

DOI: 10.15360/1813-9779-2020-3-0-1

Editorial

Коронавирус SARS-CoV-2: гипотезы влияния на кровеносную систему, перспективы использования перфторуглеродной эмульсии, возможности биофизических методов исследования (редакционная статья)

В. В. Мороз¹, А. М. Черныш¹, Е. К. Козлова^{1,2}¹ НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ РР,

Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

² Первый Московский государственный медицинский университет

им. И. М. Сеченова Минздрава России,

Россия, 119991, г. Москва, ул. Большая Пироговская, д.2, стр. 4

Coronavirus SARS-CoV-2: Hypotheses of Impact on the Circulatory System, Prospects for the Use of Perfluorocarbon Emulsion, and Feasibility of Biophysical Research Methods (Editorial)

Viktor V. Moroz¹, Alexander M. Chernysh¹, Elena K. Kozlova^{1,2}¹ V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,

Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology,

25 Petrovka Str., Bldg. 2, 107031 Moscow, Russia

² I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia,

2 Bolshaya Pirogovskaya Str., Bldg. 4, 119991 Moscow, Russia

Для цитирования: В. В. Мороз, А. М. Черныш, Е. К. Козлова. Коронавирус SARS-CoV-2: гипотезы влияния на кровеносную систему, перспективы использования перфторуглеродной эмульсии, возможности биофизических методов исследования. *Общая реаниматология*. 2020; 16 (3): 4–13. DOI: 10.15360/1813-9779-2020-3-0-1 [На русск. и англ.]

For citation: Viktor V. Moroz, Alexander M. Chernysh, Elena K. Kozlova. Coronavirus SARS-CoV-2: Hypotheses of Impact on the Circulatory System, Prospects for the Use of Perfluorocarbon Emulsion, and Feasibility of Biophysical Research Methods. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2020; 16 (3): 4–13. DOI: 10.15360/1813-9779-2020-3-0-1 [In Russ. and Engl.]

Резюме

В данной статье освещены опубликованные гипотезы, связанные с возможностью проникновения коронавируса SARS-CoV-2 в кровеносное русло, его взаимодействия с эндотелием сосудов, эритроцитами, гемоглобином и его фрагментами. В результате такого взаимодействия возможен выход иона железа в кровеносное русло и, как следствие, возникновение цитокинового шторма. В этом контексте представляется важным поиск цитопротекторов, которые могут блокировать такие процессы. Одним из таких препаратов может явиться перфторуглеродная эмульсия.

Цель работы — показать возможности биофизических методов для исследования молекулярных механизмов действия SARS-CoV-2 на эритроциты и гемоглобин человека и восстанавливающее и цитопротекторное действие перфторуглеродной эмульсии при окислении иона железа в геме.

Материалы и методы. Использовали спектроскопию высокого разрешения, атомную силовую микроскопию, атомно-силовую спектроскопию, электропорацию. Действовали на кровь окисляющими агентами различной природы. Добавляли перфторуглеродную эмульсию в различных концентрациях и исследовали ее действие при различном времени инкубации. Концентрацию производных гемоглобина, рассчитывали с учетом мультиколлинеарности, проводили статистический анализ результатов.

Результаты. Показали, что при окислении иона железа в геме перфторуглеродная эмульсия вызывает эффективное восстанавливающее и цитопротекторное действие: Fe³⁺ восстанавливался до Fe²⁺. Степень восстановления MetHb до HbO₂ и Hb зависела от концентрации окисляющего агента и времени инкубации. Наблюдали изменение содержания MetHb от (80–90)% до (5–12)%. Перфторуглеродная эмульсия в клинических концентрациях способствовала устранению локальных дефектов мембран и восстанавливала нормальную морфологию эритроцитов.

Заключение. В фокусе рассмотренных гипотез использование перфторуглеродной эмульсии может стать эффективным методом для блокирования последствий воздействия коронавируса на элементы кровеносной системы и восстановления функционального газообмена.

Ключевые слова: эритроцит; мембраны; производные гемоглобина; перфторан; цитопротекторное действие

Адрес для корреспонденции:

Александр Михайлович Черныш
E-mail: amchernysh@mail.ru

Correspondence to:

Alexander M. Chernysh
E-mail: amchernysh@mail.ru

Summary

This paper highlights published hypotheses on the possibility of coronavirus SARS-CoV-2 entry into the bloodstream, its interaction with vascular endothelium, red blood cells, hemoglobin and its fragments. As a result of such interaction, iron ions may be released into the bloodstream and, subsequently, a cytokine storm may occur. In this context, it is important to find a cytoprotective agent capable of blocking such processes. The perfluorocarbon emulsion could be a candidate for this role.

The aim of the paper is to show the feasibility of biophysical methods to study the molecular mechanisms of action of SARS-CoV-2 on human red blood cells and hemoglobin as well as the restorative and cytoprotective effect of the perfluorocarbon emulsion during Fe^{2+} oxidation in heme.

Materials and methods. High resolution spectroscopy, atomic force microscopy, atomic force spectroscopy, electroporation were used. Blood was exposed to oxidizing agents of different nature. Perfluorocarbon emulsion was added in various concentrations and its effect at various incubation times was studied. Concentration of hemoglobin derivatives was calculated considering multicollinearity, and statistical analysis of the results was performed.

Results. The perfluorocarbon emulsion was shown to have an effective restorative and cytoprotective action in iron ion oxidation in the heme: Fe^{3+} was restored to Fe^{2+} . The degree of MetHb reduction to HbO_2 and Hb depended on the concentration of the oxidizing agent and incubation time. We observed a change in MetHb content from 80–90% to 5–12%. The perfluorocarbon emulsion in clinical concentrations helped eliminate local membrane defects and restored normal erythrocyte morphology.

Conclusion. In the light of the studied hypotheses, the use of perfluorocarbon emulsion can become an effective method for blocking the consequences of coronavirus effect on the blood cells and restoring a normal gas exchange.

Keywords: erythrocyte; membranes; hemoglobin derivatives; perfloran; cytoprotective action

DOI: 10.15360/1813-9779-2020-3-0-1

Введение (гипотезы)

Пандемия COVID-19 поставила перед наукой новые задачи, решение которых, по очевидным причинам (короткий временной интервал, недостаточность исходных сведений), на сегодня не представляется возможным. Данные о происхождении новой модификации коронавируса пока ограничены и продолжают пополняться. Большое количество вопросов возникает по поводу особенностей его существования в кровеносном русле человека, молекулярных механизмов взаимодействия с эндотелием кровеносных сосудов, с клетками крови, с гемоглобином. Знания в этой области — скорее отдельные гипотезы, пока практически лишённые системных научных обоснований.

Коронавирус SARS-CoV-2. Новый коронавирус SARS-CoV-2 — один из семейства *Coronaviridae*, включающее на январь 2020 года более 40 видов РНК-содержащих вирусов, которые поражают человека и животных. В феврале 2020 г. китайские ученые выделили штамм коронавируса и впервые продемонстрировали изображения SARS-CoV-2 с помощью электронного микроскопа. Снимки получены в национальном хранилище патогенных микроорганизмов, были опубликованы на сайте ведомства, представлены ВОЗ и широко иллюстрируются в открытой печати. В литературе появились и другие изображения вируса, полученные на электронном микроскопе [1]. Исследователи из Университета Гонконга получили изображение выхода коронавируса

Introduction (Hypotheses)

The COVID-19 pandemic has set new challenges for science which, for obvious reasons (short time interval, lack of initial data), cannot be solved today. Data on the origin of the new coronavirus modification are still limited and continue to be updated. Many questions arise about the pattern of its existence in the human bloodstream, molecular mechanisms of interaction with the endothelium of blood vessels, blood cells, hemoglobin. The knowledge in this field is mostly represented by isolated hypotheses, which so far have practically no systematic scientific rationale.

Coronavirus SARS-CoV-2. The new coronavirus SARS-CoV-2 is a member of the *Coronaviridae* family, which as of January 2020 includes more than 40 species of RNA-containing viruses affecting humans and animals. In February 2020, Chinese scientists isolated the coronavirus strain and demonstrated SARS-CoV-2 electronic microscope images for the first time. The images were obtained from the national repository of pathogens and published on the agency's website, presented to WHO and are widely used by mass media. Other virus images from the electron microscope have appeared in the literature [1]. Researchers from the University of Hong Kong received an image of coronavirus exiting from an infected cell. The obtained images suggest that the size of SARS-CoV-2 practically does not differ from the other coronaviruses and is 100–125 nm [2], and its peplomers (club-shaped «spikes») have a height of about 10 nm. While passing through the cell membrane, the virus «stretches out» and changes its shape.

из зараженной клетки. Из полученных изображений следует, что размеры SARS-CoV-2 практически не отличаются от размеров других коронавирусов и составляют 100–125 нм [2], а его пепломеры (булавовидные «шипы») имеют высоту около 10 нм. При прохождении через мембрану клетки вирус «вытягивается» и меняет форму.

SARS-CoV-2, эритроцит, гемоглобин. Приводятся гипотезы о взаимодействии SARS-CoV-2 с эритроцитами, о его влиянии на гемы и порфирин. Рассматриваются 2 возможных пути взаимодействия белков вируса с гемоглобином [3].

Первый — связан с выходом гемоглобина из эритроцита и его попаданием в кровеносное русло. Это может происходить в результате гемолиза эритроцитов, например — иммунологического. События, развивающиеся после попадания гема и иона Fe^{+2} в кровеносное русло и дальнейшее развитие оксидативного стресса, описаны ранее [4, 5].

Второй путь предполагает проникновение вируса или его белков через плазматическую мембрану в эритроцит и дальнейшее взаимодействие белков вируса с гемом и порфирином. Отмечается, что дезоксигемоглобин более подвержен вирусным атакам, чем оксигенированный гемоглобин — HbO_2 [3]. Атакующее действие вирусных белков вызывает уменьшение содержания HbO_2 , реализующего газообмен в организме, и как следствие — дыхательную недостаточность.

SARS-CoV-2, кровеносная система. Рассматриваются и иные механизмы. В частности — связывание SARS-CoV-2 с клетками эндотелия кровеносной сети человека [1]. Такое взаимодействие имеет достаточно высокую вероятность существования и подтверждается фактом возникновения тромбоза у заболевших COVID-19 пациентов [6]. Возможно взаимодействие вируса не только с сосудистой стенкой, но с мембранами эритроцитов в микрососудах. Вирусные белки, проникшие в клетку, взаимодействуют с 1 бета цепью гемоглобина [3], вызывают эффект экранирования части молекул гемоглобина Hb (screening effect), уменьшая поток кислорода из эритроцита в ткани через капиллярную стенку и, соответственно, из альвеол в капилляр.

В некоторых работах отмечается, что SARS-CoV-2, связываясь с клеточными рецепторами АПФ2 и CD 147, имеет возможности для проникновения в клетку и на стадиях выхода вириона из клетки разрушать ее мембраны [7, 8]. Нарушение целостности мембран может стать причиной внутрисосудистого гемолиза (intravascular hemolysis), выхода свободного гемоглобина (cell-free Hb) эритроцита в кровеносную систе-

SARS-CoV-2, erythrocyte, and hemoglobin.

Various hypotheses on the interaction of SARS-CoV-2 with erythrocytes and its effect on hems and porphyrin have been suggested. Two possible ways of interaction of virus proteins with hemoglobin are considered [3].

The first one is related to hemoglobin exit from erythrocyte and its entry into bloodstream. This may occur as a result of erythrocyte hemolysis, e.g. immunological. The events occurring after hem and Fe^{+2} ion enter the bloodstream and further oxidative stress development have been previously described [4, 5].

The second way assumes penetration of the virus or its proteins through plasma membrane into erythrocyte and further interaction of viral proteins with hem and porphyrin. Deoxyhemoglobin has been noted to be more susceptible to viral attacks than the oxygenated hemoglobin HbO_2 [3]. The onslaught of viral proteins causes a decrease in the content of HbO_2 , a major contributor to gas exchange in the body, and results into respiratory failure.

SARS-CoV-2 and circulatory system. Other mechanisms are also under consideration. In particular, the binding of SARS-CoV-2 to endothelial cells of human circulation system may be relevant [1]. Such interaction is highly likely and was confirmed by thrombosis occurrence in COVID-19 patients [6]. The virus may interact not only with the vascular wall, but also with RBC membranes in microvasculature. The viral proteins penetrating the cell interact with 1-beta hemoglobin chain [3], cause the screening effect of part of hemoglobin molecules, which reduces the oxygen flow from erythrocyte to tissues through the capillary wall and, accordingly, from alveoli to capillaries.

In some works, SARS-CoV-2 binding to ACE2 and CD 147 cell receptors was noted to enable viral penetration into the cell and destruction of cell membranes during virion exit [7, 8]. The destruction of membrane integrity may cause intravascular hemolysis and release of the cell-free Hb into the blood system [9, 10]. Release of Hb into plasma significantly reduces the bioavailability of nitrogen oxide (NO) in the vessel, promoting vasoconstriction, endothelial dysfunction and platelet activation. Vasoconstriction (including that in micro vessels) and thrombosis are typical for Covid-19 patients [6].

Filtration-reabsorption equilibrium in the microvasculature and surrounding tissues may be disturbed if the cell structure of capillary walls is impaired [11]. As a result, interstitial edema, alveolar hemorrhage and microvascular lung thrombosis occur [12]. Progressive endothelial thrombo-inflammatory syndrome may also include microvasculature of brain and other vital organs, resulting in multi-organ failure observed in patients with Covid-19 [1, 2].

му [9, 10]. Декомплементация Hb в плазму значительно ухудшает биодоступность оксида азота (NO) в сосуде, способствуя вазоконстрикции, вызывая эндотелиальную дисфункцию и активацию тромбоцитов. У пациентов с Covid-19 обнаруживается сужение сосудов, в том числе и микрососудов, образование тромбов [6].

При нарушениях структуры клеток стенок капилляров может нарушиться фильтрационно-реабсорбционное равновесие в микрососуде и окружающих тканях [11]. В результате возникает интерстициальный отек, alveolar hemorrhage (кровоизлияние в альвеолу) и микрососудистый тромбоз легких [12]. Прогрессирующий эндотелиальный тромбо-воспалительный синдром может также включать микрососудистое русло мозга и других жизненно важных органов, приводя к полиорганной недостаточности, что наблюдается у пациентов с Covid-19 [1, 2].

Опасность представляет взаимодействие SARS-CoV-2 с клетками костного мозга. В работе [13] описан случай leukoerythroblastosis при Covid-19, связанный с нарушением костного мозга и выходом модифицированных эритроцитов.

Описанные гипотезы предполагают взаимодействие коронавируса или его белков со стенками кровеносных сосудов, эритроцитами, гемоглобином. В них рассматривается взаимодействие белков SARS-CoV-2 с гемом и порфирином, попадание ионов Fe^{+2} в кровеносное русло и дальнейшее их окисление до Fe^{+3} . Такие патологические процессы могут блокироваться и/или восстанавливаться с помощью антиоксидантов и цитопротекторов [14]. Использование препаратов этого класса может способствовать разработке методов борьбы с Covid-19.

Цель работы — показать возможности биофизических методов для исследования молекулярных механизмов действия SARS-CoV-2 на эритроциты и гемоглобин человека и восстанавливающее и цитопротекторное действие перфторуглеродной эмульсии при окислении иона железа в геме.

Материал и методы

Схема опытов. Забор крови производили в микроветты с ЭДТА (Sarstedt AG and Co., Germany) во время профилактического осмотра доноров. В соответствии с требованиями этического комитета НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского РАМН получили согласие всех доноров на проведение исследований. Схему опытов представили на рис. 1. На кровь (150 мкл) воздействовали окисляющим агентом, в качестве которого использовали либо раствор $NaNO_2$, либо ультрафиолетовое излучение (UV). В опытах для промывки клеток и разбавления суспензии использовали буфер PBS tablets (MP Biomedicals,

The SARS-CoV-2 interaction with bone marrow cells is dangerous. A paper [13] describes a case of leukoerythroblastosis in Covid-19 associated with bone marrow damage and release of modified red blood cells.

The described hypotheses suggest that the coronavirus or its proteins interact with the walls of blood vessels, erythrocytes, and hemoglobin. They consider the interaction of SARS-CoV-2 proteins with heme and porphyrin, the entry of Fe^{+2} ions into the bloodstream and their further oxidation to Fe^{+3} . Such pathological processes can be blocked and/or restored with antioxidants and cytoprotectors [14]. The use of drugs of this class may help develop methods to control Covid-19.

The aim of the paper is to show the feasibility of biophysical methods to study the molecular mechanisms of impact of SARS-CoV-2 on human red blood cells and hemoglobin and the restorative and cytoprotective effect of perfluorocarbon emulsion during the iron oxidation in heme.

Materials and Methods

Scheme of experiments. Blood was drawn in EDTA microvettes (Sarstedt AG and Co., Germany) during a routine screening of donors. In accordance with the requirements of the ethics committee of the V. A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology the consent of all donors for the study participation was obtained. The scheme of experiments is shown in fig. 1. Blood (150 μ l) was exposed to an oxidizing agent which was either $NaNO_2$ solution or ultraviolet radiation (UV). The PBS tablets buffer (MP Biomedicals, USA), (pH 7,4) was used in experiments for cell washing and suspension dilution. Micro-22R centrifuge (Hettich-Zentrifugen GMBH&Co. KG, Germany) was used for cell separation and sedimentation. The UNICO 2800 (USA) digital automatic spectrophotometer was used to record optical spectra. The method of calculation of hemoglobin derivatives concentrations, the solution of multicollinearity problem, and relevant statistical analysis were described elsewhere [15, 16].

Atomic force microscopy and spectroscopy. Images of RBC morphology were obtained using the atomic force microscope (AFM) NTEGRA Prima (NT-MDT, Russian Federation) in a resonance mode on monolayers prepared using the sedimentation method. Cantilevers NSG01 ($R=10$ nm, coefficient of elasticity $K = 5$ N/m) were used. The number of scanning points was 512, 1024. Scanning fields were $100 \times 100 \mu m^2$, $30 \times 30 \mu m^2$. 2D and 3D images were obtained using AFM software [15]. Statistical analysis of the obtained results was performed using the Origin Lab software (USA).

Electroporation (USA). Laboratory electroporator provides pulse duration 3–5 ms, pulse amplitude 3×10^3 V. A cuvette 30×30 mm was equipped with flat titanium electrodes mounted on opposite walls. The intensity of the generated field was 1040 V/cm [17].

Results and Discussion

The development of oxidation processes in blood caused by $NaNO_2$ and ultraviolet radiation ($\lambda=254$ nm) was simulated using in vitro experi-

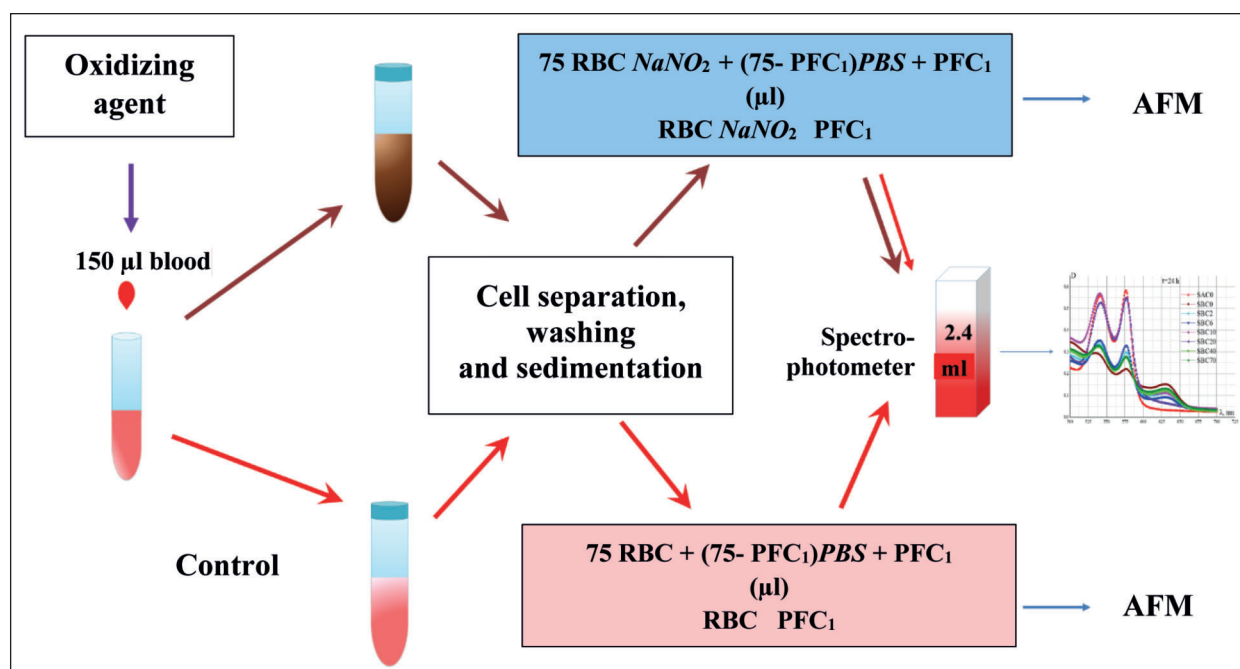


Рис. 1. Стадии экспериментов: воздействие окисляющим агентом на кровь, добавление PFC или цитофлавина в различной концентрации, измерение оптических спектров, расчет концентраций производных гемоглобина, получение ACM изображения клеток и наноповреждения мембран.

Fig. 1. Stages of the experiments: blood exposure to the oxidizing agent, addition of PFC or cytoflavin in various concentrations, measurement of optical spectra, calculation of concentrations of hemoglobin derivatives, obtaining an AFM image of cells and membrane nano-surface.

Примечание. Oxidizing agent — окисляющий агент; blood — кровь; cell separation, washing and sedimentation — центрифугирование, промыв клеток, осаждение; RBC — эритроциты; PFC — перфторуглеродная эмульсия; AFM — ACM.

USA), pH 7,4. Для разделения и осаждения клеток использовали центрифугу Micro-22R (Hettich-Zentrifugen GmbH&Co.KG, Germany). Для регистрации оптических спектров использовали цифровой автоматический спектрофотометр UNICO 2800 (USA). Методика расчета концентраций производных гемоглобина, решения проблемы мультиколлинеарности, статистического анализа описана ранее [15, 16].

Атомная силовая микроскопия и спектроскопия. Изображения морфологии эритроцитов получали с помощью атомного силового микроскопа (АСМ) NTEGRA Prima, (NT-MDT, Российская Федерация) в резонансном режиме на монослоях приготовленных с помощью метода оседания. Использовали кантилеверы NSG01, R = 10 нм, коэффициент упругости K = 5 N/m. Число точек сканирования — 512, 1024. Поля сканирования: 100×100 мкм², 30×30 мкм². Получали изображения 2D и 3D форматах, используя программное обеспечение АСМ [15]. Проводили статистическую обработку полученных результатов, используя программное обеспечение «Origin Lab» (USA).

Электропорация. Лабораторный электропоратор реализует длительность импульса (3–5) мс, амплитуду импульса 3×10³ В. Кювета 30×30 мм, оснащена плоскими титановыми электродами, закрепленными на противоположных стенках. Напряженность создаваемого поля в объеме 1040 В/см [17].

Результаты и обсуждение

В экспериментах *in vitro* моделировали развитие окислительных процессов в крови,

Fe²⁺ turned into an oxidized form (Fe³⁺) in the molecules of hemoglobin, which was evidenced by the transformation of oxyhemoglobin HbO₂ into methemoglobin MetHbO₂. The concentration and dose dependence of these processes was established. Fe³⁺ is known to prevent gas exchange between blood and tissues. Therefore, the appearance of MetHb in the blood leads to tissue hypoxia, and in high concentrations can even be fatal.

Perfluorocarbon compound «Perftoran» (Russian Federation) [18, 19] and cytoflavin (Polysan, Russian Federation) [15] were used to reduce Fe³⁺ to Fe²⁺ and, accordingly, to transform MetHb to HbO₂. At the same time, methemoglobin was reduced to oxyhemoglobin depending on the concentrations of these substances and incubation time. Concentrations of perftoran (PFC) were recorded later as indices (µl PFC per 200 µl of erythrocyte suspension). Cytoflavin concentrations were recorded as volume of cytoflavin (µl) per 150 µl of cell suspension. Fig. 2 shows MetHb concentrations on UV exposure and after introduction of Perftoran emulsion, the optical spectra, as well as the AFM field erythrocyte images under the same conditions.

Initially, 90–98% of erythrocytes were discocytes (fig. 2, a). After UV exposure, the number of discocytes decreased, and stomatocytes, echinocytes, spherocytocytes, ghost cells ap-

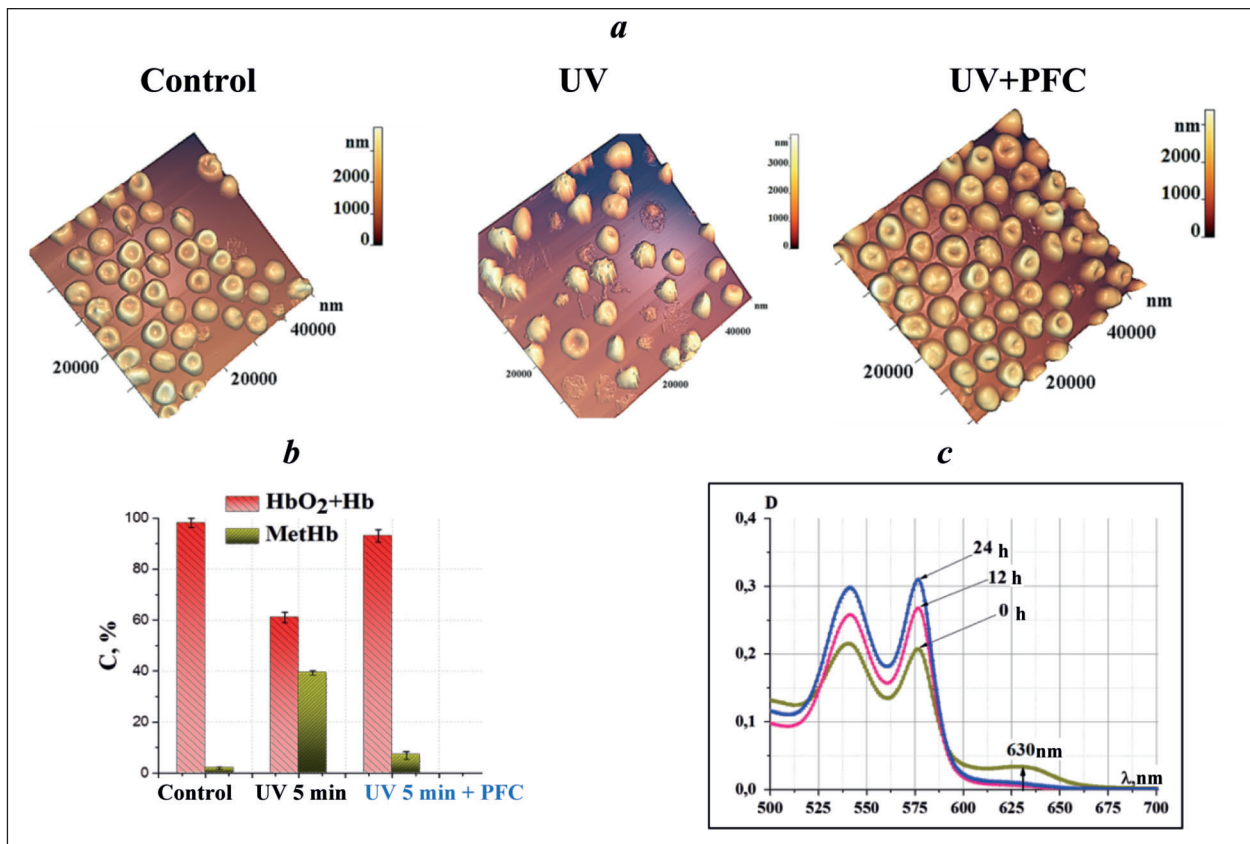


Рис. 2. Восстанавливающее действие PFC в суспензии эритроцитов.

Fig. 2. The reducing effect of PFC in erythrocyte suspensions.

Note. *a* — AFM 3D cell images: initial (control cells) on the left, the cells damaged by the UV exposure are in the middle, on the right are the cells damaged by UV and subsequently exposed to PFC for 24 hours; *b* — percentage of MetHb, HbO₂, Hb in the control, after UV exposure and subsequent PFC exposure, PFC incubation time was 24 hours; *c* — absorption spectrum changes after UV exposure and subsequent PFC action (*t*=0, 12, 24 hours).

Примечание. *a* — АСМ 3D-изображения клеток: слева — исходные (контрольные) клетки, в середине — клетки, поврежденные в результате действия UV излучения, справа — клетки после UV воздействия и последующего действия PFC в течение 24 час; *b* — процентное содержание MetHb, HbO₂, Hb в контроле, после воздействия UV и последующего действия PFC, время инкубации PFC 24 часа; *c* — динамика изменений спектра поглощения после воздействия UV излучения и последующего действия PFC50 (*t*=0, 12, 24 часа).

вызванное NaNO₂ и ультрафиолетовым излучением ($\lambda=254$ нм). В молекулах гемоглобина Fe²⁺ переходил в окисленную форму — Fe³⁺, о чем свидетельствовало превращение оксигемоглобина HbO₂ в метгемоглобин MetHbO₂. Установили концентрационную и дозовую зависимости этих процессов. Известно, что Fe³⁺ не позволяет осуществлять газообмен между кровью и тканями. Поэтому появление MetHb в крови ведет к гипоксии тканей, а при высокой концентрации может приводить даже к летальному исходу.

Для восстановления Fe³⁺ в Fe²⁺ и, соответственно, для превращения MetHb в HbO₂ использовали перфлюорокарбонное соединение «Перфторан» (PФ) [18,19] и цитофлавин (Полисан, PФ) [15]. При этом метгемоглобин восстанавливался до оксигемоглобина в зависимости от концентраций этих веществ и времени инкубации. Концентрации перфторана (PFC) записывали далее в виде индексов (мкл PFC в 200 мкл суспензии эритроцитов). Концентрации

appeared (fig. 2, *b*). As a result of subsequent PFC exposure, the percentage of discocytes recovered to 80–90%. The change in erythrocyte shapes associated with changes in concentrations of hemoglobin derivatives (fig. 2, *b, c*). The initial content of MetHb was about 0.5%. After UV exposure it increased to 35–40%, and after PFC exposure it was 2–5%. Thus, in vitro experiments showed that perftoran can be effectively used to restore MetHb to HbO₂.

These experimental data demonstrate the restorative effect of PFC on erythrocytes both in damage to membranes and cell structure, and in abnormal hemoglobin molecules.

The effect of agents on the system can be demonstrated by time and concentration dependence. Absorption spectra of hemoglobin derivatives solutions for different incubation times with PFC are shown in fig. 2, *c*. With increasing incubation time, peak at wavelength 630 nm dropped, and peaks at 542 nm and 577 nm grew, which indicates a decrease in MetHb content and, consequently, an increase in HbO₂+Hb.

цитофлавина записывали как объем цитофлавина (мкл) в 150 мкл суспензии клеток. На рис. 2 представили концентрации MetHb при действии UV и после введения эмульсии «Перфторан», оптические спектры, а также изображения эритроцитов в поле АСМ в тех же условиях.

Исходно 90–98% эритроцитов были дискоцитами (рис. 2, *a*). После воздействия UV количество дискоцитов уменьшалось, при этом появлялись стоматоциты, эхиноциты, сфероэхиноциты, тени (рис. 2, *b*). В результате последующего действия PFC процентное содержание дискоцитов восстанавливалось до 80–90%. Изменение форм эритроцитов сопровождалось изменением концентраций производных гемоглобина (рис. 2, *b, c*). Исходное количество MetHb было около 0,5%. После воздействия UV оно возросло до 35–40%, а после действия PFC составило 2–5%. Таким образом, в экспериментах *in vitro* показали, что можно эффективно использовать перфторан для восстановления MetHb в HbO₂.

The concentration dependence of the PFC exposure is shown in fig. 2, *a* (left). As early as at the concentration of PFC 5–10 µl/ml of the suspension there was a significant reduction of Fe³⁺ to Fe²⁺, i. e., MetHb to HbO₂ + Hb.

The qualitative result of transformation of methemoglobin into oxyhemoglobin is presented in the photo (fig. 2, *a, right*). The dark brown suspension after UV exposure changed its color to red after 24 hours of incubation with PFC.

Cytoflavin was also used as a reducing agent (fig. 3, *b*). In these cases the dependence of effect on concentration was also observed. Cytoflavin allowed reducing MetHb concentration from 80–90% to 20–25%.

Exposure of RBCs to oxidizing agents can produce two effects: 1) oxidation of iron, Fe²⁺ to Fe³⁺, and, accordingly, increase of MetHb concentration in them; 2) erythrocyte hemolysis.

Depending on the nature of the agent, the ratio of these biophysical processes was different (fig. 3, *c, d*). Thus, if the oxidizing agent was ionizing

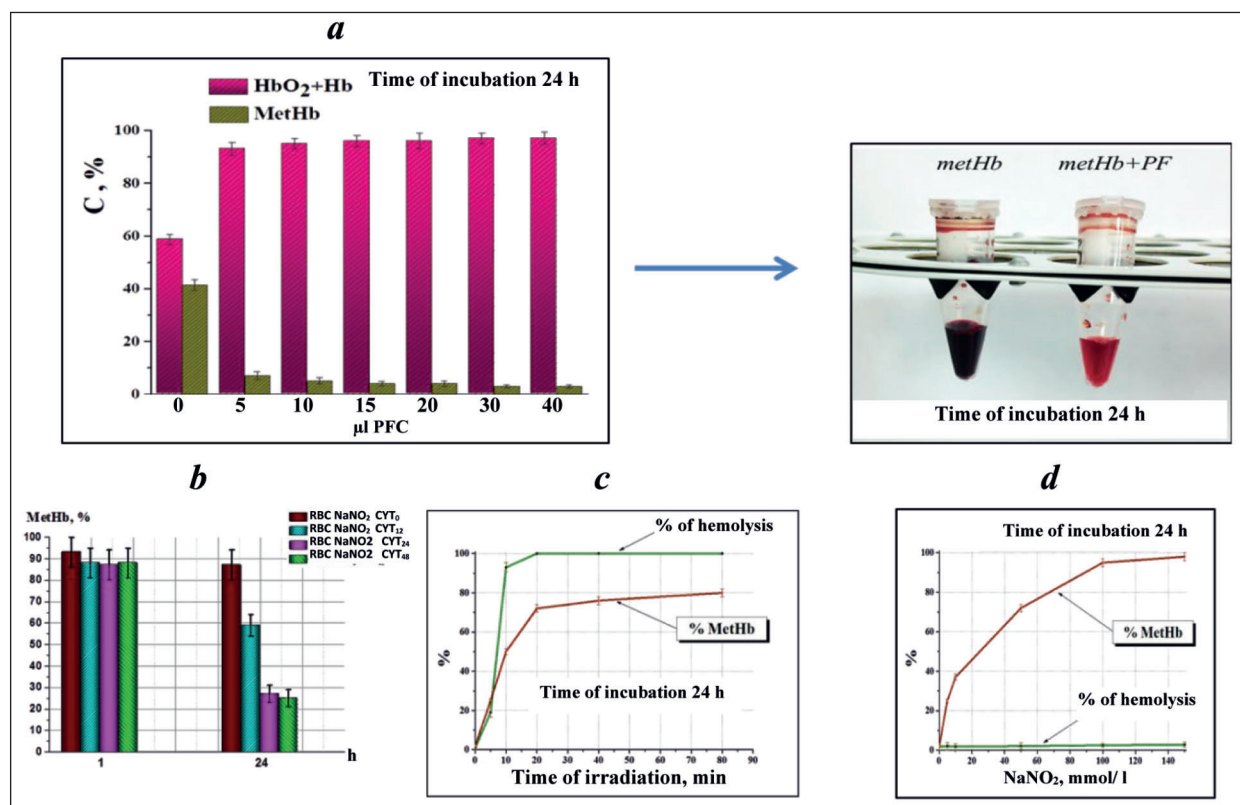


Рис. 3. Производные гемоглобина.

Fig. 3. Hemoglobin derivatives.

Note. *a* — Suspension after UV irradiation and subsequent PFC exposure in various concentrations (concentration dependence) on the left; photos of suspension after UV irradiation and subsequent incubation with PFC for 24 hours on the right; *b* — MetHb formation as a result of NaNO₂ exposure and reduction of Fe³⁺ to Fe²⁺ after exposure to cytoflavin in different concentrations (concentration dependence); *c* and *d* — correlation of biological effects (iron oxidation and hemolysis) after exposure to different agents: *c* — UV irradiation; *d* — addition of NaNO₂.

Примечание. *a* — слева — суспензия после UV облучения и последующего действия PFC в различных концентрациях (концентрационная зависимость); справа — фотографии суспензии после UV облучения и последующей инкубации с PFC в течение 24 часа; *b* — образование MetHb в результате действия NaNO₂ и восстановление Fe³⁺ до Fe²⁺ под действием цитофлавина различной концентрации (концентрационная зависимость); *c* и *d* — соотношение биологических эффектов (окисление железа и гемолиз) при действии различных агентов: *c* — UV облучение; *d* — добавление NaNO₂.

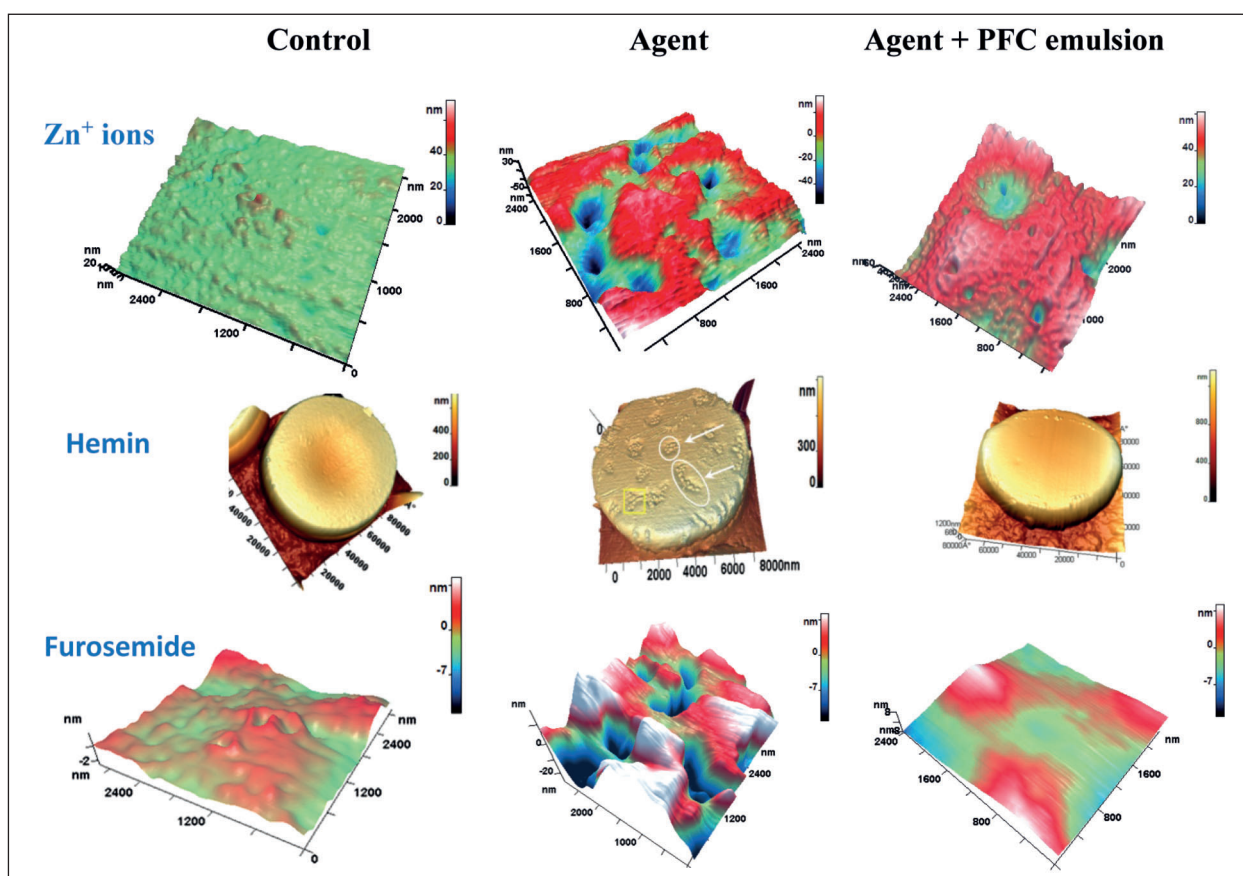


Рис. 4. Дефекты мембран эритроцитов в поле атомного силового микроскопа при действии фармакохимических агентов различной природы и протекторный эффект перфторуглеродной эмульсии «Перфторан».

Fig. 4. Defects of erythrocyte membranes in the field of atomic force microscope after exposure to various chemical agents and the protective effect of the Perftoran perfluorocarbon emulsion.

Эти экспериментальные данные свидетельствуют о восстанавливающем действии PFC на эритроциты как при повреждениях мембран и структуры клеток, так и при нарушении состояния молекул гемоглобина.

Показателем действия агентов на систему является временная и концентрационная зависимости. На рис. 2 с привели спектры поглощения растворов производных гемоглобина для различного времени инкубации с PFC. С увеличением времени инкубации пик на длине волны 630 нм уменьшался, а на 542 нм и 577 нм пики увеличивались, что свидетельствовало об уменьшении содержания MetHb и, соответственно, об увеличении HbO₂+Hb.

Концентрационную зависимость действия PFC представили на рис. 2, а (слева). Уже при концентрации PFC 5–10 мкл/мл суспензии происходило значительное восстановление Fe⁺³ до Fe⁺², то есть MetHb до HbO₂+Hb.

Качественно результат превращения метгемоглобина в оксигемоглобин представили на фотографии (рис. 2, а, справа). Темнокоричневая суспензия после UV воздействия меняла цвет на красную после 24 часов инкубации с PFC.

radiation, UV radiation, both processes occurred with the same intensity, and the dose dependence and irradiation time dependence was observed (fig. 3, c). When using the NaNO₂ agent (depending on the concentration), the content of MetHb in erythrocytes was intensively increased, but their hemolysis was practically absent (fig. 3, d). This interesting fact is important to consider when analyzing the effect of factors of different nature, including viruses and bacteria, on red blood cells.

In a number of experiments, the protective effect of the Perftoran emulsion on erythrocyte membranes was shown using AFM method (fig. 4). Hemin, ZnSO₄ and furosemide were used as membrane damaging agents. As a result of blood exposure to these agents, topological nanodefects of cell membranes in the range of 20–200 nm were found. Subsequent exposure to PFC led to a reduction in the size of membrane defects or to their complete «healing».

If the virus causes structural disorders and local cell defects, Perftoran is very likely to have a protective effect and prevent damage to both cells and cell membranes.

A major problem with the Covid-19 pandemic is the high mortality rate of the elderly, with less

В качестве восстанавливающего агента использовали также цитофлавин (рис. 3, *b*). В этих случаях также наблюдали концентрационную зависимость действия. Цитофлавин позволил уменьшить концентрацию MetHb с 80–90% до 20–25%.

При воздействии окисляющих агентов на эритроциты могут возникнуть два эффекта: 1) окисление железа, Fe^{2+} до Fe^{3+} , и, соответственно, увеличение содержания в них MetHb; 2) гемолиз эритроцитов.

В зависимости от природы агента, соотношение этих биофизических процессов было разным (рис. 3, *c, d*). Так, если окисляющим агентом являлось ионизирующее излучение, UV излучение, то одновременно интенсивно протекали оба эти процесса, причем наблюдали дозозависимость — зависимость от времени облучения (рис. 3, *c*). При использовании агента $NaNO_2$, (в зависимости от концентрации) интенсивно увеличивалось содержание MetHb в эритроцитах, но практически не наблюдали их гемолиз (рис. 3, *d*). Этот интересный факт важно учитывать при анализе действия факторов различной природы, в том числе и вирусов, и бактерий на красные клетки крови.

В ряде экспериментов методом АСМ показали протекторное действие эмульсии «Перфторан» на мембраны эритроцитов (рис. 4). В качестве повреждающих мембрану агентов использовали $ZnSO_4$, гемин, фуросемид. В результате действия этих агентов на кровь наблюдали появление топологических нанодфектов мембран клеток в диапазоне 20–200 нм. Последующее воздействие PFC приводило к уменьшению, размеров мембранных дефектов, либо к их полному «залечиванию».

Если вирус вызывает нарушения структуры и локальные дефекты клеток, то перфторан с большой вероятностью может оказать протекторное действие и предотвратить повреждение как самих клеток, так и клеточных мембран.

Тяжелой проблемой при пандемии Covid-19 является высокая смертность заболевших пожилых людей, при том, что инфицирование зависит от возраста людей в меньшей степени. Возможно, что высокая смертность людей пожилого возраста связана с исходным состоянием сосудов и мембран эритроцитов.

Используя метод мягкой электропорации (обратимый пробой мембран) мы показали ранее, что мембраны пожилых людей (65–74 лет) действительно более уязвимы, имеют большее количество потенциальных дефектов по сравнению с таковыми у людей молодого и среднего возраста [17]. Этот метод может способствовать выявлению пациентов

age-dependent infection susceptibility. The high mortality in older persons is probably due to the initial condition of blood vessels and red blood cell membranes.

Using a soft electroporation method (reversible membrane perforation), we have previously shown that membranes of older persons (65–74 years old) are indeed more vulnerable and have more potential defects than those of young and middle-aged people [17]. This method can help identify patients with increased risk of SARS-CoV-2 adverse effect on blood cells.

Conclusion

Perfluorocarbon emulsion Perftoran has a cytoprotective effect, provides additional capacity for the transfer of O_2 by blood, and contributes to the reduction of Fe^{3+} to Fe^{2+} in the heme. This emulsion is promising compound that promotes gas exchange in patients in critical conditions and can be used to protect blood cells. In the light of the hypotheses presented, perfluorocarbon emulsion (Perftoran) can be effectively used to control Covid-19. Atomic force microscopy, high-resolution optical spectroscopy and electroporation methods can be successfully used to study the molecular mechanisms of SARS-CoV-2 action on blood cells. Studies using such methods can provide a scientific rationale for the hypotheses currently presented.

с повышенным риском действия SARS-CoV-2 на клетки крови.

Заклучение

Перфторуглеродная эмульсия «Перфторан» обладает цитопротекторной функцией, предоставляет дополнительную емкость для переноса O_2 кровью, способствуют восстановлению Fe^{3+} до Fe^{2+} в гемах гемоглобина, поэтому она является перспективным соединением, способствующим газообмену у больных в критических состояниях, и может быть применима для защиты клеток крови.

В свете представленных гипотез, перфторуглеродная эмульсия («Перфторан»), может эффективно использоваться для борьбы с Covid-19. Методы АСМ, оптической спектроскопии высокого разрешения и электропорации могут быть успешно использованы для изучения молекулярных механизмов действия коронавируса SARS-CoV-2 на клетки крови. Исследования с использованием подобных методов могут способствовать научному обоснованию гипотез, выдвигаемых сегодня.

Литература

- Varga Z., Flammer A.J., Steiger P., Haberecker M., Andermatt R., Zinkernagel A.S., Mehra M.R., Schuepbach R.A., Ruschitzka F., Moch H. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet*. 2020; 395 (10234): 1417–1418. DOI: 10.1016/S0140-6736 (20)30937-5. PMID: 32325026.
- Cyranoski D. Profile of a killer: the complex biology powering the coronavirus pandemic. *Nature*. 2020; 581 (7806): 22–26. DOI: 10.1038/d41586-020-01315-7.
- Liu W., Li H. COVID-19: Attacks the 1-Beta Chain of Hemoglobin and Captures the Porphyrin to Inhibit Human Heme Metabolism. *ChemRxiv*. 2020; preprint. DOI: 10.26434/chemrxiv.11938173.v8.
- Janz D.R., Ware, L.B. The role of red blood cells and cell-free hemoglobin in the pathogenesis of ARDS. *J Intensive Care* 2015; 3 (20). DOI: 10.1186/s40560-015-0086-3
- Schaer D.J., Buehler P.W. Cell-free hemoglobin and its scavenger proteins: new disease models leading the way to targeted therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013; 3 (6): a013433. PMID: 23645855 PMCID: PMC3662353 DOI: 10.1101/cshperspect.a013433.
- Kloka E.A., Kruijb M.J.H.A., Meerc N.J.M., Arbousd M.S., Gommerse D.A.M.P.J., Kantf K.M., Kapteina F.H.J., Paassend J., Stalsa M.A.M., Huismana M.V., Endemane H. Incidence of Thrombotic Complications in Critically Ill ICU Patients With COVID-19. *Thromb. Res*. 2020; S0049-3848 (20)30120-1. DOI: 10.1016/j.thromres.2020.04.013. PMID: 32291094.
- Ulrich H., Pillat M.M.. CD147 as a Target for COVID-19 Treatment: Suggested Effects of Azithromycin and Stem Cell Engagement. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2020 DOI: 10.1007/s12015-020-09976-7
- Cohen E.S. How Viruses Invade Cells. *Biophys J*. 2016; 110 (5): 1028–1032. DOI: 10.1016/j.bpj.2016.02.006
- Orlov Y.I. Intravascular Hemolysis of Red Blood Cells in the Development of Organ Dysfunctions in Critical Conditions. *General Reanimatology*. 2008; 4 (2): 88. [In Russ.] DOI: 10.15360/1813-9779-2008-2-88.
- Conran N., Almeida C.B. Hemolytic vascular inflammation: an update. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2016; 38 (1): 55–57. DOI: 10.1016/j.bjhh.2015.10.004. PMID: 26969775.
- Kozlova E.K., Chernysh A.M., Matteys T.N. Modeling of blood flow as the result of filtration-reabsorption processes in capillaries. *Adv. Physiol. Educ*. 2000; 23 (1): 32–39. DOI: 10.1152/advances.2000.23.1.S32. PMID: 10902525.
- Park M.S. Diffuse alveolar hemorrhage. *Tuberc. Respir. Dis. (Seoul)*. 2013; 74 (4): 151–162. DOI: 10.4046/trd.2013.74.4.151. PMID: 23678356.
- Mitra A., Dwyre D.M., Schivo M., Thompson G.R., Cohen S.H., Ku N. Graff J.P. Leukoerythroblastic reaction in a patient with COVID-19 infection. *American Journal of Hematology*. 2020, Mar 25. DOI: 10.1002/ajh.25793. [Epub ahead of print]
- Cheng R. Hospital treatment of serious and critical COVID-19 infection with high-dose Vitamin C. Cheng Integrative Health Center Blog <http://www.drwlc.com/blog/2020/03/18/hospital-treatment-of-serious-and-critical-covid-19-infection-with-high-dose-vitamin-c/?fbclid=IwAR3qzrI-tjYloYMIqGQRWUfoionQPWNyJFrRyv-GQ18Rg3GSG9Sn-Z7Ln58>
- Kozlova E., Chernysh A., Sergunova V., Gudkova O., Manchenko E., Kozlov A. Atomic force microscopy study of red blood cell membrane nanostructure during oxidation-reduction processes. *J. Mol. Recognit*. 2018; 31 (10): e2724. DOI: 10.1002/jmr.2724. PMID: 29740886.
- Jensen F.B. Nitric oxide formation from nitrite in zebrafish. *J. Exp. Biol*. 2007; 210 (19): 3387–3394. DOI: 10.1242/jeb.008748. PMID: 17872992
- Moroz V.V., Kozlova E.K., Bogushevich M.S., Chernysh A.M., Bliznyuk U.A., Kozlov A.P., Alekseyeva P.Y. Red Blood Cell Membranes in Donors of Different Age Groups. *General Reanimatology*. 2006; 2 (3): 9–11. [In Russ.] DOI: 10.15360/1813-9779-2006-3-9-11.
- Maevsky E., Ivanitsky G., Bogdanova L., Axenova O., Karmen N., Zhiburt E., Senina R., Pushkin S., Maslennikov I., Orlov A., Marinicheva I. Clinical results of perfortan application: present and future. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol*. 2005; 33 (1): 37–46. DOI: 10.1081/bio-200046654. PMID: 15768564
- Rafikova O., Sokolova E., Rafikov R., Nudler E. Control of plasma nitric oxide bioactivity by perfluorocarbons: physiological mechanisms and clinical implications. *Circulation*. 2004; 110 (23): 3573–3580. PMID: 15557364 DOI: 10.1161/01.CIR.0000148782.37563.F8

Поступила 30.04.2020

References

- Varga Z., Flammer A.J., Steiger P., Haberecker M., Andermatt R., Zinkernagel A.S., Mehra M.R., Schuepbach R.A., Ruschitzka F., Moch H. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet*. 2020; 395 (10234): 1417–1418. DOI: 10.1016/S0140-6736 (20)30937-5. PMID: 32325026.
- Cyranoski D. Profile of a killer: the complex biology powering the coronavirus pandemic. *Nature*. 2020; 581 (7806): 22–26. DOI: 10.1038/d41586-020-01315-7.
- Liu W., Li H. COVID-19: Attacks the 1-Beta Chain of Hemoglobin and Captures the Porphyrin to Inhibit Human Heme Metabolism. *ChemRxiv*. 2020; preprint. DOI: 10.26434/chemrxiv.11938173.v8.
- Janz D.R., Ware, L.B. The role of red blood cells and cell-free hemoglobin in the pathogenesis of ARDS. *J Intensive Care* 2015; 3 (20). DOI: 10.1186/s40560-015-0086-3
- Schaer D.J., Buehler P.W. Cell-free hemoglobin and its scavenger proteins: new disease models leading the way to targeted therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013; 3 (6): a013433. PMID: 23645855 PMCID: PMC3662353 DOI: 10.1101/cshperspect.a013433.
- Kloka E.A., Kruijb M.J.H.A., Meerc N.J.M., Arbousd M.S., Gommerse D.A.M.P.J., Kantf K.M., Kapteina F.H.J., Paassend J., Stalsa M.A.M., Huismana M.V., Endemane H. Incidence of Thrombotic Complications in Critically Ill ICU Patients With COVID-19. *Thromb. Res*. 2020; S0049-3848 (20)30120-1. DOI: 10.1016/j.thromres.2020.04.013. PMID: 32291094.
- Ulrich H., Pillat M.M.. CD147 as a Target for COVID-19 Treatment: Suggested Effects of Azithromycin and Stem Cell Engagement. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2020 DOI: 10.1007/s12015-020-09976-7
- Cohen E.S. How Viruses Invade Cells. *Biophys J*. 2016; 110 (5): 1028–1032. DOI: 10.1016/j.bpj.2016.02.006
- Orlov Y.I. Intravascular Hemolysis of Red Blood Cells in the Development of Organ Dysfunctions in Critical Conditions. *General Reanimatology*. 2008; 4 (2): 88. [In Russ.] DOI: 10.15360/1813-9779-2008-2-88.
- Conran N., Almeida C.B. Hemolytic vascular inflammation: an update. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2016; 38 (1): 55–57. DOI: 10.1016/j.bjhh.2015.10.004. PMID: 26969775.
- Kozlova E.K., Chernysh A.M., Matteys T.N. Modeling of blood flow as the result of filtration-reabsorption processes in capillaries. *Adv. Physiol. Educ*. 2000; 23 (1): 32–39. DOI: 10.1152/advances.2000.23.1.S32. PMID: 10902525.
- Park M.S. Diffuse alveolar hemorrhage. *Tuberc. Respir. Dis. (Seoul)*. 2013; 74 (4): 151–162. DOI: 10.4046/trd.2013.74.4.151. PMID: 23678356.
- Mitra A., Dwyre D.M., Schivo M., Thompson G.R., Cohen S.H., Ku N. Graff J.P. Leukoerythroblastic reaction in a patient with COVID-19 infection. *American Journal of Hematology*. 2020, Mar 25. DOI: 10.1002/ajh.25793. [Epub ahead of print]
- Cheng R. Hospital treatment of serious and critical COVID-19 infection with high-dose Vitamin C. Cheng Integrative Health Center Blog <http://www.drwlc.com/blog/2020/03/18/hospital-treatment-of-serious-and-critical-covid-19-infection-with-high-dose-vitamin-c/?fbclid=IwAR3qzrI-tjYloYMIqGQRWUfoionQPWNyJFrRyv-GQ18Rg3GSG9Sn-Z7Ln58>
- Kozlova E., Chernysh A., Sergunova V., Gudkova O., Manchenko E., Kozlov A. Atomic force microscopy study of red blood cell membrane nanostructure during oxidation-reduction processes. *J. Mol. Recognit*. 2018; 31 (10): e2724. DOI: 10.1002/jmr.2724. PMID: 29740886.
- Jensen F.B. Nitric oxide formation from nitrite in zebrafish. *J. Exp. Biol*. 2007; 210 (19): 3387–3394. DOI: 10.1242/jeb.008748. PMID: 17872992
- Moroz V.V., Kozlova E.K., Bogushevich M.S., Chernysh A.M., Bliznyuk U.A., Kozlov A.P., Alekseyeva P.Y. Red Blood Cell Membranes in Donors of Different Age Groups. *General Reanimatology*. 2006; 2 (3): 9–11. [In Russ.] DOI: 10.15360/1813-9779-2006-3-9-11.
- Maevsky E., Ivanitsky G., Bogdanova L., Axenova O., Karmen N., Zhiburt E., Senina R., Pushkin S., Maslennikov I., Orlov A., Marinicheva I. Clinical results of perfortan application: present and future. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol*. 2005; 33 (1): 37–46. DOI: 10.1081/bio-200046654. PMID: 15768564
- Rafikova O., Sokolova E., Rafikov R., Nudler E. Control of plasma nitric oxide bioactivity by perfluorocarbons: physiological mechanisms and clinical implications. *Circulation*. 2004; 110 (23): 3573–3580. PMID: 15557364 DOI: 10.1161/01.CIR.0000148782.37563.F8

Received 30.04.2020