

2Н/175539
(039) ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ
НАУК БЕЛАРУСИ»

УДК 612.127.2 : 546.172.6-31 : 546.177.3

СТЕПУРО
Татьяна Леонидовна

**ВКЛАД МОНООКСИДА АЗОТА И ПЕРОКСИНИТРИТА
В ПРОЦЕССЫ ФОРМИРОВАНИЯ
КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ КРОВИ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 03.03.01 – физиология

Минск, 2014

Работа выполнена в УО «Гродненский государственный медицинский университет».

Научный
руководитель:

Зинчук Виктор Владимирович
доктор медицинских наук, профессор, проректор по научной работе учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет»

Официальные
оппоненты:

Кузнецов Владимир Иванович
доктор медицинских наук, профессор кафедры нормальной физиологии учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Свирид Василий Дмитриевич
кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой экологической медицины и радиобиологии учреждения образования «Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова»

Оппонирующая
организация:

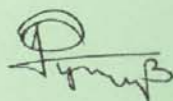
Белорусский государственный университет

Защита состоится 13 июня 2014 года в 12:00 часов на заседании совета по защите диссертаций Д 01.36.01 при ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси» (220072, г. Минск, ул. Академическая, 28, тел. 284-18-47, факс: 284-16-30, e-mail: rubakhova@mail.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси».

Автореферат разослан 13 мая 2014 года.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций,
кандидат биологических наук, доцент



В.М. Рубахова

Обеспечение организма кислородом осуществляется благодаря согласованному взаимодействию органов дыхания, кровообращения и механизмов их регуляции, совокупность которых образует систему транспорта кислорода (СТК) [Борисюк М.В., 1984; Hoffmann F.G. et al., 2010; Pittman R.N., 2011]. Одним из объединяющих, интегрирующих компонентов в настоящей системе является кровь, а именно присутствующий в эритроцитах гемоглобин [Hsia C.C.W. et al., 1998; Jensen F.B., 2009]. Указанный гемопротеин, с одной стороны, выполняет функцию сенсора – носителя специфической информации о потреблении кислорода тканями, с другой – является эффекторным звеном, посредством воздействия на которое возможно адаптивное изменение кислородсвязывающих свойств крови (КССК) в достаточно широком диапазоне [Hoff C.M., 2012; Jensen F.B., 2009; Lopes de Almeida J.P. et al., 2012].

Проблема изучения процессов регуляции кислородсвязывающих свойств крови является актуальной, имеет не только теоретическое, но и практическое значение. Её исследование позволяет расширить представления о механизмах поддержания кислородного гомеостаза в организме и на их основе решить ряд клинических задач: разработать способы направленной коррекции гипоксических состояний, сохранения кислородтранспортной функции (КТФ) донорской крови, увеличения эффективности радиотерапии онкозаболеваний и ряда других [Гацура С.В., Гацура В.В., 2005]. В целях минимизации негативных последствий наиболее перспективным в решении поставленных проблем считается применение естественных биорегуляторов [Гацура С.В., Гацура В.В., 2005; Шамова Е.В., 2011; Butler A.R. et al., 2008].

Монооксид азота (NO) и его производное – пероксинитрит (ONOO⁻) – известные сигнальные и многофункциональные биорегуляторные соединения, участвующие в посттрансляционной модификации белков [Anand P. et al., 2012; Hess D.T. et al., 2012; Liaudet L. et al., 2009; Nakamura T. et al., 2013]. Известно, что в эритроцитах функционирует достаточно мощная система их продукции, включающая синтез NO в ферментативных [Ozuyaman B. et al., 2008] и нитритредуктазных реакциях [Реутов В.П. и др., 1997; Gladwin M.T. et al., 2009], а также образование пероксинитрита с участием гемоглобина [Стародубцева М.Н., 2011].

Согласно современным представлениям, монооксид азота является третьим дыхательным газом, который наряду с кислородом и углекислым газом транспортируется гемоглобином [Gladwin M.T. et al., 2003; Gross S.S., Lane P., 1999; McMahon T.J. et al., 2002]. Значение процессов синтеза NO и его производных в эритроцитах, как и вообще, роль данных биорегуляторных молекул в респираторном цикле, по мнению ряда авторов, заключается в

регуляции сосудистого тонуса [McMahon T.J. et al., 2002; Allen B.W. et al., 2009], в поддержании реологических свойств клеток крови [Шамова Е.В., 2011; Horn P. et al., 2011; Mesquita R. et al., 2002] и эндотелия [Mattart L. et al., 2012; Wagner A.H. et al., 2011]. Однако проблема участия NO и его производного – пероксинитрита – в процессах формирования кислородсвязывающих свойств крови до конца не раскрыта и требует детальной проработки, что и предопределило цель и задачи настоящего исследования.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами

Диссертация выполнена в рамках гранта «Вклад оксида азота во внутриэритроцитарные механизмы регуляции кислородсвязывающих свойств крови» по договору № Б03-019 Фонда фундаментальных исследований РБ от 15.04.2003, № государственной регистрации 20032191, дата регистрации 01.08.2003, сроки выполнения 2003-2005 гг., а также в рамках программы «Разработать патогенетические основы диагностики и лечения фетоплацентарной недостаточности (ФПН) у беременных и лечения постгипоксических состояний у новорожденных от матерей с ФПН на основе изучения и коррекции NO-синтазной недостаточности эндотелия сосудов», № государственной регистрации 20101894, сроки выполнения 2010-2012 гг.

Тема диссертационной работы соответствует п. 3.10 «Молекулярная биология, биофизика регуляторных процессов и протеомика» перечня приоритетных направлений фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2006-2010 гг., утвержденных Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 17.05.2005 № 512, а также п. 4.1 «Самоорганизация живых систем, закономерности течения патологических процессов, коррекция жизненно важных функций» перечня приоритетных направлений фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2011-2015 гг., утвержденных Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 19.04.2010 № 585.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – на основе анализа характера влияния монооксида азота и пероксинитрита на сродство гемоглобина к кислороду обосновать их участие в процессах формирования кислородсвязывающих свойств крови.

Задачи исследования:

1. Исследовать эффект модификаторов L-аргинин-NO системы, оказываемый на кислородсвязывающие свойства крови в опытах *in vitro* при разных молярных соотношениях с гемоглобином.

2. Оценить влияние доноров монооксида азота на сродство гемоглобина к кислороду *in vitro* в условиях оксигенации/дезоксигенации.

3. Изучить влияние пероксинитрита на показатели кислородтранспортной функции венозной крови и суспензии эритроцитов при его разных молярных соотношениях с гемоглобином.

4. Исследовать воздействие пероксинитрита на сродство гемоглобина к кислороду в условиях сатурации крови оксигенирующей/дезоксигенирующей, гипокапнической/гиперкапнической газовой смесью.

5. Определить вклад компонентов L-аргинин-NO системы в процессы формирования кислородсвязывающих свойств крови.

Объект исследования – венозная кровь кролика, суспензия эритроцитов, плазма крови, гемоглобин.

Предмет исследования – газотранспортная функция крови, кислотно-основное состояние крови, L-аргинин-NO система, метгемоглобин, нитрозилгемоглобин.

При выборе объекта и предмета исследования учитывали следующие факторы: возможность забора достаточного объема крови для опытов *in vitro*, что наиболее удобно осуществлять на таком крупном животном, как кролик; использование герметично забранной венозной крови позволяет сохранить *in vitro* условия газового состава и параметров кислотно-основного состояния крови, максимально приближенных к естественным, но при этом в отсутствие влияния системных факторов, действующих на организменном уровне.

Выбранный предмет исследования позволяет в полной мере охарактеризовать важнейшие параметры кислородсвязывающих свойств гемоглобина, оценить их как при реальных, так и стандартных условиях газового, кислотно-основного и температурного состояния среды, что дает возможность вычлнить непосредственный эффект компонентов L-аргинин-NO системы, оказываемый на свойства гемоглобина. Оценка содержания метгемоглобина и нитрозилгемоглобина представляет интерес, поскольку отражает участие монооксида азота и пероксинитрита в модификации гемоглобина и, соответственно, кислородсвязывающих свойств крови.

Положения, выносимые на защиту

1. Эффект доноров монооксида азота, относящихся к группе S-нитрозотиолов, оказываемый на кровь при молярном соотношении

монооксида азота и гемоглобина-тетрамера, равном 1:1, проявляется в увеличении сродства гемоглобина к кислороду. В то же время инкубирование крови с L-аргинином, нитроглицерином, нитропруссидом натрия, молсидомином не приводит к изменению положения кривой диссоциации оксигемоглобина.

2. Модификация сродства гемоглобина к кислороду донорами монооксида азота (S-нитрозоцистеин, S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин, диэтиламин/монооксид азота) носит кислородзависимый характер. При инкубировании крови с указанными соединениями в условиях воздействия оксигенирующей газовой смеси наблюдается левосторонний сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина, в то время как в присутствии доноров монооксида азота в условиях дезоксигенации крови смесью газов сродство гемоглобина к кислороду не меняется.

3. Инкубация пероксинитрита с венозной кровью вызывает повышение сродства гемоглобина к кислороду: с увеличением концентрации пероксинитрита в крови наблюдается снижение показателя $p50$, определенного при стандартных значениях pH, pCO_2 и температуры. Воздействие пероксинитрита на эритроциты, ресуспендированные в плазме либо в натрий-фосфатном буфере, либо в таком же буфере с добавлением карбоната натрия или гидрокарбоната натрия, не оказывает влияния на положение кривой диссоциации оксигемоглобина.

4. Эффект, оказываемый пероксинитритом на кислородсвязывающие свойства крови, зависит от напряжения углекислого газа: в условиях насыщения крови гипокпапнической газовой смесью пероксинитрит снижает сродство гемоглобина к кислороду, в то время как при насыщении крови гиперкапнической газовой смесью – увеличивает его. В условиях как оксигенации, так и дезоксигенации крови соответствующей газовой смесью пероксинитрит не приводит к модификации кислородсвязывающих свойств крови.

Личный вклад соискателя

Участие автора в выполнении диссертационной работы состояло в совместном с научным руководителем анализе литературы, определении цели и задач исследования, выборе методов и дизайна экспериментальной части диссертационной работы, систематизации и анализе полученных результатов (личный вклад – 60%). Автором осуществлен патентный поиск, организованы и выполнены эксперименты, проведены исследования с помощью спектрофотометрических методов и статистическая обработка экспериментальных данных (личный вклад – 100%). Измерение показателей,

характеризующих газотранспортную функцию крови, осуществлено при технической поддержке исследовательской группы по изучению газотранспортной функции крови НИЛ УО «Гродненский государственный медицинский университет» (лаборант Тукина М.И.), личный вклад автора состоял в пробоподготовке и расчете ряда параметров (50%). Определение содержания нитрозилгемоглобина проведено автором (личный вклад – 70%) на факультете биохимии, биофизики и биотехнологии Ягеллонского университета (Краков, Польша) с методической помощью доктора П. Плонка и профессора С. Хлопицкого.

Результаты исследования представлены в совместных публикациях [1-6, 9-13, 15, 17-19, 22, 27, 28], в которых научный вклад руководителя профессора В.В. Зинчука состоял в изложении анализа полученных экспериментальных данных и общем рецензировании работы, личный вклад соискателя в указанных работах – 60%. Ряд работ [7, 8, 14, 16, 20, 24, 25] выполнены и написаны автором самостоятельно (личный вклад – 100%). Соавторы работ [10, 19, 21-23, 26, 28] оказывали помощь в организации отдельных экспериментов и оформлении публикаций к печати (личный вклад соискателя – 80%).

Апробация результатов диссертации

Результаты исследований, включенные в диссертацию, представлены в виде докладов и обсуждены на научно-практических конференциях молодых ученых и студентов, посвященных памяти академика Ю.М. Островского, профессора А.Н. Габузова, профессора Д.А. Маслакова, профессора М.В. Кораблева (Гродно, 2003, 2005, 2012, 2013), на 57-й итоговой научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные вопросы современной медицины» (Витебск, 2005), на ежегодных итоговых научных конференциях «Актуальные проблемы медицины» (Гродно, 2011, 2013), на Республиканской с международным участием научно-практической конференции «Кислород и свободные радикалы» (Гродно, 2012), Международной конференции «Фундаментальные науки и современная медицина» (Минск, 2012), Международной научно-практической конференции «Дисфункция эндотелия» (Витебск, 2012), на Международной научной конференции «Фундаментальные науки – медицине» (Минск, 2013), на Международной научной конференции «Микроциркуляция и гемореология: от ангиогенеза до центрального кровообращения» (Ярославль, 2013), на X ежегодной украинско-польско-белорусской конференции «Физиология и патология дыхания: достижения в области фундаментальных исследований и клинического применения» (Киев, 2013).

Опубликованность результатов диссертации

По материалам диссертации опубликовано 28 печатных работ. Из них 6 статей в рецензируемых журналах (4 – за рубежом), входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК Республики Беларусь (3,25 авторских листа), 13 статей в сборниках, 9 тезисов докладов на международных и республиканских съездах и конференциях. Общий объем всех опубликованных материалов по теме диссертации составляет 6,25 авторских листа, из них автору принадлежат 4,0 авторских листа.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 137 страницах печатного текста и состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 4 глав собственных исследований, главы анализа и обобщения полученных результатов, заключения, библиографического списка использованных источников, включающего 292 работы, из которых 64 – на русском, 228 – на иностранных языках, публикаций соискателя (28 работ), приложения. Диссертация содержит 21 таблицу и 26 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Материал и методы исследования

Изучение роли монооксида азота и его производного – пероксинитрита – во внутриэритроцитарных процессах регуляции сродства гемоглобина к кислороду (СГК) осуществляли *in vitro*. Выбор указанной модели исследования продиктован необходимостью исключить системные влияния на кислородсвязывающие свойства крови, которые реализуются на уровне организма.

В качестве экспериментальных животных использованы 116 беспородных кроликов-самцов массой 3,5-4,5 кг. Забор смешанной венозной крови осуществлялся у наркотизированных тиопенталом животных посредством катетеризации яремной вены. Исследования на животных проведены с разрешения этической комиссии УО «Гродненский государственный медицинский университет» в соответствии с рекомендациями, изложенными в Европейской конвенции о защите лабораторных животных.

Свежезабранную кровь инкубировали на водяной бане-шейкере «Eran-357» (Польша) в герметичных условиях в течение 60 или 30 минут при 37°C с донорами NO: нитроглицерином, молсидомином,

нитропруссидом натрия, S-нитрозоцистеином (CysSNO), S-нитрозо-N-ацетилпеницилламином (SNAP), S-нитрозоальбумином (AlbSNO), либо 30 минут при 37°C с пероксинитритом (ONOO⁻). Для того, чтобы оценить вклад ферментативно синтезированного NO в эритроците, кровь инкубировали с субстратом NO-синтазы – L-аргинином. Эффект L-аргинина, не связанный с наработкой NO, был вычленен благодаря предварительному введению в пробу ингибитора NO-синтазы – N^ω-нитро-L-аргинина (L-NNA) с последующим добавлением L-аргинина. Пробы также выдерживали на водяной бане-шейкере при 37°C в течение 60 минут. Молярное соотношение гемоглобина-тетрамера (Hb₄) и используемых доноров NO или L-аргинина в опытных образцах составляло 200:1 или 1:1, а в экспериментах с ONOO⁻ – 100:1 или 10:1. Во всех экспериментах к контрольной пробе добавляли эквивалентное количество изотонического раствора хлорида натрия.

Ряд исследований проводили с использованием суспензии эритроцитов, трижды отмытых четырехкратным объемом изотонического раствора хлорида натрия. Суспензии готовили посредством ресуспендирования эритроцитов в плазме, двукратно отцентрифугированной в течение 10 минут при 3000 оборотах на центрифуге «ОПН-3» или в 0,15 моль/л натрий-фосфатном буфере, либо в таком же буфере с добавлением 25 ммоль/л карбоната натрия или 25, или 50, или 75 ммоль/л гидрокарбоната натрия. Процентное содержание эритроцитов в суспензии составляло 40% от общего объема. Каждый вид суспензии инкубировали в течение 30 минут при 37°C в герметичных условиях с пероксинитритом на водяной бане-шейкере. В пробе концентрационное соотношение Hb₄ и ONOO⁻ составляло 100:1. В контроль в эквивалентном количестве добавляли изотонический раствор хлорида натрия или буфер соответствующего состава.

В ряде опытов кровь предварительно насыщали в термостатируемом сатураторе оксигенирующей газовой смесью (94,5% O₂ и 5,5% CO₂) в течение 30 минут. Донор NO (CysSNO, диэтиламин/монооксид азота (DEANO), SNAP) или пероксинитрит добавляли к крови в таком количестве, чтобы концентрационное соотношение NO:Hb₄ в сатураторе составляло 1:1 или 1:100 в опыте с ONOO⁻. Одновременно с этим в дезоксигенирующем сатураторе кровь, смешанную с эквивалентным количеством изотонического раствора хлорида натрия, подвергали дезоксигенации газовой смесью азота (94,5%) и углекислого газа (5,5%). Время инкубирования составляло 30 минут, температура в сатураторах поддерживалась на уровне 37°C. Для определения исследуемых показателей газотранспортной функции крови, содержания нитритов/нитратов, определения нитрозилгемоглобина и метгемоглобина смешивали равные объемы крови из каждого сатуратора. В другом случае

донор NO или ONOO^- добавляли в дезоксигенирующий сатуратор к предварительно дезоксигенированной крови, а в оксигенирующий – равного объема раствор хлорида натрия (0,9%). Остальные условия были аналогичными предыдущему опыту. В контрольный образец в оба сатуратора добавляли раствор хлорида натрия (0,9%).

В экспериментах с пероксинитритом венозную кровь помещали в термостатируемый сатуратор, через который продувалась прогретая до 37°C газовая смесь, условно названная гипокапнической (4,2% CO_2 , 5,3% O_2 , 90,5% N_2) или гиперкапнической (9,5% CO_2 , 3,5% O_2 , 87,0% N_2). Длительность воздействия пероксинитрита составляла 30 минут при 37°C . В этом исследовании концентрационные соотношения Hb_4 и ONOO^- были равны 100:1 или 10:1. В контрольном образце к крови добавляли равный объем изотонического раствора хлорида натрия.

Параметры газотранспортной функции крови: парциальное напряжение кислорода ($p\text{O}_2$), углекислого газа ($p\text{CO}_2$), кислотность крови (pH), действительный избыток оснований (ABE) измеряли с помощью газоанализатора «Syntesis-15» («Laboratorial Instrumentation», США) или «ABL-330» («Radiometer», Дания).

СГК оценивали по показателю $p50$ (парциальное давление кислорода, при котором степень насыщения гемоглобина кислородом составляет 50%), измеряемому при реальных значениях pH, $p\text{CO}_2$, температуры ($p50_{\text{реал}}$), а затем пересчитывали для стандартных условий pH=7,4, $p\text{CO}_2=40$ мм рт. ст. и температуры 37°C ($p50_{\text{станд}}$). Степень насыщения гемоглобина кислородом (SO_2 , %) рассчитывали по уравнению Хилла, исходя из значений $p50_{\text{реал}}$ и $p\text{O}_2$ в образце.

Определение суммарного количества нитритов/нитратов (NO_x^-) в плазме крови и гемолизате проводили спектрофотометрически с использованием реактива Грисса [Schulz K. et al., 1999].

Относительное содержание метгемоглобина определяли спектрофотометрически в автоматическом режиме с использованием газоанализатора «Syntesis-15» («Laboratorial Instrumentation», США) или методом М.С. Кушаковского [1968].

Образование нитрозилгемоглобина оценивалось нами методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) в замороженных при 77K образцах крови ЭПР-спектрометром E-3 («Varian», США). С помощью компьютерного приложения «EPR» («Jagiellonian University», Польша) в полученных ЭПР-спектрах оценивали интенсивность (I) и амплитуду (A) сигнала нитрозилгемоглобина, значение которых выражали в условных единицах.

Статистическая обработка результатов проведена с помощью

компьютерной программы "Statistica 10.0" (StatSoft, Inc., USA). Данные представлены в виде медианы и квартилей или среднего значения со среднеквадратичным отклонением. Для анализа статистически значимых различий между группами использовали тест Манна-Уитни, а статистически значимым принимался уровень $p < 0,05$.

Влияние модификаторов L-аргинин-NO системы на показатели кислородтранспортной функции крови

В модели *in vitro* при молярном соотношении Hb_4 и NO/L-аргинина, равном 200:1, нитроглицерин, молсидомин, а также L-аргинин и его комбинация с N_{ω} -нитро-L-аргинином не вызывают изменений показателей сродства гемоглобина к кислороду. В опытах с молсидомином и L-аргинином наблюдается обусловленное снижением парциального давления кислорода уменьшение SO_2 с 76,6 (67,6; 78,7) до 59,9 (41,6; 69,4) и до 56,4 (48,8; 67,8)%, соответственно. В перечисленных опытных образцах не зафиксировано статистически значимого прироста метгемоглобина и показателя NO_x^- в плазме.

Применение этих же соединений в большем количестве, при котором достигается молярное соотношение $Hb_4:NO$, равное 1:1, также не оказывает влияния на положение кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО) *in vitro*. В условиях описанного эксперимента наблюдается снижение SO_2 в опыте с молсидомином на 52,2, с нитроглицерином – 41,5, L-аргинином – 36,1%, соответственно. Вероятно, указанные изменения SO_2 связаны со снижением напряжения кислорода в образцах крови с молсидомином на $15,6 \pm 1,2$, с нитроглицерином – на $12,6 \pm 2,9$ и с L-аргинином – на $10,0 \pm 1,4$ мм рт. ст., соответственно. Воздействие на кровь нитропруссид натрия ($Hb_4:NO=1:1$) приводит к снижению показателя рН на $0,050 \pm 0,008$ единиц и АВЕ на $2,1 \pm 0,4$ ммоль/л, что, однако, не оказывает влияния на показатели газотранспортной функции крови. В этой серии исследования показатель NO_x^- увеличивается только в плазме проб с нитроглицерином на $31,3 \pm 13,8\%$ и с нитропруссидом натрия – на $130,1 \pm 10,5\%$ по отношению к контролю. В эритроцитах опытных образцов статистически значимого прироста NO_x^- , как и относительного количества метгемоглобина, не наблюдается.

В то же время экспериментально установлено, что S-нитрозосоединения CysSNO, SNAP, AlbsNO при воздействии на кровь *in vitro* при соотношении $Hb_4:NO$, равном 1:1 или 12:1 в случае с AlbsNO, повышают сродство гемоглобина к кислороду. Подтверждением тому служит снижение показателя $p50_{станд}$ на 2,9 мм рт. ст. в случае с CysSNO, на 4,6 мм рт. ст. – со SNAP и на 3,0 мм рт. ст. – в опыте с AlbsNO. В последнем опыте зафиксировано также достоверное снижение $p50_{реал}$ на 3,0 мм рт. ст. В результате воздействия на

кровь S-нитрозоцистеина происходит статистически значимый прирост $p\text{CO}_2$ на 15,9%, снижение $p\text{O}_2$ на 39,7% и, как следствие, снижение степени насыщения гемоглобина кислородом с 41,9 (22,9; 59,2) до 15,5 (11,3; 38,0)%. Инкубирование крови как с CysSNO, так и со SNAP приводит к снижению pH на $0,100 \pm 0,020$ единиц в первом случае и на $0,060 \pm 0,010$ – во втором, увеличению содержания метгемоглобина в 6,1 раза в опыте с CysSNO, и в 3,2 раза – со SNAP. Кроме того, в описанном исследовании зафиксировано образование другой NO-модификации гемоглобина – нитрозилгемоглобина, амплитуда сигнала которого увеличилась с 0 до 0,31 условных единиц в опыте с CysSNO и до 0,326 условных единиц – со SNAP. Присутствие доноров NO увеличивает относительно контроля содержание нитритов/нитратов исключительно в плазме на 309,6% в опыте с CysSNO и на 762,6% – со SNAP.

Таким образом, основываясь на представленных результатах, можно утверждать, что NO относится к факторам, участвующим в регуляции КССК. В условиях проведенного исследования *in vitro* только доноры NO, относящиеся к группе S-нитрозосоединений, в молярном соотношении NO:Hb₄, равном 1:1, повышают СГК, тогда как L-аргинин, нитроглицерин, молсидомин, нитропруссид натрия не оказывают влияния на показатели КТФК.

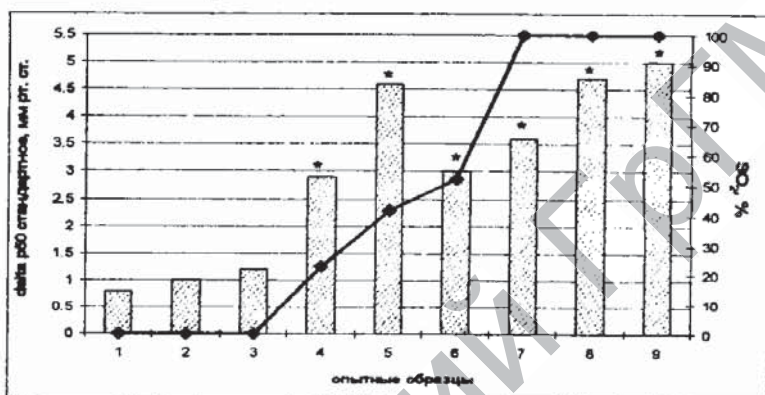
Эффект доноров NO на кислородсвязывающие свойства гемоглобина в условиях оксигенации/дезоксигенации

В экспериментах с предварительной оксигенацией крови в присутствии доноров NO происходит достоверное снижение $p50_{\text{станд}}$ относительно контроля с 32,9 (28,8; 33,6) до 29,3 (27,6; 30,1) мм рт. ст. под действием CysSNO, до 28,2 (27,9; 28,3) мм рт. ст. в присутствии DEANO и до 27,9 (27,1; 29,9) мм рт. ст. – SNAP. Реальный показатель сродства при этом не изменяется. Инкубирование оксигенированной крови с NO-продуцирующими соединениями увеличивает содержание метгемоглобина в опыте с CysSNO в 2,2, с DEANO в 2,0 и со SNAP – в 1,8 раза по сравнению с контролем и приводит к увеличению амплитуды сигнала нитрозилгемоглобина с 0,045 до 0,169, 0,160 и 0,704 условных единиц в опытах с CysSNO, SNAP и DEANO, соответственно. В плазме предварительно оксигенированных образцов увеличивается концентрация нитритов/нитратов: в опыте с CysSNO – на $310,8 \pm 76,8\%$, с DEANO – на $197,7 \pm 44,4\%$, со SNAP – на $1269,5 \pm 452,3\%$ по отношению к контролю. В эритроцитах данный показатель не превышает контрольного значения.

Инкубирование крови с CysSNO, SNAP или DEANO с предварительно дезоксигенированной кровью не приводит к изменению положения КДО в образцах. Увеличение количества метгемоглобина с 0,8 до 2,5% наблюдается только в опыте с CysSNO, тогда как прирост амплитуды сигнала

нитрозилгемоглобина – в опытах со всеми донорами: с CysSNO, DEANO и SNAP с 0,060 до 5,013, 0,916 и 2,960 условных единиц, соответственно. В свою очередь увеличение количеств нитритов/нитратов в плазме и эритроцитах предварительно дезоксигенированной крови в присутствии доноров NO не достигает статистически значимого уровня.

Таким образом, из представленных результатов следует, что характер модификации NO КСГК определяется условиями кислородного режима (рисунок).



1 - кровь при воздействии дезоксигенирующей газовой смеси + DEANO; 2 - то же + CysSNO; 3 - то же + SNAP; 4 - кровь без насыщения газовыми смесями + CysSNO; 5 - то же + SNAP; 6 - то же + AlBSNO; 7 - кровь при воздействии оксигенирующей газовой смеси + CysSNO; 8 - то же + DEANO; 9 - то же + SNAP; * - эксперименты, в которых были достигнуты статистически значимые различия между r_{50} стандартным в контроле и опыте

Рисунок – Изменение r_{50} станд (столбцы) при разной степени насыщения гемоглобина кислородом (кривая) в опытных образцах при воздействии доноров NO на кровь в присутствии различных газовых смесей

При насыщении крови дезоксигенирующей газовой смесью доноры NO не оказывают влияния на r_{50} , в то время как при более высокой степени насыщения гемоглобина кислородом эффект указанных соединений проявляется в увеличении способности гемоглобина связывать и удерживать кислород. Физиологический смысл такого влияния NO на СГК, на наш взгляд, заключается в возможности обеспечивать потребности аэробного метаболизма тканей за счет оптимальной оксигенации крови в малом круге кровообращения при высоком парциальном давлении кислорода и одновременно с этим нивелирования своего действия в условиях низкого парциального напряжения кислорода в интенсивно работающих органах.

Изменение параметров кислородтранспортной функции крови при действии пероксинитрита

При инкубировании венозной крови с пероксинитритом, полученным из нитрита натрия и пероксида водорода [Корреол W.H. et al., 1996], в соотношении ONOO^- и Hb_4 , равном 1:100, происходит снижение показателя $p50_{\text{станд}}$ с 30,0 (29,1; 32,0) до 28,6 (26,9; 29,6) мм рт. ст. и $p50_{\text{реал}}$ – с 35,2 (33,6; 37,8) до 31,4 (29,7; 34,7) мм рт. ст.; при этом достоверно увеличивается содержание метгемоглобина с 0,05 до 2,35% от общего количества гемоглобина в крови. Увеличение соотношения ONOO^- и Hb_4 до 1:10 приводит к еще более существенному снижению $p50_{\text{станд}}$ – с 29,7 (28,4; 30,5) до 20,7 (13,5; 26,7) мм рт. ст. и $p50_{\text{реал}}$ – с 31,6 (30,8; 33,9) до 21,2 (14,8; 27,7) мм рт. ст. В описанном опыте увеличивается показатель pH крови на $0,067 \pm 0,006$ единиц, снижаются значения $p\text{CO}_2$ и $p\text{O}_2$ на $7,4 \pm 0,5$ и $20,0 \pm 3,4$ мм рт. ст., соответственно, что в итоге приводит к уменьшению степени насыщения гемоглобина кислородом с 51,2 (44,3; 67,9) до 13,7 (10,9; 25,8)%. В опытном образце при соотношении ONOO^- и Hb_4 , равном 1:100, возрастает количество нитритов/нитратов в плазме на $552,5 \pm 117,5$ и в эритроцитах – на $490,1 \pm 168,2\%$ по отношению к контролю, соответственно. При соотношении ONOO^- и Hb_4 , равном 1:10, значение показателя NO_x^- увеличивается относительно контроля на $1211,1 \pm 223,2$ и $1926,3 \pm 466,3\%$ в плазме и эритроцитах, соответственно.

Для изучения влияния пероксинитрита на SGK в разных условиях среды применяли суспензии эритроцитов в плазме крови или буферах различного состава при концентрационном соотношении ONOO^- и Hb_4 , равном 1:100. Параметры pH, $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$ суспензий отличались от таковых крови как в сторону больших, так и меньших значений. Однако ни в одном случае, несмотря на окисление гемоглобина пероксинитритом, не наблюдалось изменений SGK относительно контроля. В плазме, в которой были ресуспендированы эритроциты, добавление пероксинитрита увеличивает содержание нитритов/нитратов на $823,0 \pm 219,0$ и в эритроцитах – на $150,4 \pm 24,7\%$ по отношению к контролю. Прирост указанного показателя в натрий-фосфатном буфере опытного образца составляет $753,1 \pm 155,5\%$, в то время как после добавления к буферу карбоната натрия этот показатель вырастает до $1770,2 \pm 653,1\%$ по отношению к контролю. В эритроцитах указанных суспензий наблюдается прирост по отношению к контролю содержания NO_x^- в эксперименте с натрий-фосфатным буфером на $133,9 \pm 31,9\%$ и на $430,8 \pm 94,3\%$ – в случае с суспензией, приготовленной на буфере с карбонатом натрия. В опытах с гидрокарбонатом натрия увеличение количества нитритов/нитратов в эритроцитах составило $204,7 \pm 60,2$, $197,1 \pm 44,9$ и $165,6 \pm 7,6\%$ по отношению к контролю, соответственно, для суспензии с 25, 50

и 75 ммоль/л гидрокарбоната натрия. Показатель NO_x^- в буфере вырос относительно контроля с 50 ммоль/л NaHCO_3 на $210,8 \pm 87,1\%$, а в буфере с 75 ммоль/л NaHCO_3 – на $269,6 \pm 111,1\%$.

Таким образом, представленные результаты демонстрируют способность пероксинитрита, полученного из нитрита натрия и пероксида водорода, вызывать увеличение SGK в цельной крови, что является одним из механизмов регуляции КССК на внутриэритроцитарном уровне.

Пероксинитрит-опосредованная модификация кислород-связывающих свойств гемоглобина в условиях воздействия различных газовых смесей

Воздействие пероксинитрита на цельную кровь, насыщаемую оксигенирующей или дезоксигенирующей газовой смесью, не оказывает влияния на показатели SGK и кислотно-основного состояния крови, несмотря на увеличение количества метгемоглобина в опытном образце в условиях дезоксигенации с 0,00 (0,00; 0,00) до 0,94 (0,46; 1,16)%. Содержание нитритов/нитратов в плазме и эритроцитах в этом исследовании статистически значимо не изменяется.

В суспензии эритроцитов, приготовленной на 0,15 моль/л натрий-фосфатном буфере с 25 ммоль/л карбоната натрия, при разных условиях кислородного обеспечения изменений $p50$ также не наблюдается, несмотря на прирост количества метгемоглобина относительно контроля при дезоксигенации с 0,14 (0,00; 0,32) до 1,25 (0,9; 1,75)%. Показатель NO_x^- увеличивается исключительно при насыщении суспензии оксигенирующей смесью газов в буфере на $82,7 \pm 27,1\%$ и в эритроцитарной массе на $176,2 \pm 45,0\%$ по отношению к контролю. В то же время прироста указанного показателя в условиях дезоксигенации не наблюдается.

В работе изучено влияние пероксинитрита на показатели газотранспортной функции крови при разном напряжении углекислого газа. При соотношении $\text{ONOO}^-:\text{Hb}_4$, равном 1:100, в условиях воздействия гипокapнической газовой смеси $p50_{\text{станд}}$ увеличивается с 30,5 (28,8; 30,8) до 32,5 (31,6; 33,0) и $p50_{\text{реал}}$ – с 27,5 (26,0; 28,0) до 29,4 (28,1; 30,2) мм рт. ст., соответственно. При этом наблюдается снижение напряжения кислорода на $2,9 \pm 0,6$ мм рт. ст., что приводит к уменьшению степени насыщения гемоглобина кислородом с 74,8 (73,4; 76,2) до 66,3 (63,6; 69,1)%, количество метгемоглобина при этом возрастает в 4,8 раза.

В условиях насыщения крови гиперкапнической газовой смесью в опытном образце наблюдается снижение pO_2 на $1,5 \pm 0,2$ мм рт. ст. и увеличение в 11,8 раза концентрации метгемоглобина, но такие показатели, как $p50$ и SO_2 ,

при этом остаются неизменными. Прирост количеств нитритов/нитратов относительно контроля был большим как в эритроцитах, так и в плазме обоих опытных образцов. При воздействии гипокапнической смеси он составил $467,7 \pm 39,5\%$ и $590,3 \pm 86,5\%$, соответственно, для эритроцитов и плазмы. В условиях насыщения крови гиперкапнической смесью произошло увеличение указанного показателя в плазме на $701,0 \pm 153,1$, и в эритроцитах – на $449,2 \pm 44,5\%$ по отношению к контролю.

Большая концентрация пероксинитрита в условиях насыщения крови гипокапнической смесью газов ($\text{ONOO}^-:\text{Hb}_4=1:10$) вызывает более существенный рост стандартного показателя SGK с $29,6$ ($28,5; 29,9$) до $38,2$ ($35,6; 44,5$) мм рт. ст. и реального – с $28,6$ ($27,1; 28,9$) до $36,3$ ($32,1; 39,9$) мм рт. ст. Концентрация метгемоглобина при этом увеличивается в $47,3$ раза, а напряжение кислорода в образце снижается на $15,0 \pm 2,3$ мм рт. ст.

В условиях воздействия газовой смеси с высоким напряжением углекислого газа пероксинитрит ($\text{ONOO}^-:\text{Hb}_4=1:10$) приводит к снижению $p50_{\text{реал}}$ с $35,0$ ($34,5; 38,1$) до $20,6$ ($10,2; 25,5$) мм рт. ст. и $p50_{\text{станд}}$ – с $27,1$ ($26,3; 30,0$) до $18,6$ ($7,5; 21,3$) мм рт. ст. на фоне пониженного на $19,3 \pm 1,5$ мм рт. ст. pO_2 и повышенного в $160,2$ раза количества метгемоглобина. В этом опыте значения показателя NO_x^- в плазме и эритроцитарной массе составили $532,6 \pm 129,1$ и $508,3 \pm 58,0\%$, соответственно, по отношению к контролю. При насыщении крови гипокапнической газовой смесью значения NO_x^- в плазме и эритроцитарной массе достигли $990,4 \pm 114,7$ и $1071,1 \pm 243,3\%$, соответственно.

Таким образом, экспериментально показано, что пероксинитрит оказывает модулирующее действие в отношении КССК. Эффект указанной биорегуляторной молекулы в отношении SGK зависит от газового состава среды. При максимальном или минимальном насыщении гемоглобина кислородом ONOO^- не проявляет своих модифицирующих свойств. При средних же значениях SO_2 эта сигнальная молекула смещает КДО в разном направлении в зависимости от напряжения углекислого газа: в условиях воздействия гипокапнической газовой смеси КДО сдвигается вправо, в гиперкапнической среде – влево.

Результаты выполненного исследования демонстрируют, что монооксид азота и его производное пероксинитрит способны участвовать в процессах формирования кислородсвязывающих свойств крови. Указанные биорегуляторные молекулы приводят как к увеличению, так и снижению сродства гемоглобина к кислороду в зависимости от газового состава крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Доноры монооксида азота, относящиеся к группе S-нитрозотиолов, при соотношении NO и гемоглобина, равном 1:1, повышают сродство венозной крови к кислороду. При инкубировании с S-нитрозоцистеином наблюдается снижение $p50_{\text{станд}}$ с 33,2 до 30,3, с S-нитрозо-N-ацетилпеницилламином – до 28,6 мм рт. ст., соответственно. Указанные соединения приводят к модификации кислородсвязывающих свойств крови через окисление и нитрозилирование гема гемоглобина. При инкубировании L-аргинина, нитроглицерина, молсидомина, нитропрусида натрия с венозной кровью изменений сродства гемоглобина к кислороду не отмечается [1, 7, 9, 10, 16, 18, 20, 21, 23].

2. Модифицирующее действие, оказываемое донорами монооксида азота на кислородсвязывающие свойства крови, зависит от степени насыщения гемоглобина кислородом. В условиях оксигенации крови газовой смесью наблюдается увеличение сродства гемоглобина к кислороду, что подтверждается снижением показателя $p50_{\text{станд}}$ с 32,9 до 29,3, 27,9 и 28,2 мм рт. ст. под влиянием S-нитрозоцистеина, S-нитрозо-N-ацетилпеницилламина и диэтиламин/монооксида азота, соответственно. В то же время воздействие указанных соединений при насыщении крови дезоксигенирующей смесью газов не влияет на состояние кислородтранспортной функции крови [5, 11, 15, 22, 25, 28].

3. Пероксинитрит при воздействии на кровь приводит к изменению параметров кислородтранспортной функции крови. При молярном соотношении в крови пероксинитрита и гемоглобина, равном 1:100, наблюдается увеличение сродства гемоглобина к кислороду: $p50_{\text{станд}}$ снижается с 30,0 до 28,6 и $p50_{\text{реал}}$ – с 35,2 до 31,4 мм рт. ст. При молярном соотношении в крови пероксинитрита и гемоглобина, равном 1:10, происходит более выраженное снижение как стандартного показателя сродства гемоглобина к кислороду с 29,7 до 20,7 мм рт. ст., так и $p50_{\text{реал}}$ с 31,6 до 21,2 мм рт. ст. В суспензиях эритроцитов, приготовленных в плазме либо в натрий-фосфатном буфере, либо в таком же буфере с добавлением карбоната натрия или гидрокарбоната натрия, при молярном соотношении пероксинитрита и гемоглобина, равном 1:100, не происходит изменения положения кривой диссоциации оксигемоглобина [2, 3, 8, 12, 13, 19].

4. При насыщении крови гипокапнической газовой смесью, вследствие чего напряжение углекислого газа в крови достигает 32,8 мм рт. ст., пероксинитрит приводит к снижению сродства гемоглобина к кислороду. При этом наблюдается увеличение показателя $p50_{\text{станд}}$ относительно контроля на 2,0 и 8,6 мм рт. ст. при соотношении пероксинитрита и гемоглобина, равном 1:100 и 1:10, соответственно. При насыщении крови гиперкапнической газовой смесью,

которая увеличивает напряжение углекислого газа в крови до 75,1 мм рт. ст., пероксинитрит вызывает увеличение сродства гемоглобина к кислороду, проявляющееся в уменьшении $p_{50\text{станд}}$ на 8,5 мм рт. ст. только при соотношении ONOO^- и гемоглобина, равном 1:10. В условиях оксигенации или дезоксигенации крови соответствующей газовой смесью пероксинитрит не приводит к модификации кислородсвязывающих свойств крови [4, 6, 17, 19, 26, 27].

5. Влияние компонентов L-аргинин-NO системы на состояние кислородтранспортной функции крови реализуется через процессы регуляции сродства гемоглобина к кислороду. Эффект, оказываемый монооксидом азота и его производным – пероксинитритом – на положение кривой диссоциации оксигемоглобина, зависит от газового состава среды. При низком напряжении кислорода в крови доноры монооксида азота не оказывают влияния на показатель сродства гемоглобина к кислороду, в то время как при насыщении крови кислородом эффект этих соединений проявляется в увеличении указанного параметра. Действие пероксинитрита как модулятора кислородсвязывающих свойств крови наиболее эффективно реализуется при средних значениях напряжения кислорода и зависит от напряжения углекислого газа: в условиях гиперкапнии кривая диссоциации оксигемоглобина в результате воздействия пероксинитрита смещается влево, а при гипокапнии – вправо [3, 6, 14, 19, 24, 26].

Рекомендации по практическому использованию результатов

На основании полученных результатов разработан способ модификации сродства гемоглобина к кислороду *in vitro* донором монооксида азота, на который получено уведомление о положительном результате предварительной экспертизы заявки на выдачу патента на изобретение «Средство для повышения сродства гемоглобина к кислороду *in vitro*» (заявка № а 20120679, 30.04.2012), а также способы модификации SGK *in vitro* пероксинитритом (удостоверения на рационализаторские предложения № 1614 и 1615 от 30.08.2012).

Основные результаты и выводы диссертационной работы внедрены в научную деятельность отдела биорегуляторов ГП «Институт биохимии биологически активных соединений НАН РБ», а также учебную деятельность кафедры анатомии и физиологии биологического факультета УО «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова», кафедры нормальной физиологии лечебного факультета УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», кафедры зоологии и физиологии человека и животных факультета биологии и экологии УО «Гродненский государственный университет имени Янки Купалы», кафедры нормальной физиологии УО «Гродненский государственный медицинский университет».

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

Статьи в научных журналах

1. **Stepuro, T.L.** Nitric oxide effect on the hemoglobin-oxygen affinity / **T.L. Stepuro, V.V. Zinchuk** // *Journal Physiol. & Pharmacol.* – 2006. – Vol. 57, № 1. – P. 29-38.
2. **Зинчук, В.В.** Эффект пероксинитрита на сродство гемоглобина к кислороду *in vitro* / **В.В. Зинчук, Т.Л. Степуро** // *Биофизика.* – 2006. – Т. 131, № 1. – С. 32-38.
3. **Степуро, Т.Л.** Влияние нитрозоцистеина и пероксинитрита на кислородсвязывающие свойства крови / **Т.Л. Степуро, В.В. Зинчук** // *Весті НАН Беларусі. Серыя біялагічных навук.* – 2007. – № 2. – С. 83-86.
4. **Степуро, Т.Л.** Эффект пероксинитрита на сродство гемоглобина к кислороду *in vitro* при различном напряжении углекислого газа / **Т.Л. Степуро, В.В. Зинчук** // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* – 2011. – № 8. – С. 852-861.
5. **Степуро, Т.Л.** Модификация оксидом азота сродства гемоглобина к кислороду в различных условиях кислородного режима / **Т.Л. Степуро, В.В. Зинчук** // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* – 2013. – Т. 99, № 1. – С. 111-119.
6. **Зинчук, В.В.** Внутриэритроцитарная система регуляции сродства гемоглобина к кислороду / **В.В. Зинчук, Т.Л. Степуро** // *Новости медико-биологических наук.* – 2013. – Т. 7, № 1. – С. 45-56.

Статьи в сборниках и материалах конференций

7. **Степуро, Т.Л.** Влияние нитрозоцистеина на сродство гемоглобина к кислороду *in vitro* / **Т.Л. Степуро** // *Материалы III международной научно-практической конференции «Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования».* – 2004. – С. 144-147.
8. **Степуро, Т.Л.** Влияние пероксинитрита на процессы перекисного окисления липидов и состояние антиоксидантной системы крови *in vitro* / **Т.Л. Степуро** // *Материалы 57-й итоговой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВГМУ: Актуальные вопросы современной медицины.* – 2005. – С. 227-229.
9. **Степуро, Т.Л.** Участие L-аргинин-NO системы в регуляции кислородтранспортной функции крови в условиях температурного стресса / **Т.Л. Степуро, В.В. Зинчук** // *Стресс и висцеральные системы: материалы Междунар. конф.* – Минск: «Бизнесофсет», 2005. – С. 193-195.
10. **Зинчук, В.В.** NO как лиганд, определяющий кислородсвязывающие свойства крови / **В.В. Зинчук, Т.Л. Степуро, Н.В. Зинчук** // *Активные формы кислорода,*

азота и хлора в регуляции клеточных функций в норме и при патологии. Материалы Международного симпозиума: Ч. 1 / Под ред. Степура И.И., Заводник И.Б. – Гродно, 2006. – С. 89-93.

11. Степура, Т.Л. Влияние доноров оксида азота на средство гемоглобина к кислороду *in vitro* в условиях различной оксигенированности крови / Т.Л. Степура, В.В. Зинчук // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования. Труды V международной научно-практической конференции. – Витебск, ВГМУ, 2008. – С. 99-101.

12. Степура, Т.Л. Пероксинитрит как фактор регуляции средства гемоглобина к кислороду / Т.Л. Степура, В.В. Зинчук // Актуальные проблемы медицины: материалы ежегодной итоговой научной конференции (15-16 декабря 2011 г.) / Отв. ред. М.Н. Курбат. – Гродно, ГрГМУ, 2011. – с. 386-388.

13. Зинчук, В.В. Пероксинитрит как фактор развития дисфункции эндотелия / В.В. Зинчук, Т.Л. Степура // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования. Труды VII международной научно-практической конференции. – Витебск, ВГМУ, 2012 г. – С. 6-8.

14. Степура, Т.Л. Возможность модификации средства гемоглобина к кислороду *in vitro* / Т.Л. Степура // Научно-практическая конференция «Кислород и свободные радикалы». – Гродно: ГрГМУ, 2012. – С. 157-160.

15. Степура, Т.Л. Оксид азота – кислородзависимый регулятор средства гемоглобина к кислороду / Т.Л. Степура, В.В. Зинчук // Фундаментальные науки и современная медицина: материалы международной конференции (25-26 октября 2012 г., Минск, Беларусь) / ред. И.В. Залуцкий, А.В. Кульчицкий, В.С. Улашик. – Минск: Промбытсервис, 2012. – С. 306-309.

16. Степура, Т.Л. Модификация средства гемоглобина к кислороду *in vitro* различными донорами оксида азота / Т.Л. Степура // Актуальные проблемы медицины: материалы Ежегодной итоговой научной конференции / Отв. ред. М.Н. Курбат. – Гродно, ГрГМУ, 2013. – С. 215-217.

17. Степура, Т.Л. Пероксинитрит-опосредованная модификация кислородсвязующих свойств крови в условиях воздействия газовых смесей разного состава / Т.Л. Степура, В.В. Зинчук // Фундаментальные науки – медицине: материалы Международной научной конференции. – Минск: «Беларуская навука», 2013. – С. 267-270.

18. Степура, Т.Л. Роль оксида азота в регуляции средства гемоглобина к кислороду при стрессе / Т.Л. Степура, В.В. Зинчук // Теоретические и прикладные проблемы стресса: материалы Международной научно-практической конференции. – Витебск, 2013. – С. 154-156.

19. Степура, Т.Л. Активные формы азота как внутриэритроцитарные модуляторы средства гемоглобина к кислороду / Т.Л. Степура, А.В. Шинтарь,

В.В. Зинчук // Актуальные проблемы медицины: материалы научно-практической конференции, посвященной 55-летию учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет» (3-4 октября 2013 г.): в 2-х ч. / Отв. ред. В.А. Снежицкий. – Гродно: ГрГМУ, 2013. – Ч. 2. – С. 284-287.

Тезисы докладов

20. Михно (Степуро), Т.Л. Оксид азота и средство гемоглобина к кислороду / Т.Л. Михно (Степуро) // Научно-практическая конференция молодых ученых и студентов, посвященная памяти академика Ю.М. Островского. – Гродно: ГрГМУ, 2003. – С. 146-147.

21. Михно (Степуро), Т.Л. Влияние доноров оксида азота на средство гемоглобина к кислороду и прооксидантно-антиоксидантное равновесие / Т.Л. Михно (Степуро), И.В. Каленик // Юбилейная конференция, посвященная 50-летию со дня основания Института физиологии НАНБ : тез. докл. – Минск, 2003. – С. 108-109.

22. Буйницкий, О.К. Влияние доноров оксида азота на средство гемоглобина к кислороду *in vitro* в условиях оксигенации/дезоксигенации крови / О.К. Буйницкий, И.В. Латыш, Т.Л. Степуро, В.В. Зинчук // Научно-практическая конференция молодых ученых и студентов, посвященная памяти профессора С.И. Гельберга. – Гродно: ГрГМУ, 2004. – С. 34-35.

23. Буйницкий, О.К. Эффект температурного стресса на средство гемоглобина к кислороду *in vitro* в условиях модуляции L-аргинин-NO системы / О.К. Буйницкий, Т.Л. Степуро // Научно-практическая конференция молодых ученых и студентов Гродненского государственного медицинского университета, посвященная памяти профессора А.Н. Габузова. – Гродно: ГрГМУ, 2005. – С. 25-26.

24. Степуро, Т.Л. Оксид азота и пероксинитрит как модификаторы функций гемопротеидов / Т.Л. Степуро // Сигнальные механизмы регуляции физиологических функций: тез. докл. XIII съезда Белорус. о-ва физиологов и II Междунар. науч. конф., 19-20 апр. 2012 г., Минск, Беларусь / редкол.: В.В. Лысак [и др.]. – Минск: Изд. центр БГУ, 2012. – С. 135.

25. Степуро, Т.Л. Образование нитрозилгемоглобина при инкубировании крови с S-нитрозосоединениями / Т.Л. Степуро // Научно-практическая конференция молодых ученых и студентов Гродненского государственного медицинского университета, посвященная памяти профессора Маслакова: тезисы докладов. – Гродно: ГрГМУ, 2012. – С. 399-400.

26. Шинтарь, А.В. Участие активных форм азота в регуляции кислородсвязывающих свойств крови *in vitro* / А.В. Шинтарь, Е.Ю. Васечко,

Т.Л. Степуро // Научно-практическая конференция молодых ученых и студентов Гродненского государственного медицинского университета, посвященная памяти профессора М.В. Кораблева: материалы конф. – Гродно: ГрГМУ, 2013. – С. 474.

27. Зинчук, В.В. Пероксинитрит-зависимые механизмы формирования кислородтранспортной функции крови / В.В. Зинчук, **Т.Л. Степуро** // Микроциркуляция и гемореология (от ангиогенеза до центрального кровообращения): материалы Международной научной конференции. – Ярославль: Изд. ЯГПУ им. К.Д. Ушинского, 2013. – С. 39.

28. Zinchuk V.V. The in vivo and in vitro blood oxygen-binding properties modification by different nitric oxide donors / V.V. Zinchuk, **T.L. Stepuro**, M.N. Khodosovsky // Фізіол. журн. – 2013. – Т. 59, № 4 (додаток). – С. 37.

РЭЗІЮМЭ

Сцяпура Таццяна Леанідаўна

Уклад манааксиду азоту і пераксінітрыту ў працэсы фарміравання кіслародзвяззвальных уласцівасцей крыві

Ключавыя словы: манааксід азоту, пераксінітрыт, гемаглабін, эрытрацыт, кісларод.

Мэта даследавання: на аснове аналізу характару ўплыву манааксиду азоту і пераксінітрыту на роднасць гемаглабіну да кіслароду абгрунтаваць іх удзел у працэсах фарміравання кіслародзвяззвальных уласцівасцей крыві.

Метады даследавання: спектрафотаметрычны, ЭПР-спектраметрычны, статыстычны.

Выкарыстаная апаратура: мікрагазааналізатары «Synthesis-15» і «ABL-330», спектрафотаметры «СФ-46» і «Specord M-40», лазня-шэйкер «EIran-357», ЭПР-спектраметр «Varian E-3».

Атрыманыя вынікі і іх навізна. У эксперыментах *in vitro* выяўлена, што манааксід азоту і яго вытворнае – пераксінітрыт – прымаюць удзел у фарміраванні кіслародзвяззвальных уласцівасцей крыві.

Паказана, што эфект, які аказваюць дадзеныя малекулы на палажэнне крывой дысацыяцыі оксігемаглабіну, залежыць ад паказчыкаў газавога складу асяроддзя. Донары манааксиду азоту пры насычэнні крыві кіслародам павялічваюць роднасць гемаглабіну да кіслароду, у той жа час ва ўмовах дэзаксігенацыі крыві яны не робяць уплыву на палажэнне крывой дысацыяцыі оксігемаглабіну. Уздзеянне пераксінітрыту як мадулятара кіслародзвяззвальных уласцівасцей крыві рэалізуецца пры сярэдніх значэннях напружання кіслароду і залежыць ад напружання вуглякіслага газу: ва ўмовах гіперкапніі крывая дысацыяцыі оксігемаглабіну ў выніку ўздзеяння пераксінітрыту перамяшчаецца ўлева, а пры гіпакапніі – управа.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: вынікі працы абгрунтоўваюць выкарыстанне донараў манааксиду азоту і пераксінітрыту як мадыфікатараў кіслародзвяззвальных уласцівасцей крыві.

Галіна выкарыстання: навукова-даследчыя ўстановы, тэарэтычны курс па нармальнай фізіялогіі ў ВНУ біялагічнага і медыцынскага профілю.

РЕЗЮМЕ

Степуро Татьяна Леонидовна

Вклад монооксида азота и пероксинитрита в процессы формирования кислородсвязывающих свойств крови

Ключевые слова: монооксид азота, пероксинитрит, гемоглобин, эритроцит, кислород.

Цель исследования: на основе анализа характера влияния монооксида азота и пероксинитрита на сродство гемоглобина к кислороду обосновать их участие в процессах формирования кислородсвязывающих свойств крови.

Методы исследования: спектрофотометрический, ЭПР-спектрометрический, статистический.

Использованная аппаратура: микрогазоанализаторы «Synthesis-15» и «ABL-330», спектрофотометры «СФ-46» и «Specord M-40», баня-шейкер «Erap-357», ЭПР-спектрометр «Varian E-3».

Полученные результаты и их новизна. В экспериментах *in vitro* установлено, что монооксид азота и его производное – пероксинитрит – участвуют в формировании кислородсвязывающих свойств крови.

Показано, что эффект, оказываемый указанными молекулами на положение кривой диссоциации оксигемоглобина, зависит от показателей газового состава среды. Доноры монооксида азота при насыщении крови кислородом увеличивают сродство гемоглобина к кислороду, в то время как в условиях дезоксигенации крови они не влияют на положение кривой диссоциации оксигемоглобина. Действие пероксинитрита как модулятора кислородсвязывающих свойств крови реализуется при средних значениях напряжения кислорода и зависит от напряжения углекислого газа: в условиях гиперкапнии кривая диссоциации оксигемоглобина в результате воздействия пероксинитрита смещается влево, а при гипокапнии – вправо.

Рекомендации по использованию: результаты работы обосновывают использование доноров монооксида азота и пероксинитрита как модификаторов кислородсвязывающих свойств крови.

Область применения: научно-исследовательские учреждения, теоретический курс по нормальной физиологии в вузах биологического и медицинского профиля.

SUMMARY

Stsiapura Tatsiana

The contribution of nitric oxide and peroxynitrite in the processes of formation of blood oxygen-binding properties

Keywords: nitric oxide, peroxynitrite, hemoglobin, erythrocyte, oxygen.

Objective: based on the analysis of nitric oxide and peroxynitrite influence on the hemoglobin oxygen affinity justify their participation in the processes of formation of blood oxygen-binding properties.

Methods of research: spectrophotometric, EPR- spectrometric, statistical.

Equipment: microgasanalyzers «Synthesis-15» and «ABL-330», spectrophotometers «CΦ-46» and «Specord M-40», bath-shaker «Elpan- 357», EPR-spectrometer «Varian E-3».

Results and their novelty: In experiments *in vitro* it was revealed that nitric oxide and its derivative – peroxynitrite – are involved in the formation of oxygen-binding properties of blood.

It was shown that the effect exerted by these molecules on the position of the oxyhemoglobin dissociation curve depends on the gas parameters in the blood. The nitric oxide donors increase the hemoglobin oxygen affinity when blood is saturated by oxygen, while in the deoxygenated blood they do not influence on the position of oxyhemoglobin dissociation curve. The peroxynitrite action as a modulator of oxygen-binding properties of blood is realized under intermediate values of oxygen tension and depends on carbon dioxide tension: under hypercapnia oxyhemoglobin dissociation curve shifts leftwards, while under hypocapnia – rightwards as a result of peroxynitrite exposure.

Recommended application: The results justify the use of nitric oxide donors and peroxynitrite as modifiers of oxygen-binding properties of blood.

Field of application: research institutions, theoretical course of normal physiology in the Universities of biological and medical profiles.