

И. И. Лановенко, А. В. Коцюруба, А. П. Гащук

## Взаимодействие оксида азота и кислородтранспортной функции крови при гемической гипоксии гемолитического генеза

(Представлено академиком НАН Украины А. А. Мойбенко)

*У дослідях на щурах на моделі гемічної гіпоксії гемолітичного генезу встановлено порушення кисневотранспортної функції (КТФ) крові (зменшення доставки і споживання  $O_2$ , метаболічний ацидоз) і значне збільшення (у 2-3 рази) вмісту стабільних метаболітів NO ( $NO_2^-$  і  $NO_3^-$ ) у плазмі крові. Стимуляція утворення NO (за допомогою L-аргініну) підсилює гіперпродукцію NO та відновлює КТФ крові; пригнічення утворення NO (за допомогою L-NNA) призводить до дефіциту метаболітів NO та поглиблення порушень КТФ крові. Обґрунтована можливість корекції гемічної гіпоксії за допомогою застосування донорів оксиду азоту.*

После открытия сосудистых эффектов монооксида азота изучение биорегуляторной роли этого соединения стало приоритетным направлением исследований медико-биологических наук [1, 2]. Выявлены свойства NO универсально регулировать физиологические и патофизиологические процессы, определены взаимосвязи фундаментальных механизмов NO и эффекторных элементов систем организма в условиях нормы и патологии [3–6]. Получены данные о том, что NO принимает участие в реакциях адаптации организма к гипоксии [7–10]. Гемоглобин является одной из природных мишеней NO, поэтому на состояние NO влияют кислородсвязывающие свойства крови. В то же время система NO может изменять средство гемоглобина к кислороду через внутриэритроцитарные механизмы регуляции, кислородзависимый характер образования NO, действие его дериватов (нитрозилгемоглобин, S-нитрозогемоглобин и др.) и конечных метаболитов (анион нитрит, анион нитрат, пероксинитрит), регуляцию сосудистого тонуса, транспорт и утилизацию кислорода. Учитывая ключевую роль гипоксии в патогенезе многих заболеваний и NO — как универсального регулятора клеточных функций, исследование механизмов их взаимодействия может привести к выяснению природы болезни и саногенеза.

В настоящем сообщении приведены результаты изучения взаимодействия оксида азота и кислородтранспортной функции крови при гемической гипоксии, вызванной гемолизом эритроцитов.

Исследование выполнено в эксперименте на 72 крысах линии Вистар массой ( $242,3 \pm 4,6$ ) г на модели гемической гипоксии гемолитического генеза (ГГ — фенилгидразин: 5 мг/100 г массы животных, 1% водный раствор; внутривентриально, через день, 6 раз). В условиях ГГ применяли методы целенаправленного воздействия на метаболизм NO [11]. Инвазивные манипуляции выполняли под тиопенталовым или эфирным наркозом. Проведено четыре серии опытов: I ( $n = 32$ ) — контроль (норма — интактные животные); II ( $n = 10$ ) — контроль создания модели ГГ и последующего восстановления; III ( $n = 20$ ) —

моделирование стимуляции образования NO в условиях ГГ с помощью введения донатора NO L-аргинина (10 мг/100 г, 2% водный раствор; внутривенно, ежедневно, 5 раз); IV ( $n = 10$ ) — моделирование угнетения образования NO в условиях ГГ с помощью введения ингибитора NO-синтазы L-ω-аргинина (L-NNA) — (1 мг/100 г, 0,2% водный раствор; внутривенно, ежедневно, 5 раз). Заключительные определения показателей проводили через 1–5 дней после последнего применения воздействий.

Контролировали гемограмму (количество эритроцитов (Эр, Т/л); лейкоцитов (Л, Г/л); тромбоцитов (Тр, Г/л) и ретикулоцитов (Рет, %); гематокритную величину (Гт, %); содержание гемоглобина (Hb, г/л); цветовой показатель — (ЦП, отн. ед.)), пул железа крови, клеточный состав костного мозга.

Состояние системы оксида азота определяли по содержанию (мкг/мл) в плазме (пл) и эритроцитах (эр) крови стабильных конечных метаболитов NO — нитрита аниона ( $\text{NO}_2^-$ ) и нитрата аниона ( $\text{NO}_3^-$ ):  $\text{NO}_{2\text{пл}}^-$ ,  $\text{NO}_{2\text{эр}}^-$ ,  $\text{NO}_{3\text{пл}}^-$ ,  $\text{NO}_{3\text{эр}}^-$ ;  $\text{NO}_{\text{пл}}$  ( $\text{NO}_{2\text{пл}}^- + \text{NO}_{3\text{пл}}^-$ ),  $\text{NO}_{\text{эр}}$  ( $\text{NO}_{2\text{эр}}^- + \text{NO}_{3\text{эр}}^-$ ) [11, 12].

Оценка гемической гипоксии включала показатели кислородтранспортной функции (КТФ) крови [7]: концентрацию общего гемоглобина (Hb, г/л) и его дериватов (г/л) — метгемоглобина (MtHb), сульфгемоглобина (SHb), карбоксигемоглобина (HbCO) и суммы дериватов (DHb); количество эритроцитов (Эр, Т/л); концентрацию в эритроцитах 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ, ммоль/л); концентрацию железа в сыворотке крови (СЖ, мкмоль/л); общую и ненасыщенную железосвязывающую способность сыворотки крови (ОЖСС, НЖСС; мкмоль/л); насыщение трансферрина железом (НТЖ, %); напряжение кислорода в артериальной и в смешанной венозной крови ( $P_{\text{aO}_2}$ ,  $P_{\text{vO}_2}$ , мм рт. ст.); кислородную емкость крови ( $C_{\text{max O}_2}$ , об. %); содержание кислорода в артериальной и в смешанной венозной крови ( $C_{\text{aO}_2}$ ,  $C_{\text{vO}_2}$ , об. %); артерио-венозное различие по кислороду ( $\text{avD}_{\text{O}_2}$ , об. %); минутный объем крови (МОК, мл/(100 г · мин<sup>-1</sup>)); объемную скорость транспорта кислорода артериальной и смешанной венозной кровью ( $V_{\text{aO}_2}$ ,  $V_{\text{vO}_2}$ , мл/(100 г · мин<sup>-1</sup>)); потребление кислорода тканями ( $V_{\text{O}_2}$ , мл/(100 г · мин<sup>-1</sup>)); соотношение скорости транспорта кислорода артериальной кровью к его потреблению (доставка/потребление  $\text{O}_2 - V_{\text{aO}_2}/V_{\text{O}_2}$  (SCR), отн. ед.); напряжение углекислого газа в артериальной и в смешанной венозной крови ( $P_{\text{aCO}_2}$ ,  $P_{\text{vCO}_2}$ , мм рт. ст.); концентрацию буферных оснований в артериальной и в смешанной венозной крови ( $BB_{\text{a}}$ ,  $BB_{\text{v}}$ , ммоль/л); сдвиг буферных оснований ( $BE_{\text{a}}$ ,  $BE_{\text{v}}$ , ммоль/л); концентрацию бикарбонатов ( $AB_{\text{a}}$ ,  $AB_{\text{v}}$ , ммоль/л); pH артериальной и смешанной венозной крови ( $\text{pH}_{\text{a}}$ ,  $\text{pH}_{\text{v}}$ ).

Для анализов использовали артериальную и смешанную венозную кровь и материал костного мозга животных. Применяли стандартные методы измерений, методы математической статистики, включая корреляционный и регрессионный анализы, с использованием компьютерных программ [7, 11].

Полученные результаты представлены в табл. 1, 2. У интактных животных значения контрольных показателей нормы гемограммы, NO и КТФ крови соответствовали физиологическим величинам для крыс.

После введения фенилгидразина у животных воспроизводили модель ГГ средней степени тяжести — уменьшение количества Эр и Hb в крови почти в два раза в сравнении с нормой, повышение концентрации железа в сыворотке крови в 1,5 раза, гемоконцентрация и уменьшение МОК. На этом фоне применяли дополнительные воздействия на метаболизм NO крыс; животные, которые находились в условиях спонтанного восстановления, служили контролем репрезентативности модели ГГ (серия II; ГГ-К;  $n = 10$ ).

На период окончания опытов сохранялась средняя степень ГГ: достоверное уменьшение показателей Эр, Нв и  $C_{\max O_2}$ , гемодилуция; раздражение миелоидного ростка кроветворения. Минимальное количество Нв составляло 65,9 г/л (лимит — 53,8 г/л); CV для показателей Нв и  $C_{\max O_2}$  — 16,34% ( $P < 0,001$ ), т. е. модель демонстрировала высокую репрезентативность. Фенилгидразин вызывает селективное повреждение эритрона, поэтому количество Л и Тр не изменялось.

Гемолиз и интоксикация вызывали системное повреждение КТФ крови: гипоксемию (уменьшение  $C_{vO_2}$  на 49,23%), нарушения кислородсвязывающих свойств Нв, в основном за счет повышенного образования МтНв и 2,3-ДФГ, гипоциркуляцию (МОК уменьшался на 24,77%;  $P < 0,001$ ), уменьшение доставки и потребления кислорода, энергетический дефицит, декомпенсированный метаболический ацидоз. Показательным фактом степени нарушения КТФ крови является достоверное снижение  $V_{O_2}$  (на 19,02%) и SCR (на 38,78%).

Таблица 1. Показатели NO и гемограммы в условиях модели гемической гипоксии ( $M \pm m$ )

Показатель	Контроль нормы (I)	Экспериментальная ГГ		
		ГГ-К (II)	L-арг. (III)	L-NNA (IV)
$NO_{2\text{пл}}^-$ , мкг/мл	$0,242 \pm 0,014$	$0,821 \pm 0,143^*$	$0,665 \pm 0,147^*$	$0,219 \pm 0,021^{**}$
$NO_{2\text{эр}}^-$ , мкг/мл	$0,164 \pm 0,010$	$0,172 \pm 0,016$	$0,275 \pm 0,084$	$0,101 \pm 0,010^{*,**}$
$NO_{3\text{пл}}^-$ , мкг/мл	$3,284 \pm 0,172$	$7,521 \pm 1,418^*$	$7,547 \pm 1,243^*$	$2,309 \pm 0,224^{*,**}$
$NO_{3\text{эр}}^-$ , мкг/мл	$2,175 \pm 0,130$	$2,005 \pm 0,192$	$2,977 \pm 0,621$	$1,081 \pm 0,124^{*,**}$
$NO_{\text{пл}}$ , мкг/мл	$3,526 \pm 0,184$	$8,342 \pm 1,558^*$	$8,212 \pm 1,380^*$	$2,528 \pm 0,244^{*,**}$
$NO_{\text{эр}}$ , мкг/мл	$2,339 \pm 0,138$	$2,177 \pm 0,208$	$3,252 \pm 0,703$	$1,182 \pm 0,135^{*,**}$
Нв, г/л	$141,9 \pm 2,49$	$95,0 \pm 4,91^*$	$131,6 \pm 4,08^{*,**}$	$97,2 \pm 6,40^*$
Эр, Т/л	$6,42 \pm 0,15$	$4,30 \pm 0,18^*$	$5,65 \pm 0,21^{*,**}$	$4,21 \pm 0,31^*$
ЩП, отн. ед.	$0,67 \pm 0,02$	$0,66 \pm 0,02$	$0,71 \pm 0,02$	$0,70 \pm 0,02$
Л, Г/л	$9,76 \pm 0,43$	$10,94 \pm 0,49$	$9,69 \pm 0,43$	$8,74 \pm 0,84^{**}$
Тр, Г/л	$469,9 \pm 14,4$	$411,6 \pm 27,8$	$440,3 \pm 22,1$	$364,4 \pm 33,4^*$
ГТ, %	$43,8 \pm 0,73$	$29,2 \pm 1,52^*$	$39,2 \pm 1,19^{*,**}$	$28,9 \pm 1,75^*$

Примечание. Здесь и в табл. 2: \* $P < 0,05$  по отношению к норме (контроль); \*\* $P < 0,05$  по отношению к значениям при ГГ.

Таблица 2. Показатели кислородтранспортной функции крови в условиях модели гемической гипоксии ( $M \pm m$ )

Показатель	Контроль нормы (I)	Экспериментальная ГГ		
		ГГ-К (II)	L-арг. (III)	L-NNA (IV)
Нв, г/л	$141,9 \pm 2,49$	$95,0 \pm 4,91^*$	$131,6 \pm 4,08^{*,**}$	$97,2 \pm 6,40^*$
2,3-ДФГ, ммоль/л	$5,72 \pm 0,25$	$8,15 \pm 0,27^*$	$6,31 \pm 0,22^{*,**}$	$4,07 \pm 0,41^{*,**}$
$P_{aO_2}$ , мм рт. ст.	$90,63 \pm 1,13$	$72,70 \pm 3,92^*$	$91,81 \pm 0,87^{**}$	$78,07 \pm 3,41^{*,**}$
$P_{vO_2}$ , мм рт. ст.	$41,39 \pm 0,80$	$33,47 \pm 2,29^*$	$41,88 \pm 1,25^{**}$	$36,09 \pm 2,23^*$
$C_{\max O_2}$ , об. %	$19,302 \pm 0,368$	$12,925 \pm 0,668^*$	$17,901 \pm 0,555^{*,**}$	$13,221 \pm 0,870^*$
$C_{aO_2}$ , об. %	$18,42 \pm 0,36$	$12,16 \pm 0,62^*$	$17,10 \pm 0,56^{**}$	$12,64 \pm 0,78^*$
$C_{vO_2}$ , об. %	$13,56 \pm 0,38$	$6,89 \pm 0,76^*$	$12,07 \pm 0,67^{**}$	$7,82 \pm 0,96^*$
$avD_{O_2}$ , об. %	$4,85 \pm 0,11$	$5,28 \pm 0,18^*$	$5,03 \pm 0,14$	$4,82 \pm 0,20$
МОК, мл/(100 г · мин <sup>-1</sup> )	$33,70 \pm 1,18$	$25,35 \pm 1,59^*$	$32,30 \pm 0,76^{**}$	$28,65 \pm 1,88^*$
$V_{aO_2}$ , мл/(100 г · мин <sup>-1</sup> )	$6,183 \pm 0,224$	$3,156 \pm 0,332^*$	$5,559 \pm 0,271^{**}$	$3,626 \pm 0,314^*$
$V_{vO_2}$ , мл/(100 г · мин <sup>-1</sup> )	$4,548 \pm 0,184$	$1,832 \pm 0,286^*$	$3,940 \pm 0,270^{**}$	$2,246 \pm 0,302^{*,**}$
$V_{O_2}$ , мл/(100 г · мин <sup>-1</sup> )	$1,635 \pm 0,069$	$1,424 \pm 0,072^*$	$1,619 \pm 0,051^{**}$	$1,380 \pm 0,107^*$
SCR, отн. ед.	$3,84 \pm 0,12$	$2,35 \pm 0,18^*$	$3,49 \pm 0,19^{**}$	$2,70 \pm 0,26^*$
pH <sub>a</sub>	$7,381 \pm 0,008$	$7,254 \pm 0,019^*$	$7,383 \pm 0,008^{**}$	$7,266 \pm 0,023^*$
pH <sub>v</sub>	$7,347 \pm 0,008$	$7,233 \pm 0,019^*$	$7,364 \pm 0,006^{**}$	$7,247 \pm 0,022^*$

Реакции системы NO имели качественные особенности: увеличение содержания конечных метаболитов в плазме крови при отсутствии достоверных изменений в эритроцитах. Содержание  $\text{NO}_{2\text{пл}}^-$  в 3,39 раза превышало значение нормы ( $P < 0,001$ );  $\text{NO}_{3\text{пл}}^-$  — в 2,29 раза ( $P < 0,02$ );  $\text{NO}_{\text{пл}}$  — в 2,37 раза ( $P < 0,01$ ). В то же время показатель  $\text{NO}_{2\text{эр}}^-$  лишь на 4,88% превышал норму, а  $\text{NO}_{3\text{эр}}^-$  и  $\text{NO}_{\text{эр}}$  были меньше нормы на 7,82 и 6,93% соответственно.

Таким образом, воспроизведенная с помощью химического гемолиза модель ГГ характеризовалась типичными для гемической гипоксии нарушениями КТФ крови и качественными особенностями реакций системы NO [10].

В условиях модели под влиянием донатора NO L-аргинина происходило значительное увеличение показателей периферического эритрона (Эр — на 31,40%, Нв — на 38,53%, Гт — на 34,25%;  $P < 0,01$ ) и почти полное устранение анемии. Определялось восстановление газового состава и кислотно-основного состояния крови, доставки и потребления кислорода, а также кислородного режима крови:  $P_{\text{aO}_2}$  — до 101,41% нормы;  $C_{\text{maxO}_2}$  — до 92,74%,  $C_{\text{aO}_2}$  — до 92,85%,  $\text{avD}_{\text{O}_2}$  — до 103,63%, МОК — до 95,83%,  $V_{\text{aO}_2}$  — до 89,91%,  $V_{\text{O}_2}$  — до 99,03%, SCR — до 90,59%,  $\text{pH}_v$  — до 100,23% нормы. Практически достигалась нормализация КТФ крови.

Реакции собственно системы NO на стимуляцию имели необычную направленность. Прежде всего, достаточно значительно, на 19,00% в сравнении с величиной при ГГ, уменьшалось содержание  $\text{NO}_{2\text{пл}}^-$ , оставаясь при этом в 2,75 раза выше нормы. Содержание  $\text{NO}_{3\text{пл}}^-$  оставалось практически неизменным. В итоге, содержание NO в плазме крови имело тенденцию к уменьшению. Во-вторых, значительно увеличивалось образование NO в эритроцитах:  $\text{NO}_{2\text{эр}}^-$  — в 1,60 раза;  $\text{NO}_{3\text{эр}}^-$  — в 1,49 раза относительно значений при ГГ.

После применения блокатора NO-синтазы L-NNA содержание метаболитов NO в крови достоверно уменьшалось:  $\text{NO}_{2\text{пл}}^-$  — в 3,75 раза,  $\text{NO}_{2\text{эр}}^-$  — в 1,78 раза,  $\text{NO}_{3\text{пл}}^-$  — в 3,26 раза,  $\text{NO}_{3\text{эр}}^-$  — в 1,85 раза;  $\text{NO}_{\text{пл}}$  — в 3,30 раза;  $\text{NO}_{\text{эр}}$  — в 1,84 раза. Степень повреждения эритрона и нарушений КТФ крови оставалась на уровне контроля ГГ, т. е. угнетение образования NO потенцировало гипоксию.

Таким образом, донор оксида азота, стимулируя образование NO, вызывает восстановление до нормы состояние системы NO и КТФ крови, а угнетение образования NO проявляется отсутствием реакций восстановления не только системы NO, но и КТФ крови. Более благоприятные эффекты целенаправленной регуляции метаболизма NO в условиях модельной ГГ наблюдаются при наличии избыточных количеств его предшественников, которые, вероятно, могут образовываться в результате гемолиза эритроцитов. Выявленные на модели ГГ эффекты взаимодействия NO и КТФ крови и их функциональной взаимосвязи подтверждены математически с помощью корреляционного и регрессионного анализов [11]. Это определяет возможность регуляции функционального состояния кислородтранспортной системы посредством воздействия на NO за счет нормализации процессов анаболизма и катаболизма под контролем физиологического уровня его метаболитов в крови и тканях организма.

Анализ результатов и теоретические обобщения обосновывают возможность коррекции гемической гипоксии, обусловленной гемолизом эритроцитов, с помощью биохимической и фармакологической регуляции нитроксидзависимых механизмов регуляции кислородтранспортной функции крови.

1. Furchgott R. F., Zawadzki J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine // Nature. — 1980. — **288**, No 5789. — P. 373–376.

2. Лановенко І. І. Оксид азоту – універсальний регулятор клітинних функцій // Гематологія і переливання крові. Міжвід. зб. – 2008. – 2, вип. 34. – С. 227–234.
3. Уразаев А. Х., Зефирова А. Л. Физиологическая роль оксида азота // Успехи физиол. наук. – 1999. – 30, № 1. – С. 54–72.
4. Меньшикова Е. Б., Зенков Н. К., Реутов В. П. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях // Биохимия. – 2000. – 65, № 4. – С. 485–503.
5. Фролькіс В. В., Безруков В. В., Мала Л. Т. та ін. Механізми дії оксиду азоту на серцево-судинну систему та патогенетичне лікування захворювань серцево-судинної системи // Кровообіг та гемостаз. – 2003. – № 2. – С. 42–53.
6. Голиков П. П. Оксид азота в клинике неотложных состояний. – Москва: Медпрактика-М, 2004. – 180 с.
7. Середенко М. М., Дударев В. П., Лановенко И. И. и др. Механизмы развития и компенсации гемической гипоксии. – Киев: Наук. думка, 1987. – 200 с.
8. LeCras T. D., McMurtry I. F. Nitric oxide production in the hypoxic lung // Amer. J. Physiol. – 2001. – 280, No 4. – P. 1575–1582.
9. Сагач В. Ф., Доломан Л. Б., Коцюруба А. В. та ін. Збільшений вміст стабільних метаболітів оксиду азоту в крові мешканців високогір'я // Фізіол. журн. – 2002. – 48, № 5. – С. 3–8.
10. Лановенко І. І., Гащук Г. П., Коцюруба А. В., Яцульчак М. Ю. Зміни і взаємодія оксиду азоту і кисневотранспортної функції крові при гемічній гіпоксії, спричиненій залізодефіцитом // Гематологія і переливання крові. Міжвід. зб. – 2008. – 2, вип. 34. – С. 234–242.
11. Лановенко И. И., Коцюруба А. В. Алгоритм исследования взаимодействия оксида азота и кислород-транспортной функции крови в экспериментальных условиях // Новое в гематологии и трансфузиологии. Междунар. науч.-практ. рецензир. сб. – 2007. – Вып. 7. – С. 101–109.
12. Green L. C., David A. V., Glogowski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids // Ann. Biochem. – 1982. – 126, No 1. – P. 131–138.

Государственное учреждение “Институт гематологии  
и трансфузиологии АМН Украины”, Киев  
Институт биохимии им. А. В. Палладина  
НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 22.01.2009

**I. I. Lanovenko, A. V. Kotsuruba, A. P. Gaschuk**

### **Interaction of nitric oxide and oxygen blood transport function in haemic hypoxia of hemolytic genesis**

*In experiments on rats with modeling haemic hypoxia of hemolytic genesis, the damage of OBTF (delivery and use O<sub>2</sub> decrease, metabolic acidosis) and an increase in the content of stable metabolites NO (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) in plasma of blood are determined. Activation of the generation of NO (by means of L-arginine) restores OBTF; and the depression of the generation of NO (by means of L-NNA) increases the NO metabolites deficiency and OBTF damages. The possibility of a haemic hypoxia correction by means of the use of nitric oxide donors is grounded.*