. – 1999. - Vol. 77. - 781-787.
4. Muravyov A.V., Tikhomirova I.A. Role molecular signaling pathways in changes of red blood cell deformability // Clin Hemorheol Microcirc. - 2013. - Vol. 53. - 45-59.
5. Muravyov A.V., Antonova N., Tikhomirova I.A. Red blood cell micromechanical responses to hydrogen sulfide and nitric oxide donors: Analysis of crosstalk of two gasotransmitters ( $\text{H}_2\text{S}$  and  $\text{NO}$ ) // Series on Biomechanics. - 2019. - Vol. 33. - 34-40.
6. Guimarães S. and Moura D. Vascular Adrenoceptors: An Update // Pharmacol. Rev. – 2001. – Vol. 53. – Issue 2. – P. 319–356.
7. Christophersen P., Bennekou P. Evidence for a voltage-gated, non-selective cation channel in the human red cell membrane // Biochim Biophys Acta. – 1991. – Vol. 1065. – P. 103–106.
8. Truss NJ, Warner TD. Gasotransmitters and platelets // Pharmacol Ther. – 2011. - Vol. 132. - 196-203.

**УДК 616.13–007.64:616.15**

***Н.И. Нечипуренко<sup>1</sup>, Р.Р. Сидорович<sup>1</sup>, И.Д. Пашковская<sup>1</sup>,  
Ю.И. Степанова<sup>2</sup>, А.И. Ахремчук<sup>1</sup>, Т.А. Прокопенко<sup>1</sup>***

**ОСОБЕННОСТИ КИСЛОРОДТРАНСПОРТНОЙ ФУНКЦИИ  
КРОВИ И ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО  
РАВНОВЕСИЯ ПРИ РАЗРЫВЕ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ АНЕВРИЗМ**

**Аннотация.** Обследованы 23 пациента, оперированные на 8-е (6; 10) сутки после разрыва церебральных аневризм. Установлены алкалолитические изменения, снижение  $\text{pCO}_2$ , повышение  $\text{p50}$  с уменьшением сродства гемоглобина к кислороду, активация прооксидантных процессов в венозной крови относительно данных здоровых лиц. Выявленные нарушения указывают на особенности

---

© Н.И. Нечипуренко, Р.Р. Сидорович, И.Д. Пашковская, Ю.И. Степанова, А.И. Ахремчук, Т.А. Прокопенко, 2022