

ЭФФЕКТ ПЕРОКСИНИТРИТА НА СРОДСТВО ГЕМОГЛОБИНА
К КИСЛОРОДУ IN VITRO ПРИ РАЗЛИЧНОМ НАПРЯЖЕНИИ
УГЛЕКИСЛОГО ГАЗА

© Т. Л. Степуро, В. В. Зинчук

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Беларусь, 230015,
Гродно, ул. Горького, 80, e-mail: zvvv@tut.by

Эффекты воздействия пероксинитрита (ONOO^-) на физиологические системы свидетельствуют о широком спектре токсических и регуляторных свойств этой молекулы, в том числе в отношении кислородсвязывающих свойств крови. Целью данной работы было оценить влияние пероксинитрита на сродство гемоглобина к кислороду в опытах *in vitro* при различном напряжении углекислого газа (CO_2). Инкубирование ONOO^- с венозной кровью в условиях гиперкапнии или гипокапнии вызывало разнонаправленный сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина. Обнаруженный эффект ONOO^- обусловлен, вероятно, различными продуктами модификации гемоглобина, образование которых определяется напряжением CO_2 . Способность ONOO^- разнонаправленно изменять сродство гемоглобина к кислороду может иметь большое значение в регуляции процессов оксигенации в легких и обеспечении тканей кислородом на уровне микроциркуляции.

Ключевые слова: гемоглобин, сродство гемоглобина к кислороду, пероксинитрит, углекислый газ.

Рос. физiol. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 97. № 8. С. 852—861. 2011

T. L. Stepuro, V. V. Zinchuk. PEROXYNITRITE EFFECT ON THE HAEMOGLOBIN OXYGEN AFFINITY IN VITRO IN PRESENCE OF DIFFERENT PARTIAL PRESSURE OF CARBON DIOXIDE. Grodno State Medical University, Belarus, 230015, Grodno, Gorky sr., 80, e-mail: zvvv@tut.by.

Peroxynitrite (ONOO^-) besides its toxic possesses regulatory action that includes the modulation of oxygen binding properties of blood. The aim of this work was to estimate ONOO^- effect on the haemoglobin oxygen affinity (HOA) *in vitro* in presence of different partial pressure of carbon dioxide (CO_2). The ONOO^- presence in venous blood in conditions of hypercapnia induced oxyhaemoglobin dissociation curve shift leftward while in hypocapnic conditions the result of a different character was obtained. The revealed effect of ONOO^- is realized, possibly, through various modifications of haemoglobin whose formation is dependent on the CO_2 pressure. The ONOO^- influences the HOA in different manner that can be important in regulation of blood oxygenation in lungs and maintenance of oxygen consumption in tissues.

Key words: haemoglobin, haemoglobin oxygen affinity, peroxynitrite, carbon dioxide.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 97. N 8. P. 852—861. 2011.

Пероксинитрит (ONOO^-), образующийся из оксида азота и супероксид аниона, является фактором иммунной защиты организма, регулятором межклеточной сигнализации, проапоптотическим агентом, посттрансляционным модификатором функции белков [^{1, 6, 16}]. Токсическое действие ONOO^- обнаруживается при его высоких концентрациях, а в малых — ONOO^- может проявлять свои регуля-

торные свойства в отношении функций ферментных систем, модуляции метаболизма, выживаемости клеток, передаче физиологического сигнала [1, 7, 18, 19].

Время жизни образующегося *in vivo* ONOO⁻ чрезвычайно мало. Особенно быстро происходит перехват ONOO⁻ тиолами, металлокомплексами белками и особенно углекислым газом (CO₂). Реакция ONOO⁻ с последним приводит к образованию промежуточного продукта — ONOOOCO₂⁻, который распадается с образованием 65% CO₂ и нитрата, а также 35% карбонатного радикала (CO₃^{2*}) и радикала диоксида азота (NO₂^{*}) [21]. Реакцию дисмутации ONOO⁻ до CO₂ и нитрата можно рассматривать как нейтрализующую действие пероксинитрита. Но образование радикалов CO₃^{2*} и NO₂^{*} изменяет эффекты и избирательность опосредованной пероксинитритом модификации белков [5, 18, 20].

Внеэритроцитарно образующийся пероксинитрит в протонированной форме способен свободно диффундировать через эритроцитарную мембрану. Проникновению ONOO⁻ в клетку способствует наличие в мембране анионных обменников [9, 25]. Благодаря этому при физиологических значениях гематокрита и напряжения CO₂ более половины пероксинитрита все же взаимодействует с гемоглобином (Hb) [25]. В реакциях с пероксинитритом гемоглобин играет роль утилизатора ONOO⁻ [10, 12], или «превентивного антиоксиданта» [21]. Физиологическое значение взаимодействия этих молекул также может проявляться в изменении кислородсвязывающих свойств гемоглобина [2—4, 28]. Опубликованные ранее результаты нашего исследования [3] обнаруживают важную роль CO₂ в процессе взаимодействия гемоглобина с ONOO⁻. Ряд авторов рассматривает CO₂ в качестве триггера физиологических функций пероксинитрита, что реализуется через ограничение диффузии ONOO⁻, образование нитрующих агентов [18, 20], увеличение скорости реакции взаимодействия ONOO⁻ с гемоглобином за счет изменения конформации белка [7, 8, 13].

Исходя из этого, целью работы явилась оценка влияния пероксинитрита на сродство гемоглобина к кислороду (СГК) в опытах *in vitro* при различных напряжениях углекислого газа.

МЕТОДИКА

Забор смешанной венозной крови проводился у наркотизированных тиопенталом крыс-самцов (*n* = 42, масса — 4.5—5.5 кг) посредством катетеризации яремной вены. Сразу после изъятия гепаринизированная кровь хранилась в анаэробных условиях при температуре +1 °C. Образцы крови инкубировали в течение 30 мин при 37 °C в анаэробных условиях с пероксинитритом. В других сериях пероксинитрит добавляли в сатуратор, где происходило насыщение крови при 37 °C «гипокапнической» (4.2 % CO₂, 5.3 % O₂, 90.5 % N₂) или «гиперкапнической» смесью (9.5 % CO₂, 3.5 % O₂, 87.0 % N₂). Во всех экспериментах концентрационные соотношения гемоглобина (тетрамера) и ONOO⁻ составляли 100 : 1 и 10 : 1. Манипуляции на животных осуществляли в соответствии с правилами и с разрешения этического комитета УО «Гродненский государственный медицинский университет».

Напряжение углекислого газа (pCO₂), кислорода (pO₂), pH, p50 (величина парциального давления кислорода, при которой степень оксигенированности гемоглобина составляет 50 %), количество метгемоглобина в крови измеряли с помощью газоанализатора Synthesis-15 (Laboratorial Instrumentation). СГК оценивали по следующим показателям: p50 стандартное, рассчитанное для pH 7.4, pCO₂ = 40 мм рт. ст. и температуры 37 °C, и реальное измеренное при реальных значениях pH, pCO₂, температуры. Определение количества нитритов и нитратов в плазме крови и гемолизате проводили с помощью реактива Грисса [26]. Пероксинитрит получали путем смешивания эквимолярных растворов нитрита натрия (NaNO₂) и пероксида водорода (H₂O₂) в соляной кислоте с последующей стабилизацией в растворе гидроксида натрия [15]. В ряде экспериментов использовали пероксинитрит, полученный путем озонирования азота натрия [23]. Концентрацию пероксинитрита в растворе оценивали спектрофотометрически по поглощению на длине волн 302 нм

($e_{302\text{ nm}} = 1679 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$). Статистическая обработка результатов проводилась с помощью компьютерной программы Statistica (StatSoft, Inc., США). Данные в таблицах представлены в виде среднего значения и среднего квадратичного отклонения в случае нормального распределения признака в группе или в виде медианы и квартилей при распределении, отличном от нормального. Для анализа статистически значимых различий между группами использовали тест Манна—Уитни, а статистически значимым принимался уровень $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В первой серии экспериментов использовали пероксинитрит, полученный в результате реакции пероксида водорода с нитритом натрия. При инкубировании венозной крови в анаэробных условиях в соотношении гемоглобина и ONOO^- , равном 100 : 1, произошло статистически значимо снижение $p50$ стандартного и реального (табл. 1). В опытном образце увеличилось содержание метгемоглобина (табл. 1), возросло суммарное количество нитритов в плазме и эритроцитах (рис. 1). Переход к соотношению $\text{Hb} : \text{ONOO}^- 10 : 1$ приводил к еще более существенному снижению $p50$, которое составило $8.5 \pm 3.1 \text{ мм рт. ст.}$ ($p < 0.05$) для стандартного показателя и $11.1 \pm 3.2 \text{ мм рт. ст.}$ ($p < 0.05$) для реального (табл. 2). Также увеличилось содержание нитритов в плазме и эритроцитах, изменились значения pH , pCO_2 и pO_2 крови (табл. 2, рис. 2).

В условиях гиперкапнии пероксинитрит, на фоне изменения других измеряемых параметров, снижал показатели сродства гемоглобина к кислороду только при соотношении $\text{Hb} : \text{ONOO}^- 10 : 1$ (табл. 2). Несмотря на то что при соотношении $\text{Hb} : \text{ONOO}^- 100 : 1$ увеличилось содержание метгемоглобина ($p < 0.05$), а также суммарное количество нитритов в плазме и эритроцитарной массе, $p50$ стандартное и реальное существенно не отличались от контрольного значения (табл. 1, рис. 1).

Пониженное напряжение углекислого газа в опытном образце крови обнаруживало отличный от предыдущих экспериментов эффект воздействия пероксинитрита на показатели $p50$. При соотношении $\text{Hb} : \text{ONOO}^- 100 : 1$ стандартный и реальный $p50$ статистически значимо превысили контрольные значения (табл. 1). Большая концентрация пероксинитрита вызывала более существенный прирост стандартного и реального показателей сродства гемоглобина к кислороду относительно контроля (табл. 2). Примечательно, что остальные показатели: количество метгемоглобина, нитритов в плазме и эритроцитах, напряжение кислорода в образцах — изменялись однонаправленно с таковыми в предыдущих экспериментах (табл. 1 и 2, рис. 1 и 2).

Во второй серии экспериментов использовали пероксинитрит, который получали путем озонирования азота натрия. Смешивание венозной крови с этим пероксинитритом вызвало снижение только реального показателя $p50$ на $2.5 \pm 1.0 \text{ мм рт. ст.}$ ($p < 0.05$), при этом повышался показатель pH крови, снижался pCO_2 образца (табл. 3), увеличилось содержание нитритов в эритроцитах (рис. 3). В условиях как гиперкапнии, так и гипокапнии изменений показателей, характеризующих сродства гемоглобина к кислороду, зафиксировано не было, несмотря на увеличение суммарного количества нитритов в эритроцитах в обоих случаях (табл. 3, рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Большие количества пероксинитрита могут образовываться при состояниях, сопровождающихся увеличенной продукцией NO и супероксид-аниона [^{10, 16}]. В эритроците существуют собственные механизмы образования оксида азота (NO -синтазная и нитрит-редуктазная) и супероксид-аниона, которые способны

Репозиторий

Таблица 1

Влияние пероксинитрита, синтезированного из пероксида водорода и нитрита натрия, на показатели кислородтранспортной функции и рН крови при инкубировании в условиях различного pCO_2 ($Hb : ONOO^- = 100 : 1$)

Показатель	Венозная кровь		Венозная кровь в условиях гиперкапнии		Венозная кровь в условиях гипокапнии	
	контроль	ONOO ⁻	контроль	ONOO ⁻	контроль	ONOO ⁻
<i>n</i> = 16						
p50 стандартный, мм рт. ст.	30.5 ± 0.5	28.6 (26.9; 29.6)*	30.5 (28.8; 30.8)	32.1 ± 0.3* [^]	30.0 ± 0.4	29.9 (27.5; 30.0)@
p50 реальный, мм рт. ст.	35.3 ± 1.0	31.4 ± 1.0* (7.318; 7.340)	27.5 (26.0; 28.0) ^Ψ	29.4 (28.1; 30.2)* 7.477	36.5 ± 0.7#	35.6 ± 0.6 [^] @
pH				7.480 (7.471; 7.495) ^Ψ	7.227 (7.216; 7.241) ^{Ψ#}	7.224 (7.215; 7.238) ^{Ψ@}
pCO_2 , мм рт. ст.	53.8 ± 1.5	53.5 ± 1.6 33.9 ± 3.9	32.1 ± 0.2 ^Ψ 40.0	32.2 ± 0.2 [^] (39.0; 41.0)	75.2 ± 0.6 ^{Ψ#} 27.0	75.2 ± 0.5 [^] @ 26.0
pO_2 , мм рт. ст.	37.0 ± 2.7			38.0 (36.5; 38.0)*	(27.0; 28.0) ^{Ψ#}	(25.0; 26.0)*@
Метгемоглобин, %	0.05 (0.00; 0.65)	2.8 ± 0.4*	1.9 ± 0.14 ^Ψ	9.60 (8.30; 12.20)* [^]	0.7 ± 0.1 ^{Ψ#}	8.1 ± 0.9* [^] @

Примечание (здесь и в табл. 2 и 3). * Статистически значимые различия групп в каждой серии; ^Ψ статистически значимые различия относительно контрольной группы с использованием венозной крови; # статистически значимые различия относительно контрольной группы в условиях гипокапнии; ^ статистически значимые различия относительно опытной группы с использованием венозной крови; @ статистически значимые различия относительно опытной группы в условиях гипокапнии. Цифры в скобках обозначают минимальные и максимальные значения показателей.

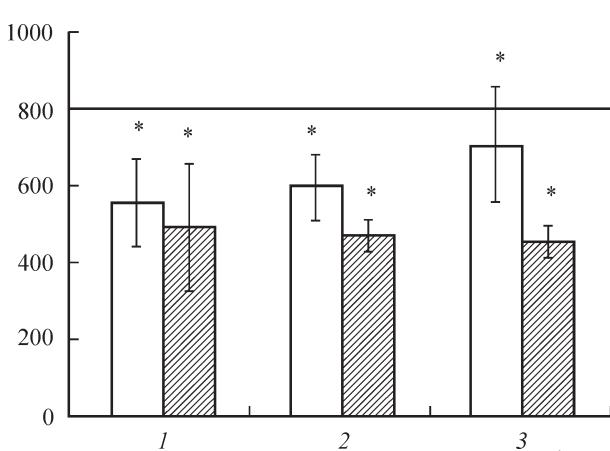


Рис. 1. Прирост суммарного количества нитритов в плазме (*светлые столбики*) и эритроцитах (*заштрихованные столбики*) при инкубировании крови с пероксинитритом, синтезированным из нитрита натрия и пероксида водорода, в условиях различного $p\text{CO}_2$.

По оси ординат — суммарное количество нитритов, процент от контроля; по оси абсцисс — опытные группы: 1 — венозная кровь, 2 — венозная кровь в условиях гипокапнии, 3 — венозная кровь в условиях гиперкапнии. Соотношение ONOO^- и гемоглобина равно 1 : 100. * Статистически значимые различия по отношению к контролю, $p < 0.05$.

потенциально увеличивать внутриэритроцитарное образование пероксинитрита. В процессе дезоксигенации крови в микроциркуляторном русле происходит усиление нитрит-редуктазной активности гемоглобина, функционируют O_2^{*-} -продуцирующие ферменты (ксантин- и другие оксидазы, диссоциированная NO-сингтаза) [1, 7]. Несмотря на присутствие супероксиддисмутазы, скорость диффузии O_2^{*-}

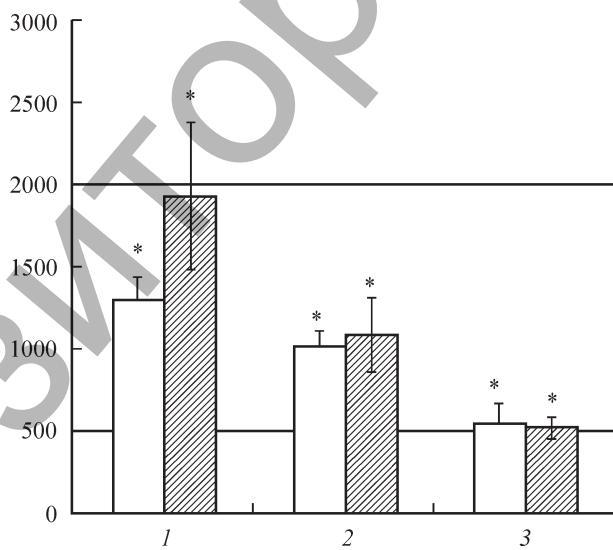


Рис. 2. Прирост суммарного количества нитритов в плазме (*светлые столбики*) и эритроцитах (*заштрихованные столбики*) при инкубировании крови с пероксинитритом, синтезированным из нитрита натрия и пероксида водорода, в условиях различного $p\text{CO}_2$.

Соотношение ONOO^- и гемоглобина равно 1 : 10. Обозначения те же, что и на рис. 1.

Таблица 2

Влияние пероксинитрита, синтезированного из пероксида водорода и нитрита натрия, на показатели кислородтранспортной функции и pH крови при инкубировании в условиях различного р_{CO₂} (Hb : ONOO⁻ = 10 : 1)

Показатель	Венозная кровь		Венозная кровь в условиях гипоксии		n = 11
	контроль	ONOO ⁻	контроль	ONOO ⁻	
<i>n</i> = 13					
p50 стандартный, мм рт. ст.	29.5 ± 0.4	21.0 ± 3.1*	29.6 (28.5; 29.9)	40.0 ± 1.4*^	27.1 (26.3; 30.0) ^Ψ
p50 реальный, мм рт. ст.	32.3 ± 0.5	21.2 ± 3.0*	28.1 ± 0.6 ^Ψ	36.7 ± 1.3*^	35.0 (34.5; 38.1) ^{Ψ#}
pH	7.315 ± 0.013	7.382 ± 0.013*	7.442 ± 0.017 ^Ψ	7.477 ± 0.016 ^Ψ	7.173 ± 0.022 ^{Ψ#}
pCO ₂ , мм рт. ст.	50.8 ± 1.5	40.2 (38.8; 48.6)*	31.3 ± 0.3 ^Ψ	31.5 ± 0.4 ^Ψ	71.8 ± 1.2 ^{Ψ#}
pO ₂ , мм рт. ст.	33.8 ± 2.2	13.8 ± 2.9*	40.0 (40.0; 41.0) ^Ψ	26.0 (17.0; 33.0)*^	73.6 ± 1.7 ^{Ψ@}
Меттемоглобин, %	0.9 ± 0.1	67.6 (44.3; 71.2)*	1.5 ± 0.1 ^Ψ	71.0 (52.9; 74.5)*	7.9 ± 1.5* ^Ψ
				0.5 ± 0.1 ^{Ψ#}	80.3 ± 0.4* ^{Ψ@}

Таблица 3
Влияние пероксинитрита, синтезированного из азотистого нитрита натрия, на показатели кислородтранспортной функции и pH крови при инкубировании в условиях различного р_{CO₂} (Hb : ONOO⁻ = 100 : 1)

Показатель	Венозная кровь		Венозная кровь в условиях гипоксии		n = 13
	контроль	ONOO ⁻	контроль	ONOO ⁻	
<i>n</i> = 10					
p50 стандартный, мм рт. ст.	29.9 ± 0.5	30.0 ± 0.4	30.3 ± 0.2	30.6 ± 0.2	30.8 ± 0.2
p50 реальный, мм рт. ст.	34.9 ± 1.1	32.4 ± 0.4*	28.3 ± 0.3 ^Ψ	28.7 ± 0.5 ^Ψ	37.9 ± 0.3 ^{Ψ#}
pH	7.298 (7.252; 7.317)	7.332 ± 0.018*	7.462 ± 0.010 ^Ψ	7.459 ± 0.013 ^Ψ	7.205 ± 0.010 ^{Ψ#}
pCO ₂ , мм рт. ст.	53.5 (52.6; 58.2)	47.5 ± 1.7*	31.8 ± 0.5 ^Ψ	32.2 ± 0.5 ^Ψ	76.1 (76.0; 76.8) ^{Ψ@}
pO ₂ , мм рт. ст.	26.6 ± 2.1	22.5 (21.0; 37.0)	41.8 ± 0.3 ^Ψ	41.0 (40.0; 42.0) ^Ψ	28.0 (28.0; 28.0) [#]
Меттемоглобин, %	1.7 ± 0.4	2.5 ± 0.4	2.5 ± 0.4	2.8 ± 0.3	2.2 ± 0.3

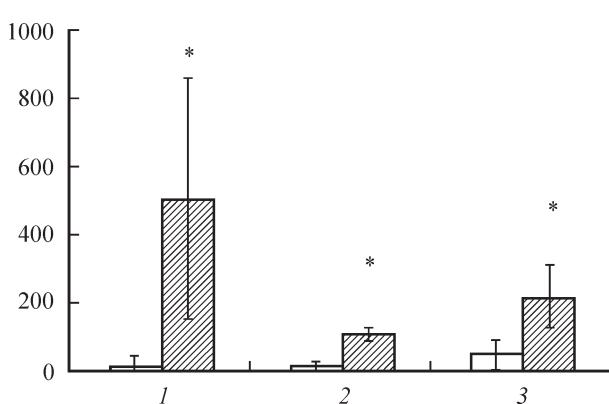


Рис. 3. Прирост суммарного количества нитритов в плазме (светлые столбики) и эритроцитах (заштрихованные столбики) при инкубировании крови с пероксинитритом, синтезированным из азида натрия, в условиях различного рСО₂.

Соотношение ONOO⁻ и гемоглобина равно 1 : 100. Обозначения те же, что и на рис. 1.

к ферменту между клеточными компартментами снижена, а скорость реагирования с NO превосходит скорость устраниния O₂^{*-} СОД [1, 16]. Следовательно, при снижении рO₂ в тканевых капиллярах вклад пероксинитрита в регуляцию кислородсвязывающих свойств крови возрастает.

В наших исследованиях [3] было показано, что инкубирование венозной крови с пероксинитритом приводит к повышению сродства гемоглобина к кислороду. При соотношении Hb : ONOO⁻ 100 : 1 отмечалось снижение по отношению к контролю величины р50 стандартного на 3.65 ± 1.28 ($p < 0.05$) и реального на 4.47 ± 1.59 мм рт. ст. ($p < 0.05$), содержание метгемоглобина при этом возрастало на 354.0% ($p < 0.05$), а на 416.5% ($p < 0.05$) увеличивалось содержание нитритов в плазме, хотя в эритроцитах последний показатель оставался неизменным [3].

Эффекты воздействия ONOO⁻ могут регулироваться углекислым газом [8, 20]. В настоящем исследовании триггерная роль CO₂ проявилась в разнонаправленном эффекте ONOO⁻, синтезированного из пероксида водорода и нитрита натрия, на положение кривой диссоциации оксигемоглобина. При рCO₂, равном приблизительно 32 мм рт. ст., кривая диссоциации оксигемоглобина сдвигалась вправо относительно контроля, тогда как при значениях рCO₂ превышающих 50 мм рт. ст., наоборот, влево. Обнаруженный эффект оказался дозозависимым, и с увеличением концентрации ONOO⁻ разница между контрольным и опытным образцами возрастила. Следует отметить, что в серии с гиперкапнией при соотношении Hb₄ : ONOO⁻, равном 100 : 1, различий в р50 стандартном между контролем и опытом не было. Вероятно, в последнем случае высокое рCO₂ (около 75 мм рт. ст.) ограничивало доступ ONOO⁻ к эритроцитам из-за происходящей в плазме дисмутации ONOOOCO₂⁺ до CO₂ и NO₃⁻, а образующиеся в 30 % случаев радикалы CO₃^{*-} и NO₂^{*} обладают слишком коротким временем жизни, чтобы проникнуть в эритроцит и прореагировать с внутриэритроцитарными мишениями. Однако при соотношении Hb₄ : ONOO⁻ 10 : 1 в гиперкапническом опыте количество проникшего в эритроцит ONOO⁻ было достаточным для модификации гемоглобина, что проявилось в снижении стандартного р50 относительно контроля.

Разнонаправленное действие ONOO⁻ на сродство гемоглобина к кислороду в зависимости от рCO₂ реализуется, вероятно, через различные механизмы. Метгемоглобину (metHb) отводят роль ведущего соединения в модификации сродства гемоглобина к кислороду [14]. Во всех сериях исследования наблюдался прирост количества metHb относительно контроля, однако эффект его присутствия был различен. Это позволяет предполагать наличие других модификаций гемоглоби-

на, обусловленных ONOO^- . Одно- или двухэлектронное окисление гемоглобина до мет- или оксоферрильной ($\text{HbFe}^{4+} = \text{O}$) формы зависит от pH и pCO_2 [21]. Малые, физиологические, количества CO_2 препятствуют переходу $\text{HbFe}^{4+} = \text{O}$ в мет-форму [13], что, вполне вероятно, имело место в эксперименте с гипокапнией.

При физиологических значениях pH *in vivo* в реакции ONOO^- с тиолами происходит образование S-нитрозосоединений, с образованием которых связывают регуляторное и цитопротекторное действие низких концентраций ONOO^- [1, 5, 7]. Также возможным механизмом модификации аминокислот гемоглобина является нитрование его тирозиновых остатков. Основными факторами, усиливающими нитрование, является наличие структурных групп с металлами переходной валентности, а также достаточно высокая концентрация CO_2 [21]. Введение группы NO_2 в тирозин может повлиять на конформацию белка, нарушить его функцию или ингибировать фосфорилирование [5, 24]. Однако для нарушения его функции требуется модификация большей части критических аминокислот [9, 24]. Альтернативой может быть нитрование отдельных специфических тирозиновых остатков, приводящее к изменению активности протеина или интенсификации передачи физиологического сигнала [16, 24]. Например, фибриноген с нитрованным тирозином усиливает образование тромба, протеинкиназа С ϵ активируется нитрованием [24]. Вполне вероятно, что модификация пероксинитритом гема или аминокислотных остатков гемоглобина (нитрование, окисление или нитрозилирование) также может иметь свое проявление в изменении кислородсвязывающих свойств белка.

Использование пероксинитрита, синтезированного из азота натрия, не вызывало изменений p50 стандартного, несмотря на повышение суммарного количества нитритов в эритроцитах, которое свидетельствует о внутриклеточном поступлении ONOO^- . Влияние пероксинитрита, синтезированного из H_2O_2 и нитрита (NO_2^-), обусловлено дополнительным воздействием непрореагировавших компонентов реакционной смеси. Известно, что из смеси $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NO}_2^-$ в присутствии металлоконтактирующих белков возможно образование пероксинитрита. Так, при добавлении к гемоглобину $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NO}_2^-$ обнаруживается увеличение количества нитрованного тирозина [11]. Данный механизм образования ONOO^- и модификации гемоглобина вполне допустим к условиям *in vivo*, так как эритроциты содержат достаточное количество нитрита и там же происходит образование пероксида водорода (например, в результате дисмутации супeroxид аниона СОД).

В опытах *in vitro* было показано, что пероксинитрит изменяет ионную проницаемость, увеличивает ригидность мембраны эритроцитов, вызывает реорганизацию цитоскелета клетки [27], модулирует метаболизм глюкозы [17, 18] и снижает содержание АТФ [20]. Изменение последних параметров может иметь эффект в отношении деформируемости эритроцитов и кислородсвязывающих свойств гемоглобина, что в итоге влияет на количество потребляемого тканями кислорода [22].

Полученные результаты позволяют предполагать, что пероксинитрит является регулятором свойств гемоглобина, действие которого зависит от напряжения углекислого газа. Повышение pCO_2 на фоне введения ONOO^- смещает кривую диссоциации оксигемоглобина влево. Данный механизм может иметь определенное физиологическое значение. В условиях гиперкапнии, когда происходит снижение сродства гемоглобина к кислороду, пероксинитрит производит противоположный эффект, способствуя насыщению такой крови кислородом в легких. В капиллярах большого круга кровообращения ONOO^- по принципу отрицательной обратной связи уменьшает поток кислорода к тканям и снижает в итоге процессы генерации кислородных свободных радикалов, сохраняя при этом кислородный резерв крови. На фоне более низкого pCO_2 , равного 40 мм рт. ст., ONOO^- оказывает противоположное действие, облегчая отдачу тканям кислорода, активизируя тканевой метаболизм.

Таким образом, пероксинитрит можно рассматривать как компонент системы регуляции кислородсвязывающих свойств крови. Результат действия этого фактора

в отношение сродства гемоглобина к кислороду оказывается разнонаправленным и зависимым, предположительно от напряжения углекислого газа, что 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Дмитренко Н. П., Холиан А. Роль взаимодействия путей метаболизма формальдегида и оксида азота в механизме их токсического действия. 2. Токсическое действие оксида азота. Укр. біохім. журн. 77 (15) : 5—23. 2005.
- [2] Зинчук В. В. Участие оксида азота в формировании кислородсвязывающих свойств гемоглобина. Успехи физiol. наук. 34 (2) : 33—45. 2003.
- [3] Зинчук В. В., Степуро Т. Л. Действие пероксинитрита на сродство гемоглобина к кислороду *in vitro*. Биофизика. 51 (1) : 32—39. 2006.
- [4] Зинчук В. В., Шульга Е. В., Гуляй И. Э. Влияние эритропоэтина на кислородтранспортную функцию крови и прооксидантно-антиоксидантное состояние у кроликов при введении липополисахарида. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 96 (1) : 43—49. 2010.
- [5] Abello N., Kerstjens H. A., Postma D. S., Bischoff R. Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins. J. Proteome. Res. 8 (7) : 3222—3238. 2009.
- [6] Beckman J. S. Understanding peroxynitrite biochemistry and its potential for treating human diseases. Arch. Biochem. Biophys. 484 (2) : 114—116. 2009.
- [7] Blum Ia. B., Krasylenko Iu. A., Iemets' A. I. Tyrosine nitration as regulatory post-translational modification of proteins. Ukr. Biokhim. Zh. 81 (5) : 5—15. 2009.
- [8] Dean J. B. Hypercapnia causes cellular oxidation and nitrosation in addition to acidosis: implications for CO_2 chemoreceptor function and dysfunction. J. Appl. Physiol. 108 (6) : 1786—1795. 2010.
- [9] Ferrer-Sueta G., Radi R. Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. ACS Chem. Biol. 4 (3) : 161—177. 2009.
- [10] Gebicka L., Didik J. Oxidative stress induced by peroxynitrite. Postepy Biochem. 56 (2) : 103—106. 2010.
- [11] Grzelak A., Balcerzyk A., Mateja A., Bartosz G. Hemoglobin can nitrate itself and other proteins. Biochim. Biophys. Acta. 1528 (2—3) : 97—100. 2001.
- [12] Herold S., Fago A. Reactions of peroxynitrite with globin proteins and their possible physiological role. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 142 (2) : 124—129. 2005.
- [13] Herold S., Shivasankar K. Metmyoglobin and methemoglobin catalyze the isomerization of peroxynitrite to nitrate. Biochemistry. 42 : 14 036—14 046. 2003.
- [14] Hrinchenko B. W., Alayash A. I., Wink D. A., Gladwin M. T., Rodgers G. P., Schechter A. N. Effect of nitric oxide and nitric oxide donors on red blood cell oxygen transport. Br. J. Haematol. 110 : 412—419. 2000.
- [15] Koppelen W. H., Kissner R., Beckman J. S. Syntheses of peroxynitrite: to go with the flow or on solid grounds? Methods Enzymol. 269 : 296—302. 1996.
- [16] Liaudet L., Vassalli G., Pacher P. Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways. Front. Biosci. 1 (14) : 4809—4814. 2009.
- [17] Metere A., Iorio E., Pietraforte D., Podo F., Minetti M. Peroxynitrite signaling in human erythrocytes: synergistic role of hemoglobin oxidation and band 3 tyrosine phosphorylation. Arch. Biochem. Biophys. 484 (2) : 173—182. 2009.
- [18] Minetti M., Pietraforte D., Straface E., Metere A., Matarrese P., Malorni W. Red blood cells as a model to differentiate between direct and indirect oxidation pathways of peroxynitrite. Methods Enzymol. 440 : 253—272. 2008.
- [19] Nossaman B. D., Kadowitz P. J. Potential benefits of peroxynitrite. Open Pharmacol. J. 2 : 31—53. 2008.
- [20] Pietraforte D., Matarrese P., Straface E., Gambardella L., Metere A., Scorza G., Leto T. L., Malorni W., Minetti M. Two different pathways are involved in peroxynitrite-induced senescence and apoptosis of human erythrocytes. Free Rad. Biol. Med. 42 (2) : 202—214. 2007.

- [21] Pietraforte D., Salzano A. M., Marino G., Minetti M. Peroxynitrite-dependent modifications of tyrosine residues in hemoglobin. Formation of tyrosyl radical(s) and 3-nitrotyrosine. *Amino Acids.* 25 (3—4) : 341—350. 2003.
- [22] 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.* 29 : 170—176. 2009.
- [23] Pryor W. A., Cueto R., Jin X., Koppenol W. H., Ngu-Schweinlein M., Squadrito G. L., Uppu P. L., Uppu R. M. A practical method for preparing peroxynitrite solutions of low ionic strength and free of hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* 18 (1) : 75—83. 1995.
- [24] Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *PNAS.* 101 (12) : 4003—4008. 2004.
- [25] Romero N., Denicola A., Souza J. M., Radi R. Diffusion of peroxynitrite in the presence of carbon dioxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 368 (1) : 23—30. 1999.
- [26] Schulz K., Kerber S., Kelm M. Reevaluation of the Griess method for determining $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ in aqueous and protein-containing samples. *Nitric Oxide.* 3 (3) : 225—234. 1999.
- [27] Starodubtseva M. N., Tattersall A. L., Kuznetsova T. G., Yegorenkov N. I., Ellory J. C. Structural and functional changes in the membrane and membrane skeleton of red blood cells induced by peroxynitrite. *Bioelectrochemistry.* 73 (2) : 155—162. 2008.
- [28] 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.

Поступила 28 IV 2011