

2.Olas B, Brodek P, Kontek B. The Effect of Hydrogen Sulfide on Different Parameters of Human Plasma in the Presence or Absence of Exogenous Reactive Oxygen Species. Antioxidants (Basel). 2019.- 3;8(12):610. doi: 10.3390/antiox8120610.

3.Габбасов З.А., Попов Е.Г., Гаврилов И.Ю., Позин Е.Я., Маркосян Р.А. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов. Лабораторное дело, 1989, N10, с.15-18.

4.Yagdi E, Cerella C, Dicato M, Diederich M. Garlic-derived natural polysulfanes as hydrogen sulfide donors: Friend or foe? Food Chem Toxicol 2016, 95:219-33.

5.Szabo C, Papapetropoulos A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H₂S Levels: H₂S Donors and H₂S Biosynthesis Inhibitors. Pharmacol Rev 2017, 69:497–564.

УДК 612.014.3

И.А. Тихомирова, Е.П. Петроченко, Ю.В. Малышева, Н.В. Кислов, В.А. Лемехова, А.В. Муравьев

ВЛИЯНИЕ ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА И СЕРОВОДОРОДА НА МИКРОРЕОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭРИТРОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ

Аннотация. При злокачественных новообразованиях (ЗНО) происходит нарушения кровообращения и реологических свойств крови. При этом газотрансммиттеры (ГТ) положительно влияют на сосудистый тонус и микрореологию клеток крови. Целью данного исследования была оценка микрореологических ответов эритроцитов на доноры ГТ: нитропруссид натрия (НПН) и гидросульфид натрия (NaHS). Эритроциты и их восстановленные тени инкубировали в течение 30 мин., при 37° С с НПН (100 мкМ), с NaHS (100 мкМ) отдельно, и при их совместном применении. После инкубации регистрировали деформируемость эритроцитов путем измерения индекса удлинения (ИУЭ) и их агрегацию, а также вязкость суспензий клеток (Hct=40%) при высоких (BK1) и низких скоростях сдвига (BK2). Были получены данные, свидетельствующие о

положительном влиянии обоих доноров ГТ на микрореологию эритроцитов больных ЗНО. Также было показано, что совместное применение двух доноров ГТ одновременно давало, хотя умеренный, но достоверно больший эффект, чем отдельное воздействие каждого из этих двух ГТ соединений.

Ключевые слова: злокачественные новообразования, эритроциты, микрореология, газотрансммиттеры

I.A. Tikhomirova, E.P. Petrochenko, Yu.V. Malysheva, N.V. Kislov, V.A. Lemekhova, A.V. Muravyov

EFFECT OF DONORS OF NITROGEN OXIDE AND HYDROGEN SULFIDE ON ERYTHROCYTE MICRORHEOLOGICAL CHARACTERISTICS IN PATIENTS WITH MALIGNANT TUMOUR

Abstract. In malignant tumours, there is a violation of blood circulation and rheological properties of blood. At the same time, gas transmitters (GT) have a positive effect on vascular tone and microrheology of blood cells. The purpose of this study was to evaluate the microrheological responses of erythrocytes to GT donors: sodium nitroprusside (SNP) and sodium hydrosulfide (NaHS). Erythrocytes and their reconstituted shadows were incubated for 30 min at 37°C with SNP (100 μ M), with NaHS (100 μ M) separately, and when they were used together. After incubation, the erythrocyte deformability was recorded by measuring the elongation index (EI) and their aggregation, as well as the viscosity of cell suspensions (Hct=40%) at high (SV1) and low shear rates (SV2). Data were obtained indicating a positive effect of both GT donors on the erythrocyte microrheology in malignant neoplasm patients. It was also shown that the combined use of two GT donors simultaneously gave, although moderate, but significantly greater effect than the separate effect of each of these two GT compounds.

Keywords: malignant tumours, erythrocytes, microrheology, gasotransmitters

Введение

Газовые медиаторы или газотрансммиттеры (ГТ) играют важную роль в регуляции функций организма как в норме, так и патологии [1-3]. В том числе влияют на функции клеток крови [4]. Известно, что эритроциты при выполнении кислородтранспортной функции

должны реализовать свои микрореологические свойства – деформируемость и агрегацию [5]. Было показано, что эти клеточные характеристики положительно изменяются под влиянием донора NO, нитропруссид натрия, или при активации эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) с помощью L-аргинина [6-8]. Что касается других газотрансмиттеров, то имеются только данные о положительном влиянии сероводорода на агрегацию тромбоцитов [9, 10]. Тем не менее это может благоприятно сказаться на состоянии гемостаза у больных злокачественными новообразованиями (ЗНО), поскольку нарушение реологических свойств крови при ЗНО сочетается с повышением риска тромбозов [11].

С учетом вышесказанного целью настоящего исследования было изучение микрореологических ответов эритроцитов больных ЗНО на отдельное и сочетанное применение доноров оксида азота и сероводорода.

Материал и методы исследования

Пробы крови (9 мл) получали венопункцией у больных злокачественными новообразованиями (колоректальный рак, n=16) в вакуумные пробирки (вакутайнеры с EDTA). Эритроциты отделяли от плазмы центрифугированием (15 мин, 3000 об/мин), трижды отмывали в изотоническом растворе NaCl. Суспензию эритроцитов (в растворе Рингера с добавлением декстрана-150 в соотношении 7:3) 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 H₂S – гидросульфидом натрия (NaHS, в концентрациях 100 мкМ);
- 3) с одновременным добавлением в среду инкубации НПН (100 мкМ) и NaHS (100 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-150 (10% ХАЕС-стерил, Fresenius Kabi, Германия) в соотношении объемов 7:3. Для оценки деформируемости эритроцитов (ДЭ) определяли индекс их удлинения (ИУЭ) в проточной микрокамере. Регистрировали индекс АЭ и ДЭ

после инкубации с препаратами и сравнивали с их с данными контрольных опытов (инкубация эритроцитов без препаратов). Готовили суспензии эритроцитов с гематокритом 40% и измеряли ее вязкость при высоких (ВК1, $\gamma > 100 \text{ с}^{-1}$) и низких (ВК2, $\gamma < 20 \text{ с}^{-1}$) скоростях сдвига.

Для более точного выявления изменений микромеханики клеточных мембран эритроцитов под действием доноров ГТ, их добавляли к суспензии восстановленных теней эритроцитов. Эритроциты разрушали осмотическим шоком. Для этого к 1 мл клеток добавляли 7 мл охлажденной H_2O (при температуре 4°C) с последующей двукратной отмывкой в фосфатном буфере. Затем концентрат теней инкубировали в растворе Рингера с добавлением 30% декстран-150 (соотношение как 7:3, по объему). Суспензию восстановленных теней делили на несколько аликвот, добавляли указанные выше препараты, и после инкубирования с ними (30 мин при 37°C), регистрировали деформируемость в проточной микрокамере.

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

Как видно из данных, приведенных в таблице 1, ВК1 несколько немного снизилась, на 4% под влиянием инкубации суспензии клеток с НПН. При низких скоростях сдвига уменьшение ВК2 было более заметным (- 16%), однако в обоих случаях – не достоверным (табл. 1). Тогда как ИУЭ увеличился на 6%, а ПАЭ был на 28% меньше, чем в контрольной суспензии и различия были достоверными ($p < 0,01$).

В ответ на донор сероводорода снижение ВК1 и ВК2 были достоверными и составили 6 и 22%, соответственно. При этом и позитивные изменения ИУЭ и ПАЭ были более выраженными (табл. 1).

Таблица 1

Изменение микрореологических характеристик эритроцитов под влиянием НПН и NaHS отдельно и при их совместном действии у больных злокачественными новообразованиями ($M \pm \sigma$, $n=16$)

Показатели	Контроль	НПН	NaHS	НПН+NaHS
BC1, мПа.с	3,93 $\pm$ 0,95	3,76 $\pm$ 0,69	3,69 $\pm$ 1,05**	3,29 $\pm$ 0,24**
BC2, мПа.с	15,85 $\pm$ 4,28	13,24 $\pm$ 3,72	12,29 $\pm$ 5,34**	10,73 $\pm$ 0,39**
ИУЭ, отн. ед.	2,02 $\pm$ 0,05	2,14 $\pm$ 0,02**	2,17 $\pm$ 0,03**	2,22 $\pm$ 0,05**
ПАЭ, отн. ед.	17,00 $\pm$ 4,60	12,20 $\pm$ 6,45**	10,72 $\pm$ 6,09**	10,24 $\pm$ 7,00**

Примечание: * – различия по сравнению с показателями контроля достоверны при $p < 0,05$; **при $p < 0,01$; ВК1 – вязкость крови при высоких скоростях сдвига; ВК2 – вязкость крови при низких скоростях сдвига; ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов; ПАЭ – показатель агрегации эритроцитов.

Что касается комбинированного воздействия двух доноров ГТ, то все четыре микрореологические характеристики изменялись, в этих условиях, более существенно. Так ВК1 и ВК2 снижались на 16 и 32% ($p < 0,01$), соответственно. Прирост ИУЭ составил 10%, а ПАЭ снизился на 40% (табл. 1). Важно указать на то, что применение комплекса двух доноров привело к достоверно большему приросту ИУЭ, чем отдельно НПН. Разница составила 5% ($p = 0,007$). То же самое было получено при сравнении увеличения ИУЭ только на NaHS и на комбинацию «НПН+ NaHS», разница приростов была тоже достоверно большей при применении двух ГТ одновременно ($p = 0,026$).

При инкубировании теней эритроцитов с донором NO наблюдали прирост деформируемости на 8% ($p < 0,01$), тогда как донор сероводорода увеличил ИУтЭ на 11,7%. При их совместном действии на тени эритроцитов произошло увеличение деформируемости на 13% (рис. 1, $p < 0,01$). Если сравнить величины прироста деформируемости теней эритроцитов под влиянием НПН и при комбинации «НПН+ NaHS», то оказывается, что совместное применение двух доноров ГТ достоверно ($p = 0,008$) больше

увеличивает ИУтЭ. Совместный эффект двух доноров был также несколько более эффективен, чем влияние одного NaHS (рис. 2; $p=0,008$).

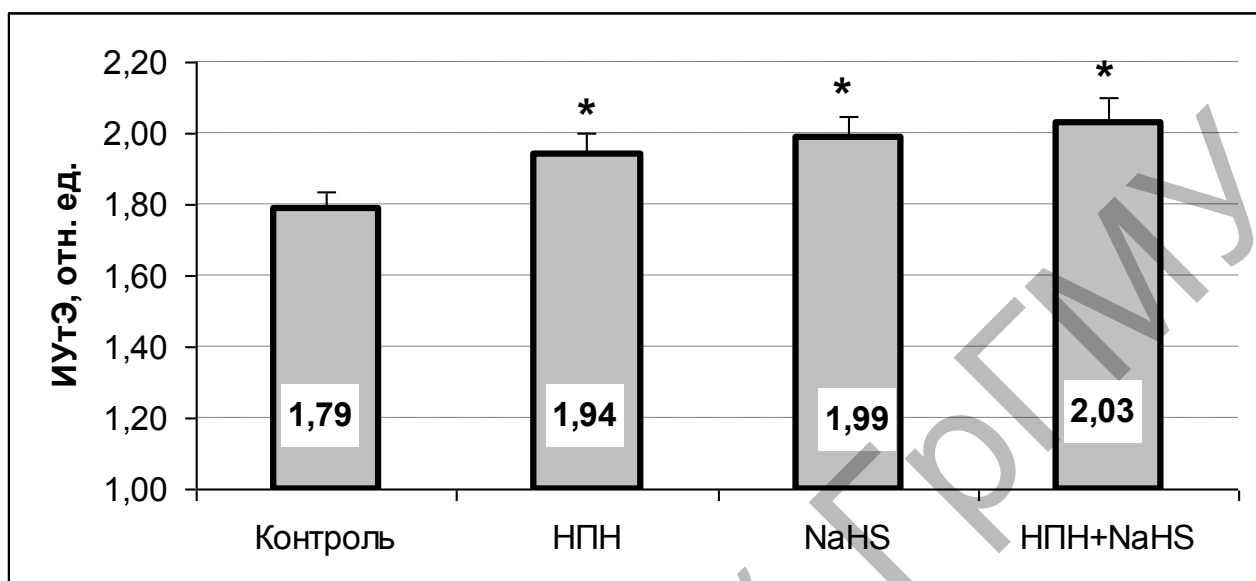


Рис. 1. Изменение деформируемости теней эритроцитов (ИУтЭ) под влиянием доноров газотрансмиттеров отдельно (НПН и NaHS) и при их совместном применении (НПН+NaHS)

Примечание: * – различия по сравнению с показателями контроля достоверны при $p<0,01$.

Расчет показал, что прирост ИУтЭ под влиянием НПН был равен $0,16 \pm 0,04$ отн. ед.; после инкубации с NaHS – $0,20 \pm 0,06$, а после пары «НПН+ NaHS» – $0,24 \pm 0,04$ отн. ед. Разница хотя и была меньшей, чем в первом случае, однако тоже достоверной (рис. 2, $p=0,007$).

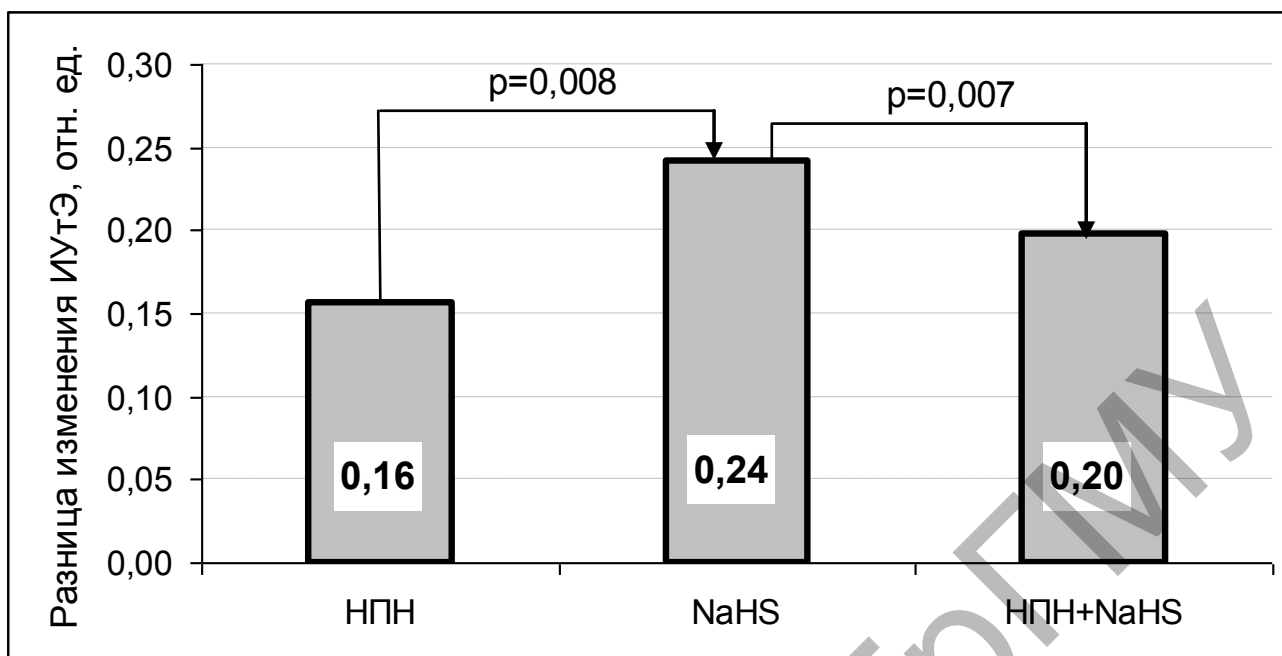


Рис. 2. Разница в приросте индекса удлинения теней эритроцитов (ИУТЭ) под влиянием отдельных доноров ГТ и при их совместном действии.

Заключение

Полученные результаты исследования свидетельствуют о положительном влиянии микрореологические характеристики эритроцитов больных ЗНО отдельно взятых доноров газотрансммиттеров, особенно гидросульфида натрия, а также показывают, что комбинация двух доноров проявляет больший положительный эффект и существенно улучшает транспортный потенциал эритроцитов больных лиц.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00143.

Библиографический список

1. Olas B. Gasomediators (NO, CO, and H₂S) and their role in hemostasis and thrombosis // Clin. Chim. Acta. 2015. 445, 115-121.
2. Balligand J.L., Cannon P.J. Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences // Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997.17, 1846-1858.
3. Wallace J.L., Ianaro A., Flannigan K.L., Cirino G. Gaseous mediators in resolution of inflammation // Semin Immunol. 2015. 27, 227-233.
4. Chen K. and Popel A.S. Nitric oxide production pathways in erythrocytes and plasma // Biorheology. 2009. 46, 107-119.

5. Muravyov A.V., Tikhomirova I.A. Role molecular signaling pathways in changes of red blood cell deformability // Clin Hemorheol Microcirc. 2013. 53, 45-59.
6. Bor-Kucukatay M., Wenby R.B., Meiselman H.J., Baskurt O.K. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2003. 284, 1577-1584.
7. Uyuklu M., Meiselman H.J., Baskurt O.K. Role of hemoglobin oxygenation in the modulation of red blood cell mechanical properties by nitric oxide // Nitric Oxide. 2009. 21, 20-26.
8. Mozar A., Connes P., Collins B., Hardy-Dessources M.D., Romana M., Lemonne N., Bloch W., Grau M. Red blood cell nitric oxide synthase modulates red blood cell deformability in sickle cell anemia // Clin Hemorheol Microcirc. 2016. 64, 47-53.
9. Gao L., Cheng C., Sparatore A., Zhang H., Wang C. Hydrogen sulfide inhibits human platelet aggregation in vitro in part by interfering gap junction channels: effects of ACS14, a hydrogen sulfide-releasing aspirin // Heart Lung Circ. 2015. 24, 77-85.
10. Truss NJ, Warner TD. Gasotransmitters and platelets // Pharmacol Ther. 2011. 132, 196-203.
11. Von Tempelhoff G.F., Niemann F., Heilmann L., Hommel G. Association between blood rheology, thrombosis and cancer survival in patients with gynecologic malignancy // Clin Hemorheol Microcirc. 2000. 22. 107-130.

УДК. 612.1; 591.11

Фадюкова О.Е., Кошелев В.Б.

КАЛИЕВЫЕ И ХЛОРНЫЕ КАНАЛЫ ОПОСРЕДУЮТ ЭФФЕКТЫ СЕРОВОДОРОДА НА ДЕФОРМИРУЕМОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫСЫ

Аннотация. *Цель исследования:* проанализировать участие калиевых и хлорных каналов в изменениях деформируемости эритроцитов (ДЭ) крысы в ответ на низкую и высокую концентрации донора газотрансмиттера сероводорода NaHS в опытах *in vitro*.

Материалы и методы исследования. Пробы крови крыс, полученные под наркозом (хлоралгидрат 450 мг/кг) из нижней полой вены (антикоагулянт ЭДТА, 2 мг/мл), инкубировали с исследуемыми