

ОБЗОРЫ

ЭРИТРОЦИТЫ И NO: ФАКТЫ, ГИПОТЕЗЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ, ПЕРСПЕКТИВЫ
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

М.В. Кручинина¹, А.А. Громов¹, И.О. Светлова¹, В.М. Генералов², А.С. Сафатов²,
Г.А. Буряк², В.Н. Кручинин³, С.В. Рыхлицкий³

¹ ФГБУ «НИИ терапии и профилактической медицины» СО РАМН
630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1

² ФГБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
633159, пос. Кольцово, Новосибирская область

³ ФГБУН Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 13

Данный обзор посвящен рассмотрению взаимосвязей между эритроцитами и оксидом азота, роли клеток красной крови в качестве участников вазорегуляции. Представлены результаты исследований, касающихся изучения физиологического происхождения вазоактивного NO в условиях гипоксии, источников оксида азота, связанного с эритроцитами. Проанализированы данные о влиянии NO на деформируемость эритроцитов. Изложена гипотеза недостаточной биодоступности NO при хранении крови, обусловленной дегенеративными изменениями в эритроцитах (повышение уровня свободного гемоглобина и микрочастиц из клеток красной крови). Приведены результаты оценки измерения уровня гемоглобина, связанного с NO, с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния света. Определены перспективы в отношении диагностики и терапии определения и изменения уровня эритроцит-производного NO и АТФ.

Ключевые слова: эритроциты, оксид азота, аденозинтрифосфат, эндотелиальные клетки, вазорегуляция, деформируемость, биодоступность NO, спектроскопия комбинационного рассеяния света.

В последние годы возрос интерес к изучению нарушений на уровне микроциркуляторного русла для целого ряда сердечно-сосудистых патологий, в том числе атеросклероза, ишемической болезни сердца, артериальной гипертензии,

цереброваскулярной болезни. Это обусловлено стремлением к более глубокому исследованию патогенеза заболеваний, выявлению ключевых звеньев их развития, а также поиску механизмов воздействия с помощью лекарственных препаратов.

Кручинина Маргарита Витальевна — д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории гастроэнтерологии, e-mail: kruchmargo@yandex.ru

Громов Андрей Александрович — канд. мед. наук, старший научный сотрудник, рук. группы исследования гемостаза лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, e-mail: gromovcenter@rambler.ru

Светлова Ирина Олеговна — канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории гастроэнтерологии, e-mail: iosvetlova@yandex.ru

Генералов Владимир Михайлович — д-р техн. наук, ведущий научный сотрудник отдела биофизики и экологических исследований, e-mail: vmgeneral@mail.ru

Сафатов Александр Сергеевич — д-р техн. наук, зав. отделом биофизики и экологических исследований, e-mail: safatov@vector.nsc.ru

Буряк Галина Алексеевна — научный сотрудник отдела биофизики и экологических исследований, e-mail: buryak@vector.nsc.ru

Кручинин Владимир Николаевич — канд. хим. наук, научный сотрудник лаборатории эллипсомеррии, e-mail: vladd.kruch@yandex.ru

Рыхлицкий Сергей Владимирович — канд. техн. наук, зав. лабораторией эллипсомеррии, e-mail: rhl@isp.nsc.ru

© Кручинина М.В., Громов А.А., Светлова И.О., Генералов В.М., Сафатов А.С., Буряк Г.А., Кручинин В.Н., Рыхлицкий С.В., 2014

В свете этого понятен интерес к клеткам красной крови, как одним из самых многочисленных участников процессов, происходящих на микроциркуляторном уровне. В среднем у человека эритроциты имеют объем $\sim 8,7 \cdot 10^{-14}$ л, составляют в диаметре 6–8 мкм и живут в среднем 110–120 дней до разрушения в таких органах, как селезенка. Эритроциты составляют около 40–45 % от общего объема крови взрослого человека (5 л), таким образом, в среднем взрослый имеет около 2 л эритроцитов. Эритроцит также имеет множество уникальных особенностей в сравнении с другими типами клеток; одна из них состоит в том, что в нем отсутствует ядро и митохондрии.

Тем не менее эритроциты не полностью лишены клеточных структур. Так, известно, что эритроцит имеет очень активную двуслойную клеточную мембрану, обладает транспортером глюкозы (GLUT1), имеет многие из тех же ионных насосов, что и другие клетки, и даже полагают, что он участвует в общем контроле кровотока. В дополнении к транспорту кислорода и диоксида углерода другой важной физиологической функцией эритроцитов является процесс гипоксической вазодилатации. Эта функция регулирует местный кровоток в направлении преимущественной перфузии и обеспечения кислородом самых гипоксических тканей, включает комбинированную активность эритроцитов и эндотелиальных клеток по регулированию тонуса гладких мышц артериол [1].

Данные многих авторов свидетельствуют о том, что эритроциты могут выступать маркерами возникновения и прогрессирования сердечно-сосудистых заболеваний. Так, в 1996 г. была выдвинута гипотеза о ведущей роли неишемической гипоксии в патогенезе атеросклероза, вызванного нарушением деформируемости эритроцитов [2]. Этот параметр является одним из факторов травматического повреждения эндотелия в области разветвления сосудов, стеноза за счет повышения местного напряжения сдвига [3].

В ряде исследований [4, 5], данные которых были обобщены в мета-анализе Cochrane (2009 г.), уровень содержания полиненасыщенных жирных кислот в мембранах эритроцитов декларирован как независимый маркер внезапной сердечно-сосудистой смерти. Работами D.N. Tziakas с соавт. [6] установлено, что значительное повышение уровня холестерина в мембранах клеток красной крови – предиктор развития острого инфаркта миокарда. Показатель вариабельности объема эритроцитов рассматривают как маркер фатальных событий, осложнений среди пациентов с острым инфар-

ктом миокарда, выявлена ассоциация этого параметра с наличием атеросклероза сонных артерий [7–11]. Г.Г. Гогин с соавт. [12] отметил, что изменения в параметрах эритроцитов (их способность деформироваться, жесткость мембран) предшествуют появлению цифр повышенного артериального давления (АД) у пациентов. Поэтому авторы предложили гипотезу о первичности изменения эритроцитов с последующими компенсаторными гемодинамическими изменениями, включающими повышение АД, для продвижения «жестких» клеток в микроциркуляторном русле. Более того, в последние годы ряд авторов рассматривают гипертензию как болезнь микроциркуляции [13], поскольку именно на этом уровне реализуется механизм сужения просвета артериол, переходя из стадии активной миогенной вазоконстрикции в стадию автотрофного внутреннего ремоделирования стенок сосудов. Во многих экспериментальных и клинических исследованиях по гипертензии выявляют микрососудистое разрежение, определяемое как снижение пространственной плотности микрососудистых сетей, причем подобные находки обнаружены у нормотензивных людей с наследственной предрасположенностью к артериальной гипертензии (АГ) [14]. Возможно, наблюдаемое разрежение способствует повышению периферического сосудистого сопротивления при гипертонической болезни. Наши предшествующие исследования выявили различия в параметрах эритроцитов, связанные со степенью артериальной гипертензии [15].

С момента открытия и идентификации оксида азота (NO) в 1998 г. не прекращаются исследования по выяснению его метаболизма, возможностей определения наличия соединения и его производных. Вазодилатирующие эффекты NO реализуются на микроциркуляторном уровне, что напрямую связано с функцией эндотелия [16], а капилляры (где выполняют свои функции эритроциты) состоят исключительно из эндотелиальных клеток. NO синтезируется в эндотелии NO-синтазой, а затем действует паракринным путем посредством диффузии в подлежащие клетки гладкой мускулатуры для активации гуанилатциклазы, что приводит к релаксации гладкой мышцы и вазодилатации [17, 18].

Остается весьма актуальной тема взаимоотношений эритроцитов и NO, поскольку эти аспекты весьма перспективны как в плане возможностей вмешательства в метаболизм NO, так и в отношении диагностики и новых аспектов терапии целого ряда заболеваний.

Работы последних десятилетий демонстрируют как факты, подтверждающие тесную связь

клеток красной крови и NO, так и предлагают гипотезы их взаимодействия.

Роль эритроцитов в качестве участников вазорегуляции в исследованиях рассматривается с двух точек зрения: сначала как прямого «освободителя» NO, затем – как стимулятора освобождения NO через синтез аденозинтрифосфата (АТФ) эритроцитами. До нынешнего времени не прекращаются дебаты относительно того, каково физиологическое происхождение вазоактивного NO в условиях гипоксии.

Известно о трех основных источниках NO, два из которых происходят из эритроцитов, а именно: S-нитрозотиолы из гемоглобина, и NO, производимого с помощью нитритредуктазы гемоглобина. Дополнительно описан потенциальный механизм, состоящий в индуцировании АТФ продукции NO в эндотелии через эндотелиальную NO-синтазу (eNOS) (рис. 1), взято из [19].

S-НИТРОЗОТИОЛЫ КАК ИСТОЧНИК ВАЗОАКТИВНОГО NO

Stamler с соавт. сообщили, что NO держится в стабильной форме как S-нитрозотиолы на высококонсервативном остатке цистеина в бета-цепи гемоглобина [20, 21]. Вазоактивность этого вида NO затем сохраняется и защищается от воздействий окружающей химической среды более стабильной формой. Важным фактором как в отношении эритроцитов, так и крови в целом является то, что существует много химических соединений, включая гем, кислород и небольшие молекулы тиолов, которые могут взаимодействовать с NO, устраняя его вазоактивность.

Показано, что период полураспада NO может зависеть от насыщения кислородом [22], вместе с тем это время оценивается менее нескольких секунд [23, 24]. Поэтому весьма перспективна теория о существовании более стабильных форм NO для достижения клеток гладкой мускулатуры.

Кроме того, формирование S-нитрозотиолов активно происходит при высокой насыщенности кислородом, а реализация механизма освобождения NO более вероятна в условиях гипоксии, поскольку гемоглобин изменяет конфигурацию при низкой насыщенности кислородом [21, 25].

НИТРИТРЕДУКТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕМОГЛОБИНА

Авторы ряда работ предоставляют доказательства того, что биодоступным источником NO является нитритредуктазная активность ге-

моглобина, которая впервые была исследована в начале 1980-х годов [26]. Многие нитриты, подобные упомянутому ранее S-нитрозотиолам, являются вероятной устойчивой формой хранения NO и присутствуют в плазме крови в концентрации от 500 до 1000 нМ [27]. Фактом, подтверждающим эту гипотезу, является наблюдаемый градиент концентрации нитритов в артериальной и венозной крови [27, 28]. Хотя не совсем понятны конкретные механизмы, снижение концентрации нитритов по мере дезоксигенации крови указывает на то, что нитриты потребляются, возможно, для образования NO [29]. Кроме того, в этом исследовании наблюдали увеличение кровотока, связанное с инфузией нитрита *in vivo*.

Авторы исследований затрудняются в трактовке реакции отрыва NO от гемоглобина, однако известно, что нитритредуктазная активность гемоглобина наблюдается только в дезоксигенированном состоянии [26], реализуя механизм контроля за продукцией NO.

СТИМУЛИРОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ОКСИДА АЗОТА ОСВОБОЖДЕНИЕМ АТФ ИЗ ЭРИТРОЦИТОВ

АТФ и пуриnergические рецепторы. Известно, что приток АТФ к эндотелиальным клеткам приводит к увеличению синтеза оксида азота [30, 31]. АТФ представляет особый интерес, поскольку он присутствует в миллимолярных количествах в эритроцитах [32–35]. Выявлено и частично охарактеризовано множество рецепторов к АТФ на различных клетках [30, 36–39]. Так, P2X пуриnergический рецептор в сосудистом русле присутствует в основном на сосудистых гладкомышечных клетках, его активация приводит к сокращению этих клеток [37, 40, 41]. В отличие от этого, P2Y-рецептор обнаружен, прежде всего, на эндотелиальных клетках [30, 36, 38, 40].

Связывание АТФ с эндотелиальным P2Y-рецептором приводит к синтезу NO [30, 32] и/или вазодилатирующим метаболитам арахидоновой кислоты [42, 43]. Таким образом, АТФ, приложенный непосредственно к гладкомышечной мускулатуре интактных сосудов, должен привести к сужению сосудов посредством активации рецепторов P2X.

В отличие от этого, АТФ, приложенный со стороны просвета сосуда, например, тот, что освобожден в процессе циркуляции из эритроцитов, приводит к эндотелий-зависимой вазодилатации посредством взаимодействия с рецептором P2Y, присутствующим на эндотелиальных клетках, с последующим высвобождением из них NO [30, 41].

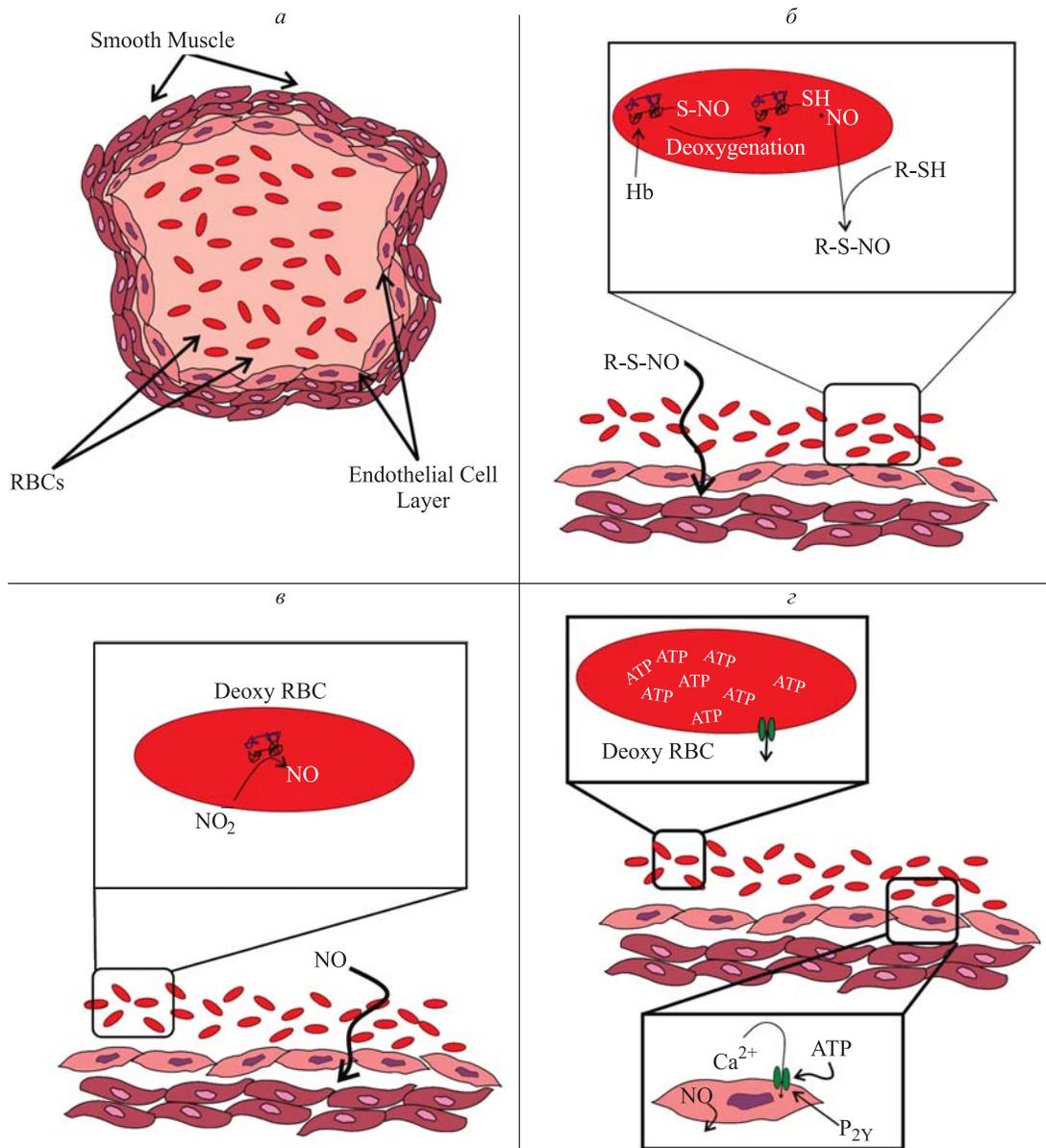


Рис. 1. Предполагаемые механизмы опосредованной эритроцитами вазодилатации [19].

a – типичное сечение кровеносного сосуда. Центр этого сечения содержит эритроциты, плазму и другие компоненты крови. Внутренний слой стенки сосуда состоит из эндотелиальных клеток, которые окружены гладкой мускулатурой; *б* – графическое представление о механизме SNO-Hb, в котором связанный с цистеином NO высвобождается, когда гемоглобин переходит в деоксигенированную конфигурацию. Затем NO способен диффундировать из эритроцита; в плазме крови он реагирует со свободными тиоловыми соединениями, такими как глутатион или альбумин. Эти соединения доводят NO до стенки сосуда, где он должен диффундировать к клеткам гладкой мускулатуры, чтобы вызвать расширение кровеносных сосудов; *в* – механизм нитритредуктазной активности гемоглобина. Нитриты диффундируют в эритроцит, где дезоксигенированный гемоглобин может проявлять нитритредуктазную активность, производя NO. Этот NO может затем диффундировать через эндотелий к гладким мышцам, вызывая расширение кровеносных сосудов; *г* – АТФ-опосредованный механизм. АТФ активно высвобождается в условиях гипоксии, затем диффундирует к эндотелию, где он взаимодействует с P₂Y-рецептором, вызывая поток кальция в клетку. Это активирует eNOS, производящую NO, который затем может диффундировать из эндотелиальной клетки к гладкой мускулатуре сосуда.

АТФ-стимуляция NO в эндотелии. В ряде исследований показано, что при воздействии гипоксической среды эритроциты освобождают до $2\mu\text{M}$ АТФ, и этот АТФ способен активировать eNOS [32, 44–46]. Более того, известно, что при достижении эндотелия АТФ может активировать eNOS через P2Y-рецепторы [30, 47, 48]. Этот механизм, как и описанный выше, включает эритроциты как посредника в регуляцию сосудистого тонуса. Он имеет преимущества в связи со стабильностью АТФ в кровотоке в течение более длительных временных промежутков. Кроме того, вазоактивная форма NO образуется ближе к клеткам гладких мышц – в эндотелии, в противоположность таковой из эритроцитов. В этом случае для нестабильной молекулы NO необходимо пройти меньшее расстояние в процессе диффундирования к гладким мышцам (через однослойную клеточную мембрану эндотелиальных клеток), а не через эритроциты и эндотелиальный слой.

АТФ-стимуляция производства NO в тромбоцитах. Основная функция тромбоцитов в крови включает гемостаз и предотвращение потери крови через свертывание. Тромбоциты обычно циркулируют в кровотоке, не адгезируя на эндотелиальных клетках, выстилающих сосудистые стенки; однако, когда происходит травма и обнажается субэндотелиальный коллаген, тромбоциты активируются. Эта активация характеризуется изменением формы тромбоцитов, что позволяет клеткам прилипнуть к стенкам сосуда, а также привлекать другие циркулирующие тромбоциты к растущему тромбу [49, 50]. Тем не менее существуют некоторые другие эндогенные агонисты, такие как тромбин, АТФ, АДФ, тромбоксан A2 (ТХА2), серотонин и адреналин, которые также способствуют активации тромбоцитов [51]. Показано, что NO также выступает посредником этого процесса путем активации растворимой гуанилатциклазы (GC), которая инициирует протеинкиназаG(PKG)-зависимый путь [52]. NO кровотока производится не только эндотелиальными клетками, но также и самими тромбоцитами [53].

Аденин-рецепторы, обнаруженные на тромбоцитах, являются основными детерминантами в функции тромбоцитов и включают P2Y₁ и P2Y₁₂ (оба АДФ-рецепторы) и P2X₁ (АТФ-рецептор) [54, 55]. Как полагают, оба типа рецепторов участвуют в агрегации тромбоцитов, однако доказательств роли P2X₁ в агрегации не убедительны. Есть сообщения, которые показывают, что P2X₁ не функционирует в агрегации тромбоцитов [56].

Измерения притока Ca^{2+} показали, что АТФ может стимулировать приток Ca^{2+} в тромбоци-

ты через рецептор P2X₁ [57]. Эти повышенные уровни Ca^{2+} могут поднять концентрацию биодоступного Ca^{2+} -кальмодулина, тем самым стимулируя NO-синтазы и производство NO.

На основе этих сообщений очевидно, что АТФ играет важную роль в тромбоцитарном NO-производстве. Исследования агрегации тромбоцитов показали ее повышение как при низких, так и при высоких концентрациях АТФ. Вполне возможно, что при низких уровнях АТФ недостаточное производство NO ингибирует тромбоцитарную активацию, но при более высоких уровнях АТФ NOS может стать насыщенным, и Ca^{2+} -кальмодулиновый комплекс может активировать GP IIb-IIIa комплекс (интегрин мембран вовлекался в активацию/агрегацию тромбоцитов) на мембране тромбоцитов [58]. Обе эти ситуации будут зависеть от количества АТФ, освобожденного из эритроцитов.

Влияет ли оксид азота на способность эритроцитов освободить АТФ? Данные литературы свидетельствуют о том, что эритроциты имеют возможность выделять АТФ в ответ на такие стимулы, как индуцированную потоком механическую деформацию [59], гипоксию [45, 46], ацидоз [32], а также различные молекулярные реагенты [60–62], точные механизмы которых в настоящее время не ясны. Кроме того, устанавливается способность эритроцитов к освобождению NO в ответ на гипоксию [63]. Интересно, что кроме этих сообщений с описанием высвобождения этих двух молекул (АТФ и NO) из эритроцитов, есть также исследования, дающие основание предполагать, что уровни NO или NO-метаболитов в эритроцитах могут непосредственно повлиять на способность этой клетки к освобождению АТФ.

Есть сообщения, что NO, добавленный к эритроцитам, может увеличить деформируемость клеток [64, 65]. В этом контексте можно было бы ожидать увеличение высвобождения АТФ из эритроцитов под воздействием деформации.

В противоположность данным исследованиям есть работы [66, 67], которые позволяют предположить, что добавление NO к эритроцитам может увеличить жесткость клеток; в свою очередь такое снижение деформируемости сократит уровень эритроцит-извлеченного АТФ, происходящего под воздействием деформации. Показано, что прямое добавление NO к эритроцитам может уменьшить способность этой клетки к освобождению АТФ.

Основываясь на этих сообщениях, складывается впечатление неуверенности доказательств о влиянии NO на высвобождение АТФ из эритроцитов. Тем не менее детальный ана-

лиз этих исследований выявил интересную особенность: в частности, оказывается, что эффект влияния NO на эритроциты зависит от концентрации.

Недавно было показано, что добавление NO_2^- к эритроцитам приводит либо к снижению, либо к увеличению количества освобожденного АТФ из этих клеток [68]. Было высказано предположение, что добавление нитрита к эритроцитам приводит к производству внутриклеточного АТФ за счет увеличения активности мембрано-связанного гликолитического комплекса [69]. Было также показано, что непосредственное добавление NO к эритроцитам привело к увеличению высвобождения АТФ, когда клетки подвергали воздействию поток-индуцированной деформации [70]. Тем не менее при более высоких уровнях NO добавление его к эритроцитам приводит к снижению высвобождения АТФ.

Эти исследования доказывают, что добавление NO или NO-метаболитов, таких как нитрит, действительно может влиять на освобождение АТФ из эритроцитов, и важно то, что этот эффект, по-видимому, зависит от дозы.

Проведенные исследования стали важными с терапевтической точки зрения при рассмотрении недавней работы, демонстрирующей, что гидроксимочевина (HU) — единственно доказанная терапия для людей с серповидно-клеточной анемией. Вероятно, ее эффективность обусловлена стимуляцией eNOS эритроцитами. Было сделано заключение, что производство NO самими эритроцитами связано с повышенным выделением АТФ из клеток красной крови после краткой инкубации с гидроксимочевинной [70]. Предыдущие исследования связывали некоторые из эффектов влияния гидроксимочевины с оксидом азота [71, 72]; однако результаты, показывающие, что гидроксимочевина имела прямое влияние на продукцию NO самими эритроцитами и что этот NO впоследствии содействовал высвобождению АТФ из эритроцитов, были не приоритетны.

Способность эритроцитов деформироваться играет важную роль в регуляции тонуса легочной сосудистой сети путем механического воздействия на стенку капилляров и активации высвобождения ими сосудосуживающих веществ. Высказано предположение о существовании уникального механизма контроля за сопротивлением легочных сосудов, согласно которому высвобождение АТФ из эритроцитов происходит в ответ на их механическую деформацию, обуславливая стимуляцию синтеза вазодилатора NO [73].

Вопросы источников NO и его метаболизма приобретают особую значимость в свете

рассмотрения негативных последствий у пациентов вследствие переливания длительно хранимых эритроцитов [19].

Исследования показывают, что S-нитрозилирование гемоглобина (SNO-Hb) приводит к хранению пула NO в эритроцитах, которые могут быть выпущены в гипоксические среды [74–76], и, как было показано, уровень S-нитрозилированного Hb снижается в процессе хранения эритроцитов [77]. Другие исследователи показали, что нитрит (который присутствует при высокой концентрации в плазме) может быть преобразован гемоглобином в NO [29, 78–80]. В этой модели дезоксигенированный гемоглобин, который имеется в высоких концентрациях в гипоксических тканях, связывает нитрит и протон, чтобы произвести NO и метгемоглобин. Если в долго хранимой крови нарушена нитрит-редуктазная активность гемоглобина, то этот источник NO будет прерван. Также изменения в концентрации нитрита при хранении могут изменить способность трансфузий влиять на NO-опосредованную вазодилатацию.

В каждой из этих моделей NO должен диффундировать из эритроцитов к гладким мышцам, чтобы произвести расширение сосудов [81, 82]. В третьей модели, которая потенциально может объяснить сниженную продукцию NO долго хранящимися эритроцитами, высвобождение АТФ эритроцитами (стабильным механизмом для стимулирования эндотелиальной продукции NO [34, 83, 84]) может быть нарушено в процессе хранения крови [85].

В качестве альтернативного механизма, который мог бы также лежать в основе снижения гипоксической вазодилатации сосудов после переливания крови, рассматривают следующий: перелитые долго хранимые эритроциты могут производить угнетающий фактор, который прерывает обычную передачу сигналов NO между эндогенными эритроцитами, эндотелием и подлежащими гладкими мышцами. Этот механизм, который может функционировать в сочетании с (или вместо) дефектом синтеза, описанным выше, является убедительным, потому что это может позволить небольшому объему переливаемых долго хранимых эритроцитов ухудшить гипоксическую вазодилатацию в целом. Срыв передачи NO долго хранимыми эритроцитами может быть опосредован свободным гемоглобином (или другими компонентами эритроцитов), выпущенным в плазму как следствие гемолиза эритроцитов, или посредством гемоглобина или других факторов, заключенных в микрокапсулах, производных эритроцитов [81, 82, 86]. Механизм воздействия свободного гемоглобина

подтверждается клиническими и экспериментальными исследованиями, показывающими, что плазменный свободный гемоглобин может удалять NO, снижая его биодоступность и вызывая сосудистые осложнения [87–89]. Микрочастицы эритроцитов важны, поскольку они могут проходить ближе к эндотелию, чем интактные эритроциты, принося закрытый гемоглобин близко к местам синтеза NO, что может в последующем усиливать удаление NO после переливания крови [90]. Хотя неповрежденные эритроциты могут также потенциально мешать NO-опосредованной вазодилатации. В настоящее время доказательств этого механизма недостаточно.

Авторы опубликованных данных [90] предложили модель с участием свободного гемоглобина и микрочастиц (следствие дегенеративно измененных в ходе хранения эритроцитов), которые могут снизить биодоступность NO.

В связи с данными обстоятельствами была выдвинута гипотеза «двойного удара» для объяснения того, как длительно хранимые эритроциты могут привести к вредным последствиям у некоторых трансфузионных реципиентов, которая была названа «гипотезой недостаточной биодоступности NO (INOBA)» [91–94]. Эта гипотеза предполагает, что как изменения, происходящие в эритроцитах во время хранения, так и патологические процессы у трансфузионного реципиента (например, дисфункция эндотелия) могут независимо регулировать местный уровень NO. Сумма этих факторов определяет биодоступность NO, которая контролирует вазодилатацию и ток крови. Когда биодоступность NO снижается ниже критического порога, местный кровоток и доставка O₂ оказываются недостаточными для удовлетворения потребностей тканей, приводя к органам осложнениям. Недавние исследования подтверждают этот механизм двойного удара для объяснения негативных последствий переливания крови длительного хранения [92, 95]. Что касается роли эритроцитов в гипотезе INOVA, ряд исследований подтвердили, что долго хранимые эритроциты транспортируют и/или синтезируют более низкие количества NO, чем свежие эритроциты [75, 77, 92, 96].

В то же время продолжается дискуссия о клинических эффектах влияния низких уровней плазменного свободного гемоглобина на вазореактивность [90, 97]. Ряд исследователей предполагают, что свободный гемоглобин или другие вещества, выделяемые из хранимых эритроцитов, опосредуют ингибирующие эффекты посредством захвата постэндотелиального NO. Для примера, Donadee и коллеги [90] показали, что супернатант, содержащий свободный гемогло-

бин из долго хранимых человеческих эритроцитов, значительно повышает среднее артериальное давление при инфузиях анестезированным крысам. В отличие от этих результатов, работа Jason T. Alexander и соавт. [19] показала, что плазменные составляющие супернатанта, включая свободный гемоглобин и микрочастицы, не были единственной причиной сосудосуживающего эффекта. Скорее, длительно хранимые эритроциты сами способны ингибировать NO-опосредованную вазодилатацию (либо препятствуя постэндотелиальной передаче NO к гладкой мускулатуре, либо подавляя эндотелиальное производство NO), как недавно подтвердили другие исследования [98].

ВЛИЯНИЕ NO НА ДЕФОРМИРУЕМОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ

Для выяснения влияния NO на деформируемость эритроцитов выполнен ряд экспериментальных исследований. При этом принималось во внимание, что NO, являясь свободнорадикальной молекулой, участвует в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма, проявляя в различных ситуациях свойства прооксиданта либо гасителя радикалов (например, взаимодействие NO с супероксиданионом является важным механизмом инактивации этого медиатора) [99]. В то же время данное соединение является важным фактором регуляции процессов транспорта кислорода (сосудистый тонус, кислородсвязывающие свойства гемоглобина) [100]. Активный метаболит молсидомина, спонтанно высвобождающий NO, в опытах на крысах *in vivo* и *in vitro* улучшает деформируемость эритроцитов, измеряемую с помощью лазерного дифрактометра, предположительно вследствие прямого действия этого соединения на эритроциты [95]. При перегревании в условиях ингибирования NO-синтазы выявлено наиболее значимое уменьшение деформируемости эритроцитов на 24,6 % ($0,24 \pm 0,018$, $p < 0,01$, в сравнении с контролем $0,31 \pm 0,07$), в то время как у крыс, подвергавшихся только перегреванию, индекс деформируемости эритроцитов составил $0,26 \pm 0,013$ ($p < 0,01$), а введение донора NO, наоборот, содействовало улучшению ригидности эритроцитов [101].

В случае лихорадки у кроликов наиболее выраженное ухудшение деформируемости эритроцитов на 51,2 % ($p < 0,01$) отмечается через 120 мин после введения в кровоток липополисахаридов (ЛПС) [102]. Предварительная инъекция ингибитора NO-синтазы до введения ЛПС N-нитро-L-аргинина вызывала менее значимое снижение индекса деформируемости эритроцитов, чем

совместное введение L-аргинина и соответствующего ингибитора. В обеих сериях опытов имели место сильные корреляционные связи между значениями индекса деформируемости эритроцитов и показателями кислородтранспортной функции крови, перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы [103].

Обработка эритроцитов конкурентными аналогами L-аргинина снижает величину гипотонического гемолиза, изменяет транспорт K^+ и обуславливает спинальные изменения морфологии эритроцитов [104]. Деформируемость эритроцитов в образцах крови, обработанных нитропруссидом натрия, улучшалась как в нормо-, так и гипоксических условиях [105]. Однако инкубация цельной крови здоровых добровольцев с L-аргином или блокаторами NO-синтазы практически не влияла на деформируемость эритроцитов, оцениваемую при высоких скоростях сдвига [106]. В то же время функциональное состояние эритроцитов активно влияет на регуляторные механизмы гемодинамического аппарата (например, формируя тонус легочных сосудов, являясь источником различных вазодилататоров) [104].

Увеличение жесткости эритроцитов при введении в организм ЛПС в условиях угнетения синтеза NO менее выражено, и оно коррелирует с активностью процессов свободнорадикального окисления, что свидетельствует об участии L-аргатиН-NO-СНСТеМbi в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма через изменение деформируемости эритроцитов.

БУДУЩИЕ НАПРАВЛЕНИЯ

Исследования, связанные с потенциальной ролью эритроцитов в качестве участников регуляции кровотока, не новы, хотя произошел значительный рывок с начала 1990-х годов в объяснении точного механизма, посредством которого роль эритроцитов является определяющей. Тем не менее осталось много вопросов, включая взаимосвязь эритроцитов, NO и АТФ, которые требуют ответа. Например, в условиях гипоксии очевидно, что эритроцит высвобождает как АТФ, так и NO. Обе ли эти молекулы участвуют в релаксации гладких мышц? Или, возможно, одна из молекул (АТФ) предназначена для стимуляции образования NO в других тканях, таких как эндотелий; в то время как NO, полученный непосредственно из эритроцитов, имеет другую, очень важную функцию, а именно – ингибирование агрегации тромбоцитов в присутствии высоких уровней АТФ, которые вырабатываются эритроцитами в условиях гипоксии? Эти возможности показаны на рис. 2.

Еще одна область, которая потребует дальнейшего изучения – это клиническая роль эритроцит-производного NO и АТФ. Исследования показали, что люди с диабетом [107, 108], муковисцидозом [59] и первичной легочной гипертензией имели эритроциты, которые высвобождают меньше АТФ по сравнению с эритроцитами цельной крови лиц контрольной группы без этих патологий.

Кроме того, известно, что эти пациенты имеют гиперактивные тромбоциты, нарушения

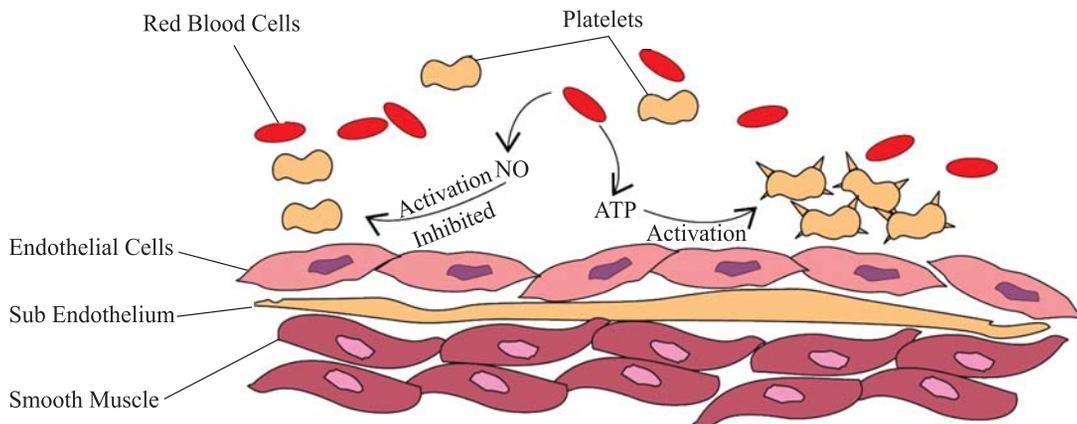


Рис. 2. Определение ролей освобожденных из эритроцитов АТФ и NO [19].

В условиях гипоксии эритроциты, как известно, высвобождают как АТФ, так и NO. В то время как АТФ, как показано, участвует в эндотелиальной продукции NO, она также может иметь возможность активировать тромбоциты (либо через АТФ, или АДФ-активацию тромбоцитарных пуринергических рецепторов); однако NO, который высвобождается в условиях гипоксии, будет ингибировать активацию тромбоцитов, которая может возникнуть в связи с высвобождением АТФ

кровотока в целом и, в случае пациентов с муковисцидозом, более низкие уровни NO-биодоступности.

В этом свете весьма интересны предложенные методы оценки уровня NO в эритроцитах. Так, O.V. Rodnenkov и соавт. [109] с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния света (Raman) оценивали изменения конформации порфирина и содержания комплексов гемоглобина (d-Hb, ox-Hb и Hb-NO). Соотношение пиков Raman-спектра I1355/I1564 свидетельствовало о способности дезоксигемоглобина (d-Hb) связывать O₂ и NO; комплекс с оксидом азота без нарушения связи между белком и гемопорфирином оценивался по соотношению пиков I1626/I1580. Комплекс Hb с оксидом азота при разрушении связи между белком и гемопорфирином регулирует способность Hb отдавать O₂ (I1668/I1580). Установлено, что при ишемической болезни сердца, гипертонии и недостаточности кровообращения уменьшается содержание комплексов Hb-NO (II), что снижает сброс O₂; горная гипоксия увеличивает содержание комплексов ox-Hb и Hb-NO (II), что усиливает обмен O₂ [109]. Это и было подтверждено изменением соотношения пиков в Raman-спектрах.

Возможность модулировать высвобождение АТФ и биодоступность NO, связанного с эритроцитами, может оказаться полезной в разработке терапевтических подходов целого ряда заболеваний. Приведенные выше недавние исследования подтвердили важность участия эритроцитов в хранении, метаболизме и биодоступности NO.

В заключение следует сказать, что, несмотря на успехи, достигнутые в отношении понимания значения взаимоотношений эритроцитов и NO, полное осознание их роли в *in vivo* не получено, и требуются дальнейшие усилия исследователей в этой области. Достижения в создании новых биотехнологических подходов, позволяющие всесторонне объяснить механизмы взаимодействия эритроцитов и NO на молекулярном уровне, будут способствовать этой цели.

ЛИТЕРАТУРА

- Allen B.W., Piantadosi C.A. How do red blood cells cause hypoxic vasodilation? The SNO-hemoglobin paradigm // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006. Vol. 291. P. H1507–H1512.
- Simanonok J.P. Non-ischemic hypoxia of the arterial wall is a primary cause of atherosclerosis // *Med. Hypotheses.* 1996. Vol. 46, N 2. P. 155–161.
- Becker R.C. The role of blood viscosity in the development and progression of coronary artery disease // *Cleve. Clin. J. Med.* 1993. Vol. 60, N 5. P. 353–358.
- Harris W.S., von Schacky C. The omega-3 index: a new risk factor for death from coronary heart disease? // *Prev. Med.* 2004. Vol. 39. P. 212–220.
- Smith S.C., Allen J., Blair S.N., Bonow R.O., Brass L.M., Fonarow G.C., et al. AHA/ACC guidelines for secondary prevention for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease: 2006 update // *Circulation.* 2006. Vol. 11, N 3. P. 2363–2372.
- Tziakas D.N., Kaski J.C., Chalikias G.K., Romero, Fredericks S., Tentis I.K., Kortsaris A.X., Hatseras D.I., Holt D.W. Total cholesterol content of erythrocyte membranes is increased in patients with acute coronary syndrome: a new marker of clinical instability? // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007. Vol. 49, N 21. P. 2081–2089.
- Allen L.A., Felker G.M., Mehra M.R. et al. Validation and potential mechanisms of red cell distribution width as a prognostic marker in heart failure // *J. Card. Fail.* 2010. Vol. 16. P. 230–238.
- Dabbah S., Hammerman H., Markiewicz W., Aronson D. Relation between red cell distribution width and clinical outcomes after acute myocardial infarction // *Am. J. Cardiol.* 2010. Vol. 105, N 3. P. 312–317.
- Sangoi M.B., da Silva S.H., da Silva J.E., Moresco R.N. Relation between red blood cell distribution width and mortality after acute myocardial infarction // *Am. J. Cardiol.* 2010. Vol. 105, N 3. P. 313–317.
- Uyarel H., Ergelen M., Cicek G. et al. Red cell distribution width as a novel prognostic marker in patients undergoing primary angioplasty for acute myocardial infarction // *Coron. Artery Dis.* 2011. Vol. 22, N 3. P. 138–144.
- Wen Y. High red blood cell distribution width is closely associated with risk of carotid artery atherosclerosis in patients with hypertension // *Exp. Clin. Cardiol.* 2010. Vol. 15, N 3. P. 37–40.
- Гогин Г.Г., Гогин Е.Г. Гипертоническая болезнь и ассоциированные болезни системы кровообращения: основы патогенеза, динамика и выбор лечения. М.: Ньюдиамед, 2006. 254 с.
- Engelhardt H., Gaub H., Sackmann E. Viscoelastic properties of erythrocyte membranes in high-frequency electric fields // *Nature (London).* 1984. Vol. 307, N 5949. P. 378–380.
- Kawakami S., Kaibara M., Kawamoto Y., Yamanaoka K. Rheological approach to the analysis of blood coagulation in endothelial cellcoated tubes: activation of the intrinsic reaction on the erythrocyte surface // *Biorheology.* 1995. Vol. 32, N 5. P. 521–536.
- Кручинина М.В., Громов А.А., Рабко А.В., Баум В.А., Генералов В.М., Кручинин В.Н., Рыхлицкий С.В., Володин В.А. Есть ли различия в оптических параметрах крови, связанные со степенью артериальной гипертензии? // *Атеросклероз.* 2014. Т. 10, № 1. С. 22–31.
- Kreuzer F., Hoofd L. Facilitated diffusion of oxygen: possible significance in blood and muscle // *Oxygen Transp. Tissue. 5 Proc. Meet. Dortmund.* 1982. P. 3–21.
- Villar I.C., Francis S., Webb A., Hobbs A.J., Ahluwalia A. Novel aspects of endothelium-dependent regulation of vascular tone // *Kidney Int.* 2006. Vol. 70. P. 840–853.
- Walford G., Loscalzo J. Nitric oxide in vascular biology // *J. Thromb. Haemost.* 2003. Vol. 1. P. 2112–2118.

19. Alexander J.T., El-Ali A.M., Newman J.L., Karatela S., Predmore B.L., Lefler D.J., Sutliff R.L., Roback J.D. Red blood cells stored for increasing periods produce progressive impairments in nitric oxide-mediated vasodilation // *Transfusion*. 2013. Vol. 53. P. 2619–2628.
20. Gow A.J., Luchsinger B.P., Pawloski J.R., Singel D.J., Stamler J.S. The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. Vol. 96. P. 9027–9032.
21. Jia L., Bonaventura C., Bonaventura J., Stamler J.S. S-nitrosohaemoglobin: A dynamic activity of blood involved in vascular control // *Nature*. 1996. Vol. 380. P. 221–226.
22. Kelm M., Feelisch M., Deussen A., Schrader J., Strauer B.E. The role of nitric-oxide in the control of coronary vascular tone in relation to partial oxygen-pressure, perfusion-pressure, and flow // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1991. Vol. 17. P. S95–S99.
23. Hakim T.S., Sugimori K., Camporesi E.M., Anderson G. Half-life of nitric oxide in aqueous solutions with and without haemoglobin // *Physiol. Meas.* 1996. Vol. 17. P. 267–277.
24. Kelm M., Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide // *Circ. Res.* 1990. Vol. 66. P. 1561–1575.
25. Diesen D.L., Hess D.T., Stamler J.S. Hypoxic vasodilation by red blood cells evidence for an s-nitrosothiol-based signal // *Circ. Res.* 2008. Vol. 103. P. 545–553.
26. Doyle M.P., Pickering R.A., De Weert T.M., Hoekstra J.W., Pater D. Kinetics and mechanism of the oxidation of human deoxyhemoglobin by nitrites // *J. Biol. Chem.* 1981. Vol. 256. P. 12393–12398.
27. Gladwin M.T., Shelhamer J.H., Schechter A.N., Pease-Fye M.E., Waclawiw M.A., Panza J.A., Ognibene F.P., Cannon R.O. Role of circulating nitrite and s-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. Vol. 97. P. 11482–11487.
28. Lauer T., Preik M., Rassaf T., Strauer B.E., Deussen A., Feelisch M., Kelm M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. Vol. 98. P. 12814–12819.
29. Cosby K., Partovi K.S., Crawford J.H., Patel R.P., Reiter C.D., Martyr S., Yang B.K., Waclawiw M.A., Zalos G., Xu X.L., Huang K.T., Shields H., Kim-Shapiro D.B., Schechter A.N., Cannon R.O., Gladwin M.T. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation // *Nat. Med.* 2003. Vol. 9. P. 1498–1505.
30. Bogle R.G., Coade S.B., Moncada S., Pearson J.D., Mann G.E. Bradykinin and ATP stimulate l-arginine uptake and nitric-oxide release in vascular endothelial-cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991. Vol. 180. P. 926–932.
31. Dull R.O., Tarbell J.M., Davies P.F. Mechanisms of flow-mediated signal transduction in endothelial cells: kinetics of ATP surface concentrations // *J. Vasc. Res.* 1992. Vol. 29. P. 410–419.
32. Bergfeld G.R., Forrester T. Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia // *Cardiovasc. Res.* 1992. Vol. 26. P. 40–47.
33. Miseta A., Bogner P., Berenyi M., Kellermayer M., Galambos C., Wheatley D., Cameron I. Relationship between cellular ATP, potassium, sodium and magnesium concentrations in mammalian and avian erythrocytes // *Biochem. Biophys. Acta*. 1993. Vol. 1175. P. 133–139.
34. Sprague R.S., Ellsworth M.L., Stephenson A.H., Lonigro A.J., Andrew J. ATP: the red blood cell link to NO and local control of the pulmonary circulation // *Am. J. Physiol.* 1996. Vol. 271, N 6(2). P. H2717–H2722.
35. Sprague R.S., Stephenson A.H., Dimmitt R.A., Weintraub N.A., Branch C.A., Mc Murdo L.A. J. Effect of L-NAME on pressure-flow relationships in isolated rabbit lungs: role of red blood cells // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1995. Vol. 269. P. H1941–H1948.
36. Allsup D.J., Boarder M.R. Comparison of P2 purinergic receptors of aortic endothelial cell with those of adrenal medulla: evidence for heterogeneity of receptor subtype and of inositol phosphate response // *Mol. Pharm.* 1990. Vol. 38. P. 84–91.
37. Houston D.A., Burnstock G., Vanhoutte P.M. Different P2-purinergic receptor subtypes of endothelium and smooth muscle in canine blood vessels // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1987. Vol. 241. P. 501–506.
38. Liu S.F., Mc Cormack D.G., Evans T.W., Barnes P.J. Characterization and distribution of P2-purinoreceptor subtypes in rat pulmonary vessels // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989. Vol. 251. P. 1204–1210.
39. Motte S., Perotton S., Boeynaems J.M. Heterogeneity of ATP receptors in aortic endothelial cells: involvement of P2y and P2u receptors in inositol phosphate response // *Circ. Res.* 1993. Vol. 72. P. 504–510.
40. Dazel H.H., Westfall D.P. Receptors for adenine nucleotides and nucleosides: subclassification, distribution and molecular characterization // *Pharmacol. Rev.* 1994. Vol. 46. P. 449–466.
41. Kennedy C., Delbro D., Burnstock G. P2-purinoreceptors mediate both vasodilation (via the endothelium) and vasoconstriction of the isolated rat femoral artery // *Eur. J. Pharmacol.* 1985. Vol. 107. P. 161–168.
42. Forsberg E., Feuerstein G., Shohami E., Pollard H. Adenosine triphosphate stimulates inositol phospholipid metabolism and prostacyclin formation in adrenal medullary endothelial cells by means of P2-purinergic receptors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1987. Vol. 84. P. 5630–5634.
43. Hassessian H., Burnstock G. Interacting roles of nitric oxide and ATP in the pulmonary circulation of the rat // *Br. J. Pharmacol.* 1995. Vol. 114. P. 846–850.
44. Dietrich H.H., Ellsworth M.L., Sprague R.S., Dacey R.G. Jr. Red blood cell regulation of microvascular tone through adenosine triphosphate // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000. Vol. 278. P. H1294–H1298.
45. Ellsworth M.L., Ellis C.G., Goldman D., Stephenson A.H., Dietrich H.H., Sprague R.S. Erythrocytes: oxygen sensors and modulators of vascular tone // *Physiology*. 2009. Vol. 24. P. 107–116.
46. Faris A., Spence D.M. Measuring the simultaneous effects of hypoxia and deformation on ATP release from erythrocytes // *Analyst*. 2008. Vol. 133. P. 678–682.

47. **Burnstock G.** Local-Control of blood-pressure by purines // *Blood Vessels*. 1987. Vol. 24. P. 156–160.
48. **Oblak T.D., Root P., Spence D.M.** Fluorescence monitoring of ATP-stimulated, endothelium-derived nitric oxide production in channels of a poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic device // *Anal. Chem.* 2006. Vol. 78. P. 3193–3197.
49. **Cerecedo D., Stock R., Gonzalez S., Reyes E., Mondragon R.** Modification of actin, myosin and tubulin distribution during cytoplasmic granule movements associated with platelet adhesion // *Haematologica*. 2002. Vol. 87. P. 1165–1176.
50. **Kovacsovics T.J., Hartwig J.H.** Thrombin-induced GPIIb-IX centralization on the platelet surface requires actin assembly and myosin II activation // *Blood*. 1996. Vol. 87. P. 618–629.
51. **Packham M.A.** Role of platelets in thrombosis and hemostasis // *Can. J. Physiol. Pharm.* 1994. Vol. 72. P. 278–284.
52. **Wang G.-R., Zhu Y., Halushka P.V., Lincoln T.M., Mendelsohn M.E.** Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: in vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP dependent protein kinase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. Vol. 95. P. 4888–4893.
53. **Freedman J.E., Loscalzo J., Barnard M.R., Alpert C., Keaney J.F., Michelson A.D.** Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment // *J. Clin. Invest.* 1997. Vol. 100. P. 350–356.
54. **Hall D.A., Hourani S.M.O.** Effects of analogs of adenosine nucleotides on increases in intracellular calcium mediated by P2 Purinoceptors on human blood platelets // *Br. J. Pharmacol.* 1993. Vol. 108. P. 728–733.
55. **Von Kugelgen I., Wetter A.** Molecular pharmacology of P2Y receptors // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2000. Vol. 362. P. 310–323.
56. **Takano S., Kimura J., Matsuoka I., Ono T.** No requirement of P2X1 purinoceptors for platelet aggregation // *Eur. J. Pharmacol.* 1999. Vol. 372. P. 305–309.
57. **Karunaratne W., Ku C.J., Spence D.M.** The dual nature of extracellular ATP as a concentration-dependent platelet P2X1 agonist and antagonist // *Integr. Biol.* 2009. Vol. 1. P. 655–663.
58. **Nesbitt W.S., Kulkarni S., Giuliano S., Goncalves I., Doppeide S.M., Yap C.L., Harper I. S., Salem H.H., Jackson S.P.** Distinct glycoprotein Ib/V/IX and integrin alpha(IIb)beta(3)-dependent calcium signals cooperatively regulate platelet adhesion under flow // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P. 2965–2972.
59. **Sprague R.S., Ellsworth M.L., Stephenson A.H., Kleinhenz M.E., Lonigro A.J.** Deformation-induced ATP release from red blood cells requires CFTR activity // *Am. J. Physiol.* 1998. Vol. 275. P. H1726–H1732.
60. **Genes L.I., Tolan N.V., Hulvey M.K., Martin R.S., Spence D.M.** Addressing a vascular endothelium array with blood components using underlying microfluidic channels // *Lab. Chip*. 2007. Vol. 7. P. 1256–1259.
61. **Meyer J.A., Froelich J.M., Reid G.E., Karunaratne W., Spence D.M.** Metal-activated C-peptide facilitates glucose clearance and the release of a nitric oxide stimulus via the glut1 transporter // *Diabetologia*. 2008. Vol. 51. P. 175–182.
62. **Meyer J.A., Subasinghe W., Sima Anders A.F., Keltner Z., Reid G.E., Daleke D.L., Spence D.M.** Zinc-activated c-peptide resistance to the type 2 Diabetic erythrocyte is associated with hyperglycemia-induced phosphatidylserine externalization and reversed by metformin // *Mol. Biosyst.* 2009. Vol. 5. P. 1157–1162.
63. **Halpin S.T., Spence D.M.** Direct plate-reader measurement of nitric oxide released from hypoxic erythrocytes flowing through a microfluidic device // *Anal. Chem.* 2010. Vol. 82. P. 7492–7497.
64. **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. Vol. 284. P. H1577–H1584.
65. **Starzyk D., Korbut R., Gryglewski R.J.** Effects of nitric oxide and prostacyclin on deformability and aggregability of red blood cells of rats *ex vivo* and *in vitro* // *J. Physiol. Pharmacol.* 1999. Vol. 50. P. 629–637.
66. **Bateman R.M., Jagger J.E., Sharpe M.D., Ellsworth M.L., Mehta S., Ellis C.G.** Erythrocyte deformability is a nitric oxide-mediated factor in decreased capillary density during sepsis // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001. Vol. 280. P. H2848–H2856.
67. **Mesquita R., Picarra B., Saldanha C., Silva J.M.E.** Nitric oxide effects on human erythrocytes structural and functional properties – An *in vitro* study // *Clin. Hemorheo. Micro.* 2002. Vol. 27. P. 137–147.
68. **Garcia J.I., Seabra A.B., Kennedy R., English A.M.** Nitrite and nitroglycerin induce rapid release of the vasodilator ATP from erythrocytes: Relevance to the chemical physiology of local vasodilation // *J. Inorg. Biochem.* 2010. Vol. 104. P. 289–296.
69. **Cao Z., Bell J.B., Mohanty J.G., Nagababu E., Rifkin J.M.** Nitrite enhances RBC hypoxic ATP synthesis and the release of ATP into the vasculature: a new mechanism for nitrite-induced vasodilation // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009. Vol. 297. P. H1494–H1503.
70. **Rathagala M., Karunaratne W., Kryziniak M., McCracken J., Spence D.M.** Hydroxyurea stimulates the release of ATP from rabbit erythrocytes through an increase in calcium and nitric oxide production // *Eur. J. Pharmacol.* 2010. Vol. 645. P. 32–38.
71. **Gladwin M.T., Schechter A.N., Ognibene F.P., Coles W.A., Reiter C.D., Schenke W.H., Csako G., Waclawiw M.A., Panza J.A., Cannon R.O.** Divergent nitric oxide bioavailability in men and women with sickle cell disease // *Circulation*. 2003. Vol. 107. P. 271–278.
72. **King S.B.** The nitric oxide producing reactions of hydroxyurea // *Curr. Med. Chem.* 2003. Vol. 10. P. 437–452.
73. **Hakim T.S.** Effect of erythrocyte heat treatment on pulmonary vascular resistance // *Microvasc. Res.* 1994. Vol. 48, N 1. P. 13–25.
74. **Ignarro L.J., Lipton H., Edwards J.C., Baricos W.H., Hyman A.L., Kadowitz P.J., Gruetter C.A.** Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1981. Vol. 218. P. 739–749.
75. **Pawloski J.R., Stamler J.S.** Nitric oxide in RBCs // *Transfusion*. 2002. Vol. 42. P. 1603–1609.
76. **Stamler J.S., Simon D.I., Osborne J.A., Mullins M.E., Jaraki O., Michel T., Singel D.J., Loscalzo J.** S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active com-

- pounds // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. Vol. 89. P. 444–448.
77. Reynolds J.D., Ahearn G.S., Angelo M., Zhang J., Cobb F., Stamler J.S. S-nitrosohemoglobin deficiency: a mechanism for loss of physiological activity in banked blood // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. Vol. 104. P. 17058–17062.
 78. Chen K., Popel A.S. Theoretical analysis of biochemical pathways of nitric oxide release from vascular endothelial cells // *Free Radic. Biol. Med.* 2006. Vol. 41. P. 668–680.
 79. Huang K.T., Keszler A., Patel N., Patel R.P., Gladwin M.T., Kim-Shapiro D.B., Hogg N. The reaction between nitrite and deoxyhemoglobin. Reassessment of reaction kinetics and stoichiometry // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. P. 31126–31131.
 80. Huang Z., Shiva S., Kim-Shapiro D.B., Patel R.P., Ringwood L.A., Irby C.E., Huang K.T., Ho C., Hogg N., Schechter A.N., Gladwin M.T. Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control // *J. Clin. Invest.* 2005. Vol. 115. P. 2099–2107.
 81. Chen K., Piknova B., Pittman R.N., Schechter A.N., Popel A.S. Nitric oxide from nitrite reduction by hemoglobin in the plasma and erythrocytes // *Nitric Oxide*. 2008. Vol. 18. P. 47–60.
 82. Chen K., Pittman R.N., Popel A.S. Nitric oxide in the vasculature: where does it come from and where does it go? A quantitative perspective // *Antioxid. Redox Signal.* 2008. Vol. 10. P. 1185–1198.
 83. Ellsworth M.L. Red blood cell-derived ATP as a regulator of skeletal muscle perfusion // *Med. Sci. Sports Exerc.* 2004. Vol. 36. P. 35–41.
 84. Ellsworth M.L., Forrester T., Ellis C.G., Dietrich H.H. The erythrocyte as a regulator of vascular tone // *Am. J. Physiol.* 1995. Vol. 269, N 6 (2). P. H2155–H2161.
 85. Zhu H., Zennadi R., Xu B.X., Eu J.P., Torok J.A., Telen M.J., Mc Mahon T.J. Impaired adenosine-5'-triphosphate release from red blood cells promotes their adhesion to endothelial cells: a mechanism of hypoxemia after transfusion // *Crit. Care Med.* 2011. Vol. 39. P. 2478–2486.
 86. Roback J.D. Vascular effects of the red cell storage lesion // *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2011. P. 475–479.
 87. Kim-Shapiro D.B., Lee J., Gladwin M.T. Storage lesion: role of red blood cell breakdown // *Transfusion*. 2011. Vol. 51. P. 844–851.
 88. Reiter C.D., Wang X., Tanus-Santos J.E., Hogg N., Cannon R.O. 3rd, Schechter A.N., Gladwin M.T. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease // *Nat. Med.* 2002. Vol. 8. P. 1383–1389.
 89. Rother R.P., Bell L., Hillmen P., Gladwin M.T. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease // *JAMA*. 2005. Vol. 293. P. 1653–1662.
 90. Donadee C., Raat N.J., Kanias T., Tejero J., Lee J.S., Kelley E.E., Zhao X., Liu C., Reynolds H., Azarov I., Frizzell S., Meyer E.M., Donnenberg A.D., Qu L., Triulzi D., Kim-Shapiro D.B., Gladwin M.T. Nitric oxide scavenging by red blood cell microparticles and cell-free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion // *Circulation*. 2011. Vol. 124. P. 465–476.
 91. Glynn S.A. The red blood cell storage lesion: a method to the madness // *Transfusion*. 2010. Vol. 50. P. 1164–1169.
 92. Kanias T., Gladwin M.T. Nitric oxide, hemolysis, and the red blood cell storage lesion: interactions between transfusion, donor, and recipient // *Transfusion*. 2012. Vol. 52. P. 1388–1392.
 93. Roback J.D., Neuman R.B., Quyyumi A., Sutliff R. Insufficient nitric oxide bioavailability: a hypothesis to explain adverse effects of red blood cell transfusion // *Transfusion*. 2011. Vol. 51. P. 859–866.
 94. Spinella P.C., Doctor A., Blumberg N., Holcomb J.B. Does the storage duration of blood products affect outcomes in critically ill patients? // *Transfusion*. 2011. Vol. 51. P. 1644–1650.
 95. Yu B., Lei C., Baron D.M., Steinbicker A.U., Bloch K.D., Zapol W.M. Diabetes augments and inhaled nitric oxide prevents the adverse hemodynamic effects of transfusing syngeneic stored blood in mice // *Transfusion*. 2012. Vol. 52. P. 1410–1422.
 96. Crawford J.H., Isbell T.S., Huang Z., Shiva S., Chacko B.K., Schechter A.N., Darley-Usmar V.M., Kerby J.D., Lang J.D. Jr, Kraus D., Ho C., Gladwin M.T., Patel R.P. Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation // *Blood*. 2006. Vol. 107. P. 566–574.
 97. Bunn H.F., Nathan D.G., Dover G.J., Hebbel R.P., Platt O.S., Rosse W.F., Ware R.E. Pulmonary hypertension and nitric oxide depletion in sickle cell disease // *Blood*. 2010. Vol. 116. P. 687–692.
 98. Stapley R., Owusu B.Y., Brandon A., Cusick M., Rodriguez C., Marques M.B., Kerby J.D., Barnum S.R., Weinberg J.A., Lancaster J.R. Jr, Patel R.P. Erythrocyte storage increases rates of NO and nitrite scavenging: implications for transfusion-related toxicity // *Biochem. J.* 2012. Vol. 446. P. 499–508.
 99. Squadrito G.L., Pry W.A. The formation of peroxynitrite in vivo from nitric oxide and superoxide // *Chem. Biol. Interact.* 1995. Vol. 96. P. 203–206.
 100. Stamler J.S., Jia L., Eu J.P. et al. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient // *Science*. 1997. Vol. 276, N 5321. P. 2034–2037.
 101. Zinchuk V., Borisiuk V. The effect of NO synthase inhibition on blood oxygen-carrying function during hyperthermia in rats // *Res. Physiol.* 1998. Vol. 113, N 1. P. 39–45.
 102. Зинчук В.В., Борисюк М.В. Эффект ингибирования NO-синтазы на кислородтранспортную функцию крови при лихорадке у кроликов // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 1997. Т. 83, № 4. С. 111–116.
 103. Зинчук В.В. Факторный анализ параметров кислородтранспортной функции крови и перекисного окисления липидов в условиях ингибирования NO-синтазы при лихорадке у кроликов // *Вестн. АН РБ. Сер. бъл. нав.* 1997. № 2. С. 89–93.
 104. Caramelo C., Riesco A., Outeirino J. et al. Effects of nitric oxide on red blood cells: changes in erythrocyte resistance to hypotonic hemolysis and potassium efflux by experimental maneuvers that decrease nitric oxide // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994. Vol. 199, N 2. P. 447–454.

105. **Bozzo J., Hernandez M.R., Galan A.M. et al.** Antiplatelet effects of sodium nitroprusside in flowing human blood: studies under normoxic and hypoxic conditions // *Thromb. Res.* 2000. Vol. 97, N 4. P. 217–225.
106. **Walter R., Mark M., Reinhart W.H.** Pharmacological concentrations of arginine influence human whole blood viscosity independent of nitric oxide synthase activity in vitro // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. Vol. 269, N 3. P. 687–691.
107. **Carroll J., Raththagala M., Subasinghe W., Baguzis S., Oblak T.D.A., Root P., Spence D.** An altered oxidant defense system in red blood cells affects their ability to release nitric oxidestimulating ATP // *Mol. Bio. Syst.* 2006. Vol. 2. P. 305–311.
108. **Sprague R.S., Stephenson A.H., Bowles E.A., Stumpf M.S., Lonigro A.J.** Reduced expression of Gi in erythrocytes of humans with type 2 diabetes is associated with impairment of both cAMP generation and ATP release // *Diabetes.* 2006. Vol. 55. P. 3588–3593.
109. **Rodnenkov O.V., Luneva O.G., Ulyanova N.A., Maksimov G.V., Rubin A.B., Orlov S.N., Chazov E.I.** Erythrocyte membrane fluidity and haemoglobin haemoporphyrin conformation: features revealed in patients with heart failure // *Pathophysiology.* 2005. Vol. 11, N 4. P. 209–213.

ERYTHROCYTES AND NO: THE FACTS AND HYPOTHESES INTERACTION, PROSPECTS FOR DIAGNOSIS AND THERAPY

M.V. Kruchinina¹, A.A. Gromov¹, I.O. Svetlova¹, V.M. Generalov², A.S. Safatov²,
G.A. Buryak², V.N. Kruchinin³, S.V. Rykhliitsky³

¹*Research Institute of Internal and Preventive Medicine of SB RAMS
630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1*

²*State Research Center of Virology and Biotechnology «Vektor»
633159, Novosibirsk region, Koltsovo*

³*Institute of Semiconductor Physics named after A.V. Rzhanov
630090, Novosibirsk, Academic Lavrentev av., 13*

This review deals with the relationship between red blood cells and nitric oxide, the role of erythrocytes as participants of vasoregulation. There were the results of studies on the physiological origin of vasoactive NO under hypoxic conditions, sources of nitric oxide associated with erythrocytes. The data of the NO effect on the erythrocyte deformability have been analyzed. The hypothesis of insufficient NO bioavailability during blood storage caused by degenerative changes in red blood cells (increased levels of free hemoglobin and microparticles from erythrocytes) was presented. The results of evaluation of hemoglobin associated with NO by means of Raman-spectroscopy were given. Prospects have been identified in the diagnosis and therapy related to the definition and changes in levels of erythrocyte-derived NO and ATP.

Keywords: red blood cells, nitric oxide, adenosine triphosphate, endothelial cells, vasoregulation, deformability, the bioavailability of NO, Raman-spectroscopy.

Статья поступила 14 октября 2014 г.