

В. В. ЗИНЧУК, Т. Л. СТЕПУРО

## ВНУТРИЭРИТРОЦИТАРНАЯ СИСТЕМА РЕГУЛЯЦИИ СРОДСТВА ГЕМОГЛОБИНА К КИСЛОРОДУ

*Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь*

Кислородсвязывающие свойства крови определяются различными факторами (рН, 2,3-дифосфоглицерат, углекислый газ, температура и др.), которые образуют относительно автономную внутриэритроцитарную систему. Полезный приспособительный результат данной системы направлен на оптимизацию функциональных свойств гемоглобина, что позволяет адекватно обеспечивать аэробный метаболизм тканей. Особое значение в регуляции сродства гемоглобина к кислороду отводится оксиду азота и его производным, которые реализуют своё действие как непосредственно, так и опосредованно через влияние на мембранную организацию эритроцитов.

*Ключевые слова:* сродство гемоглобина к кислороду, внутриэритроцитарная система регуляции сродства гемоглобина к кислороду, оксид азота, пероксинитрит.

**Введение.** Физиологическое значение функционирования системы транспорта кислорода (СТК) в организме заключается в обеспечении адекватного поступления кислорода в ткани [2, 8]. При реализации данной функции происходит объединение органов систем дыхания и кровообращения, а также механизмов их регуляции. Одним из объединяющих, интегрирующих компонентов в данной системе является кровь. В процессе циркуляции она подвержена влияниям со стороны отдельных органов, что позволяет ей выступать в роли носителя специфической информации о потреблении кислорода тканями. Вместе с тем данную структуру можно рассматривать и как эффекторное звено, способное адаптировать функционирование компонентов СТК к потребностям организма. Например, показано, что состояние кислородсвязывающих свойств крови определяет работу сердечно-сосудистой системы, выявлены ее функциональные взаимоотношения с центральными механизмами регуляции [2]. В итоге, согласованная работа компонентов СТК обеспечивает удовлетворение потребностей всего организма в кислороде.

В отдельных органах и тканях поддержание оптимального кислородного режима достигается за счет изменения двух основных параметров: площади диффузии кислорода и его капиллярно-тканевого градиента. Оптимизация последнего приспособительного результата достигается, в большей степени, за счет изменения количества и функциональных свойств гемоглобина (Hb). Данный факт подтвержден экспериментами, свидетельствующими о том, что для крови, оттекающей от отдельных органов, характерно различное значение показателя сродства к кислороду [2]. На основании этого были сформулированы представления об автономной внутриэритроцитарной системе регуляции сродства гемоглобина к кислороду (СГК), позволяющей удовлетворять местные особенности аэробного обмена за счет изменения функциональных свойств гемоглобина [1].

Оптимизация свойств гемоглобина эволюционно закрепилась и реализуется в особенностях строения его молекулы, в определенном эритроцитарном структурировании белка, а также в наличии внутри- и внеэритроцитарных факторов регуляции его свойств.

**Общая характеристика гемоглобина.** Красный пигмент крови представляет собой гемопротейд-тетрамер, каждый мономер которого включает простетический гемовый компонент и апоглобин – белковую цепь. Существует как минимум 6 генов, ответственных за синтез глобина у человека. В результате в эритроцитах транслируется 6 основных типов цепей с различной аминокислотной последовательностью. Основной гемоглобин взрослого человека – HbA, представлен парами  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей, которые в виде двух  $\alpha\beta$ -димеров располагаются вокруг центральной полости, заполненной молекулами воды [46]. Гемовая группа, в свою очередь, состоит из порфиринового кольца с атомом железа в центре. В норме железо находится в 2+ редокс-состоянии (феррогемоглобин) и способно обратимо связывать кислород и другие лиганды. Взаимодействие гемоглобина с лигандами протекает также и по апоглобину [49].

Каждая молекула гемоглобина включает четыре субъединицы, которые взаимодействуют друг с другом, проявляя кооперативный эффект. Суть такого гомотропного взаимодействия состоит в том, что присоединение лиганда, например, кислорода, к первой субъединице облегчает присоединение кислорода к последующим [47]. В основе этого явления лежат перестройки как третичной, так и четвертичной структуры белка. В результате такого взаимодействия мономеров кривая насыщения гемоглобина кислородом в зависимости от напряжения  $O_2$  имеет S-образный вид, а не гиперболический, который присущ миоглобину, аналогу субъединицы гемоглобина. Физиологический смысл такой формы кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО) заключается в том, что гемоглобин даже при низком  $pO_2$  в альвеолах способен связывать кислород в достаточном количестве и одновременно с этим поддерживать необходимый градиент кислорода между кровью и тканями, сохраняя определенную степень насыщенности кислородом в венозном отделе кровеносной системы. В области полунасыщения КДО образует крутой подъем. В этой части кривой степень оксигенированности гемоглобина снижается существенно при небольших изменениях  $pO_2$ . Этот механизм позволяет адекватно обеспечивать потребности работающих органов и тканей в кислороде без дополнительных энергетических затрат [13].

Помимо положительного гомотропного взаимодействия при оксигенации, гемоглобин подвержен гетеротропным влияниям. Еще в 1965 г. Monod, Wyman и Changeux была предложена модель кооперативности, которая предполагала наличие двух конформаций белка: R (relaxed) – максимально реакционной, обладающей высоким сродством к субстрату, и T (tense) – с минимальным значением активности.  $T \leftrightarrow R$  конформационный переход молекулы гемоглобина регулируется как аллостерическими эффекторами, так и субстратом – кислородом в процессе оксигенации [54].

Согласно представлениям Perutz [47], в T (дезоксигемоглобин)-конформации гемоглобина внутри мономера возникают солевые связи – мостики, и атом железа располагается за пределами плоскости порфиринового кольца. В процессе оксигенации железо «втягивается» в плоскость гема, способствуя реорганизации пептидной спирали, что оказывает влияние на структуру всей молекулы гемоглобина и приводит к образованию R (оксигенированной)-конформации белка.

Современные представления о механизме кооперативности и аллостерической регуляции функций гемоглобина предполагают, что в отсутствие гетеротропных эффекторов данный гемопротеид оказывается достаточно инертным, проявляя слабую функциональную подвижность [66]. Влияние гетеротропных эффекторов согласно динамической аллостерической модели [65], оказывает минимальные сдвиги спиралей гемоглобина, вызывая скорее перестройки третичной структуры белка, нежели T/R конформационные переходы четвертого порядка [38]. Таким образом, именно окружение гемоглобина, наличие эффекторов, позволяет регулировать способность гемоглобина связывать и отдавать кислород в ответ на изменение физиологических стимулов, что расширяет диапазон реакции сродства гемоглобина к кислороду как одного из компонентов, обеспечивающих полезный приспособительный результат СТК.

**Внутриэритроцитарная система регуляции сродства гемоглобина к кислороду.** Заключение гемоглобина в специализированные клетки является универсальным признаком для всех позвоночных. Эритроциты обладают рядом свойств, позволяющих оптимизировать не только дыхательную, но и гемодинамическую, транспортную и другие функции в организме. Во-первых, высокая концентрация гемоглобина внутри эритроцита и изоляция пигмента от плазмы позволяет резко повысить кислородную емкость крови без увеличения онкотического давления в плазме, что имеет огромное значение для обмена воды и электролитов между тканями и кровью в тканевых капиллярах. Кроме этого, красные клетки обладают способностью уменьшать вязкость крови в самом ответственном для обмена веществ звене кровеносного русла – в артериолах и капиллярах. Во-вторых, обособление гемоглобина внутри эритроцита необходимо для сохранения пигментом сложного строения, для обеспечения кооперативного эффекта и своеобразной формы КДО. Существенным преимуществом клеточного структурирования гемоглобина является также возможность поддержания наиболее благоприятной ионной среды и наличие специфических регуляторов для выполнения дыхательным пигментом своих функций.

Представления о регуляции свойств гемоглобина начинались с выявления эффектов отдельных лигандов (2,3-дифосфоглицерат, углекислый газ, ионы и т.д.) и параметров среды (температура, pH) на положение КДО [11]. Позже в рамках теории функциональных систем П. К. Анохина, были обоснованы системные механизмы регуляции сродства крови к кислороду на уровне эритроцита и их зависимость от различных элементов системы транспорта кислорода [1, 2]. Показано, что, благодаря наличию внутриэритроцитарной системы, на уровне эритроцита происходит адаптация генетически детерминированных свойств гемоглобина к регионарным потребностям в кислороде. В данной

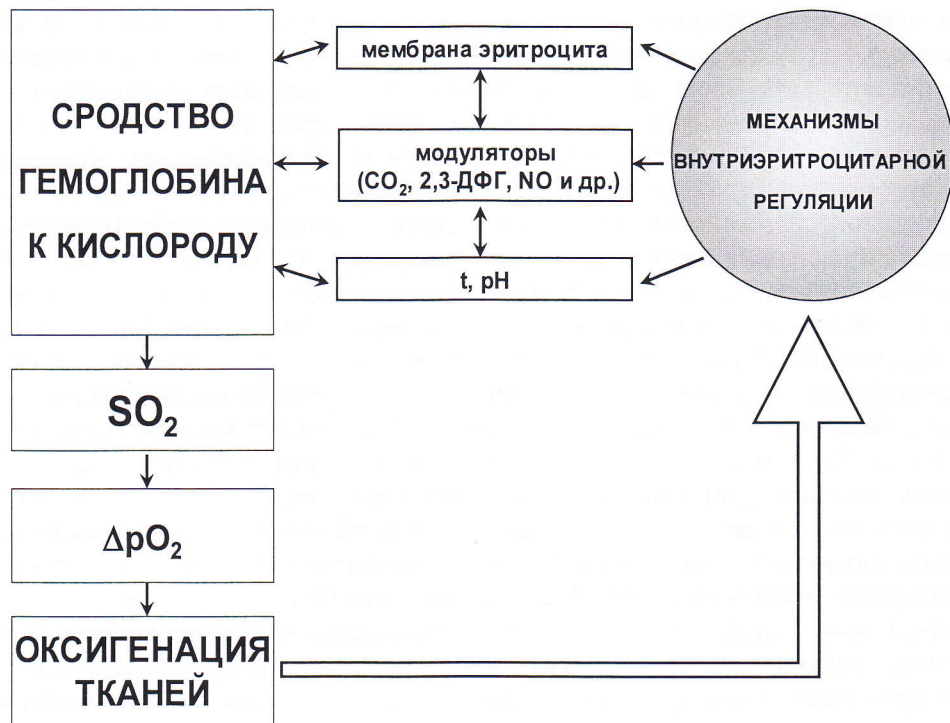
системе дыхательный пигмент выполняет функцию сенсора, степень дезоксигенированности которого является специфической информацией, отражающей потребление кислорода тканями. Одновременно с этим гемоглобин оказывается эффекторным звеном и посредством воздействия на него происходит модуляция потока кислорода в клетки. Регуляция способности гемоглобина связывать и отдавать кислород осуществляется рядом факторов прямого и косвенного действия. Прямого действия эффекторы представляют собой лиганды (кислород, протоны, углекислый газ, органические фосфаты и т.д.), способные взаимодействовать с гемоглобином и изменять в результате его конформацию и свойства. Косвенное действие факторов среды направлено на изменение характера взаимодействия лиганда с белком (температура, кислотность среды).

Наличие внутриэритроцитарной системы регуляции сродства гемоглобина к кислороду становится очевидным, если сравнить характеристики раствора гемоглобина и цельной крови [6, 42]. Как известно, р50 гемолизата составляет примерно 16–18 мм рт. ст., а для внутриэритроцитарного гемоглобина – почти в 1,5–2 раза больше. В растворе происходит распад тетрамеров гемоглобина до моно- и димеров, у которых ослаблено как гомотропное взаимодействие субъединиц, так и гетеротропное взаимодействие с лигандами [66]. Такой гемоглобин менее устойчив к окислению, что снижает его кислородную емкость. Более того, неинкапсулированный гемоглобин при аутоокислении активизирует образование кислородных и азотных свободных радикалов [16]. В то же время образующийся в эндотелии оксид азота подвергается мгновенной «инактивации» растворенным гемоглобином, что приводит к негативным изменениям реологических свойств крови и гемодинамики [52].

Данные факты подтверждают то, что эритроциты – это не просто форма для упаковки гемоглобина. Помимо того, что красные клетки крови оптимизируют гемодинамическую функцию крови, внутри клеток существует система факторов и механизмов, способная сохранять оптимальной структуру гемоглобина и адаптивно регулировать его свойства в процессе циркуляции и цикла оксигенации/дезоксигенации в зависимости от потребностей отдельных органов.

На рисунке представлена схема участия внутриэритроцитарной системы регуляции SGK в обеспечении оптимального снабжения тканей кислородом. Механизмы, регулирующие кислородтранспортные свойства крови, реализуются на нескольких уровнях. Во-первых, они затрагивают мембранную организацию эритроцитов: состав и упруго-эластические свойства мембраны, её транспортную функцию, взаимодействие с компонентами цитоскелета и модуляторами SGK и т.д. Во-вторых, кислородтранспортная функция крови есть результат модулирующего воздействия на Hb различных аллостерических эффекторов, таких как  $H^+$ ,  $Cl^-$ ,  $CO_2$ , органические фосфаты и др., обеспечивающих адаптацию к гипоксической гипоксии [6]. Определенное влияние на сродство крови к кислороду оказывают температура и кислотность среды, которые определяют как состояние мембран красных клеток крови, так и эффективность воздействия прямых модуляторов на свойства гемоглобина. Совокупность перечисленных механизмов образует внутриэритроцитарную систему регуляции кислородсвязывающих свойств крови, которая формирует функциональные характеристики гемоглобина (р50,  $SO_2$ ). Полезным приспособительным результатом SGK является поддержание определенного капиллярно-тканевого градиента напряжения кислорода ( $\Delta pO_2$ ), который является движущей силой диффузии данного газа, а следовательно, и фактором, определяющим оксигенацию тканей. Значение данного показателя, с одной стороны, зависит от свойств самой крови, а с другой – от интенсивности потребления кислорода тканями. В свою очередь особенности метаболизма в органе, удовлетворенность его запроса в кислороде образуют петлю обратной связи в данной системе. Таким образом, происходит формирование кислородсвязывающих свойств крови, адаптированное к местным потребностям обмена веществ.

**Значение pH и  $pCO_2$  в регуляции сродства гемоглобина к кислороду.** Функция гемоглобина внутри эритроцита определяется не только структурой самого белка, но и его взаимодействием с факторами внутриклеточной среды. Сродство гемоглобина к кислороду находится в зависимости от pH среды. Это явление называется эффектом Бора и в общей форме отражает влияние концентрации протонов на состояние атома железа в гемоглобине, а именно его устойчивость к окислению, взаимодействие с лигандами –  $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $NO$  [11]. Подкисление среды в диапазоне значений pH от 6–6,5 и выше (для человека) вызывает сдвиг КДО вправо от исходных, что связано со связыванием протонов в процессе дезоксигенации и отдачей их при оксигенации. Данное явление было названо прямым, или щелочным, эффектом Бора. Существует также обратный, кислотный, эффект, который характеризуется противоположной зависимостью р50 от значений pH.



**Рисунок.** Участие внутриэритроцитарных механизмов регуляции сродства гемоглобина к кислороду в кислородном обеспечении тканей ( $SO_2$  – степень насыщения гемоглобина кислородом,  $\Delta pO_2$  – капиллярно-тканевой градиент напряжения кислорода).

Построение КДО для некоторых видов рыб при различных значениях pH показало, что при очень высокой концентрации протонов и углекислого газа не происходит полного насыщения гемоглобина кислородом даже при очень высоком напряжении кислорода. Данное явление было названо эффектом Рута [11]. Оказалось, что этот эффект наступает быстрее, если снижение pH обусловлено избытком углекислого газа ( $CO_2$ ), нежели эквивалентным количеством, к примеру, молочной кислоты, что связано со способностью гемоглобина присоединять  $CO_2$ .

Если эффект Бора отражает зависимость насыщения гемоглобина кислородом от концентрации протонов, то реципрокный эффект Холдейна определяет, как оксигенация гемоглобина влияет на транспорт углекислого газа и протонов. Связь этих явлений основана на конформационных перестройках и аллостерическом взаимодействии между местами связывания  $O_2$  и  $H^+/CO_2$  в цикле оксигенации–дезоксигенации [35]. Уменьшение степени насыщения гемоглобина переводит молекулу в Т-конформацию, которая характеризуется меньшей «упакованностью» и большей реактивностью полипептидных цепей. В такой конформации облегчается взаимодействие функциональных групп с гетеротропными лигандами, т.е. большее количество  $CO_2$  образует карбаминные связи с белком, что сопровождается отщеплением протонов от  $\alpha$ -аминогрупп. Косвенным объединяющим фактором описанных эффектов является то, что поступающий в эритроцит углекислый газ с участием карбоангидразы гидратируется и диссоциирует, являясь дополнительным источником  $H^+$ . Таким образом, действие углекислоты по своему влиянию на выраженность эффекта Бора превосходит на 20% действие других кислот или недоокисленных продуктов обмена [1].

Эффекта Бора реализуется посредством изменения как третичной структуры белка, так и четвертичной. Снижение pH сопровождается диссоциацией тетрамера гемоглобина до димеров и мономеров [53]. Конформационные перестройки молекулы гемоглобина происходят при отщеплении или присоединении в цикле оксигенации–дезоксигенации боровских протонов в имидазольных, карбоксильных, сульфгидрильных и  $\alpha$ -аминогруппах, находящихся преимущественно в  $\alpha$ -цепях белка [1]. Значение различных групп гемоглобина в выраженности эффекта Бора было установлено благодаря использованию аномальных или модифицированных гемоглобинов. Большой интерес представляет то обстоятельство, что сродство гемоглобина к кислороду имеет норму реакции шире, чем изменения этого свойства гемоглобина в зависимости от значений pH. Это позволяет предположить, что эффект Бора реализуется не только с участием «заинтересованных»

функциональных групп белков, но и связан с участием ионов хлора [38]. Экспериментально были обнаружены два сайта связывания для ионов хлора, насыщение которых проявляется в модуляции димер–димер взаимодействия, а также косвенно через изменение гидратации белка [31].

Солевой состав среды действует на конформацию гемоглобина и его чувствительность к изменениям pH. Зависимость эффекта Бора от концентрации солей можно описать колоколообразной кривой. Очищенный от солей диализом гемоглобин не проявляет зависимость  $p50$  от pH, а в гипертонической среде эффект Бора составляет 1/3 нормы [11]. Описанные наблюдения показывают, что соответствие среды по содержанию солей естественным значениям – изоосмотичность является важным условием сохранения нативной конформации гемоглобина для выполнения эволюционно закрепленных функций.

Аналогичный, одновершинный, характер зависимости величины эффекта Бора от степени насыщенности гемоглобина кислородом ( $SO_2$ ) был обнаружен у млекопитающих [68]. При  $SO_2$  большем 60 или меньшем 40% величина эффекта снижается, а наибольшее значение её соответствует области  $p50$ . Важно отметить, что такой тип зависимости сохраняется при постоянном  $pCO_2$ . Однако, в условиях гиперкапнии наибольший эффект Бора наблюдается при низкой степени насыщения гемоглобина кислородом [1].

Физиологическое значение эффектов Бора и реципрокного ему Холдейна заключается в сопряженности транспорта кислорода и углекислого газа в организме [44]. Во время дезоксигенации гемоглобин присоединяет протоны, выделяемые в результате связывания  $CO_2$  и образования гидрокарбоната ( $HCO_3^-$ ). Описанный механизм, с одной стороны, способствует сдвигу реакции гидратации  $CO_2$  в сторону образования  $HCO_3^-$ , что обеспечивает транспорт углекислого газа к легким, а с другой – протонизация переводит гемоглобин в Т-конформацию, снижая СГК и увеличивая отдачу кислорода тканям.

**Значение органических фосфатов.** Внутриэритроцитарная система регуляции СГК включает и во многом сводится к механизмам, основанным на связи метаболизма и энергетики клетки с функциональной активностью гемоглобина [1, 43]. Связующим звеном в этих процессах служат органические фосфаты: аденозинтрифосфат (АТФ) и 2,3-дифосфоглицерат (2,3-ДФГ). В эритроцитах человека около 20% АТФ достаточно прочно связано с гемоглобином, причем это взаимодействие оказывается независимым от степени оксигенации. Наравне с этим, существуют другие области белка, к которым в зависимости от насыщенности кислородом происходит присоединение АТФ. Однако значение АТФ оказывается менее существенным в регуляции СГК млекопитающих [1]. Данное явление обусловлено меньшим сродством АТФ к неспецифическим участкам гемоглобина, меньшей, чем у других фосфатов, концентрацией в эритроцитах, а также большей связанностью с ионами магния [23]. Основная роль этого макроэрга сводится к поддержанию активного транспорта, формы клетки, к обеспечению обменных процессов в эритроците, регуляции тонуса сосудов в ответ на гипоксический стимул и изменение напряжения сдвига [36, 49].

В эритроцитах млекопитающих количество 2,3-ДФГ составляет 60% всех органических фосфатов и приближается к эквимолярным с гемоглобином, что позволяет отнести его к основному регулятору положения КДО [20]. Уровень этого органического фосфата регулируется мультифункциональным ферментом, осуществляющим как синтез, так и его катаболизм. Активность и направление действия фермента определяются значением pH внутри эритроцита, напряжением кислорода, содержанием неорганических фосфатов и уровнем гликолиза в клетке [23].

Органические фосфаты оказывают влияние на положение КДО, вызывая ее правосторонний сдвиг. Повышение концентрации 2,3-ДФГ на 0,42 мкмоль/г гемоглобина увеличивает  $p50$  на 1 мм рт. ст. [1]. Наибольшее сродство 2,3-ДФГ проявляет к дезоксигемоглобину. Было установлено, что отрицательно заряженные группы 2,3-ДФГ образуют электростатические связи с определенными положительно заряженными группами аминокислотных остатков  $\beta$ -цепей, расположенными у входа в центральную полость молекулы дезоксигемоглобина [23]. При этом происходят изменения четвертичной и третичной структуры белка, характерные для конформации Т, в которой облегчается отдача кислорода и затрудняется оксигенация гемов [37]. Интересен тот факт, что фетальный гемоглобин (HbF), в составе которого отсутствуют  $\beta$ -цепи, обладает меньшим сродством к 2,3-ДФГ. Определение количеств органических фосфатов в эритроцитах на различных стадиях онтогенеза показало снижение концентрации 2,3-ДФГ в эмбриональный период [11]. Это явление в совокупности со сниженным сродством HbF к органическим фосфатам приводит к повышенному СГК в крови плода по отношению к материнской и обеспечивает транспорт кислорода через плаценту. Сравнение аномальных гемоглобинов, в которых изменена аминокислотная последовательность в областях связывания с органическими фосфатами, также обнаруживает

отсутствие или ослабление зависимости р50 от концентрации АТФ или 2,3-ДФГ [37]. Более того, эти области сохраняют удивительную консервативность у тех видов млекопитающих, у которых высока чувствительность SGK к наличию органических фосфатов [23].

В эритроцитах выделяют три фракции органических фосфатов: свободно растворимая в цитоплазме, связанная с мембраной и ассоциированная с гемоглобином. Количество свободного 2,3-ДФГ определяется кислородной обеспеченностью клетки, активностью гликолитических процессов и гормонов. При увеличении степени дезоксигенации гемоглобина, снижении рН, при малом напряжении углекислого газа происходит связывание 2,3-ДФГ гемоглобином, причем в этом процессе конкурируют с последним ионы магния [43]. Магний не взаимодействует с гемоглобином непосредственно, но присоединение его к АТФ или 2,3-ДФГ приводит к повышению сродства гемоглобина к кислороду за счет уменьшения ассоциированной с белком фракции. При дезоксигенации часть ионов магния связывается со спектрином – белком цитоскелета эритроцита, увеличивая стабильность мембран [19]. При этом высвобождается часть 2,3-ДФГ, способная реагировать с частично «восстановленным» гемоглобином. При оксигенации весь процесс имеет противоположное направление: частично  $Mg^{2+}$  уступает место на спектрине для 2,3-ДФГ, а в большинстве связывается с органическим фосфатом после его отщепления от гемоглобина [19].

Таким образом,  $Mg^{2+}$  можно отнести к регуляторному фактору пула свободного 2,3-ДФГ, функционирование которого определено циклом оксигенации–дезоксигенации гемоглобина. Мембраносвязанный 2,3-ДФГ составляет около 30% и является резервом для регуляции SGK [1]. Исследование взаимодействия 2,3-ДФГ с транспортными белками, например, анионообменником полосы 3, или с белками цитоскелета не позволяет рассматривать этот процесс только как способ инактивации 2,3-ДФГ, позволяющий уменьшить влияние органического фосфата на свойства гемоглобина. Его роль, в дополнение к предыдущей функции, может быть расширена до регуляторов мембранного транспорта, деформируемости и реологических свойств эритроцитов [1, 19].

Соотношение фракций 2,3-ДФГ, как и его абсолютное содержание, является зависимым от потребностей тканей в кислороде. Изменение концентрации 2,3-ДФГ становится заметным при изменении внешних средовых факторов, как-то дайвинг или подъем в горы, а также с изменением физиологического состояния организма, сопровождающего беременность или физические нагрузки. Возникающая в перечисленных условиях гипоксия является фактором, под влиянием которого происходит увеличение концентрации 2,3-ДФГ. Кислород в данном процессе действует не как прямой эффектор, а опосредовано, через изменение степени оксигенированности гемоглобина [43]. Дезоксигенация эритроцитов сопровождается ростом внутриклеточного рН на 0,07–0,14 единиц в силу того, что дезоксигенированный гемоглобин обладает большим сродством к протонам, чем оксигенированный. Дополнительный эффект оказывает способность дезоксигемоглобина в большей степени, чем оксигемоглобина, присоединять фосфорилированные промежуточные продукты гликолиза, что в итоге влияет на метаболизм 2,3-ДФГ.

Острый ответ на гипоксию сопровождается гипервентиляцией, ведущей к респираторному алкалозу. Однако если алкалоз оказывается скомпенсированным, то прироста концентрации 2,3-ДФГ не возникает [11]. Наблюдения этого явления в различных условиях и экспериментальных моделях привели к пониманию роли рН в регуляции метаболизма 2,3-ДФГ. Небольшое в пределах физиологических значений снижение рН увеличивает сродство 2,3-ДФГ к гемоглобину вследствие депротонизации фосфата и одновременно с этим присоединения  $H^+$  к аминокислотным остаткам белка [1]. Дальнейшее подкисление среды оказывает ингибирующее действие на ферменты как гликолиза, так и шунта Люберинга-Рапопорта, что снижает выход 2,3-ДФГ [43].

Соотношение в эритроците АТФ/АДФ также имеет определенное значение в регуляции направления реакций выше названного шунта [43]. Накопление АДФ сдвигает равновесие в сторону реакции дефосфорилирования 1,3-дифосфоглицериновой кислоты, что увеличивает выход АТФ.

Участие рН, напряжения кислорода, соотношения АТФ/АДФ в обмене 2,3-ДФГ имеет важное физиологическое значение. Эти показатели характеризуют состояние и интенсивность в тканях обменных процессов, которые сопровождаются изменением соотношения АТФ/АДФ, потреблением кислорода, накоплением кислых продуктов обмена, выделением  $CO_2$  с последующим подкислением плазмы и, как следствие, внутриэритроцитарной среды. Сдвиги рН и  $pO_2$ , изменение соотношения АТФ/АДФ в одну или другую сторону посредством влияния 2,3-ДФГ на SGK позволяют обеспечивать потребности организма в количестве кислорода, необходимого для окислительного фосфорилирования.

**Влияние температуры.** В ходе исследований, проведенных Баркрофтом, были получены КДО при различных температурах. Исходя из них, впервые была обнаружена зависимость положения КДО от температуры. Температурный коэффициент ( $K_T = \Delta \lg pO_2 / \Delta T$ ) численно отражает зависимость

изменения сродства гемоглобина к кислороду, как и к любому другому лиганду, от изменения температуры. Снижение температуры на 1 °С приводит к снижению р50 гемоглобина человека на 1,5 мм рт. ст. [55]. Обнаруженная зависимость сродства гемоглобина от температуры объясняется тем, что процесс оксигенации является экзотермичным, т.е. протекает с выделением энергии. Количество теплоты, выделяющееся при насыщении кислородом гемов различных видов животных и человека, примерно одинаково [63]. Однако сам температурный коэффициент оксигенации зависит от рН, наличия лигандов, половой принадлежности [64]. Данное явление объясняется самими особенностями функционирования гемоглобина. Конечный выход тепловой энергии при оксигенации является результирующей величиной между выделяющимся теплом при насыщении гемов кислородом и количеством энергии, расходуемой на отщепление ряда лигандов (эндотермический процесс) [10]. Так, энтальпия оксигенации цельной крови в присутствии CO<sub>2</sub> равна -19 ккал/моль, а в его отсутствие -30,5 ккал/моль, что связано с поглощением части энергии при диссоциации CO<sub>2</sub> из связи с α-аминогруппами [11]. Необходимо также учитывать не только наличие и количество лигандов у гемоглобина, но и теплоту растворения кислорода, а также теплоту конформационных перестроек гемоглобина при оксигенации [54].

Сравнительно недавно были открыты нейроглобин и цитоглобин, относящиеся к тому же семейству гемопротеидов, что и гемоглобин, миоглобин. Нейроглобин экспрессируется в различных областях мозга и клетках сетчатки [56], а цитоглобин – тканеспецифичный белок, представленный внутриядерной и цитоплазматической фракциями, активность которых регулируется гипоксическим стимулом [24]. Так же как гемоглобин, нейроглобин и цитоглобин могут быть отнесены к кислородным сенсорам, способным регулировать поступление кислорода к внутриклеточным мишеням. Интересен тот факт, что, несмотря на аналогичность строения с гемоглобином, температурная зависимость взаимодействия нейро- и цитоглобинов с лигандами выражена незначительно [61]. Авторы связывают эту особенность шестикоординатных глобинов с их «эволюционной реликтовостью» [61], однако данный характер зависимости свойств от температуры, как было показано выше, не является уникальным. Вполне вероятно, что температурная зависимость аффинитета белка была утрачена филогенетически в связи с температурным постоянством среды, чего нельзя сказать о крови человека, которая в процессе циркуляции претерпевает воздействие достаточно больших перепадов температур, достигающих 10–20 °С [10].

Температурная зависимость свойств гемоглобина на первый взгляд является эволюционным достижением, позволяя за счет увеличения р50 гемоглобина адекватно обеспечивать кислородом работающие органы, в которых температура повышается. Однако у некоторых организмов такая зависимость выражена слабо или даже имеет противоположный характер на всем протяжении КДО или её части [64]. Например, некоторые млекопитающие, птицы и рыбы, адаптированные к условиям низких температур, демонстрируют адаптивное снижение зависимости СГК от температуры [63]. В первую очередь, это связано с усиленным взаимодействием аллостерических регуляторов с гемоглобином (протонов, ионов хлора, 2,3-дифосфоглицерата, инозитолгексафосфата или АТФ), а также наличием нескольких сайтов их связывания в молекуле гемоглобина. Такой механизм адаптации к холодному климату имеет свои преимущества, поскольку в поверхностных тканях, подверженных охлаждению, предотвращается дисбаланс между количеством кислорода, поступающего с кровью и необходимого для удовлетворения метаболических потребностей тканей.

**Гемоглобин и мембранная организация эритроцита.** Как правило, красные клетки крови имеют форму двояковогнутого диска, но в ряде случаев их форма может существенно изменяться. Экспериментально было замечено, что эритроциты различной формы характеризуются разным р50 [1, 11]. Кровь больных серповидноклеточной анемией обладает низким сродством, тогда как р50 гемолизата этой крови не отличается от здоровых. Сфероцитоз, вызванный введением антиэритроцитарной сыворотки, сопровождается левосторонним сдвигом КДО, и наоборот, полученные в результате спленэктомии истонченные эритроциты обладают меньшим сродством. Потеря исходной формы эритроцита сопровождается изменением объема клетки, внутренними структурными перестройками, затрагивающими связь цитоскелета с компонентами билипидного слоя мембраны [67]. Увеличение, как и уменьшение объема само по себе влияет на свойства гемоглобина. Помещение клеток в гипо- или гипертонические растворы приводит к внутриклеточному изменению концентрации гемоглобина, что влияет на положение КДО [11]. При снижении концентрации гемоглобина за счет увеличения объема клетки или вследствие гемолиза эритроцитов наблюдается увеличение СГК, тогда как при концентрировании – наоборот, его снижение. Важное значение в этом процессе имеет диссоциация гемоглобина до ди- и мономеров, которые обладают большим сродством к кислороду, чем нативный белок. Свой вклад в это явление вносит также изменение

концентрации ионов и других модуляторов SGK. В дополнение к этому при изменении формы и объема эритроцита происходит гидродинамическое перемешивание цитоплазмы, существенно облегчающее внутриклеточную диффузию кислорода и конвекцию дезокси-/оксигемоглобинов [5]. Представленные факты отражают значимость физиологической структуры эритроцитов, гемоглобин-мембранного взаимодействия в механизмах внутриэритроцитарной регуляции SGK.

Современные представления о системе регуляции объема клетки постулируют, что изменения, затрагивающие объем эритроцита и взаимодействие цитоскелета с мембраной, являются кислородзависимыми [19]. Гемоглобин в этой системе играет роль как сенсора кислорода, так и неспецифического волюморцептора. С другой стороны, гемоглобин является и эффекторной молекулой, так как только в его присутствии наблюдается объем- и pH-зависимая регуляция активности ионного транспорта [19]. В красных кровяных клетках оксигенация сопровождается активацией ионного транспорта (например, K-Cl котранспорт), связанного с набуханием клетки, увеличением её объема. Дезоксигенация, наоборот, приводит к перемещению ионов (Na-K-2Cl котранспорт и Na/H-обменник), способствующих сморщиванию клетки и уменьшению её объема [32].

Функция гемоглобина как регулятора ионного транспорта и объема эритроцита реализуется благодаря взаимодействию с анионообменником полосы 3 (band 3/AE1), который представляет собой белок-переносчик отрицательно заряженных ионов. Его содержание в мембране составляет около 25% от всех мембранных белков, а число копий достигает 1 200 000 [60]. AE1 состоит из трех доменов: расположенного в мембране, короткого С-терминального и более длинного N-терминального цитоплазматических доменов (cdb3). Мембранный домен ответственен за перенос хлорид-, гидрокарбонат-, сульфат и нитрит- ионов из/в эритроцит [60, 62]. С-конец взаимодействует с карбоангидразой II, а N-терминаль этого белка – с компонентами цитоскелета (спектрин, анкерин, белок 4.1), ферментами гликолиза (фосфофруктокиназа, альдолаза и др.), переносчиками ионов (Na/K-АТФ-аза), 2,3-ДФГ, а также с гемоглобином [22, 60]. Сродство cdb3 значительно выше к дезоксигенированному гемоглобину, чем к оксигенированному [26]. Присоединение дезоксигемоглобина приводит к внутренним структурным перестройкам AE1, что изменяет анионный транспорт через него, и, благодаря связям с другими белками, модулирует мембранный транспорт в целом. Известно, что снижение напряжения кислорода в крови сопровождается активацией гликолиза. Механизм этого явления скрыт во взаимоотношениях AE1, дезоксигемоглобина и гликолитических ферментов. Насыщенный кислородом гемоглобин обладает достаточно низким сродством к N- терминальному концу cdb3, и в то же время ферменты гликолиза оказываются связанными с мембраной, однако при дезоксигенации гемоглобин вытесняет гликолитические ферменты из связи с band 3, что существенно активизирует гликолиз [60].

Взаимодействие гемоглобина с мембраной оказывает влияние не только на состояние клетки – ее метаболизм, проницаемость для ионов, но и *vice versa*, свойства гемоглобина подвержены влиянию со стороны мембраны. Присоединение синтетического пептида, аналогичного cdb3, или взаимодействие с band 3 снижает сродство гемоглобина к кислороду [69]. Реализуется действие band 3 через механизм, аналогичный действию 2,3-ДФГ, то есть через присоединение определенными отрицательно заряженными группами аминокислот транспортного белка к центральной полости тетрамера [26]. Если учесть количества гемоглобина и band3 в эритроците, то очевидно, что только 0,5% гемоглобина может вступить во взаимодействие с AE1, что вряд ли может иметь существенный эффект в отношении SGK [26]. Однако связывание N-терминали AE1 дезоксигенированным гемоглобином приводит к высвобождению ферментов гликолиза и образованию 2,3-ДФГ – важного фактора регуляции SGK. Таким образом, физиологический сигнал от мембраны, а именно от AE1, передается в глубь клетки и существенно усиливается, что оказывается решающим в модуляции свойств гемоглобина. Свой вклад вносит также карбоангидраза II, которая через С-терминальный конец band3 образует с гемоглобином метаболон. КА II в процессе функционирования вырабатывает протоны, которые присоединяются к боровским группам гемоглобина и снижают его сродство к кислороду. Являясь одним из самых быстрых известных ферментов, КА способна за очень короткое время (менее 0,5 с) приводить к локальному снижению pH [17]. Возникающий ацидоз, благодаря структурирующему, опосредующему участию band3, мгновенно снижает сродство гемоглобина к кислороду, увеличивая поступление O<sub>2</sub> в активно работающие ткани [17].

Деформируемость эритроцитов, поддержание его двояковогнутой формы, единство структурных компонентов клетки с мембраной обеспечивается во многом организацией цитоскелета [39]. Спектрин – основной белок цитоскелета эритроцитов образует гексагональную сеть, узлы которой через вспомогательные белки (анкерин, белок 4.1) объединены с интегральными белками мембраны [40]. Обнаружены комплексы цитоскелета с гликофорином С и с белком резус фактора.

Наиболее значимым является взаимодействие основного интегрального белка мембраны эритроцитов – band 3 со спектрином через анкерин. Изучение мутаций генов, ответственных за синтез белков цитоскелета и мембраны, позволяет раскрыть роль взаимодействия этих белков в функционировании эритроцитов [34]. Так нарушение синтеза цепей спектрина, AE1 или белков 4.1, 4.2 приводит к возникновению наследственных сфероцитоза, эллиптоцитоза, стоматоцитоза и других заболеваний, которые сопровождаются нарушением не только морфологии клетки, но и ее деформируемости, реологических и кислородсвязывающих свойств [28, 34].

Спектрин, как и актин, опосредует связывание гемоглобина с мембраной кислородзависимым образом: при дезоксигенации взаимодействие усиливается, а при насыщении гемоглобина кислородом ослабляются его связи с белками мембраны и цитоскелета [19, 25, 27]. Определенные фрагменты актина и тубулина, будучи присоединенными к гемоглобину, приводят к снижению сродства гемопротейна к кислороду [19]. Наименьшая константа диссоциации была определена для комплекса спектрина с  $\alpha$ -цепью гемоглобина [27]. Взаимный аффинитет белков существенно снижается в присутствии магния/АТФ или 2,3-ДФГ [25]. Важную роль в регуляции взаимодействия данных белков играют ионы кальция.  $Ca^{2+}$  тесно связан с регуляцией механических и структурных характеристик мембраны эритроцитов через кальмодулинзависимые протеинкиназы, а также непосредственно, через взаимодействие кальмодулина с кальциевыми помпами, спектрином, аддуцином и др. [19]. Образование комплекса спектрин-Нb приводит к увеличению упругости мембраны и снижению ее фильтруемости [19]. Для гемоглобина же такое взаимодействие проявляется в изменении сродства к кислороду – связывание оксигемоглобина со спектрином сопровождается легким увеличением сродства к кислороду и превосходит устойчивость комплекса спектрина с cdb3 [27, 29]. Существование зависимости между деформируемостью эритроцитов и кислородсвязывающими свойствами крови подтверждается исследованиями. В опытах, сопровождающихся гипертермией различного генеза, была обнаружена сильная корреляционная связь между индексом деформируемости и показателями КТФК [5]. В клинической практике изменение сродства крови к кислороду у больных с серповидноклеточной анемией сопровождается нормализацией формы клеток [1]. В доказательство также может быть продемонстрирована обратная зависимость между соотношением холестерина/фосфолипиды в мембране эритроцита и выходом кислорода из клетки [1]. Известно, что кровь матери и плода отличается способностью связывать кислород. Аналогичная закономерность была обнаружена в отношении деформируемости эритроцитов – у плода этот параметр красных клеток крови превосходит материнские значения, что обеспечивает эффективную доставку кислорода в его ткани [1].

Представленные факты подтверждают, что, с одной стороны, гемоглобин и его свойства находятся в сложной динамической зависимости от состояния мембраны [1, 39, 69]. Характеристики мембраны определяют функции гемоглобина через изменение состава мембраны и её упруго-эластических свойств, через регуляцию количества свободных модуляторов, например, посредством модуляции ионной проницаемости, связывания 2,3-ДФГ с белками мембраны и цитоскелета [19, 39]. С другой стороны, показана обратная связь кислородтранспортной функции и реологических свойств эритроцитов.

**Монооксид азота как внутриэритроцитарный модулятор сродства гемоглобина к кислороду.** В процессе циркуляции эритроциты подвержены воздействию оксида азота (NO), образующегося как в эндотелии, так и внутриэритроцитарно. Продукцию NO сосудистой стенкой красные клетки способны регулировать через механическое воздействие на неё и выделение АТФ [30]. Помимо этого в самих эритроцитах происходит образование оксида азота. Показано, что в данных клетках крови экспрессируется NO-синтаза, аналогичная эндотелиальной [45], выявлены процессы нитритредукции, которые превосходят синтазные на несколько порядков [12, 33]. Предполагается, что NO-продуцирующая система эритроцитов вносит вклад в регуляцию тонуса сосудов [18] и реологических свойств крови [19, 59]. Кислородсвязывающие свойства крови влияют на состояние L-аргинин-NO системы, и в то же время было высказано предположение, что она может определять функциональные свойства гемоглобина путем модификации его сродства к кислороду через внутриэритроцитарные механизмы регуляции, кислородзависимый характер образования NO, регуляцию сосудистого тонуса, действие пероксинитрита [3].

На основании полученных нами результатов было подтверждено участие NO и его производного – пероксинитрита (ONOO<sup>-</sup>) в модификации гемоглобина и его сродства к кислороду на уровне эритроцитов [4, 9, 14, 15, 58]. В собственных исследованиях *in vitro* обнаружено, что доноры NO и ONOO<sup>-</sup>, синтезированные из пероксида водорода и нитрита, оказывают влияние на положение кривой диссоциации оксигемоглобина. Причем данные сигнальные молекулы способны по-разному модулировать СГК в зависимости от газовых характеристик среды.

Эффект доноров NO в экспериментах *in vitro* определялся условиями оксигенированности гемоглобина [14, 58]. Если NO взаимодействовал со смешанной венозной кровью без насыщения газовой смесью или при воздействии оксигенирующей смеси (94,5% O<sub>2</sub> и 5,5% CO<sub>2</sub>), то КДО сдвигалась влево. При дезоксигенации крови смесью 94,5% N<sub>2</sub> и 5,5% CO<sub>2</sub> влияние доноров в отношении давления полунасыщения (p50) не проявлялось. Таким образом, была выявлена зависимость влияния NO на положение КДО от степени насыщения Hb кислородом. Данное наблюдение можно объяснить кислород-зависимым образованием различных NO-опосредованных модификаций Hb, одни из которых (мет- и SNO-Hb) вызывают увеличение SGK, а другие ( $\alpha$ 5-координатная форма нитрозилгемоглобина) – его снижение.

В отношении эффекта ONOO<sup>-</sup> на положение КДО решающее значение имело напряжение углекислого газа в крови [9, 15]. При pCO<sub>2</sub>, равном приблизительно 32 мм рт. ст., КДО сдвигалась вправо относительно контроля, тогда как при значениях pCO<sub>2</sub>, превышающих 50 мм рт. ст., наоборот, влево. Триггерная роль CO<sub>2</sub> реализуется за счет образования интермедиата ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>, при дисмутации которого образуются радикалы, модифицирующие Hb специфическим образом, отличным от ONOO<sup>-</sup> *per se* [48].

В опытах *in vitro* небиволол (препарат, изменяющий состояние L-аргинин-NO системы) увеличивал значения p50 при реальных значениях pH и pCO<sub>2</sub> на 4,3±0,8 ( $p < 0,05$ ) мм рт. ст. при самой низкой концентрации, а последующее 2- и 3-кратное увеличение его концентрации повышало его величину на 7,5±1,1 ( $p < 0,01$ ) и 10,6±0,7 ( $p < 0,01$ ) мм рт. ст., соответственно, что отражает дозозависимый характер его действия, при этом уровень метгемоглобина и содержание нитрат/нитритов возрастали пропорционально концентрации препарата [7]. Аналогичные изменения в SGK были получены у больных артериальной гипертензией III степени. Под влиянием небиволола у данных пациентов p50<sub>реал</sub> увеличилось на 9,2% ( $p < 0,05$ ), p50<sub>станд</sub> – на 8,3% ( $p < 0,05$ ), т.е. отмечалось нормализующее влияние данного препарата на SGK [50].

Различными исследователями в опытах *in vitro* было обнаружено, что, помимо модификации гемоглобина, оксид азота способен оказывать влияние на различные свойства и процессы в красных клетках крови. Показано, что NO влияет на форму, реологические свойства [19] и деформируемость эритроцитов [59], модулирует ионную проницаемость их мембраны [21], регулирует взаимодействие гемоглобина с анионообменником полосы 3, изменяя тем самым соотношение растворенного и мембраносвязанного гемоглобина [51]. Пероксинитрит в свою очередь воздействует на ионный транспорт, увеличивает ригидность мембраны эритроцитов, вызывает реорганизацию цитоскелета клетки [57], модулирует метаболизм глюкозы [41] и снижает содержание АТФ [48]. В итоге изменение параметров эритроцитов, как и непосредственная модификация гемоглобина оксидом азота или пероксинитритом, может быть одним из механизмов внутриэритроцитарной регуляции свойств гемоглобина.

**Заключение.** Механизмы регуляции кислородсвязывающих свойств крови на уровне клеточного компартмента образуют внутриэритроцитарную систему, автономность которой носит относительный характер. Условия внешней по отношению к эритроциту среды определяют состояние метаболизма в красных клетках крови, а следовательно, и количество основных модуляторов функциональных характеристик гемоглобина. Посредством их участия происходит поддержание кислородсвязывающих свойств эритроцитов в соответствии с обменными процессами в клетке. Если учесть скорость биохимических реакций, то данный контур регуляции осуществляет относительно быструю адаптацию КССК к потребностям в кислороде. Более быстрые механизмы в автономной системе регуляции SGK реализуются, вероятно, через перестройки мембранных структур, которые происходят в эритроцитах в ходе цикла оксигенации/дезоксигенации крови, а также в процессе циркуляции и связаны с деформируемостью клеток. Показано, что данные изменения затрагивают механочувствительные, O<sub>2</sub>-зависимые ионные каналы, реорганизацию цитоскелета и мембраны, а также процессы взаимодействия гемоглобина с мембраной. В ответ на гипоксический стимул окружающими тканями, в том числе и эритроцитами, происходит образование оксида азота и, как следствие, его производных. Данные соединения участвуют в поддержании аэробного гомеостаза за счет изменения просвета сосудов, в конечном итоге, изменения площади диффузии кислорода. Результаты собственных исследований демонстрируют, что помимо этого NO и его производные участвуют в поддержании оптимальной оксигенации тканей через краткосрочные механизмы внутриэритроцитарной регуляции SGK.

Таким образом, внутриэритроцитарная система регуляции SGK включает ряд факторов, таких как pH, углекислота, 2,3-ДФГ, NO и его производные, которые при совокупном воздействии формируют кислородсвязывающие свойства крови для оптимальной оксигенации тканей.

**Литература:**

- [1]. Борисюк М. В. // Успехи физиологических наук. 1983. Т. 14, № 1. С. 89–101.
- [2]. Борисюк М. В. // Успехи физиологических наук. 1984. Т. 15, № 2. С. 3–16.
- [3]. Зинчук В. В. // Успехи физиологических наук. 2003. № 34 (2). С. 33–45.
- [4]. Зинчук В. В. // Кардиология. 2009. Т. 49 (7–8). С. 81–89.
- [5]. Зинчук В. В. // Успехи физиологических наук. 2001. № 32 (3). С. 66–78.
- [6]. Зинчук В. В. Кислородсвязывающие свойства крови: избранное. LAP LAMBERT, 2012.
- [7]. Зинчук В. В., Зинчук Н. В. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2007. Т. 70, № 1. С. 44–47.
- [8]. Зинчук В. В., Максимович Н. А., Борисюк М. В. Функциональная система транспорта кислорода: фундаментальные и клинические аспекты. Гродно, 2003.
- [9]. Зинчук В. В., Степура Т. Л. // Биофизика. 2006. Т. 131, № 1. С. 32–38.
- [10]. Иванов К. П. Физиология терморегуляции: Руководство по физиологии. Л.: Наука, 1984.
- [11]. Иржак Л. И. Гемоглобины и их свойства. М.: Наука, 1975.
- [12]. Реутов В. П., Сорокина Е. Г., Охотин В. Е. и др. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М.: Наука, 1997.
- [13]. Рябов Г. А. Гипоксия критических состояний. М.: Медицина, 1988.
- [14]. Степура Т. Л., Зинчук В. В. // Весці НАН Беларусі. Серыя біялагічных навук. 2007. № 2. С. 83–86.
- [15]. Степура Т. Л., Зинчук В. В. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2011. № 8. С. 852–861.
- [16]. Титов В. Ю., Петренко Ю. М. // Биохимия. 2005. Т. 70, № 4. С. 575–588.
- [17]. Aamand R., Dalsgaard T., Jensen F. B. et al. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2009. № 297(6). P. 2068–2074.
- [18]. Allen B. W., Stamler J. S., Piantadosi C. A. // Trends Mol. Med. 2009. No. 15(10). P. 452–460.
- [19]. Barvitenko N. N., Adragna N. C., Weber R. E. // Cell Physiol. Biochem. 2005. No. 15. P. 1–18.
- [20]. Benesch R., Benesch R. E. // Biochem Biophys Res Commun. 1967. No. 26 (2). P. 162–167.
- [21]. Bogdanova A., Berenbrink M., Nikinmaa M. // Acta Physiol. (Oxf). 2009. № 195(3). P. 305–319.
- [22]. Bruce L. J., Beckmann R., Ribeiro M. L. et al. // Blood. 2003. No. 101. P. 4180–4188.
- [23]. Bunn H. F. // Blood. 1981. No. 58(2). P. 189–197.
- [24]. Burmester T., Ebner B., Weich B. et al. // T. Mol. Biol. Evol. 2002. No. 19. P. 416–421.
- [25]. Chakrabarti A., Datta P., Bhattacharya D. et al. // Hematology. 2008. No. 13(6). P. 361–368.
- [26]. Chu H., Breite A., Ciralo P. et al. // Blood. 2008. № 111(2). P. 932–938.
- [27]. Datta P., Chakrabarty S., Chakrabarty A. et al. // J. Biosci. 2007. No. 32(6). P. 1147–1151.
- [28]. Delaunay J. // Blood Rev. 2007. No. 21(1). P. 1–20.
- [29]. Devogel M., Leonis J., Vincentelli J. // Experientia. 1977. No. 33. P. 1429–1450.
- [30]. Dufour S. P., Patel R. P., Brandon A. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2010. No. 299. P. 1936–1946.
- [31]. Dzhagarov B. M., Lepeshkevich S. V. // Chem. Phys. Lett. 2004. No. 390. P. 59–64.
- [32]. Gibson J. S., Cossins A. R., Ellory J. C. // J. Exp. Biol. 2000. No. 203. P. 1395–1407.
- [33]. Gladwin M. T., Grubina R., Doyle M. P. // Acc. Chem. Res. 2009. No. 42(1). P. 157–167.
- [34]. Iolascon A., Perrotta S., Stewart G. W. // Rev. Clin. Exp. Hematol. 2003. No. 7(1). P. 22–56.
- [35]. Jensen F. B. // Acta Physiol. Scand. 2004. No. 182(3). P. 215–227.
- [36]. Jensen F. B. // J. Exp. Biol. 2009. No. 212. P. 3387–3393.
- [37]. Laberge M., Yonetani T. // Biophys. J. 2008. No. 94(7). P. 2737–2751.
- [38]. Lepeshkevich S. V., Dzhagarov B. M. // FEBS Journal. 2005. Vol. 272 (23). P. 6109–6119.
- [39]. Matteucci E., Giampietro O. // Biomark Insights. 2007. No. 2. P. 321–329.
- [40]. Mills J. W., Mandel L. J. // FASEB J. 1994. No. 8. P. 1161–1165.
- [41]. Minetti M., Pietraforte D., Straface E. et al. // Methods Enzymol. 2008. No. 440. P. 253–272.
- [42]. Mozzarelli A., Ronda L., Faggiano S. et al. // Blood Transfus. 2010. Vol. 8 (3). P. 59–68.
- [43]. Mulquiney P. J., Kuchel P. W. // Biochem. J. 1999. No. 342 (3). P. 597–604.
- [44]. Nikinmaa M. // The Journal of Experimental Biology. 1997. No. 200. P. 369–380.
- [45]. Ozüyan B., Grau M., Kelm M. et al. // Trends Mol. Med. 2008. No. 14(7). P. 314–322.
- [46]. Perutz M. F. // Nature. 1970. No. 228. P. 726–739.
- [47]. Perutz M. F., Wilkinson A. J., Paoli M. et al. // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1998. No. 27. P. 1–34.
- [48]. Pietraforte D., Matarrese P., Straface E. et al. // Free Rad. Biol. Med. 2007. No. 42 (2). P. 202–214.
- [49]. Pittman R. N. Regulation of tissue oxygenation. San Rafael (CA): Morgan and Claypool Life Science, 2011. P. 89.
- [50]. Pronko T. P., Zinчук V. V. // Clin. Physiol. Funct. Imaging. 2009. Vol. 29, No. 3. P. 170–176.
- [51]. Rifkind J. M., Salgado M. T., Cao Z. // Adv. Exp. Med. Biol. 2012. No. 737. P. 183–189.
- [52]. Rochon G., Caron A., Toussaint-Hacquard M. et al. // Hypertension. 2004. No. 43. P. 1110–1115.
- [53]. Russo R., Benazzi L., Perrella M. // The Journal of Biological Chemistry. 2001. No. 276. P. 13628–13634.
- [54]. Safo M. K., Ahmed M. H., Ghatge M. S. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2011. No. 1814(6). P. 797–809.
- [55]. Samaja M., Melotti D., Rovida E. et al. // Clin. Chem. 1983. No. 29. P. 110–114.
- [56]. Schmidt M., Giessel A., Laufs T. et al. // J. Biol. Chem. 2003. No. 278. P. 1932–1935.
- [57]. Starodubtseva M. N., Tattersall A. L., Kuznetsova T. G. et al. // Bioelectrochemistry. 2008. No. 73 (2). P. 155–162.
- [58]. Stepuro T. L., Zinчук V. V. // Journal Physiol. & Pharmacol. 2006. Vol. 57, No. 1. P. 29–38.

- [59]. Suhr F., Porten S., Hertrich T. et. al. // Nitric Oxide. 2009. No. 20(2). P. 95–103.  
[60]. Tanner M. J. // Mol. Membr. Biol. 1997. No. 14(4). P. 155–165.  
[61]. Uzan J., Dewilde S., Burmester T. et. al. // Biophys. J. 2004. No. 87(2). P. 1196–1204.  
[62]. Vitturi D. A., Teng X., Toledo J. C. et. al. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2009. No. 296(5). P. 1398–1407.  
[63]. Weber R. E., Campbell K. L. // Acta Physiologica. 2011. Vol. 202 (3). P. 549–562.  
[64]. Weber R. E., Campbell K. L., Fago A. et. al. // J. Exp. Biol. 2010. No. 213(Pt 9). P. 1579–1585.  
[65]. Yonetani T., Laberge M. // Biochim. Biophys. Acta. 2008. No. 1784(9). P. 1146–1158.  
[66]. Yonetani T., Park S., Tsuneshige A. et. al. // The Journal of Biological Chemistry. 2002. Vol. 277 (37). P. 34508–34520.  
[67]. Yoon Y. Z., Hong H., Brown A. et. al. // Biophys. J. 2009. No. 97(6). P. 1606–1615.  
[68]. Zhang Y., Kobayashi K., Kitazawa K. et. al. // Zoolog. Sci. 2006. No. 23(1). P. 49–55.  
[69]. Zhang Y., Manning L. R., Falcone J. et. al. // J. Biol. Chem. 2003. No. 278(41). P. 39565–39571.

Поступила в редакцию: 26.12.2012 г.

V. V. ZINCHUK, T. L. STEPURO

## INTRAERYTHROCYTIC SYSTEM OF HEMOGLOBIN OXYGEN AFFINITY REGULATION

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

### Summary

The oxygen binding properties of blood are determined by different factors (pH, 2,3-biphosphoglycerate, carbon dioxide, temperature, and etc.) which form relatively autonomic intraerythrocytic system. The useful adaptive result of this system is aimed at optimization of functional properties of hemoglobin that makes it possible to adequate supply with oxygen tissues metabolism. The great importance in the process of regulation of hemoglobin oxygen affinity belongs to nitric oxide and its derivatives that realize their action both directly and indirectly through influence on the erythrocytic membrane organization.

*Key words:* hemoglobin oxygen affinity, intraerythrocytic system of hemoglobin oxygen affinity regulation, nitric oxide, peroxynitrite.