

УДК 612.111.11: 612.23

ГАЗОТРАНСПОРТНАЯ ФУНКЦИЯ КРОВИ И NO

В.В. Зинчук, Д.М.Н., профессор

Кафедра нормальной физиологии

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

L-аргинин-NO система участвует в формировании газотранспортной функции крови через внутриэритроцитарные механизмы ее регуляции, образование различных NO-производных гемоглобина, действие пероксинитрита. В ряде наших опытов на различных моделях гипоксических состояний (лихорадка, перегревание, гипотермия, окислительный стресс, индуцированный липополисахаридом), было показано изменение кислородтранспортной функции крови при введении в организм веществ, изменяющих активность L-аргинин-NO системы.

Ключевые слова: монооксид азота, гемоглобин, кислород

The L-arginine-NO system participates in the development of gas transport function of blood through intraerythrocyte mechanisms of its regulation, formation of various NO-derivatives of hemoglobin, action of peroxynitrite. In our experiments on various models of hypoxic conditions (fever, hyperthermia, hypothermia, oxidative stress induced by lipopolysaccharide) change of blood oxygen transport function was shown in introduction of the substances changing the activity of L-arginine-NO system.

Key words: nitric oxide, hemoglobin, oxygen

Основное количество монооксида азота (NO), образуемого в организме, (более 90%) приходится на эндотелий. Его образование эндотелием *in situ* или в культуре примерно равно 4 пмоль/кг белка/мин, что в перерасчете на общую массу данного типа клеток 1,5 кг для организма человека составляет 1728 мкмоль/сут [19]. В этих клетках образуется в сотни раз больше его, чем это требуется для регуляции кровотока. Существует гетерогенность эндотелия по NO-образующей функции по ходу сосудистого русла: в артериолах она наиболее высока, а в венах существенно меньше [10]. Наблюдаемая неоднородность распределения активности эндотелиальной NO-синтазы отражает функциональные особенности сосудов. Так, базальный уровень синтеза NO в артериях выше, чем в венах. Артериовенозная разница содержания NO-производных есть, по-видимому, следствие различной NO-синтазной активности эндотелия по ходу сосудистой системы (его гетерогенности). Следует учитывать особенность объемного содержания крови в различных отделах сердечно-сосудистой системы, что предполагает более высокое содержание NO и его производных на микроциркуляторном участке сосудистого русла (в 100 и более раз) и, соответственно, его большую долю, взаимодействующую непосредственно с компонентами крови.

В сохранении биоактивности NO имеют важное значение эритроциты, через мембрану которых он транспортируется, образуя при взаимодействии с Hb ряд его производных. Диффузионный барьер эритроцитарной мембраны является важным фактором его метаболизма. NO, взаимодействуя с гемоглобином через высокоаффинные Fe²⁺-связывающие участки на геме, образует нитрозилгемоглобин [21]. Также он может связываться в глобиновой цепи гемоглобина с β⁹³-цистеином, образуя S-нит-

розогемоглобин, который в больших концентрациях индуцирует существенную модификацию функциональной активности гемоглобина [27]. Связывание NO влияет на аллостерическую конформацию гемоглобина, стабилизируя T-состояние, что ведёт к снижению его сродства к O₂ и усилению его доставки в ткани. Различные соединения гемоглобина с NO определяют положения кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО) всей крови. Метгемоглобин и S-нитрозогемоглобин смещают ее влево, а нитрозилгемоглобин – вправо. Величина р50 S-нитрозогемоглобина, находящегося вне эритроцита, имеет значение менее 10 мм рт. ст. [12], для раствора S-нитрозогемоглобина (с 30% нитрозилированием β⁹³-цистеина) составляет 4,3±0,27 мм рт. ст. [25], а для нитрозилгемоглобина его величина составляет 39,6±1,5 мм рт. ст. [21]. В целом, дыхательный цикл можно рассматривать как систему «трех газов»: NO/O₂/CO₂ [15]. В ходе одного цикла движения эритроцита в сосудистой системе происходят последовательные реакции гемоглобина с NO, модулирующие его структурные переходы из R- в T-состояние, что на уровне капилляров малого круга кровообращения может быть дополнительным механизмом, способствующим оксигенации крови, а на уровне микроциркуляции большого круга – оптимизирующим десатурацию крови, и, соответственно, доставку кислорода в ткани (рис.1).

Обсуждается вопрос об альтернативных источниках образования NO в крови. Учитывая сложную природу участия NO в обеспечении различных функций организма, должны существовать эффективные механизмы регуляции его уровня в тех или иных процессах. Предполагается наличие собственных механизмов синтеза NO в эритроцитах, судя по накоплению конечных продуктов его метаболизма NO₂⁻/NO₃⁻ [14], цитрулина [13]. Об-

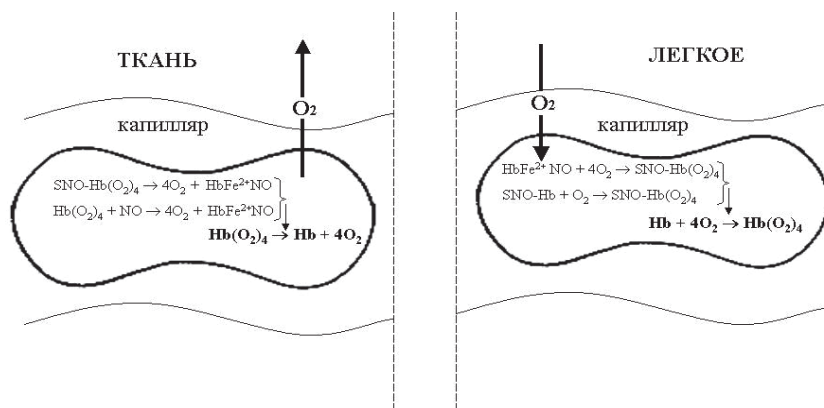


Рисунок 1 – Механизм влияния NO на процессы оксигенации и десатурации крови в капиллярах малого и большого кругов кровообращения [Зинчук В.В., 2003].

наружено методом иммуноблоттинга наличие в эритроцитах белков типа NO-синтаза [17]. Kang E.S. et al. [18] показали, что нормальные циркулирующие эритроциты содержат две изоформы этого фермента, не обладающие в обычных условиях каталитической активностью, хотя, возможно, что незрелые эритроциты (эритробласты, ретикулоциты) могли бы экспрессировать их NO-синтазную активность, утрачивая ее по мере дифференциации.

Kleinbongard P. et al. [2006] выявили, что в эритроцитах содержатся протеины, расположенные на плазматической мембране и обладающие NO-синтазной активностью, сопоставимой с аналогичным ферментом в эндотелиальных клетках. Согласно анализу, с помощью дополнительного иммунозолотого мечения стоматином NO-синтаза в эритроцитах локализуется только на внутренней стороне мембраны и обеспечивает существенные регуляторные функции для эндотелия и крови. Их ферментативная активность в эритроцитах, определяемая по специфическому превращению L-аргинина в цитруллин, составляет $0,3 \pm 0,1$ пмоль/мг белка/мин, что сравнимо с активностью этого фермента в культуре эндотелиальных клеток ($0,7 \pm 0,1$ пмоль/мг белка/мин), а по высвобождению NO-родственных интермедиатов в окружающую плазму – $5,9 \pm 0,8$, а при стимуляции L-аргинином – $12,4 \pm 3,5$ пмоль/мл·мин [20]. Интенсивные физические упражнения значительно снижают активность NO-синтазы в эритроцитах, что важно для формирования реологических свойств, кислородтранспортной функции (КТФ) крови [29]. Показана экспрессия NO-синтазы эндотелиального типа в эритроцитах человека при экстракорпоральной циркуляции, оценивавшаяся по содержанию соответствующих антител, активность которой коррелировала со временем внешней перфузии [30]. Предполагается следующий регуляторный механизм функционирования эритроцитарного синтеза NO: данная NO-синтаза связывается с кальвеолой-1 в цитоплазме и транспортируется в везикулах к мембране, где рас-

полагается в липидном слое в неактивном состоянии, затем напряжение сдвига инициирует фосфорилирование этого белка в присутствии роста концентрации Ca^{2+} , что активирует этот фермент и вместе с теплошоковыми белками происходит образование NO [24].

В ряде наших опытов на различных моделях гипоксических состояний: лихорадка, перегревание, гипотермия, окислительный стресс, индуцированный липополисахаридом, было показано изменение КТФ крови при введении в организм веществ, изменя-

ющих активность L-аргинин-NO системы (L-аргинин, селективные и неселективные ингибиторы NO-синтазы, доноры NO). Данная система вовлечена в регуляцию КТФ крови на действие липополисахарида, обуславливая сдвиг КДО вправо [33]. Введение ингибитора NO-синтазы (N^G -нитро-L-аргинин) при лихорадке, индуцированной введением липополисахарида, через 120 минут сопровождалось увеличением $p50_{\text{станд}}$ с $33,7 \pm 1,1$ до $37,1 \pm 1,3$ мм рт.ст., что, в частности, обусловлено различными эффектами NO-производных гемоглобина на сродство гемоглобина к кислороду (СГК) [2]. Введение в организм крыс метилового эфира N^G -нитро-L-аргинина значительно снижает устойчивость животных к действию высокой внешней температуры и сдвигает КДО вправо (значение $p50_{\text{реал}}$ составило $42,3 \pm 1,19$, $p < 0,01$, в то время как в контроле $34,9 \pm 0,73$ мм рт.ст.) [32]. У животных, получавших L-аргинин и подвергавшихся гипотермии, отмечается наименьший сдвиг КДО влево [34]. Введение нитроглицерина в/б крысам приводит к увеличению концентрации метгемоглобина на 217,1% и $p50$ на 29,2%, в условиях введения липополисахарида и этого донора NO эти показатели также увеличивались [3]. Потенцирования данных эффектов при одновременной коррекции СГК и L-аргинин-NO системы не происходит, что отражает, по видимому, истощение адаптационных резервов, реализуемых через NO-зависимые механизмы формирования кислородсвязывающих свойств гемоглобина [4]. Коррекция окислительного стресса путем введения метилового эфира N^G -нитро-L-аргинина и L-аргинина существенно не влияет на данный характер изменения СГК, в то время как селективный ингибитор индуцибельной изоформы NO-синтазы (L-лизина- N^G -ацетамида) снижает $p50_{\text{станд}}$ на 8,6 % ($p < 0,02$), а $p50_{\text{реал}}$ уменьшает на 10,6 % ($p < 0,001$), соответственно, КДО сдвигалась влево [1]. Введение эритропоэтина и мелатонина крысам, подвергавшимся холодovому воздействию и последующему отогреванию, смещают КДО

вправо и, судя по приросту концентрации нитрат/нитритов, механизмы имеют NO-зависимую природу [9; 16]. Приведенные данные предполагают существование механизма формирования кислородсвязывающих свойств крови с участием NO, реализуемого на эритроцитарном уровне.

В клинических исследованиях у больных стенокардией при лечении нитросорбидом наблюдалось уменьшение $p50_{\text{станд}}$ и, соответственно, сдвиг КДО влево, что обусловлено повышением компенсаторных возможностей гемодинамики [8]. У больных АГ III ст. под влиянием небиволола (препарата, изменяющего состояние L-аргинин-NO системы) $p50_{\text{реал}}$ увеличилось на 9,2% ($p < 0,05$), $p50_{\text{станд}}$ – на 8,3% ($p < 0,05$), т.е. отмечалось нормализующее влияние данного препарата на SGK [26]. В опытах *in vitro* небиволол увеличивал $p50_{\text{реал}}$ на $4,3 \pm 0,8$ ($p < 0,05$) мм рт.ст. при самой низкой концентрации, а последующее 2- и 3-кратное увеличение его концентрации повышало $p50_{\text{реал}}$ на $7,5 \pm 1,1$ ($p < 0,01$) и $10,6 \pm 0,7$ ($p < 0,01$) мм рт.ст., соответственно, что отражает дозозависимый характер его действия, при этом уровень метгемоглобина и содержание нитрат/нитритов возрастало при росте концентрации препарата [7]. Очевидно, изменения SGK при действии небиволола реализуются также через автономную внутриэритроцитарную систему регуляции кислородсвязывающих свойств крови. NO в этом случае выступает в качестве важного модификатора функциональных свойств гемоглобина.

Вклад NO во внутриэритроцитарные механизмы регуляции кислородсвязывающих свойств крови изучался в его различных концентрационных отношениях в опытах *in vitro*. При инкубации крови с нитрозосистеином и в условиях оксигенации значение $p50_{\text{станд}}$ было ниже на $3,9 \pm 0,70$ мм рт.ст. ($p < 0,05$), а $p50_{\text{реал}}$ на $3,4 \pm 0,95$ мм рт.ст. ($p < 0,05$), что приводит к левостороннему сдвигу КДО [28]. Возможно, наблюдаемые сдвиги КДО влево в эксперименте с предшествующей оксигенацией ($\text{NO}/\text{Hb} = 1/2$) обусловлены не только присутствием окисленной формы гемоглобина, но и нитрозилированной по 93 остатку цистеина в β -цепи. Взаимодействие крови с донорами NO в условиях дезоксигенации также увеличивает содержание метгемоглобина, что, однако, не вызывает ожидаемого снижения показателя SGK. Как показывает анализ результатов наших исследований, влияние NO на SGK определяется как условиями оксигенированности крови, так и соотношением выделяющегося NO и гемоглобина крови, что особенно наглядно видно в опытах с дезоксигенацией. Уменьшение этого соотношения до величины 1/4 в условиях предшествующей дезоксигенации вызывает левосторонний сдвиг КДО на фоне отсутствия достоверного увеличения количества метгемоглобина. Наблюдаемый рост SGK мог быть связан с образованием S-нитрозогемоглобина. Образование которого, вероятно, обусловлено генерацией нитрозилирующих

агентов в условиях данного эксперимента, когда NO медленно диссоциирует из комплекса с гемом и взаимодействует с кислородом.

NO взаимодействует с O_2^- с образованием пероксинитрита, который может быть модификатором свойств эритроцитарной мембраны и гемоглобина через различные реакции. Пероксинитрит способен воздействовать на эритроциты через окисление гемоглобина и эритроцитарной полосы 3 тирозин фосфорилирования [23]. Эффект взаимодействия Hb и пероксидаз (H_2O_2 , LOOH , ONOO^-) может быть более значимым, чем его окислительное повреждение [31]. При высоких концентрациях пероксинитрит вызывает полимеризацию спектрина, нарушает присущую эритроцитарной мембране асимметрию распределения липидов, пространственное распределение гликофорина и анионного обменника (AE1) в мембране, в результате чего происходят нарушения ее структуры, и, как следствие, изменяются формы эритроцита (дискоциты трансформируются в основном в акантоциты, а также в «пузырчатые» клетки) [11, 22]. Инкубирование венозной крови с пероксинитритом приводит к повышению SGK. Отмечается снижение, по отношению к контролю, величины $p50_{\text{станд}}$ на $3,65 \pm 1,28$ мм рт.ст. ($p < 0,05$) и $p50_{\text{реал}}$ на $4,47 \pm 1,59$ мм рт.ст. ($p < 0,05$), содержание метгемоглобина и нитритов в плазме при этом возрастало [6]. Вероятно, данный эффект реализуется через образование различных форм гемоглобина: окисленной по гемю и модифицированной по его аминокислотным остаткам. Это может иметь значение для формирования функциональных свойств гемоглобина и его участия в формировании потока O_2 в ткани и поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия в организме. Вероятно, эффект пероксинитрита на положение КДО цельной крови определяется непосредственными продуктами его взаимодействия с гемоглобином. В нашей экспериментальной модели были выбраны достаточно высокие соотношения $\text{ONOO}^-/\text{гемоглобина}$, так как концентрации NO в таких отделах сосудистой системы, как артериолы, капилляры гораздо выше, чем в крови, содержащейся в крупных сосудах. На основании этих результатов можно предположить, что пероксинитрит является не только цитотоксичным окислителем, но и фактором регуляции кислородсвязывающих свойств гемоглобина.

Эволюция наших представлений о взаимодействии NO с гемоглобином прошла сложный путь: от понимания роли гемоглобина только как фактора элиминации NO, до его значения как депо, и далее как модификатора кислородсвязывающих свойств гемоглобина (рис. 2). Газотранспортная функция крови обеспечивает перенос не только O_2 , CO_2 , но и NO. L-аргинин-NO система может участвовать в формировании КТФ крови через внутриэритроцитарные механизмы регуляции, кислородзависимый характер образования NO, регуля-

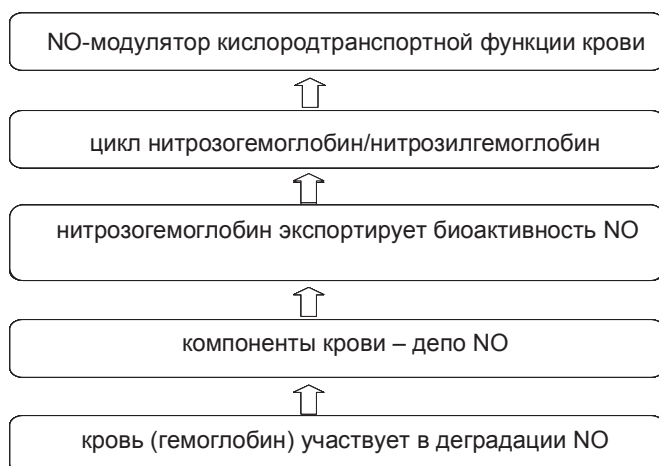


Рисунок 2 – Эволюция представления о физиологических значениях взаимодействия NO с компонентами крови

цию сосудистого тонуса, действие пероксинитрита. Возможна коррекция гипоксии через целенаправленное воздействие на кислородсвязывающие свойства крови и L-аргинин-NO систему.

Литература

1. Глебов А.Н., Зинчук В.В. Кислородтранспортная функция крови крыс при введении липополисахарида в условиях коррекции L-аргинин-NO системы // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2005. – Т. 91, № 9. – С. 1052-1060.
2. Зинчук В.В., Борисюк М.В. Эффект ингибирования NO-синтазы на кислородтранспортную функцию крови при лихорадке у кроликов // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 1997. – Т. 83, № 4. – С. 111-116.
3. Зинчук В.В., Борисюк М.В. Роль кислородсвязывающих свойств крови в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма // Усп. физиол. наук. – 1999. – Т. 30, № 3. – С. 38-48.
4. Зинчук В.В. Прооксидантно-антиоксидантное состояние организма при введении липополисахарида в условиях коррекции сродства гемоглобина к кислороду и L-аргинин-NO-системы // Биол. экпер. биол. и мед. – 2001. – Т. 131, № 1. – С. 39-42.
5. Зинчук В.В. Участие оксида азота в формировании кислородсвязывающих свойств гемоглобина // Успехи физиологических наук. – 2003. – Т. 34, № 2. – С. 33-45.
6. Зинчук В.В., Степура Т.Л. Эффект пероксинитрита на сродство гемоглобина к кислороду *in vitro* // Биофизика. – 2006. – Т. 131, № 1. – С. 32-38.
7. Зинчук В.В., Зинчук Н.В. Влияние небиволола на кислородтранспортную функцию крови // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2007. – Т. 70, № 1. – С. 44-47.
8. Зинчук В.В., Добродей М.А., Лис М.А. Особенности кислородтранспортной функции крови у больных стенокардией в условиях коррекции L-аргинин-NO системы // Физиология человека. – 2008. – Т. 34, № 2. – С. 1-3.
9. Зинчук В.В., Глуткин С.В. Влияние мелатонина на прооксидантно-антиоксидантное равновесие в условиях холодового воздействия с последующим отогреванием крыс // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова – 2008. – Т. 94, № 12. – С. 1435-1442.
10. Aird C.W. Mechanisms of endothelial cell heterogeneity in health and disease // Circ. Res. – 2006. – Vol. 98. – P. 159-162.
11. Bartosz G. Peroxynitrite: mediator of the toxic action of nitric oxide // Acta. Biochim. Pol. – 1996. – Vol. 43, № 4. – P. 645-659.
12. Bonaventura C., Ferruzzi G., Tesh S., Stevens R.D. Effects of S-nitrosation on oxygen binding by normal and sickle cell hemoglobin // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274, № 35. – P. 24742-2478.
13. Chen L.Y., Mehta J.L. Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of

- red blood cells on platelet function // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 1998. – Vol. 32. – P. 57-61.
14. Deliconstantinos G., Villiotou V., Stavrides J.C. et al. Nitric oxide and peroxynitrite production by human erythrocytes: a causative factor of toxic anemia in breast cancer patients. // Anticancer. Res. – 1995. – Vol. 15. – P. 1435-1446.
15. Gross S.S., Lans P. Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – Vol. 96, № 18. – P. 9967-9969.
16. Hlutkin S., Zinchuk V. Effect of melatonin on the blood oxygen transport during hypothermia and rewarming in rats // Ann. Acad. Med. Bialostocensis. – 2008. – Vol. 53, № 2. – P. 234-239.
17. Jubelin B.C., Gierman J.L. Erythrocytes may synthesize their own nitric oxide // Am. J. Hypertens. – 1996. – Vol. 9. – P. 1214-1219.
18. Kang E.S., Ford K., Grokulsky G. et al. Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins // J. Lab. Clin. Med. – 2000. – Vol. 135, № 6. – P. 444-451.
19. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown // Biochim. et Biophys. Acta. – 1999. – № 1411. – P. 273-289.
20. Kleinbongard P., Schulz R., Rassaf T. et al. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase // Blood. – 2006. – Vol. 107, № 7. – P. 2943-2951.
21. Kosaka H., Seiyama A. Physiological role of nitric oxide as an enhancer of oxygen transfer from erythrocytes to tissues // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1996. – Vol. 218, № 3. – P. 749-752.
22. Matarrese P., Straface E., Pietraforte D. et al. Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl protease // FASEB J. – 2005. – Vol. 19, № 3. – P. 416-418.
23. Minetti M., Agati L., Malorni W. The microenvironment can shift erythrocytes from a friendly to a harmful behavior: pathogenetic implications for vascular diseases // Cardiovasc. Res. – 2007. – Vol. 75, № 1. – P. 21-28.
24. Ozyaman B., Grau M., Kelm M., Merx M.W., Kleinbongard P. RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects // Trends. Mol. Med. – 2008. – Vol. 14, № 7. – P. 314-322.
25. Patel R.P., Go Y.M., Maland M.C. et al. Evidence for peroxynitrite as a signaling molecule in flowdependent activation of c-JunNH₂-terminal kinase // Am. J. Physiol. – 1999. – Vol. 277. – P. 1647-1653.
26. Pronko T.P., Zinchuk V.V. Effect of nebivolol on blood oxygen transport indices and endothelial dysfunction in patients with arterial hypertension // Clin. Physiol. Funct. Imaging. – 2009. [Epub ahead of print]
27. Stamler J.S., Jia L., Eu J.P., McMahon T.J. et al. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient // Science. – 1997. – Vol. 276, № 5321. – P. 2034-2037.
28. Stepuro T.L., Zinchuk V.V. Nitric oxide effect on the hemoglobin-oxygen affinity // Journal Physiol. & Pharmacol. – 2006. – Vol. 57, № 1. – P. 29-38.
29. Suhr F., Porten S., Hertrich T. et al. Intensive exercise induces changes of endothelial nitric oxide synthase pattern in human erythrocytes // Nitric Oxide. – 2008. – Vol. 20, № 2. – P. 95-103.
30. Uwe M., Schindler R., Brixius K. et al. Extracorporeal circulation activates endothelial nitric oxide synthase in erythrocytes // Ann. Thorac. Surg. – 2007. – Vol. 84. – P. 2000-2003.
31. Yeh L.H., Alayash A.I. Redox side reactions of haemoglobin and cell signalling mechanisms // J. Intern. Med. – 2003. – Vol. 253, № 5. – P. 518-526.
32. Zinchuk V., Borisiuk V. The effect of NO synthase inhibition on blood oxygen-carrying function during hyperthermia in rats // Respiration Physiology. – 1998. – Vol. 113, № 1. – P. 39-45.
33. Zinchuk V. Effect of NO-synthase inhibition on hemoglobin-oxygen affinity and lipid peroxidation in rabbits during fever // Respiration. – 1999. – Vol. 66, № 5. – P. 448-454.
34. Zinchuk V.V., Dorokhina L.V. Blood oxygen transport in rats under hypothermia combined with modification of the L-arginine-NO pathway // Nitric Oxide. – 2002. – Vol. 6, № 1. – P. 29-34.

Поступила 08.04.09