

Секция 1.

ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ БИОХИМИЯ

УЧАСТИЕ МОНООКСИДА АЗОТА В АДАПТАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ К ГИПОКСИИ/РЕОКСИГЕНАЦИИ

Акулич Н.В.¹, Зинчук В.В.²

¹ ГУ «Республиканский научно-практический центр спорта», г. Минск;

² УО «Гродненский государственный медицинский университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь

Актуальность. Для функционирования клеток необходимо поддержание кислородного гомеостаза. В условиях физиологического покоя до 90 % доступного кислорода потребляется митохондриями для получения АТФ посредством окислительного фосфорилирования. Ограничение, или отсутствие кислорода сопровождается изменениями в метаболизме и функции клеток и приводит к гипоксии, при этом, в адаптации к ней принимает участие гемоглобин (Hb), обеспечивая взаимосвязь между содержанием кислорода и кровотоком [1]. В результате взаимодействия NO и гемоглобина происходит образование его различных форм, которые играют роль аллостерического регулятора функциональной активности гемопротейна [2].

Цель работы является оценка роли монооксида азота в адаптации эритроцитов к гипоксии/реоксигенации.

Материалы и методы. Исследования проводилось на суспензии эритроцитов. Забор венозной крови проводили в вакуумированные пробирки, антикоагулянт – ЭДТА К₂. После центрифугирования ($g=400$) и выделения эритроцитов, к ним добавляли буферный раствор для получения суспензии с гематокритом 5%, которую впоследствии подвергали воздействию гипоксии (30 мин) (1-я группа) гипоксии (30 мин)/реоксигенации в течение 60 минут (2-я группа).

Для оценки механизмов влияния гипоксии/реоксигенации использовали эксперименты *in vitro* в условиях 5% CO₂ и 4 % O₂ (гипоксия) и 5% CO₂ и 14 % O₂ (реоксигенации), 37° С, которые были созданы в перчаточном боксе. Концентрацию монооксида азота в клетках определяли с использованием 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлуоресцеина (DAF-FM DA). DAF-FM DA использовался для определения внутриклеточной концентрации NO. Оценка спектров суспензии эритроцитов и расчет фракций гемоглобина суспензии эритроцитов и раствора гемоглобина производили согласно формулам, приведенным ранее в нашей работе [3]. Сродство гемоглобина к кислороду определяли по показателю p_{50} определяли по формуле J.W. Severinghaus [4].

Интенсивность флуоресценции DAF-FM DA и одновременная регистрация спектров поглощения эритроцитарной суспензии реализована на планшетном спектрофлуориметре Biotek Synergy H1. Дополнительно проводилась оценка внутриклеточного NO на цитофлуориметре FACS ARIA (BD Bioscience, США).

Определяли внутриэритроцитарную интенсивность флуоресценции DAF-FM DA в нормоцитах (субпопуляция эритроцитов, несущих на поверхности гликофорин А и имеющие линейные размеры, соответствующие эритроцитам) каждой клетке. Для логического гейтирования нормоцитов использовали моноклональные антитела к CD 235а. Анализировали в каждой пробе не менее 40000 клеток.

Гематологические параметры (средний объем эритроцита и показатель ширины распределения эритроцитов по объему) определяли на гематологическом анализаторе Sysmex 2000i (Япония).

Оценку нитритов проводили с использованием Measure-iT™ High-Sensitivity Nitrite Assay Kit (Molecular Probes). Количественный анализ осуществляли после калибровки при титровании 11 мМ нитрита натрия. Оценку флуоресценции набора проводили при возбуждении с длиной волны 365 нм, эмиссия регистрировалась на длине волны 450 нм.

Полученные данные были обработаны методами вариационной статистики с использованием программы для персонального компьютера «Statistica 10.0».

Результаты и обсуждение. Результаты спектрофотометрических исследований суспензии эритроцитов здоровых добровольцев при гипоксии/реоксигенации показывают, что в условиях гипоксии происходит снижение фракции оксигемоглобина (HbO_2) на 9,3 % до 40,3%, $p < 0,05$. Доля дезоксигемоглобина (Hb) при 4 % концентрации O_2 в атмосфере бокса возрастает, $p < 0,05$. Фракция метгемоглобина (MetHb) снижается на 1,0-1,5%, $p < 0,05$.

Процесс реоксигенации 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 % $p < 0,05$. Регистрируется смещение влево максимума поглощения полосы Core при моделировании гипоксии/реоксигенации во всех основных группах наблюдения.

В условиях 30-ти минутной гипоксии (5% CO_2 и 4 % O_2) установлено снижение показателя $p50$ до 40,5 мм рт. ст. Реоксигенация в течение 30-ти минут сопровождается снижением сродства гемоглобина к кислороду: параметр $p50$ возрастает до 42,3 мм рт. ст. Эти же величины $p50$ сохраняются и при 60-ти минутой реоксигенации.

Концентрация монооксида азота эритроцитов, измеренная по интенсивности флуоресценции DAF-FM DA, при моделирование гипоксии вырастает на 15,7 %, ($p < 0,05$), динамика роста при реоксигенации сохраняется, и на 60-й минуте прирост концентрации NO в красных кровяных тельцах составляет 106,4% ($p < 0,05$).

Анализ концентрации нитритов в пробах показывает, что моделирование гипоксии/реоксигенации приводит к снижению их концентрации. В частности, при гипоксии концентрация нитритов в плазме снижается на 15,3% ($p < 0,05$), а при реоксигенации – на 22,5% ($p < 0,05$).

Проведение корреляционного анализа показывает, что между концентрацией монооксида азота в эритроцитах и – нитритов плазмы существует отрицательная корреляционная связь ($r=-0,71$), ($p<0,05$).

Согласно нашим данным, концентрация монооксида азота в субпопуляции эритроцитов (нормоцитах) при моделировании гипоксии/реоксигенации повышается.

Выводы. Гипоксия/реоксигенации сопровождается конформационными перестройками гемоглобина, изменением сродства гемоглобина к кислороду, что имеет значение для формирования кислородтранспортной функции крови.

Рост внутриклеточной концентрации монооксида азота в условиях гипоксии/реоксигенации обеспечивается за счет нитритов плазмы, что подтверждается отрицательными корреляционными связями между этими параметрами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nitric oxide in red blood cell adaptation to hypoxia / Y. Zhao [et al.] // Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). – 2018. – Vol. 50, № 7. – P. 621-634.
2. Зинчук, В.В. Роль кислородсвязующих свойств крови в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма / В.В. Зинчук, М.В. Борсюк // Успехи физиологических наук. – 1999. – Т. 30, № 3. – С. 38-48.
3. Akulich, N.V. Role of the L-Arginine/NO System in Red Blood Cells at Different Values of Oxygen Partial Pressure / N.V. Akulich, V.V. Zinchuk // J Evol Biochem Phys. – 2022. – Vol. 58, № 2. – P. 548-557.
4. Severinghaus, J.W. Blood gas calculator. / J.W. Severinghaus // Journal of Applied Physiology. – 1966. – Vol. 21, № 3. – P. 1108-1116.

ВЛИЯНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* К ЦЕФТАЗИДИМУ И ИМИПЕНЕМУ

^{1,2}Артюх Т.В., ¹Сидорович Е.А., ²Тапальский Д.В.

¹УО «Гродненский государственный медицинский университет», г.Гродно;

²УО «Гомельский государственный медицинский университет»,

г. Гомель, Республика Беларусь

Актуальность. В настоящее время наиболее рациональным подходом для сдерживания распространения антибиотикорезистентности грамотрицательных возбудителей с множественной лекарственной устойчивостью является поиск или разработка адъювантов антибиотиков. С 1950-го года научное сообщество начало вкладывать средства в реабилитацию существующих антибиотиков посредством «комбинированной терапии» с соединениями способными усиливать или восстанавливать активность существующих антибиотиков в отношении устойчивых штаммов бактерий. Механизмы действия соединений, потенцирующих активность антибиотиков, разнонаправлены и до конца не изучены [4].