

МЕХАНИЗМЫ УЧАСТИЯ МОНООКСИДА АЗОТА ЭРИТРОЦИТОВ В АДАПТАЦИИ К ГИПОКСИИ *IN VIVO* И *IN VITRO*

Акулич Н. В.¹, Зинчук В. В.²

¹Республиканский научно-практический центр спорта
Минск, Беларусь

²Гродненский государственный медицинский университет
Гродно, Беларусь

Введение. Несмотря на многочисленные исследования, касающиеся исследования механизмов гипоксии, существуют разночтения в использовании термина «гипоксия» и «нормоксия». В частности, термин «нормоксия» почти повсеместно используется для описания «нормального» уровня кислорода при проведении исследований *in vitro* с культурами тканей – около 20-21% кислорода, хотя уже в альвеолах лёгких уровень O_2 снижается примерно до 14,5%, а в периферических (по отношению к легким) тканях медианный уровень O_2 варьируется от 3,4% до 6,8%. Измерения оксигенации *in vivo* показывают, что существуют значимые различия не только между тканями, но и в ее пределах [1]. Несмотря на сложность создания гипоксии для различных тканей организма разработаны устройства, в которых использование газовой смеси с низким содержанием кислорода тождественно понятию гипоксия [2, с. 37].

Поскольку периферические ткани подвергаются воздействию кислорода примерно на 75% ниже, чем атмосферный воздух, предполагается, что 5% кислорода (38 мм рт.ст.) является более точным приближением насыщения тканей, и это следует рассматривать как «физиоксию», с которой следует сравнивать другие экспериментальные условия. Следовательно, для создания гипоксических условий требуется менее 5% кислорода в модельной газовой среде. В последние годы актуальными являются исследования [3], согласно которым механизм адаптации к гипоксическим состояниям функционирует с участием газотрансмиттера монооксида азота (NO), который, обладая рядом уникальных физико-химических свойств, играет роль регулятора функциональной активности гемоглобина эритроцитов. Эритроциты млекопитающих не содержат ядра и митохондрий, что, вероятно, снижает потребность этих клеток в кислороде, и известно [4], что отсутствие доступа к O_2 при хранении крови способствует повышению качества эритроцитарной массы и минимизирует побочные эффекты у реципиента клеточного продукта.

Поскольку красные кровяные тельца имеют эти особенности метаболизма, то актуальность исследования состоит в сравнительном анализе механизмов участия монооксида азота эритроцитов в адаптации к гипоксии *in vivo* и *in vitro*.

Цель. Выяснить механизмы участия монооксида азота эритроцитов в адаптации к гипоксии *in vivo* и *in vitro*.

Методы исследования. В исследовании *in vivo* принимали участие спортсмены национальной команды по биатлону (высота 1950 м, давление 600 мм рт.ст. – гипобарическая гипоксия), а для модели *in vitro* использовалась суспензия эритроцитов. Для оценки механизмов влияния гипоксии *in vitro* в перчаточном боксе создавали искусственную газовую среду, содержащую 5% CO₂ и 4% O₂.

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. Оценку спектров суспензии эритроцитов и расчет сродства гемоглобина к кислороду определяли по показателю р50 определяли по формуле J.W.Severinghaus [5].

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 A и имеющие линейные размеры, соответствующие эритроцитам) каждой клетке. Для логического гейтирования нормоцитов использовали моноклональные антитела к CD 235a. Анализировали в каждой пробе не менее 40 000 клеток. Анализ фиксированных и окрашенных препаратов производили с использованием микроскопа Olympus BX-53.

Оценку нитрат/нитритов проводили с использованием Measure-iT™ High-Sensitivity Nitrite Assay Kit (Molecular Probes) на планшетном спектрофлуориметре Synergy H1 (Biotek). 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.

Результаты и их обсуждение. Системная адаптация к гипобарической гипоксии, которая развивалась в условиях среднегорья сопровождалась гипервентиляцией, ростом парциального давления кислорода и снижением рCO₂ на этой высоте. Величина р50 венозной крови (31,03±3,76) у спортсменов в условиях гипоксии была выше (р<0,05), чем в условиях равнины (25,59±3,01), что указывает на более высокое давление O₂ венозной крови, необходимое для полунасыщения кислородом ее гемоглобина.

Более 95% эритроцитов в условиях гипоксии *in vitro* не имели пэллора (характерной формы впадины в центре эритроцита): красные кровяные тельца представляли собой гиперхромные диски без типичной двояковогнутой формы. Гипоксия *in vivo* характеризовалась противоположными изменениями.

Поскольку клетки разного происхождения обладают разной чувствительностью и толерантностью к содержанию кислорода, следовательно, «системная» гипоксия может не затрагивать эритроциты, а другие ткани могут не только иметь более высокую чувствительность, но и реагировать на нее разнообразными системными эффектами.

Одной из возможных стратегий адаптации к гипобарической гипоксии является изменение функционирования L-аргинин-NO-системы эритроцитов. Для выяснения ее роли проведена оценка газотрансмиттера монооксида азота красных кровяных телец. Установлено, что пребывание в среднегорье в течение 24 дней приводит к снижению концентрации нитрат/нитритов на 9,74% ($p < 0,05$) и 8-ми кратному росту уровня NO эритроцитов, сохраняющемуся после возвращения на равнину не менее 5 дней. Исследование *in vitro* показало, что в условиях 30-ти минутной гипоксии (5% CO₂ и 4% O₂) установлено снижение показателя р50 с 46,32 до 40,53 мм рт.ст., концентрация монооксида азота эритроцитов, измеренная по интенсивности флуоресценции DAF-FM DA, при моделировании гипоксии выросло на 15,21%, ($p < 0,05$), а концентрация нитрит/нитритов снизилась на 17,32% ($p < 0,05$).

Таким образом, выявлено сходство в содержании внутриэритроцитарного газотрансмиттера монооксида азота и при адаптации к гипобарической гипоксии, и в экспериментах *in vitro*. При этом сродство гемоглобина к кислороду при моделировании искусственной газовой среды, содержащей 5% CO₂ и 4% O₂ повышалось, а при вдыхании атмосферного воздуха в условиях среднегорья, по сравнению с условием равнины, было ниже. Кроме того, оценка морфоденситометрических показателей эритроцитов свидетельствует об отсутствии признаков, свидетельствующих о гипоксии, при нахождении в условиях среднегорья.

Выводы. В адаптации к гипоксии *in vivo* и *in vitro* принимает участие система монооксида азота эритроцитов. Механизмы адаптации к гипобарической гипоксии *in vivo*, в отличие от модели *in vitro*, включают снижение сродства гемоглобина к кислороду, рост площади поверхности и диаметра эритроцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. McKeown, S. R. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment respons / S. R. McKeown // Br J Radiol. – 2014. – Vol. 87, № 1035. – Art. 20130676. – doi: 10.1259/bjr.20130676.
2. Воловец, С. А. Эффективность гипо-гипероксических тренировок в медицинской реабилитации пациентов, перенёвших COVID-19 / С. А. Воловец, Т. Н. Цыганова, Н. Г. Бадалов // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. – 2022. – Т. 21, № 1. – С. 35-46. – doi: 10.17816/rjpb109501.
3. Red Blood Cell Metabolism In Vivo and In Vitro / A. D'Alessandro, A. T. Anastasiadi, V. L. Tzounakas [et al.] // Metabolites. – 2023. – Vol. 13, № 7. – Art. 793. – doi: 10.3390/metabo13070793.
4. Storage-Induced Micro-Erythrocytes Can Be Quantified and Sorted by Flow Cytometry / M. Marin, S. Peltier, Y. Hadjou [et al.] // Front Physiol. – 2022. – Vol. 13. – Art. 838138. – doi: 10.3389/fphys.2022.838138.
5. Severinghaus, J. W. Blood gas calculator / J. W. Severinghaus // J Appl Physiol. – 1966. – Vol. 21, № 3. – P. 1108-1116. – doi: 10.1152/jappl.1966.21.3.1108.