

ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА ГЕМОГЛОБИНА  
И МОНООКСИДА АЗОТА

© В. В. Зинчук,\* Н. В. Глуткина

Гродненский государственный медицинский университет,  
Беларусь, 230009, Гродно, ул. Горького, 80, \*e-mail: zinchuk@grsmu.by

Анализ литературных данных и собственных результатов исследований указывают, что монооксид азота выполняет роль аллостерического эффектора в отношении гемоглобина, изменяя его сродство к кислороду и определяя состояние кислородтранспортной функции крови. Это имеет важное значение в модификации функциональных свойств гемоглобина и его участия в формировании потока  $O_2$  в ткани, что вносит вклад в развитие дезадаптивных реакций при стрессе и снижении биоактивности NO при дисфункции эндотелия. Представляется возможным обоснование создания новых путей коррекции гипоксических состояний через воздействие на кислородсвязывающие свойства крови и активность L-аргинин-NO системы.

*Ключевые слова:* монооксид азота, гемоглобин, кислород.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 99. № 5. С. 537—554. 2013

V. V. Zinchuk,\* N. V. Glutkina. OXYGEN-BINDING CAPACITIES OF HEMOGLOBIN AND NITRIC OXIDE. Grodno State Medical University, Grodno, 230009, Gorky St., 80, Belarus, \*e-mail: zinchuk@grsmu.by.

The analysis of the literature and our own results indicates that a nitric oxide carries out a role the allosteric effector of hemoglobin, changing its affinity to oxygen and defining a condition of oxygen transport blood function. It is important point for modification of functional properties of hemoglobin and its participation in the flow of oxygen in tissues, which plays an important role in development of disadaptation reactions at stress and decreased bioactivity of the nitric oxide at the endothelial dysfunction. These findings give possibility to create the new ways to correct hypoxical conditions through influence on oxygen—binding properties of the blood and activity of L-arginin-NO system.

*Key words:* the nitric oxide, hemoglobin, oxygen.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 99. N 5. P. 537—554. 2013

Гемоглобин (типовой аллостерический белок), формируя кислородсвязывающие свойства крови, в значительной степени определяет диффузию кислорода из альвеолярного воздуха в кровь, а затем на уровне капилляров в ткань. S-образная форма кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО) в обычных условиях обеспечивает процессы транспорта кислорода кровью, облегчая ее максимальную оксигенацию при относительно низких  $pO_2$  и деоксигенацию при относительно высоких  $pO_2$ , улучшая доставку требуемых количеств  $O_2$  в ткани при сравнительно

малых величинах кровотока. Ее положение характеризуется показателем  $p50$  ( $pO_2$ , соответствующее 50%-ному насыщению гемоглобина кислородом).

В последние годы проблема изучения физиологических эффектов монооксида азота (NO) приобрела новый аспект, а именно его взаимодействие с различными компонентами крови, в частности с гемоглобином. В литературе широко обсуждались различные стороны этого вопроса, что получило отражение в ряде публикаций [24—26, 31, 41, 43, 46, 53, 67 72—74]. На определенном этапе взаимодействию NO и гемоглобина не придавалось должного значения. Так, в широко известной классической монографии Л. И. Иржака [13] указывалось, что «имеются лиганды, по отношению к которым гемоглобин проявляет значительно более высокое сродство, чем к кислороду. К ним относятся CO и NO. Последний представляет главным образом теоретический интерес, тогда как действие CO имеет большое физиологическое значение». Гемоглобин связывает и высвобождает не только  $O_2$ ,  $CO_2$ , но и NO, для которого с каждым годом возрастает количество выявленных разнообразных физиологических ответов (вазодилатация, нейротрансмиссия, иммунная защита и др.).

### МОНООКСИД АЗОТА И КРОВЬ

NO образуется из аминокислоты L-аргинина и молекулы  $O_2$  под действием фермента NO-синтазы в присутствии НАДФН, кальмодулина и других кофакторов (L-аргинин-NO система). Кроме того, выявлен метаболический цикл NO с нитритредуктазным компонентом, происходящий в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме клеток и заключающийся в восстановлении нитрит-анионов до NO [18]. Существуют определенные механизмы, обеспечивающие модуляцию NO-редокс-чувствительных сигнальных путей, а именно образование NO-производных гемоглобина, наличие гидрофобной клеточной мембраны эритроцита (как барьера для диффузии), существование вокруг эритроцита плазменной зоны.

Газотранспортная функция крови проявляется в переносе не только  $O_2$ ,  $CO_2$ , но и NO. Причем если первые диффундируют как в эритроцит, так и из него, то NO преимущественно в данную клетку. Он диффундирует в просвет сосудов и мгновенно реагирует с  $HbO_2$  (скорость реакции  $\sim 10^7$  моль/с) с образованием метгемоглобина и  $NO_2^-$ . Однако в сохранении биоактивности NO и с учетом низкой концентрации свободного гемоглобина имеют важное значение эритроциты, через мембрану которых он транспортируется, образуя при взаимодействии с гемоглобином ряд его производных. Диффузионный барьер эритроцитарной мембраны является важным фактором, определяющим деградацию NO.

Обсуждается вопрос об альтернативных источниках образования NO в крови. Учитывая сложную природу его участия 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  $NO_2^-/NO_3^-$ . В 2006 г. P. Kleinbongard и соавт. [55] выявили в эритроцитах особые протеины, расположенные на внутренней стороне плазматической мембраны и обладающие NO-синтазной активностью, сопоставимой с аналогичным ферментом в эндотелиальных клетках. Показано, что NO-синтаза в эритроцитах локализуется только на внутренней стороне мембраны и обеспечивает существенные регуляторные функции для эндотелия и крови. 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), при этом по высвобождению NO-родственных интермедиатов в окружающую плазму (оцениваемую по хемилюминесцен-

ции) —  $5.9 \pm 0.8$ , а при стимуляции L-аргинином —  $12.4 \pm 3.5$  пмоль/мл · мин [55]. Интенсивные физические упражнения значительно снижают активность NO-синтазы в эритроцитах, что важно для формирования реологических свойств, кислородтранспортной функции крови [78]. Наблюдается значительное увеличение активности эритроцитарной NO-синтазы при повышении напряжения сдвига до 0.1 Па/мин [80]. Выявлен рост экспрессии NO-синтазы эндотелиального типа в эритроцитах человека при экстракорпоральной циркуляции, оцениваемой по содержанию соответствующих антител, активность этого фермента коррелировала со временем внешней перфузии [81]. Инкубация крови в течение 30 мин с росува-статином (20 нг/мл) приводила к повышению активности эритроцитарной NO-синтазы (с  $3.76 \pm 2.98$  до  $24.88 \pm 4.35$ ,  $p < 0.02$  усл. ед.), концентрации нитритов в плазме (с  $55.8 \pm 7.9$  до  $98.2 \pm 12.4$  ммоль/л) и улучшению деформируемости эритроцитов, а ингибитор NO-синтазы (N<sup>G</sup>-мометил-L-аргинин) подавлял данный эффект [58]. Предполагается следующий регуляторный механизм образования эритроцитарного NO: данная NO-синтаза связывается с кальвеолой-1 в цитоплазме и транспортируется в везикулах к мембране, где располагается в липидном слое в неактивном состоянии, затем напряжение сдвига инициирует фосфорилирование этого белка при росте концентрации Ca<sup>2+</sup>, что вместе с белками теплового шока активирует этот фермент и приводит к образованию NO [67].

В сосудистой системе существуют достаточно значимые соотношения NO к гемоглобину (1 к 100 и даже более), а в таких ее отделах, как артериолы и капилляры, его концентрация гораздо выше, чем в крови, содержащейся в более крупных сосудах. Данный факт можно объяснить существующими различиями NO-синтазной активности эндотелия на протяжении сосудистой системы, которая в артериолах максимальна, а в венах значительно снижена. Кроме того, соотношение объема крови, проходящей на терминальные артериолы и капилляры, к площади поверхности данного отдела сосудистого русла наименьшее. Это позволяет предположить, что количество молекул гемоглобина, взаимодействующих с NO, в микроциркуляторном русле будет большей, чем в остальных отделах сосудистой системы [6, 89]. Относительный вклад эндотелия и различных эритроцитарных источников NO в его общую доступность изменяется вдоль сосудистого дерева, что отражает влияние этих источников на макро- и микроциркуляцию [54]. Изменение концентрации NO<sub>2</sub> в плазме после стимуляции цельной крови L-аргинином зависит от ее дозы в физиологической области, что указывает на возможность жесткого контроля активности NO-синтазы в эритроцитах доступностью субстрата [55]. Эритроциты, секвестрируя NO в терминальных артериолах и капиллярах, уменьшают его участие в вазодилатации и тем самым участвуют в реализации кислородтранспортной функции крови. Регуляторные механизмы эритроцитарной NO-синтазной активности могут быть мишенью различных терапевтических воздействий, обуславливая адекватную деформацию либо дезорганизацию плазматической мембраны [67].

#### ЭФФЕКТ МОНООКСИДА АЗОТА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ

Предполагается, что образование NO в эритроцитах (в эквивалентных дозах) может изменять их функциональные свойства. В опытах по инкубированию образцов крови с L-аргинином наблюдалось уменьшение вязкости крови при высоких скоростях сдвига [84]. Выявлена взаимосвязь между содержанием NO в эритроцитах и их гемореологическими свойствами, проявляющаяся, в частности, в ухудшении деформируемости эритроцитов при увеличении концентрации NO, стимулированного ацетилхолином [30]. Деформируемость эритроцитов определяется не только непрерывным образованием NO, но и родственными NO-интермедиатами, находящимися внутри мембраны (в присутствии L-аргинина в концент-

рации 3 ммоль/л упругоэластические свойства красных клеток крови улучшаются, а при добавлении N<sup>G</sup>-нитро-L-аргинина и оксигемоглобина — ухудшаются [55]. При сепсисе рост системной выработки NO сопровождается снижением деформируемости эритроцитов, но введение при этом селективного ингибитора индуцибельной изоформы NO-синтазы (аминогуанидина) предотвращает ухудшение деформируемых свойств этих клеток, что может быть обусловлено как прямым взаимодействием NO с элементами цитоскелета, так и действием пероксинитрита, окисляющего мембранные белки [27]. 30-минутная инкубация крови с метиловым эфиром N<sup>G</sup>-нитро-L-аргинина и асимметричным диметиларгинином характеризуется ухудшением деформируемости эритроцитов, судя по увеличению времени их прохождения через фильтр, в то время как доноры NO существенно не влияли на этот параметр, но в присутствии асимметричного диметиларгинина (10<sup>-5</sup> моль) снижали его [56]. Инкубация крови со спермин-NONO уменьшает деформируемость эритроцитов и р50 (в зависимости от концентрации NO, не влияя на активность перекисного окисления липидов) [64].

Наблюдаемое ухудшение деформируемости эритроцитов, определяемое эктацитометрическим методом, при длительном хранении крови (4 недели) обусловлено уменьшением содержания NO-производных гемоглобина [28]. Добавление нитроглицерина к эритроцитарной суспензии, обогащенной ретикулоцитами, в течение 2 ч в анаэробных условиях (в концентрации от 0.1 до 1.5 мкмоль) увеличивает содержание нитритов, пероксинитрита, продуктов перекисного окисления липидов, что не наблюдается в обычных эритроцитах, и предполагает биотрансформацию нитроглицерина в крови через механизмы генерации активных форм азота и в меньшей степени трансформации гемоглобина [61]. Инкубация нитропруссидом натрия (10<sup>-6</sup> моль) с образцами оксигенированной и деоксигенированной крови приводит к увеличению деформируемости эритроцитов, и отсутствие этого эффекта при добавлении неспецифического ингибитора NO-синтазы метилового эфира N<sup>G</sup>-нитро-L-аргинина предполагает вклад NO в регуляцию механических свойств эритроцитов через различные механизмы его образования [82]. 30-минутная инкубация эритроцитарной суспензии с фибриногеном (в диапазоне концентраций 150—400 мг/дл) при комнатной температуре приводит к увеличению концентрации NO (определяемого амперметрическим методом), нитритов и S-нитрозоглутатиона [32]. Показано, что в присутствии доноров NO (нитропруссид натрия, S-нитрозоглутатиона и динитрозильного комплекса железа с глутатионом) происходит замедление детергент-индуцированного гемолиза эритроцитов и снижение модуля их упругости, изменение упругих свойств тромбоцитов (с помощью атомно-силовой микроскопии), что свидетельствует о регуляции донорами NO структурно-функциональных свойств данных клеток крови [22].

NO и его производные влияют на метаболизм эритроцитов, в том числе на синтез и утилизацию АТФ, а именно оказывают эффект на энергетический процесс через рост активности гликолитических ферментов, но без изменения содержания АТФ, отражая сокращение времени его круговорота при максимальных дозах используемых доноров и указывая на стимуляцию потребляющих этот макроэрг процессов на уровне красных элементов крови [60]. В этом аспекте важно отметить, что эритроциты через способность высвобождать АТФ в ответ на физиологические стимулы (механическая деформация) могут влиять на синтез и высвобождение NO, регулируя тем самым величину сосудистого сопротивления [66]. Данный механизм реализуется через рецепторно-опосредованную активацию гетеротримерного Gs-белка. У больных с хронической сердечной недостаточностью обнаружено увеличение микровязкости плазматической мембраны эритроцитов в области локализации полярных групп липидов, уменьшение содержания оксигемоглобина, вызванное снижением лигандов на гемопорфирине и увеличением числа комплексов Hb-NO, изменение характера связывания NO с этим протеидом: на фоне увеличения связывания NO с гемопорфирином уменьшается число комплексов Hb-NO, облегчающих выделение O<sub>2</sub> [16]. Механиче-

ский стресс усиливает генерацию NO в эритроцитах. Так, отмечается рост NO в эритроцитарной суспензии после прохождения через фильтр с диаметром пор 5 мкм, это увеличение содержания NO зависит от концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и величины оксигенации [79].

Эффект NO зависит от условий среды и степени окислительного стресса: если повышенное образование NO уравнивается умеренным ростом кислородных радикалов, то он оказывает защитный эффект и, наоборот, при чрезмерном образовании радикалов по отношению к нему наблюдаются повреждающие эффекты. Под влиянием ингибитора NO-синтазы (метиловый эфир  $\text{N}^G$ -нитро-L-аргинина) в эритроцитах детей с астматическим бронхитом и церебральным параличом содержание оснований Шиффа увеличивалось почти в два раза [2]. Донор NO (изокет) при электромагнитном излучении терагерцового диапазона на частотах молекулярного спектра излучения и поглощения NO 240 Гц оказывает более выраженный нормализующий эффект на вязкостные свойства крови больных с нестабильной стенокардией (при высоких скоростях сдвига 300, 200 и 150  $\text{c}^{-1}$  эта разница составляла 15.6%, а при малых — 14.4%) и деформируемость эритроцитов (1.067 усл. ед. по сравнению с контролем 1.03 усл. ед.,  $p = 0.000003$ ), что может быть связано с увеличением образования молекул NO из этого вещества [14]. Эритроциты участвуют в контроле регионарной перфузии через уменьшение циркулирующих метаболитов NO, S-нитрозогемоглобина (SNO-Hb) и высвобождения АТФ из эритроцитов [37]. Важно отметить, что нарушения гемореологических параметров часто наблюдается у больных с коронарной недостаточностью при полиморфизме гена эндотелиальной NO-синтазы Glu(298)Asp [29]. NO в значительной степени определяет различные функции эритроцитов, что позволяет рассматривать их как мишень для терапии ряда заболеваний.

#### NO-ПРОИЗВОДНЫЕ ГЕМОГЛОБИНА

Гемоглобин связывает и высвобождает не только  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$ , но и NO, который привлекает большой интерес не только как вырабатываемый эндотелием релаксирующий фактор, но и как гораздо более многофункциональная молекула, инициирующая различные физиологические процессы. Эритроциты содержат высокую концентрацию гемоглобина, который быстро захватывает NO и окисляет его в физиологически активные и неактивные метаболиты ( $\text{NO}_3^-$  и другие). В эритроцитах протекают нитрозирующие реакции, ведущие к образованию с NO различных соединений, обладающих широким спектром физиологического и патологического действия.

В результате взаимодействия NO и гемоглобина происходит образование его различных форм, которые играют роль своеобразного аллостерического регулятора функциональной активности данного протеина на уровне отдельных его тетрамеров и в целом всей его популяции. Реакция NO с гемоглобином через высокоаффинные  $\text{Fe}^{2+}$ -связывающие участки на геме образует нитрозилгемоглобин ( $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ ), в то время как с оксигемоглобином продуцируется метгемоглобин и нитрат. Перестройка третичной структуры гемоглобина и модификация железопорфирина, вызванные присоединением NO, обуславливают конформационные изменения апобелка в областях ближайшего белкового окружения гема и субъединичных контактов, ослабление кооперативных взаимодействий в тетрамерах. Эти изменения характеристик смесей гемопротеидов позволяют предположить, что молекулы оксигемоглобина и  $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$  вступают в определенные взаимодействия, результатом которых является формирование комплекса с низким сродством к кислороду [1].

Связывание NO влияет на аллостерическую конформацию гемоглобина, стабилизируя Т-состояние, что ведет к снижению его сродства к  $\text{O}_2$  и усилению доставки кислорода в ткани. Так как *in vivo* гемоглобин обычно насыщен кисло-

родом не на 100% (обычно заняты 3 гема из 4), связывание NO на вакантном гемовом участке не влияет непосредственно на его способность переносить кислород. В организме NO фактически находится в равновесии с более стабильными нитроксидными формами, взаимопревращения которых регулируются химическими факторами и специфическими ферментами, в том числе гемоглобином [74].

Также NO может связываться в глобиновой цепи гемоглобина с  $\beta^{93}$ -цистеином, образуя SNO-Hb, который в больших концентрациях индуцирует существенную модификацию функциональной активности данного гемопротейна. SNO-Hb находится в равновесии с  $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ , доля которого определяется присутствием различных гомо- и гетеротропных регуляторов. Он может образовываться путем восстановительного нитрозилирования или переноса с гема на тиол, а  $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$  — в результате реакции присоединения, дающей стабильный  $\alpha\text{-FeNO}$  либо  $\text{Fe}^{3+}$ -гем и анион  $\text{NO}_3^-$ , который может действовать как вазодилатор. SNO-Hb может высвобождать NO на анионообменном белке-1 в мембране или непосредственно в окружающую плазму. Данный белок может доставлять NO в плазму, возможно, на глутатион или альбумин, или непосредственно в эндотелий. Доставка эквивалентов NO в стенки сосудов может происходить непосредственно или через рецепторы S-нитрозотиолов. Реакция нитрита с гемоглобином динамично влияет на аллостерическое равновесие между его R- и T-состояниями, что в свою очередь увеличивает его нитритредуктазную активность [49]. Ингаляция NO увеличивает наряду с нитрат/нитритами содержание S-нитрозогемоглобина, в то время как концентрация нитрозилгемоглобина не меняется [47]. Кислородсвязывающие свойства крови определяются содержанием различных типов гемоглобина, в частности связанных с NO, соответственно метгемоглобин и SNO-Hb оказывают левосторонний эффект, а  $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$  — правосторонний на положение КДО.

#### СОДЕРЖАНИЕ NO-ПРОИЗВОДНЫХ ГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ

Концентрация NO колеблется в широком пределе от наномолей до нескольких сотен мкмоль в тканях мозга, сердце, других органах и культуре эндотелиальных клеток, что определяется различиями в функциональном состоянии этих тканей и особенностью методов определения NO: прямое (электрохимическое) и непрямое (флюоресцентное, биосенсорное) измерение. В организме человека в состоянии покоя в плазме крови, по данным A. Dejam и соавт. [33], содержание  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  составляет 0.15—0.20 и  $14.4 \pm 1.7$  мкмоль/л соответственно, хотя в некоторых работах указываются и более высокие значения этих показателей (для  $\text{NO}_2^-$  0.1—0.5 и для  $\text{NO}_3^-$  20—50 мкмоль/л) [59]. Уровень нитритов внутри эритроцита выше (более чем в 2 раза), чем в плазме [83].

Вопрос о количестве NO-производных гемоглобина в циркулирующей крови дискутируется. В организме концентрации гемоглобина и  $\text{O}_2$  обычно находятся в миллимолярной, а NO — в наномолярной области. Но возможное содержание последнего в микроциркуляторной области выше [74]. Концентрация SNO-Hb в эритроцитах колеблется от 0.01 до 5 мкмоль/л [36, 51]. По данным T. J. McMahon и соавт. [63], уровни эндогенного SNO-Hb у людей составляют примерно 2—5 мкмоль/л, измеренного путем вызываемого  $\text{HgCl}_2$  расщепления связи S-NO с последующим спектрофотометрическим обнаружением производных NO или путем фотолиза в потоке ультрафиолетовых лучей с обнаружением высвободившегося NO методом хемилюминесценции в газовой фазе при предварительной обработке  $\text{HgCl}_2$ . Ряд других исследователей приводит несколько меньшие значения эндогенного SNO-Hb в эритроцитах (500 нмоль/л и ниже), оцениваемого методом хемилюминесценции [43]. E. Bennett-Guerrero и соавт. [28] определили в эритроцитарной суспензии содержание SNOHb  $6.5 \cdot 10^{-4}$  моль/Hb (т. е.

1 SNOHb на 1.527 тетраметр гемоглобина), которое снижалось через 3 ч до  $1.5 \cdot 10^{-4}$  моль/гемоглобин (1 SNOHb на 7.915 гемоглобин тетраметр). Содержание SNOHb в венозной крови составляло  $0.69 \cdot 10^{-3}$  на тетраметр гемоглобина и уменьшалось на 85—95% в течение первых 7 дней хранения, а затем повышалось на 7—21-е сутки, а ренинтрозилирование (путем насыщения раствором NO) увеличивало его содержание почти в 10 раз, количество в артериальной крови было выше, чем в венозной [71]. SNO-Hb по своей концентрации значительно различается между артериальной и венозной кровью, что предполагает циклический метаболизм SNO-Hb при его циркуляции в организме.

Судя по ЭПР-исследованиям, эндогенные уровни нитрозилированного гемоглобина в крови в целом составляют примерно 0.2 у людей, 0.6 у крыс и 0.4—0.5 у мышей мкмоль/л [35, 48, 69]. По данным В. Datta и соавт. [31], содержание HbFe<sup>2+</sup>NO составляет в диапазоне от 2.1 до 9.0 мкмоль/л в цельной крови. Методом ЭПР анализа определялся уровень HbFe<sup>2+</sup>NO около 200 нмоль/л в артериальной и венозной крови и его рост до 0.5—2.5 мкмоль/л при ингаляции NO (80%) с периодом полувыведения 40 мин [69]. J. Jiang и соавт. [50] измерили уровень HbFe<sup>2+</sup>NO в диапазоне 10—50 мкмоль/л, линейно возрастающий с увеличением оксигемоглобина. Эти авторы не отмечали различий в его содержании в артериальной и венозной крови, хотя в последней 5-координатного HbFe<sup>2+</sup>NO было больше. Длительное введение метилового эфира N<sup>G</sup>-нитро-L-аргинина в течение 8 недель пер ор гипертензивным крысам приводило к снижению уровня HbFe<sup>2+</sup>NO с  $38.8 \pm 8.9$  до  $6.0 \pm 31$  усл. ед. [52]. У жителей Тибета наблюдалось 10-кратное увеличение содержания биоактивных NO продуктов в плазме и эритроцитах: концентрация NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> в плазме  $234 \pm 31$  и  $158 \pm 13$  мкмоль/л у мужчин и женщин соответственно по сравнению с контролем  $23 \pm 4$  и  $30 \pm 4$  мкмоль/л ( $p < 0.001$ ), а HbFe<sup>2+</sup>NO  $0.18 \pm 0.05$  и  $0.03 \pm 0.1$  ( $p = 0.03$ ) соответственно [39]. Кроме сдвига от парамагнитного пентакоординатного α-HbFe<sup>2+</sup>NO к гексакоординатному α-HbFe<sup>2+</sup>NO (переход из дезоксиподобного T-состояния в оксиподобное R-) никаких значимых изменений его концентрации в артерио-венозном цикле крыс, обработанных донором NO, или людей после вдыхания NO не наблюдалось, что не согласуется с предполагаемым переносом NO внутри гемоглобина от нитрозилированных гемов на β93-цистеин после реоксигенации [35, 48]. По данным М. А. Morgan и соавт. [65], уровень нитритов в плазме и эритроцитах артериальной крови выше, чем в венозной, а для нитрозогемоглобина у здоровых особей наоборот. Следует отметить, что при сепсисе эти различия имеют противоположный характер. Содержание различных NO-производных важно для обеспечения различных функций крови и в целом организме.

#### ЗНАЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОНООКСИДА АЗОТА С ГЕМОГЛОБИНОМ

Разнообразные эффекты NO реализуются в условиях высокого содержания гемоглобина в крови. Существует парадокс: быстрая инактивация NO на внутрисосудистой стороне эндотелиальной клетки, казалось бы, должна предотвращать достижение его функциональной концентрации на противоположной стороне, где гладкомышечные клетки сосудов осуществляют опосредуемую им вазодилатацию, но существуют физиологические барьеры, ограничивающие, но не исключающие взаимодействие NO с гемоглобином и активным сохранением его биоактивности [74]. Нитриты являются потенциальным региональным и системным вазодилататором, участвуя в реакциях с дезоксигемоглобином. Взаимодействие NO с гемоглобином ставит вопрос о паракринной и аутокринной функции NO. Транспортировка NO в организме проявляется при физиологических условиях, но еще в большей мере реализуется при высоких его уровнях [72]. Предполагается, что реакция гемоглобина с NO служит не только для его гашения, но и для

сохранения его биоактивности. S-нитрозотиолы участвуют в регуляции функционирования системы дыхания, влияя на активность респираторного центра, легочную микроциркуляцию, сосудистый тонус легочных сосудов, констрикцию/дилатацию бронхоиол, антимикробный эффект и др. Серповидноклеточные эритроциты имеют недостаточную биоактивность NO за счет повышенных уровней окисленных мембранных тиолов, ингибирующих перенос NO трансмембранным анионообменным белком-1 и не способствующих образованию SNO-Hb и HbFe<sup>2+</sup>NO [68]. Нитрит-индуцированное улучшение микроциркуляции связано с увеличением пула NO-производных в эритроцитах (почти в 40 раз) и высвобождением NO в T-конформации гемоглобина.

Показано участие гемоглобина в регуляции активности NO в сосудах [76]. Предполагается, что NO транспортируется гемоглобином в качестве третьего дыхательного газа и вызывает вазодилатацию по взаимосвязанному с кислородом аллостерическому механизму [44]. Гемоглобин способен вне эритроцита вызывать вырабатываемый эндотелием NO в 800 раз быстрее, чем внутри эритроцитов, что может привести к вазоконстрикции, снижению кровотока, активации агрегации тромбоцитов и в конечном итоге повреждению органов [57]. Дезоксигемоглобин восстанавливает NO<sub>2</sub><sup>-</sup> в NO и расширяет сосуды в циркуляторном русле людей в соответствии с физиологическими градиентами кислорода [42]. Теория сосудистого «сохранения» SNO-Hb и его транспорта привлекательна, так как сигнальное действие NO в этом регионе достаточно кратковременно ввиду быстрой реакции NO с гемовой группой гемоглобина и его высокой концентрацией. Наличие (высокая концентрация гема в цельной крови) высокоаффинной «ловушки» NO существенно уменьшает его диффузионное расстояние и, таким образом, ограничивает вазодилатацию. В присутствии HbFe<sup>2+</sup>NO, очевидно, происходят изменения пространственного расположения отдельных фрагментов полипептидных цепей в области гемового кармана, что облегчает доступ лиганда к активному центру молекулы. Эта форма гемоглобина играет в данном процессе роль своеобразного аллостерического регулятора функциональной активности исследуемого гембелка на уровне отдельных тетрамеров [1]. Установлено, что у больных хронической сердечной недостаточностью снижается число комплексов гемоглобин-лиганд, увеличивается содержание комплексов I Hb-NO (I<sub>1618</sub>/I<sub>1580</sub>) и уменьшается содержание комплексов II Hb-NO (I<sub>1618</sub>/I<sub>1580</sub>), содержание оксигемоглобина падает, поскольку понижено связывание лигандов и, кроме того, увеличено число комплексов гемоглобина с NO, конкурирующим с O<sub>2</sub> за связывание на атоме Fe<sup>2+</sup> порфирина. В связи с ухудшением связывания O<sub>2</sub> на гемопорфирине и конкуренции его с NO снижается эффективность его доставки [16]. Гемоглобин в эритроцитах действует как аллостерически контролируемый носитель доставки NO.

Тиол-NO дериваты гемоглобина (SNO-Hb) являются важным механизмом сохранения биоактивности NO и его транспортировки эритроцитами, обеспечивая действие NO как гормона. Аллостерические переходы гемоглобина в эритроците в сосуде регулируют биоактивность NO. Данный гемопротеид ощущает O<sub>2</sub> и отвечает путем управляемого связывания, образования и высвобождения NO-групп. При высоком pO<sub>2</sub> венозной системы легких гемоглобин находится в R-состоянии, активный остаток β93-цистеин защищен в гидрофобном кармане β-гемов, а при дезоксигенации в периферической циркуляции приобретает T-структуру, таким образом аллостерические переходы контролируют активность β93-цистеина. В T-состоянии часть гемоглобина реагирует с NO, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> и/или низкомолекулярными S-нитрозотиолами, образуя HbFe<sup>2+</sup>NO. Переход в R-состояния влечет за собой реакцию нитрозилирования между NO-гемом и β93-цистеином, что ведет к образованию ковалентно связанного SNO-цистеина. Гемоглобин после частичной дезоксигенации приобретает T-конформацию, β93-цистеин легко реагирует с S-нитрозотиол-мишенями, инициируя каскад транснаитрозилирований, ведя к образованию S-нитрозотиолов вне эритроцитов, ко-



торые в качестве вазодилаторов столь же активны, как и NO, и имеют независимые от NO функции (эритроциты действуют как датчики O<sub>2</sub> для точной регуляции его доставки) [74]. S-нитрозотиолы эритроцитов обеспечивают гипоксическую вазодилатацию через O<sub>2</sub>-зависимый механизм перехода гемоглобина из R/T-конформации и последующего высвобождения NO [34]. Истощение уровня SNOHb в крови при ее хранении и как следствие падение NO биоактивности крови может быть причиной отсутствия положительного эффекта от проводимой гемотрансфузии при возникающей гипоксии при анемиях [71]. Стимулирование синтеза NO при гипоксии важно для развития адаптационной защиты сердечно-сосудистой системы. С одной стороны, повышенная продукция NO компенсирует абсолютный и относительный дефицит NO, вызванный активацией свободнорадикальных процессов и нарушением активности эндотелиальной NO-синтазы, с другой — предварительное умеренное повышение уровня NO ограничивает гиперпродукцию NO по механизму отрицательной обратной связи, благодаря чему адаптивное усиление его синтеза оказывает благоприятное действие не только при его дефиците, но и при гиперпродукции [17]. В то же время подавление эритроцитарной NO-синтазной активности может обеспечить благоприятный эффект при такой патологии, как сепсис, сопровождающийся гиперпродукцией NO [67].

Скорость реакции между нитритом и гемоглобином зависит от его насыщения кислородом, наибольшая ее скорость наблюдается при рO<sub>2</sub>, соответствующем значению р50, что регулирует экспорт NO от эритроцитов [83]. В нитрит-индуцированной вазодилатации важное значение отводится взаимодействию NO с кровью, реализуемое через следующие механизмы: транспортные процессы через эритроцитарную мембрану, взаимодействие непосредственно с гемоглобином, выход NO из красных клеток крови и индукция вазодилатации [49]. Молекулярные механизмы гипоксической вазодилатации реализуются через образование SNO-Hb, функционирования гемопротеина в роли нитрит-редуктазы, конверсии NO<sub>2</sub><sup>-</sup> в NO в эритроцитах при участии ксантиоксида-редуктазы и эндотелиальной изоформы NO-синтазы [85]. Аллостерическая регуляция насыщения гемоглобина O<sub>2</sub> участвует в изменении биоактивности NO (через образование SNO-Hb, S-нитрозотиолов и др.), что имеет очень важное значение для формирования газотранспортной функции крови и регуляции регионарного кровотока через механизм гипоксической вазодилатации, что фактически является основой новой парадигмы коррекции различных форм гипоксий [24].

#### ЭФФЕКТ МОНООКСИДА АЗОТА НА КИСЛОРОДТРАНСПОРТНУЮ ФУНКЦИЮ КРОВИ

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 (L-аргинин, селективные и неселективные ингибиторы NO-синтазы, доноры NO). Данная система вовлечена в ответ на действие липополисахарида, обуславливая сдвиг КДО вправо [6]. Введение ингибитора NO-синтазы (N<sup>G</sup>-нитро-L-аргинин) при лихорадке, индуцированной введением липополисахарида, через 120 мин сопровождалось увеличением р50<sub>станд</sub> с 33.7 ± 1.1 до 37.1 ± 1.3 мм рт. ст., что, в частности, обусловлено различными эффектами NO-производных на сродство гемоглобина к кислороду (СГК) [7]. Введение в организм крыс метилового эфира N<sup>G</sup>-нитро-L-аргинина значительно снижает устойчивость животных к действию высокой внешней температуры и сдвигает КДО вправо (значение р50<sub>реал</sub> составило 42.3 ± 1.2, в то время как в контроле 34.9 ± 0.7 мм рт. ст.; *p* < 0.01) [87]. У животных, получавших L-аргинин и подвер-

гавшихся охлаждению, отмечается наименьший сдвиг КДО влево [88]. Введение нитроглицерина крысам приводит к увеличению концентрации метгемоглобина на 217.1% и  $p50$  на 29.2%, а в условиях введения липополисахарида и этого донора NO приведенные показатели увеличивались [7]. Потенцирования этих эффектов при одновременной коррекции SGK (посредством использования цианата натрия) и L-аргинин-NO системы не происходит, что отражает, по-видимому, истощение адаптационных резервов, реализуемых через NO-зависимые механизмы формирования кислородсвязующих свойств гемоглобина [5]. Коррекция окислительного стресса путем введения метилового эфира  $N^G$ -нитро-L-аргинина и L-аргинина существенно не влияет на данный характер изменения SGK, в то время как селективный ингибитор индуцибельной изоформы NO-синтазы (L-лизин- $N^G$ -ацетамидин) снижает  $p50_{\text{станд}}$  на 8.6 % ( $p < 0.02$ ), а  $p50_{\text{реал}}$  уменьшает на 10.6 % ( $p < 0.001$ ) и соответственно КДО сдвигалась влево [4].

Введение эритропоэтина и мелатонина крысам, подвергавшимся холодовому воздействию и последующему отогреванию, смещает положение КДО вправо, механизм которого, судя по приросту концентрации нитрат/нитритов, имеют NO-зависимую природу [8, 45]. Воздействие эритропоэтином у мышей в течение 14 суток приводит к увеличению содержания ретикулоцитов, эритроцитов, но у трансгенных животных (с дефицитом эндотелиальной NO-синтазы) этот эффект отсутствовал [38]. Приведенные данные предполагают существование механизма формирования кислородсвязующих свойств крови с участием NO, реализуемого, очевидно, на эритроцитах.

L-аргинин-NO система участвует в патогенезе реперфузионных повреждений печени: инфузия L-аргинина уменьшает нарушения прооксидантно-антиоксидантного состояния и тяжесть реперфузионных повреждений органа, ингибирование NO-синтазы приводит к увеличению активности свободнорадикальных процессов и срыву механизмов антиоксидантной защиты, а также к усугублению повреждений печени при данной патологии [21]. Через данный механизм также осуществляется влияние 1-метилникотинамида на параметры прооксидантно-антиоксидантного баланса у крыс при ишемии-реперфузии печени [21]. Выявленные изменения кислородтранспортной функции крови, прооксидантно-антиоксидантного состояния печени при ишемии-реперфузии отражают кислород-зависимый механизм патогенеза повреждений органа и предполагают, что путем целенаправленного воздействия на кислородное обеспечение и L-аргинин-NO систему можно ослабить повреждающее действие реоксигенации на печень [12].

Вклад NO во внутритроцитарные механизмы регуляции кислородсвязывающих свойств крови изучался при различных концентрационных отношениях в опытах *in vitro*. При инкубации крови с нитрозоцистеином и в условиях оксигенации значение  $p50$  стандартного было ниже на  $3.9 \pm 0.7$  мм рт. ст. ( $p < 0.05$ ), а  $p50$  реального на  $3.4 \pm 0.9$  мм рт. ст. ( $p < 0.05$ ), что приводит к левостороннему сдвигу КДО и может быть обусловлено не только присутствием метгемоглобина [77]. Возможно, наблюдаемые сдвиги КДО влево в эксперименте с предшествующей оксигенацией (NO/гемоглобин-1/2) обусловлены не только присутствием окисленной формы гемоглобина, но и нитрозилированной по 93-му остатку цистеина в  $\beta$ -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 доноров NO на SGK определяется условиями оксигенированности крови и соотношением выделяющегося из донора NO и гемоглобина в крови, что особенно наглядно видно в опытах с дезоксигенацией. Уменьшение соотношения NO/гемоглобин до величины 1/4 в условиях предшествующей дезоксигенации вызывает левосторонний сдвиг КДО на фоне отсутствия 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.

Применение тиотриазолина в комплексном лечении острого панкреатита снижает проявления гипоксии и ацидоза за счет изменения кислородсвязывающих свойств крови и устранения дисбаланса L-аргинин-NO системы: отмечается значительное смещение КДО влево на 5-е сутки и смещение КДО на 10-е сутки вправо по отношению к положению КДО в группе крыс со стандартным лечением [15], снижение проявлений метаболического ацидоза у пациентов на 5-е сутки и их полная компенсация к 10-м суткам, устранение гипоксии к 10-м суткам; снижение концентрации нитрат/нитритов по сравнению с группой без применения тиотриазолина на 16.2% ( $p < 0.01$ ) к 5-м суткам и 16.9% ( $p < 0.001$ ) к 10-м суткам) [3].

У больных стенокардией при лечении нитросорбидом наблюдалось уменьшение  $p50_{\text{станд}}$  и соответственно сдвиг КДО влево, что обусловлено повышением компенсаторных возможностей гемодинамики [9]. Изучение показателей кислородтранспортной функции крови и дисфункции эндотелия у больных ишемической болезнью сердца при стабильной стенокардии напряжения I и II функциональных классов, протекавшей с артериальной гипертензией II степени и без нее в условиях NO-зависимой терапии, выявило снижение содержания нитратов/нитритов в плазме крови, показателя СГК у исследуемых и их рост после проведенной терапии [23]. У больных артериальной гипертензией III степени 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 СГК [70]. В опытах *in vitro* небиволол увеличивал значения  $p50$  при реальных значениях pH и  $pCO_2$  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 его величину 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 возрастал при росте концентрации препарата [10]. Очевидно, изменения СГК 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.

#### ПЕРОКСИНИТРИТ И СРОДСТВО ГЕМОГЛОБИНА К КИСЛОРОДУ

NO взаимодействует с  $O_2$  с образованием пероксинитрита, который может быть не только сильным окислителем, повреждающим различные биомолекулы, но и модификатором свойств эритроцитарной мембраны и гемоглобина через различные реакции. Пероксинитрит способен воздействовать на эритроциты двумя путями: через окисление гемоглобина и нитрования тирозина эритроцитарной полосы 3. В эритроцитах, подвергшихся действию пероксинитрита в концентрации, не приводящей к существенным изменениям его формы, выявлены (методом атомно-силовой микроскопии) изменения микро- и макрообласти с аномальной структурой мембранной поверхности, что свидетельствует об увеличении неоднородности ее механических свойств при действии этого фактора, и может лежать в основе изменения транспортных функций [19]. При высоких концентрациях пероксинитрит вызывает полимеризацию спектрина, нарушает присущую эритроцитарной мембране асимметрию распределения липидов, пространственное распределение гликофорина и анионного обменника (AE1), в результате чего происходят нарушения ее структуры и как следствие изменение формы эритроцита (дискоциты трансформируются в основном в акантоциты, а также в «пузыр-

чатые» клетки) [62]. Пероксинитрит влияет на механизмы транспортных систем эритроцита ( $K^+/Cl^-$ , 2,4-динитрофенил-S-глутатиона и др.), инактивирует мембранные (ацетилхолинэстераза, АТФазы) и антиоксидантные ферменты. Так, инкубация его с эритроцитарной взвесью уменьшает уровень восстановленного глутатиона до  $34 \pm 7.4\%$  от исходного (при концентрации 2 ммоль/л), а с увеличением концентрации пероксинитрита и уменьшением величины гематокрита степень гемолиза возрастает (50% лизиса происходит через 2 часа при его концентрации 3 ммоль/л) [75].

Основной мишенью пероксинитрита в эритроците является гемоглобин. Взаимодействие пероксинитрита с окси- или дезоксигемоглобином приводит к образованию метгемоглобина. Эффект взаимодействия гемоглобина и пероксидаз ( $H_2O_2$ , LOOH, ONOO<sup>-</sup>) может быть более значимым, чем его окислительное повреждение. В обычных условиях внутриэритроцитарный гемоглобин взаимодействует с нитрит-ионами с преобладающим образованием метгемоглобина, при окислительном стрессе — преимущественно с возникновением нитритного метгемоглобина, который способен реагировать с  $H_2O_2$ , образуя, в частности, пероксинитрит, участвующий в лизисе эритроцитов. Спектроскопическими методами было установлено, что пероксинитрит окисляет гемоглобин через образование промежуточных феррильной ( $Fe^{4+}=O$ ) или перферрильной ( $Por^{*+}-Fe^{4+}=O$ ) форм гемопroteина [40]. Помимо того, образующийся при разрыве пероксинитрита радикал  $NO_2^*$  вызывает нитрование тирозиновых остатков гемоглобина. В присутствии физиологических концентраций углекислого газа ONOO<sup>-</sup> образует нитрозопероксикарбоксилат анионный аддукт ( $ONOOCO_2^-$ ), распад которого также приводит к окислению гемоглобина и образованию нитрующего радикала  $NO_2^*$ . В то же время гемоглобин может обеспечивать защиту от пероксинитрита, выполняя функцию внутриклеточного антиоксиданта, что уменьшает вероятность образования его высоких концентраций и, следовательно, его повреждающего действия. Существует определенная связь между СГК и процессами его аутоокисления и окислительной модификации. Гемоглобин выступает в роли редокс-активного соединения, формируя псевдопероксидазный каталитический цикл, возникающий между  $Fe^{3+}$  и  $Fe^{4+}$  при поглощении гемоглобином  $H_2O_2$ . Возможная роль кислородсвязывающих свойств крови в модифицировании механизмов клеточной сигнализации заключается в следующем: недостаток кислорода ведет к изменению редокс-состояния гемоглобина ( $HbFe^{3+}$  и  $HbFe^{4+}$ ), что в свою очередь увеличивает экспрессию таких протеинов, как индукцибельный фактор-1 $\alpha$  и гемоксигеназа [86]. Гемоглобин, регулируя содержание NO в том или ином регионе организма, формирует определенный уровень прооксидантно-антиоксидантного состояния. При нормальных физиологических условиях, когда количество образуемого NO невелико, прооксидантные эффекты пероксинитрита и  $H_2O_2$  угнетаются антиоксидантной функцией NO, а в условиях сдвига прооксидантно-антиоксидантного баланса, чрезмерного образования  $O_2^-$  и соответственно пероксинитрита и  $H_2O_2$  реализуется прооксидантный эффект NO. СГК, регулируя уровень NO, может вносить вклад в равновесие между ним и  $O_2^-$  в сосудистой сети.

Инкубирование венозной крови с пероксинитритом (в значимом соотношении с гемоглобином 1:100) приводит к повышению СГК. Отмечается снижение по отношению к контролю величины р50 стандартного на  $3.6 \pm 1.3$  мм рт. ст. ( $p < 0.05$ ) и реального на  $4.5 \pm 1.6$  мм рт. ст. ( $p < 0.05$ ) содержание метгемоглобина при этом возрастает на 354.0 % ( $p < 0.05$ ) по сравнению с контролем [11]. Вероятно, данный эффект реализуется через образование различных форм гемоглобина: окисленной по гему и модифицированной по его аминокислотным остаткам. Вероятно, эффект пероксинитрита на положение КДО цельной крови определяется непосредственными продуктами его взаимодействия с гемоглобином. В нашей экспериментальной модели были выбраны относительно высокие соотношения ONOO<sup>-</sup>/гемоглобина, так как концентрации NO в таких отделах

сосудистой системы, как артериолы, капилляры, гораздо выше, чем в крови, содержащейся в крупных сосудах. Основные механизмы реакции пероксинитрита с аминокислотами реализуются через следующие формы пероксинитрита:  $\text{HOONO}$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{ONOOOCO}_2^-$ . Инкубирование  $\text{ONOO}^-$  с венозной кровью в условиях гиперкапнии или гипокapнии вызывает разнонаправленный сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина, что обусловлено различными продуктами модификации гемоглобина, образование которых определяется напряжением  $\text{CO}_2$  [20]. Результат реакций предположительно определяется факторами (pH,  $p\text{CO}_2$ ,  $p\text{O}_2$ ), которые влияют на соотношение этих форм пероксинитрита. На основании этих результатов можно предположить, что пероксинитрит является не только цитотоксичным окислителем, но и фактором регуляции кислородсвязывающих свойств гемоглобина.

### ЗНАЧЕНИЕ NO ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ КРОВИ

Среди механизмов, через которые клетки приспосабливаются к изменениям оксигенации, важное место отводится модификации эндогенных сигналов NO. Для обеспечения транспорта  $\text{O}_2$  в ткани эритроциты выполняют двойную функцию по его переносу и регуляции локального кровотока: через деоксигенацию крови, зависимую от высвобождения АТФ эритроцитами, стимулирующими продукцию NO, его высвобождение из  $\text{SNO-Hb}$  во время деоксигенации и уменьшения вазоактивности NO деоксигемоглобином [49].

Кислород-зависимый характер равновесия между  $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$  и  $\text{SNO-Hb}$  обеспечивает соответствие кровотока с его потребностью, т. е. оптимальный баланс между потребностью в кислороде и его доставкой. Это может иметь важное значение и в модификации функциональных свойств гемоглобина и его участия в формировании потока  $\text{O}_2$  в ткани и поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия в организме. Аллостерию гемоглобина в эритроцитах контролирует пусковой кислородчувствительный механизм, который управляет гипоксическим процессом, стабилизирующим внутриклеточную энергетику и обеспечивающим их способность высвобождать кислород. 2,3-ДФГ влияет на биоактивность NO через изменения взаимодействия гемоглобина и эритроцитарной мембраны. 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 [6]. При изучении действия различных стрессоров на синтез NO предполагается, что снижение его концентрации в крови является проявлением дезадаптации организма к стрессорному воздействию, а увеличение депонирования NO в эндотелии сосудов рассматривается как критерий адаптации организма к стрессору [14]. Поиск путей направленного модулирования метаболизма NO представляет большой интерес в отношении повышения способности организма адаптироваться к гипоксии и устойчивости к ней [17]. В настоящее время сформировано представление об L-аргинин-NO системе как обособленном стресс-лимитирующем механизме, который активируется при действии на организм различных стресс-факторов [14]. В развитии дисфункции эндотелия и окислительного стресса имеет важное значение снижение биодоступности NO, обусловленное снижением его продукции либо его усиленной деградацией, а также его взаимодействием с молекулой гемоглобина и модификацией ее свойств и соответственно в целом кислородтранспортной функции крови. Очевидно, взаимодействие NO с гемоглобином может вносить свой вклад в развитие адаптивных и дезадаптивных

реакций при стрессе, снижение биоактивности NO при дисфункции эндотелия и гипоксии.

Таким образом, анализ литературных данных и собственных результатов исследований указывает, что NO выполняет роль аллостерического эффектора в отношении гемоглобина, изменяя его сродство к кислороду. Оценивая взаимодействие гемопротейна с NO, последний можно рассматривать как лиганд, определяющий состояние кислородтранспортной функции крови. Исходя из этого представляется возможным обоснование создания новых путей коррекции гипоксических состояний через целенаправленное воздействие на кислородсвязывающие свойства крови и активность L-аргинин-NO системы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] *Артюхов В. Г., Калаева Е. А., Путинцева О. В.* Динамика оксигенации нативного и УФ-модифицированного гемоглобина человека в присутствии оксида азота. Физиол. человека. 30 (2) : 110—116. 2004.
- [2] *Васильева Е. М., Баканов М. И., Марков Х. М.* Влияние системы L-аргинин-NO на активность АТФаз и ПОЛ эритроцитов. Бюл. эксперим. биологии и медицины. 9 (128) : 321—323. 1999.
- [3] *Гарелик П. В., Колешико С. В., Зинчук В. В.* Влияние тиотриазолина на механизмы транспорта кислорода кровью и L-аргинин-NO систему при экспериментальном остром панкреатите. Новости хирургии. 3 : 7—15. 2009.
- [4] *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. 91 (9) : 1052—1060. 2005.
- [5] *Зинчук В. В.* Дисфункция эндотелия и кислородсвязывающие свойства гемоглобина. Кардиология. 49 (7—8) : 81—89. 2009.
- [6] *Зинчук В. В.* Участие оксида азота в формировании кислородсвязывающих свойств гемоглобина. Успехи физиол. наук. 34 (2) : 33—45. 2003.
- [7] *Зинчук В. В., Борисюк М. В.* Роль кислородсвязывающих свойств крови в поддержании прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма. Успехи физиол. наук. 30 (3) : 38—48. 1999.
- [8] *Зинчук В. В., Глуткин С. В.* Влияние мелатонина на прооксидантно-антиоксидантное равновесие в условиях холодного воздействия с последующим отогреванием крыс. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. (12) : 1435—1442. 2008.
- [9] *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. 34 (2) : 1—3. 2008.
- [10] *Зинчук В. В., Зинчук Н. В.* Влияние небиволола на кислородтранспортную функцию крови. Эксперим. и клинич. фармакология. 70 (1) : 44—47. 2007.
- [11] *Зинчук В. В., Степура Т. Л.* Эффект пероксинитрита на сродство гемоглобина к кислороду *in vitro*. Биофизика. 131 (1) : 32—38. 2006.
- [12] *Зинчук В. В., Ходосовский М. Н.* Участие кислородзависимых процессов в патогенезе реперфузионных повреждений печени. Успехи физиол. наук. 34 (4) : 45—56. 2006.
- [13] *Иржак Л. И.* Гемоглобины и их свойства. М. Наука. 1975.
- [14] *Киричук В. Ф., Иванов А. Н., Кулапина Е. Г., Креницкий А. П., Майборodin А. В.* Влияние электромагнитного излучения терагерцового диапазона на частотах оксида азота на концентрацию нитритов в плазме крови белых крыс, находящихся в состоянии иммобилизационного стресса. Бюл. эксперим. биологии и медицины. 149 (2) : 132—134. 2010.
- [15] *Колешико С. В.* Динамика показателей кислородтранспортной функции крови и нитрат/нитритов при остром экспериментальном панкреатите у крыс. Журн. Гродненского гос. мед. ун-та. 2 : 203—205. 2009.
- [16] *Максимов Г. В., Родненко О. В., Лунева О. Г., Браже Н. А., Паршина Е. Ю., Рубин А. Б., Чазов Е. И.* Изучение роли плазматической мембраны эритроцитов в формировании гипоксии у больных с хронической сердечной недостаточностью. Терапевтический архив. 9 : 70—73. 2005.

- [17] Манухина Е. Б., Малышев И. Ю., Архипенко Ю. В. Оксид азота в сердечно-сосудистой системе: роль в адаптационной защите. Вестник РАМН. 10 : 16—20. 2005.
- [18] Реутов В. П., Сорокина Е. Г., Охотин В. Е., Косицын Н. С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М. Наука. 1997.
- [19] Стародубцева М. Н., Кузнецова Т. Г., Кузнецова Т. А. Пероксинитрит-индуцированные структурные перестройки в эритроцитарных мембранах. Вести НАН Беларуси. Сер. биол. наук. 3 : 90—93. 2006.
- [20] Степура Т. Л., Зинчук В. В. Эффект пероксинитрита на сродство гемоглобина к кислороду *in vitro* при различном напряжении углекислого газа. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 97 (8) : 852—861. 2011.
- [21] Ходосовский М. Н., Зинчук В. В. Участие L-аргинин-NO системы в развитии реперфузионных повреждений печени. Экспериментальная и клиническая фармакология. 66 (3) : 39—43. 2003.
- [22] Шамова Е. В., Бичан О. Д., Дрозд Е. С., Горудко И. В., Чижик С. А., Шумаев К. Б., Черенкевич С. Н., Ванин А. Ф. Регуляция функциональных и механических свойств тромбоцитов и эритроцитов донорами азота. Биофизика. 56 (2) : 265—271. 2011.
- [23] Янковская Л. В., Зинчук В. В., Лис М. А. Кислородтранспортная функция крови и дисфункция эндотелия у больных со стенокардией и артериальной гипертензией. Кардиология. 47 (4) : 22—27. 2007.
- [24] Allen B. W., Stamler J. S., Piantadosi C. A. Hemoglobin, nitric oxide and molecular mechanisms of hypoxic vasodilation. Trends. Mol. Med. 15 (10) : 452—460. 2009.
- [25] Andreotti F., Pafundi T., Coluzzi G., Maseri A. Hemoglobin levels, nitric oxide bioavailability and cardiovascular outcomes. Am. J. Cardiol. 107 (7) : 1099. 2011.
- [26] Angelo M., Hausladen A., Singel D. J., Stamler J. S. Interactions of NO with hemoglobin: from microbes to man. Methods Enzymol. 436 : 131—168. 2008.
- [27] Bateman R. M., Jagger J. E., Sharpe M. D., Ellsworth M. L., Mehta S., Ellis C. G. Erythrocyte deformability is a nitric oxide-mediated factor in decreased capillary density during sepsis. Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol. 280 : 2848—2856. 2001.
- [28] Bennett-Guerrero E., Veldman T. H., Doctor A., Telen M. J., Ortel T. L., Reid T. S., Mulherin M. A., Zhu H., Buck R. D., Califf R. M., McMahon T. J. Evolution of adverse changes in stored RBCs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104 (43) : 17 063—17 068. 2007.
- [29] Bor-Kucukatay M., Demir S., Akbay R., Dursunoglu D., Akdag B., Semiz E. Relationship between hemorheology and Glu(298)Asp polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene in patients with coronary artery disease. Mol. Biol. Rep. 37 (1) : 171—178. 2010.
- [30] Carvalho F. A., Maria A. V., Braz Nogueira J. M., Guerra J., Martins-Silva J., Saldanha C. The relation between the erythrocyte nitric oxide and hemorheological parameters. Clin. Hemorheol. Microcirc. 35 (1—2) : 341—347. 2006.
- [31] Datta B., Tufnell-Barrett T., Bleasdale R. A., Jones C. J., Beeton I., Paul V., Frenneaux M., James P. Red blood cell nitric oxide as an endocrine vasoregulator: a potential role in congestive heart failure. Circulation. 109 (11) : 1339—1342. 2004.
- [32] de Almeida J. P. L., Carvalho F. A., Silva-Herdade A. S., Santos-Freitas T., Saldanha C. Redox thiol status plays a central role in the mobilization and metabolism of nitric oxide in human red blood cells. Cell. Biol. Int. 33 (3) : 268—275. 2009.
- [33] Dejam A., Hunter C. J., Pelletier M. M., Hsu L. L., Machado R. F., Shiva S., Power G. G., Kelm M., Gladwin M. T., Schechter A. N. Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. Blood. 106 (2) : 734—739. 2005.
- [34] Diesen D. L., Hess D. T., Stamler J. S. Hypoxic vasodilation by red blood cells: evidence for an S-nitrosothiol-based signal. Circ. Res. 103 (5) : 545—553. 2008.
- [35] Dikalov S., Fink B. ESR techniques for the detection of nitric oxide *in vivo* and in tissues. Methods. Enzymol. 306 : 597—610. 2005.
- [36] Doctor A., Platt T., Sheram M. I., Eisoheid A., McMahon T., Maxey T., Doherty I., Axelrod M., Kline I., Gurka M., Gow A., Gaston B. Hemoglobin conformation couples erythrocyte S-nitrosothiol content to O<sub>2</sub> gradients. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102 : 5709—5714. 2005.
- [37] Dufour S. P., Patel R. P., Brandon A., Teng X., Pearson J., Barker H., Ali L., Yuen A. H., Smolenski R. T., González-Alonso J. Erythrocyte-dependent regulation of human skeletal muscle blood flow: role of varied oxyhemoglobin and exercise on nitrite, S-nitrosohemoglobin, and ATP. Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 299 (6) : 1936—1946. 2010.

- [38] *d'Uscio L. V., Smith L. A., Santhanam A. V., Richardson D., Nath K. A., Katusic Z. S.* Essential role of endothelial nitric oxide synthase in vascular effects of erythropoietin. *Hypertension*. 49 (5) : 1142—1118. 2007.
- [39] *Erzurum S. C., Ghosh S., Janocha A. J., Xu W., Bauer S., Bryan N. S., Tejero J., Hermann C., Hille R., Stuehr D. J., Feelisch M., Beall C. M.* Higher blood flow and circulating NO products offset high-altitude hypoxia among Tibetans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104 (45) : 17 593—17 598. 2007.
- [40] *Exner M., Herold S.* Kinetic and mechanistic studies of the peroxynitrite-mediated oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin. *Chem. Res. Toxicol.* 13 : 287—293. 2000.
- [41] *Gladwin M. T.* Role of the red blood cell in nitric oxide homeostasis and hypoxic vasodilation. *Adv. Exp. Med.* 588 : 189—205. 2006.
- [42] *Gladwin M. T., Crawford J. H., Patel R. P.* The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and nemoglobin: role in blood flow regulation. *Free. Radic. Biol. Med.* 36 (6) : 707—717. 2004.
- [43] *Gladwin M. T., Lancaster J. R., jr., Freeman B. A., Schechter A. N.* Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm. *Nat. Med.* 9 (5) : 496—500. 2003.
- [44] *Gow A. J., Luchsinger B. P., Pawloski J. R., Singel D. I., Stamler I. S.* The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96 (16) : 9027—9032. 1999.
- [45] *Hlutkin S., Zinchuk V.* Effect of melatonin on the blood oxygen transport during hypothermia and rewarming in rats. *Ann. Acad. Med. Bialostocensis*. 53 (2) : 234—239. 2008.
- [46] *Hobbs A. J., Gladwin M. T., Patel R. P., Williams D. L. H., Butler A. R.* Haemoglobin NO transporter, NO inactivator or NO one of the above? *Trends in Pharmacological. Sciences*. 23 (9) : 406—411. 2002.
- [47] *Ibrahim Y. I., Ninnis J. R., Hopper A. O., Deming D. D., Zhang A. X., Herring J. L., Sowers L. C., McMahon T. J., Power G. G., Blood A. B.* Blood nitrite, nitrate, and s-nitrosohemoglobin concentrations in infants with pulmonary hypertension. *J. Pediatr.* 2011 Sep. 8. [Epub ahead of print].
- [48] *Jaszewski A. R., Fann Y. C., Chem Y. R., Sato K., Corbett I., Mason R. P.* EPR spectroscopy studies on the structural transition of nitrosyl hemoglobin in the arterial-venous cycle of DEANO-treated rats as it relates to the proposed nitrosyl hemoglobin/nitrosothiol hemoglobin exchange. *Free. Radic. Biol. Med.* 35 : 444—451. 2003.
- [49] *Jensen F. B.* The dual roles of red blood cells in tissue oxygen delivery: oxygen carries and regulators of local blood flow. *J. Exp. Biol.* 212 (21) : 3387—3393. 2009.
- [50] *Jiang J., Corbett J., Hogg N., Mason R. P.* An electron paramagnetic resonance investigation of the oxygen dependence of the arterial-venous gradient of nitrosyl hemoglobin in blood circulation. *Free. Radic. Biol. Med.* 43 (8) : 1208—1215. 2007.
- [51] *Jourd'heuil D., Hallen K., Feelisch M., Grisham M. B.* Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood. *Free. Radic. Biol. Med.* 28 : 409—417. 2000.
- [52] *Kanematsu Y., Yamaguchi K., Ohnishi H., Motobayashi Y., Ishizawa K., Izawa Y., Kawazoe K., Kondo S., Kagami S., Tomita S., Tsuchiya K., Tamaki T.* Dietary doses of nitrite restore circulating nitric oxide level and improve renal injury in L-NAME-induced hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 295 (5) : 1457—1462. 2008.
- [53] *Kim-Shapiro D. B.* Hemoglobin-nitric oxide cooperativity: is NO the third respiratory ligand? *Free. Radic. Biol.* 36 (4) : 402—412. 2004.
- [54] *Kleinbongard P., Keymel S., Kelm M.* New functional aspects of the L-arginine-nitric oxide metabolism within the circulating blood. *Thromb. Haemost.* 98 : 970—974. 2007.
- [55] *Kleinbongard P., Schulz R., Rassaf T., Lauer T., Dejam A., Iax T., Kumara I., Gharni P., Kabanova S., Ozuyaman B., Schnurch H. G., Godecke A., Weber A. A., Robenek M., Robenek H., Bloch W., Rosen P., Kelm M.* Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood*. 107 (7) : 2943—2951. 2006.
- [56] *Kuwai T., Hayashi J.* Nitric oxide pathway activation and impaired red blood cell deformability with hypercholesterolemia. *J. Atherosclerosis. Thrombosis*. 13 (6) : 286—294. 2006.
- [57] *Liu X., Miller M. J., Joshi M. S., Sadowska-Krowicka H., Clark D. A., Lancaster J. R.* Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 273 (30) : 18 709—18 713. 1998.
- [58] *Ludolph B., Bloch W., Kelm M., Schulz R., Kleinbongard P.* Short-term effect of the HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin on erythrocyte nitric oxide synthase activity. *Vasc. Health. Risk. Manag.* 3 (6) : 1069—1073. 2007.



- [59] Lundberg J. O., Weitzberg E. NO generation from nitrite and its role in vascular control. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (5) : 915—922. 2005.
- [60] Maletic S. D., Drsgicevic-Djorovic L. M., Zikic R. V., Stajn A. S., Milenkovic P., Kostic M. M. Effects of nitric oxide donors on energy metabolism of rat erythrocytes. *Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology*. 19 (4) : 383—390. 2000.
- [61] Markovic S. D., Ognjanovic B. I., Stajn A. S., Zikic R. V., Saicic Z. S., Radojicic R. M., Spasic M. B. The effects of nitroglycerine on the redox status of rat erythrocytes and reticulocytes. *Physiol. Res.* 55 : 389—396. 2006.
- [62] Matarrese P., Straface E., Pietraforte D., Gambardella L., Vona R., Maccaglia A., Minelli M., Malorni W. Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl protease. *FASEB J.* 19 (3) : 416—418. 2005.
- [63] McMahon T. J., Moon R. E., Luschinger B. P., Stone A. E., Stolp B. W., Gow A. I., Pawloski I. R., Watke P., Singel D. I., Piantadosi C. A., Stamler J. S. Nitric oxide in the human respiratory cycle. *Nat. Med.* 8 : 711—717. 2002.
- [64] Mesquita R., Picarra B., Saldanha C., Martins e Silva. Nitric oxide effects on human erythrocytes structural and functional properties an in vitro study. *Clin Hemorheol Microcirc.* 27 (2) : 137—147. 2002.
- [65] Morgan M. A., Frasier L. M., Stewart J. C., Mack C. M., Gough M. S., Graves B. T., Apostolakis M. J., Doolin K. P., Darling D. C., Frampton M. W., Pietropaoli A. P. Artery-to-vein differences in nitric oxide metabolites are diminished in sepsis. *Crit. Care. Med.* 38 (4) : 1069—1077. 2010.
- [66] Olearczyk J. J., Stephenson A. H., Lonigro A. J., Sprague R. S. NO inhibits signal transduction pathway for ATP release from erythrocytes via its action on heterotrimeric G protein G<sub>1</sub>. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 287 : 748—754. 2004.
- [67] Ozuyaman B., Grau M., Kelm M., Merx M. W., Kleinbongard P. RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects. *Trends. Mol. Med.* 14 (7) : 314—322. 2008.
- [68] Pawloski J. R., Hess D. T., Stamler J. S. Impaired vasodilation by red blood cells in sickle cell disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102 (7) : 2531—2536. 2005.
- [69] Pikhova B., Gladwin M. T., Schechter A. N., Hogg N. Electron paramagnetic resonance analysis of nitrosylhemoglobin in humans during NO inhalation. *J. Biol. Chem.* 280: 40 583—40 588. 2005.
- [70] Pronko T. P., Zinchuk V. V. Effect of nebulolol on blood oxygen transport indices and endothelial dysfunction in patients with arterial hypertension. *Clin. Physiol. Funct. Imaging.* 29 (3) : 170—176. 2009.
- [71] Reynolds J. D., Ahearn G. S., Angelo M., Zhang J., Cobb F., Stamler J. S. S-nitrosohemoglobin deficiency: a mechanism for loss of physiological activity in banked blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104 (43) : 17 058—17 062. 2007.
- [72] Schechter A. N., Gladwin M. T. Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide. *N. Engl. J. Med.* 348 (15) : 1483—1485. 2003.
- [73] Singel D. J., Stamler J. S. Chemical physiology of blood flow regulation by red blood cells: the role of nitric oxide and S-nitrosohemoglobin. *Annu. Rev. Physiol.* 67 : 99—145. 2005.
- [74] Sonveaux P., Lobysheva I. I., Feron O., McMahon T. J. Transport and peripheral bioactivities of nitrogen oxides carried by red blood cell hemoglobin: role in oxygen delivery. *Physiology.* 22 : 97—112. 2007.
- [75] Soszynski M., Grzelak A., Jakubowski W., Bartosz G. Effect of peroxynitrite on the red blood cell. Active forms of oxygen, nitrogen and chlorine in control of cellular functions in the normal state and under pathology. *Proceedings of the International Symposium.* 190—195.
- [76] Stamler J. S., Jia L., Eu J. P., McMahon T. J., Demchenko I. T., Bonaventura J., Gerner K., Piantadosi C. A. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science.* 276 (5321) : 2034—2037. 1997.
- [77] Stepuro T. L., Zinchuk V. V. Nitric oxide effect on the hemoglobin-oxygen affinity. *J. Physiol. Pharmacol.* 57 (1) : 29—38. 2006.
- [78] Suhr F., Porten S., Hertrich T., Brixius K., Schmidt A., Platen P., Bloch W. Intensive exercise induces changes of endothelial nitric oxide synthase pattern in human erythrocytes. *Nitric Oxide.* 20 (2) : 95—103. 2008.
- [79] Ulker P., Meiselman H. J., Baskurt O. K. Nitric oxide generation in red blood cells induced by mechanical stress. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 45 (2—4) : 169—175. 2010.

[80] Ulker P., Yaras N., Yalcin O., Celik-Ozenci C., Johnson P. C., Meiselman H. J., Baskurt O. K. Shear stress activation of nitric oxide synthase and increased nitric oxide levels in human red blood cells. *Nitric Oxide*. 24 (4) : 184—191. 2011.

[81] Uwe M., Schindler R., Brixius K., Mehllhorn U., Bloch W. Extracorporeal circulation activates endothelial nitric oxide synthase in erythrocytes. *Ann. Thorac. Surg.* 84 : 2000—2003. 2007.

[82] Uyuklu M., Connes P., Tripette I., Boneher I. M., Betar E., Chalabi I., Ialein D., Chout R., Hue O., Harday-Dessourus M. D., Baskurt O. K. Sampling time after tourniquet removal affects erythrocyte deformability and aggregation measurements. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 41 (1) : 9—15. 2009.

[83] van Faasen E. E., Bahrami S., Feelisch M., Hogg M., Kelm M., Kim-Shapiro D. B., Kozlov A. V., Li H., Lundberg I. O., Mason R., Nohl H., Rassaf T., Samonilov A., Slama-Schwok A., Shiva S., Vanin A., Wetzberg E., Zwuer I., Gladwin M. T. Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology. *Med. Res. Rev.* 29 (5) : 683—741. 2009.

[84] Walter R., Mark M., Reinhart W. H. Pharmacological concentration of arginine influence human whole blood viscosity independent of nitric oxide synthase activity in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*. 269 (2) : 687—691. 2000.

[85] Webb A. Mechanisms underlying erythrocyte and endothelial nitrite reduction to nitric oxide in hypoxia: role for xanthine oxidoreductase and endothelial nitric oxide synthase. *Circ. Res.* 103 (9) : 957—964. 2008.

[86] Yeh L. H., Alayash A. I. Redox side reactions of haemoglobin and cell signalling mechanisms. *J. Intern. Med.* 253 (5) : 518—526. 2003.

[87] Zinchuk V. V., Borisiuk M. V. The effect of NO synthase inhibition on blood oxygen-carrying function during hyperthermia in rats. *Respir. Physiol.* 113 (1) : 39—45. 1998.

[88] Zinchuk V. V., Dorokhina L. V. Blood oxygen transport in rats under hypothermia combined with modification of the L-arginine-NO pathway. *Nitric Oxide*. 6 (1) : 29—34. 2002.

[89] Zinchuk V. V., Pronko T. P., Lis M. A. Blood oxygen transport and endothelial dysfunction in patients with arterial hypertension. *Clin. Physiol. Nuclear Med.* 24 : 205—211. 2004.

Поступила 3 XII 2012