Biol. Stud. 2010: 4(1); 143–160 • DOI: https://doi.org/10.30970/sbi.0401.080
www.http://publications.lnu.edu.ua/journals/index.php/biology

УДК 616.1551-008: 612.124.4

МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ДЕПОНУВАННЯ ОКСИДУ АЗОТУ В ЕРИТРОЦИТАХ

Н. О. Сибірна, М. Я. Люта, Н. І. Климишин

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail:sybirna_natalia.yahoo.com

На основі літературних і власних експериментальних даних проведено аналіз та узагальнення сучасних уявлень про молекулярні механізми утворення, метаболізму й депонування оксиду азоту. Описано ферментативний і неферментативний шляхи біосинтезу NO, ключові ензими циклу оксиду азоту та регуляцію їхньої активності. Детально розглянуто роль еритроцитів у депонуванні NO, біологічні функції нітрозильних комплексів гемоглобіну.

В огляді наведені результати власних досліджень нітрозування/нітрозилювання дезоксигемоглобіну у системі *in vitro*, охарактеризовано зміни в електронних спектрах дезокси- та нітрозилгемоглобіну за умов експериметального цукрового діабету. Обґрунтовано доцільність і перспективність подальшого вивчення модифікації білків організму продуктами метаболізму NO для пошуку шляхів корекції та діагностики патологій різної етіології.

Ключові слова: еритроцит, оксид азоту, нітрозильні комплекси гемоглобіну.

ВСТУП

У 1998 р. група вчених на чолі з Р. Фуршготтом отримала Нобелівську премію за вивчення ефектів оксиду азоту (NO) у кровоносних судинах. З того часу список функцій, які виконує оксид азоту, значно розширився. Як внутрішньоклітинний і міжклітинний месенджер NO бере участь у регуляції низки метаболічних реакцій, чим сприяє нормальному функціонуванню організму. NO має широке коло біологічних властивостей і задіяний у регуляції кровоплину, нейротрансмісії, механізмах антимікробного захисту й імуномодуляції, посттрансляційній модифікації біомолекул. Оксид азоту також відіграє важливу роль у синаптичній передачі нервового імпульсу, регуляції кровопостачання шлункового тракту, секреції інсуліну, розвитку діабету тощо [16, 17, 37]. Індукований синтез NO відіграє важливу роль у функціонуванні гепатоцитів і захищає печінку від септичної та ішемічної реперфузії. NO проявляє протекторну дію завдяки його здатності перешкоджати інтраваскулярним тромбозам шляхом інгібування адгезії тромбоцитів і нейтралізації токсичних радикалів

оксигену. Оксид азоту виконує як прозапальну, так і протизапальну роль. Він виявляє регуляторну дію *in vivo* та *in vitro* на процеси генетично запрограмованої смерті клітин, блокуючи TNF-α-індукований апоптоз, який запускає каспазозалежний механізм клітинної загибелі [58]. Дослідження різноманітних аспектів біологічної дії оксиду азоту не втрачають своєї актуальності і є надзвичайно перспективними.

За одних умов оксид азоту має протекторну дію, за інших – сприяє формуванню патологічних процесів. Такі різноспрямовані ефекти цієї молекули визначаються як хімічними властивостями, так і її концентрацією, характером обмінних процесів у тканинах тощо [5].

Цей огляд присвячений аналізові літературних і власних експериментальних даних, що узагальнюють сучасні уявлення про молекулярні механізми утворення, метаболізму та депонування оксиду азоту.

Шляхи утворення та метаболізму оксиду азоту

Механізм біосинтезу NO з L-аргініну вперше з'ясовано у 1987 р. *In vivo* NO утворюється ензиматичним або неензиматичним шляхами. Неензиматично нітрат або нітрит відновлюється до оксиду азоту, що може відбуватися як диспропорціонування нітриту або азотистої кислоти. Такий механізм утворення NO спостерігається при патологічних станах, для яких характерним є зниження pH середовища [8]:

$$NO_2^- + H^+ \leftrightarrow HNO_2;$$
$$NO_2^- + HNO_2 \leftrightarrow N_2O_3 + OH^-;$$
$$N_2O_3 \leftrightarrow NO_2 + NO.$$

Пряме відновлення нітриту/нітрату до NO відбувається за присутності гемових білків при нейтральних значеннях pH.

Ферментативне утворення NO в організмі людини та тварин з амінокислоти L-аргініну відбувається під дією P-450-подібних гемопротеїнів – NO-синтаз (NOS). Відомі три ізоформи цього ферменту, які відрізняються локалізацією в організмі та способом активації і кодуються різними генами: ендотеліальна NOS (eNOS), нейрональна NOS (nNOS), індуцибельна NOS (iNOS). Для роботи NOS необхідні: кисень, НАДФН(H^+), гем, кальмодулін, тетрагідробіоптерин, ФАД, ФМН.

Сумарне рівняння каталізованої NOS реакції включає 5-електронне окиснення атому азоту в L-аргініні, поєднане з окисненням НАДФН(H^+), і виглядає так:

$$2\text{L-аргінін} + 3\text{НАДФН} + 3H^+ + 4O_2 \rightarrow 2\text{L-цитрулін} + 2NO + 3\text{НАДФ}^+ + 4H_2O \text{ [4].}$$

Відповідно до концепції циклу оксиду азоту у клітинах тварин наявні два шляхи утворення оксиду азоту – NO-синтазний і нітрит/нітратредуктазний [10, 53] (рис.1).

NO-синтазний ендогенний шлях синтезу NO відбувається шляхом ферментативного окиснення L-аргініну у присутності кисню. У нітритредуктазній реакції утворений NO_2^- відновлюється до оксиду азоту ($NO_2^- + e \rightarrow NO$). Відновленням нітрату і нітриту до NO завершується цикл оксиду азоту:

$$NO\ (NO^{\bullet}) \rightarrow NO_2^- / NO_3^- \rightarrow NO + \text{продукти відновлення}$$

Біоактивність NO лімітується його швидким окисненням до нітриту або нітрату. Завдяки взаємодії з гемвмісними білками, оксид азоту може окиснюватися до нітрату (NO_3^-). У людському організмі нітрат відновлюється до нітриту бактеріями

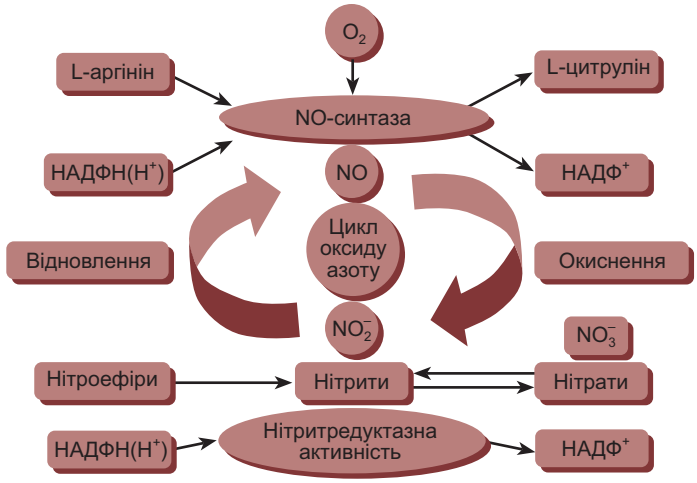

Рис. 1. Цикл оксиду азоту
Fig. 1. Nitrogen oxide cycle

у черевній порожнині, а також ксантиноксидазою і, можливо, іншими ферментами у тканинах [44, 45]. Невелика кількість оксиду азоту відновлюється до N_2O, з якого утворюються інші оксиди. NO може вступати у реакції з вільними радикалами, зокрема, з $O_2^{\bullet -}$, $OH^{\bullet}$. Так, у реакції з гідроксильним радикалом утворюється нітрит ($NO + OH^{\bullet} \rightarrow HNO_2 \leftrightarrow NO_2^- + H^+$) (рис.2).

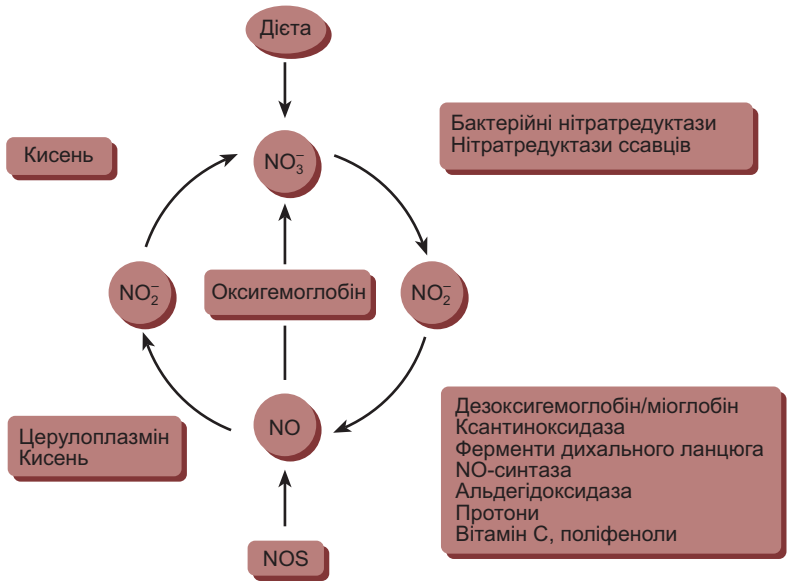

Рис. 2. Цикл оксиду азоту для ссавців
Fig. 2. Mammalian nitrogen oxide cycle

Іони NO_2^- взаємодіють з дезоксигемоглобіном з утворенням його окисненої форми – метгемоглобіну (Met*Hb*).

У ході цієї реакції іони NO_2^- відновлюються до NO:

$$Hb^{2+} + NO_2^- + 2H^+ \rightarrow \text{Met}Hb + NO$$

При взаємодії з відновленим гемоглобіном NO утворює стабільні комплекси:

$$Hb^{2+} + NO \rightarrow NOHb$$

Цитотоксична дія оксиду азоту значно зростає завдяки його взаємодії з супероксид-аніон радикалом і генерації пероксинітриту ($ONOO^-$), який швидко руйнується у кислому середовищі з утворенням нітрат-аніона, гідроксильного радикала і радикала діоксиду азоту:

$$NO^\bullet + O_2^{\bullet-} \rightarrow ONOO^- + H^+ \leftrightarrow HOONO \rightarrow NO_2^- + H^+ + OH^\bullet + NO_2^\bullet$$

У клітинах $ONOO^-$ функціонує як окиснювач білків, вітамінів, ДНК. Цитотоксичну дію також проявляє гідроксильний радикал.

Пероксинітрит вступає у реакції з тіолами з утворенням тіонітритів ($RS^- + ONOO^- \rightarrow RSNO + HOO^-$), які можуть знову перетворюватися в оксид азоту [44, 46]. У крові і тканинах нітрит може далі метаболізувати до NO й інших біологічно активних оксидів нітрогену. Таке відновлення каталізується різними ензиматичними і неензиматичними шляхами, більшість із яких посилюється при гіпоксії.

До основних реактивних форм оксиду азоту належить також діазотріоксид (N_2O_3), який утворюється при автоокисненні оксиду азоту за участю кисню.

Продукти перетворення оксиду азоту також володіють біологічною активністю.

У людини нітрит-аніон довший час розглядався як стабільний інтермедіат при окисненні радикалів оксиду азоту до нітрату. Це поступове окиснення вважалося незворотним при фізіологічних станах організму. Однак чимало експериментальних робіт свідчить, що наявність ендогенного нітриту регулює численні сигнальні шляхи та події при фізіологічних і патологічних станах, а також за різного парціального тиску кисню. При передачі різних сигналів за умов гіпоксії відбувається зміна просвіту судин, модуляція мітохондріального дихання, що не допускає розвитку ішемічного інсульту. Ці явища віднесли до відновлення нітрит-аніонів до оксиду азоту за умов зниження локального рівня оксигену у тканинах [60]. Нітрит-аніон також включається у реакції нітрування, які переважно характерні для таких патологічних процесів, як запалення, атеросклероз тощо. Зокрема, є дані про ендогенне утворення нітрованих ненасичених жирних кислот, які опосередковують адаптивні й антизапальні реакції [44, 62]. Таким чином, дослідження вказують на значення нітриту як відносно стабільного депо біоактивного NO. При гіпоксичних станах, коли зменшується функція NOS, відновлення нітриту може сприяти збереженню його пулу для підтримання NO сигналінгу протягом метаболічного стресу.

Неорганічний нітрит (NO_2^-) є регулятором фізіологічних функцій і відповіді тканин на ішемію, тоді як більш стабільний нітрат-аніон (NO_3^-) вважається біологічно інертним. Проте ендогенний нітрат залучений до регуляції гомеостазу нітриту й оксиду азоту. Бактерії експресують нітратредуктази, що продукують нітрит, але у ссавців ці ферменти відсутні. Експериментально показано, що тканини ссавців відновлюють нітрат до нітриту і потім до оксиду азоту за участі ксантиноксидази [34].

Незважаючи на те, що нітрит є важливою формою запасання і джерелом NO в організмі, залишалися нез'ясованими механізми, локалізація і значення альтер-

нативних шляхів нітрит-залежного утворення NO у біологічних системах. Показано, що нітрит запускає утворення великої кількості NO в серці та печінці, але лише слідові кількості у крові. Після введення інгібітора ксантиноксидази оксипуринолу або інгібітора альдегідоксидази ралоксифену суттєво знижується утворення оксиду азоту з нітриту в серці та печінці, а зменшення pH і парціального тиску кисню спричинює його зростання. Таким чином, у тканинах ссавців виявлена нітритредуктазна активність, яка не залежить від гемоглобіну (*Hb*), а забезпечується ксантиноксидазою і альдегідоксидазою [42].

Експериментально показано наявність складних шляхів регуляції NO-синтазної активності. Припускають, що нейрональна NOS зазнає автоінгібування такими ендогенно генерованими молекулами, як NO або прекурсор NO (нітроксил-аніон – NO^-) [40]. Генерований NO^- перетворюється в NO за участі супероксиддисмутази (СОД), розкладається до N_2O або реагує з киснем з утворенням $ONOO^-$ (рис.3).

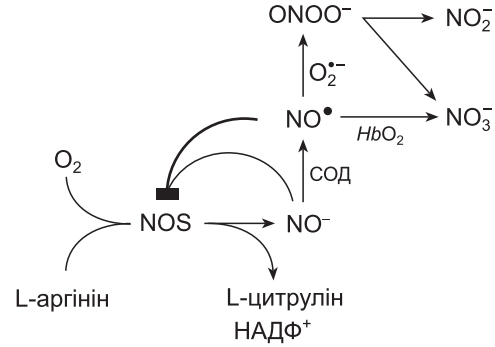

Рис. 3. Автоінгібування NOS протягом першої фази каталізу
Fig. 3. Autoinhibition of NOS during first phase of catalysis

Останній може також утворюватися з NO в реакції з $O_2^{\bullet-}$, але в цьому випадку його концентрація недостатня для інгібування ферментативної функції. Встановлено, що всі активні форми NO і продукти NOS інгібують функціональну активність ферменту протягом каталізу. На противагу цьому, NO_2^-, NO_3^-, L-цитрулін і $НАДФ^+$ є у цьому сенсі неефективними. Через 15 хв інкубації та переходу до 2-ї фази каталізу NOS інактивується H_2O_2. Каталаза, руйнуючи H_2O_2, стабілізує NOS (рис.4.)

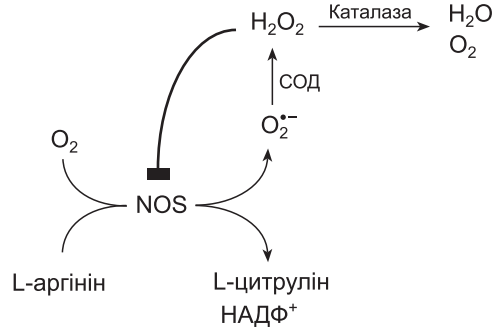

Рис. 4. Автоінгібування NOS протягом другої фази каталізу
Fig. 4. Autoinhibition of NOS during second phase of catalysis

В утворенні NO беруть участь не лише конститутивні й індуцибельні NOS. Вважають, що в умовах нестачі кисню інгібується NO-синтазний компонент циклу оксиду азоту і зростає активність нітритредуктазної системи, пов'язаної з гемвмісними

білками – *Hb*, міоглобіном, цитохромоксидазою та цитохромом Р-450, які здатні в дезоксиформі відновлювати нітрити в NO [12]. В еритроцитах нітритредуктазна реакція каталізується електрондонорними системами за участю НАДН(H^+), НАДФН(H^+), флавопротеїнів і дезоксигемоглобіну (RHb). Особлива роль у відновленні нітрит-іонів крові належить Hb, і лише R*Hb* відновлює нітрит/нітрат-аніони до оксиду азоту. Завдяки наявності порфіринового кільця у гемвмісних білках, вони мають систему спряжених зв'язків і делокалізовані рухливі π-електрони та можуть легко віддавати і приймати електрони, а, отже, вступати в окисно-відновні реакції [7, 10, 11]. Родина нітрит-відновлювальних білків розширилася завдяки нейроглобінові – мономерному гемовому білку, який специфічно експресується у мозку. Вважають, що експресія цього білка асоціює з цитопротекторними ефектами при ішемії мозку [44, 46].

Як уже зазначалося, NO залучений як у фізіологічну регуляцію, так і до багатьох патофізіологічних процесів. Доведено, що активність NOS змінюється при експериментальному цукровому діабеті, артеріальній гіпертензії, гіпоксії [1, 3, 13, 20]. Як надлишок, так і нестача NO відіграють значну роль у патогенезі багатьох захворювань [1, 13, 29].

Наявність різних ізоформ NOS, їхня просторова розділеність, неоднакова активність, а також можливість синтезу оксиду азоту не лише із L-аргініну, а й із нітрит- і нітрат-іонів свідчать про складний характер впливу цієї фізіологічно-активної сполуки на числені функції в організмі людини і тварин.

У судинній системі NO синтезується за участю eNOS [32, 49]. У клітинах ендотелію кровоносних судин оксид азоту активує розчинний фермент – гуанілатциклазу з утворенням циклічного гуанозинмонофосфату, який задіяний у процесах перерозподілу внутрішньоклітинного та позаклітинного вмісту іонів Ca^+. Після вивільнення NO з ендотелію він може дифундувати у клітини гладеньких м'язів, призводячи до вазодилатації.

Показано, що NO, який вивільняється з ендотеліальних клітин, дифундує перш за все не в периферичні тканини, а у кров [7], де він взаємодіє з оксигемоглобіном еритроцитів (*Hb*O_2), з утворенням нітрат-аніону та Met*Hb*, а частина відновленого NO окиснюється до нітриту [36, 61]. Окиснювальний процес перетворення *Hb*O_2 в Met*Hb* під дією нітрит-іонів спряжений зі синтезом NO. У перенесенні електронів на гемвмісні білки задіяні як ферментні, так і неферментні системи (зокрема, Met*Hb*-редуктазна активність), а також електронно-транспортні ланцюги мітохондрій і ендоплазматичного ретикулуму. Ці ферментні системи, як відомо, переносять електрони від НАДФН(H^+) або НАДН(H^+) через флавопротеїни на гемвмісні білки [31].

За винятком пероксинітриту, метаболіти оксиду азоту можуть за певних умов виділяти NO у вільному вигляді, і, таким чином, бути його депо. Далі будуть розглянуті біологічна роль нітрозильних комплексів гемоглобіну та механізми депонування NO еритроцитами.

Еритроцит як внутрішньоклітинне депо оксиду азоту в організмі людини

Відомо, що еритроцити є донорами не лише O_2, але й NO для більшості клітин, і можуть виконувати важливу роль у забезпеченні вазодилатації у нормі та при патологіях. *Hb* еритроцитів може слугувати транспортером „корисного" NO від місць його утворення до біологічних мішеней [1].

Відкриття в еритроцитах власного синтезу NO поставило нову низку питань щодо ролі цього низькомолекулярного регулятора у функціонуванні еритроцитів.

Молекула головного білка еритроцитів – гемоглобіну – складається з чотирьох субодиниць (двох α- та двох β-субодиниць), які містять відповідно по 141 і 146 амінокислотних залишків, специфічно вкладених навколо плоского залізовмісного кільця гема – феропротопорфірину. У центрі гема міститься іон Fe^{2+}, який утворює чотири зв'язки з атомами нітрогену пірольних кілець: два ковалентні і два донорно-акцепторні. Оскільки координаційне число Fe^{2+} – шість, то два інші зв'язки розташовані перпендикулярно до площини кільця протопорфірину. Один із них утворює зв'язок із глобіном через атом нітрогену проксимального гістидину (His F8). З протилежного боку від атома заліза на значно більшій відстані розміщений дистальний гістидин (His E7). Ділянка між дистальним гістидином і залізом є вільною і може бути зайнята ліпофільною молекулою ліганду у шостому координаційному положенні атома заліза. Залежно від типу ліганду (O_2, CO, NO, H_2S), відповідно, утворюються оксигемоглобін (*Hb*O_2), карбоксигемоглобін (*Hb*CO), нітрозилгемоглобін (NO*Hb*) та сульфгемоглобін (S*Hb*) [2, 6]. Вивчення взаємодії гемоглобіну з NO є надзвичайно актуальною проблемою, оскільки оксид азоту вищу високу спорідненість до гемової групи дезоксигемоглобіну, ніж O_2 та CO. Це дає змогу припускати його конкурування з киснем за відповідні ділянки на молекулах частково оксигенованого гемоглобіну [63]. Взаємодія NO з гемоглобіном в еритроцитах важлива для регуляції цих обох молекул *in vivo*.

У цільній крові швидкість перетворення NO в нітрат-аніон є вищою, ніж у плазмі, що підтверджує активну участь формених елементів крові в метаболізмі оксиду азоту [43, 64].

NO проникає крізь клітинну мембрану за допомогою спеціального переносника білка AE1 або аніон-обмінника. Проникність еритроцитарної мембрани для NO порівняно невисока, що впливає на його біодоступність і взаємодію оксиду азоту з гемоглобіном [63]. Припускають існування цитоскелетного бар'єру для дифузії NO, який реалізується через спеціальні міжбілкові пори в еритроцитарній мембрані, стан деяких регулюється і, відповідно, змінює вхід NO [47]. Швидкість реакції гемоглобіну з NO, який міститься в еритроцитах, у 800 разів менша, ніж з еквівалентною кількістю вільного гемоглобіну [51]. В артеріальній крові NO в реакції з *Hb*O_2 утворює нітрат та Met*Hb*, а у венозній – нітрозилгемоглобін (NO*Hb*), який здатний при високих значеннях парціального тиску O_2 розпадатися з вивільненням молекули NO, яка окиснюється у присутності кисню до NO_3^- [7].

Встановлено, що нітрит-аніони потенційно можуть бути найбільшим внутрішньосудинним депо NO в організмі людини і здатні переносити NO від місць його формування до місця прояву його біоактивності [21].

Рівень нітрит-іонів часто використовують як показник активності NOS *in vivo* [38,41]. Незважаючи на зростаючий інтерес до ролі нітрит-іонів за фізіологічних умов і як маркера різних захворювань, вимірювання рівня циркулюючого нітрит-іона ускладнено через його відносну нестабільність у крові. Тому в літературі наведено різні значення вмісту нітрит-аніона – в межах від невизначених до 20 мкмоль/л [27, 38, 48]. Нітрит-аніон, як і NO, взаємодіє з оксигемоглобіном еритроцитів, формуючи нітрат-аніон і Met*Hb* [39]. Проте нітрат взаємодіє також із R*Hb* з утворенням NO і Met*Hb* [24]. Ця реакція є важливою в еритроцит-залежній гіпоксичній вазодилатації [21, 31]. На думку деяких авторів, еритроцит може бути додатковим резервуаром для нітрит-аніонів [23].

Оксид азоту взаємодіє з O_2, формуючи різні окислені продукти [25]. Це створює певні труднощі у прямому вимірюванні рівня NO в крові [59]. Поряд із тим,

вважається, що вміст одного з оксидативних продуктів NO у крові – нітрит-аніона – є пропорційним відображенням загального ендотеліального синтезу NO [23]. Встановлено, що у людини та інших ссавців близько 90% циркулюючого нітриту-аніона плазми походить від NOS-активності [54]. Lauer і співробітники показали, що рівень нітрит-аніонів плазми відображає зміни локальної NOS-активності [41].

Вміст нітрит-іонів як показника NOS-активності може характеризувати метаболізм NO *in vitro* та *in vivo* [22, 28]. Відомо, що нітрит-аніон швидко потрапляє в еритроцити з плазми та взаємодіє з *Hb*, утворюючи нітрат-аніон. Проте тільки частина внутрішньосудинного нітрату походить від NOS-залежних шляхів. Таким чином, перетворення нітрит-аніона у нітрат-аніон не може бути показником змін NOS-активності.

Рівень нітрит-аніонів плазми також широко використовують як показник NOS-активності *in vivo*; проте необхідність швидкої обробки крові після її забору створює значні перешкоди у визначенні нітрит-іонів плазми у клінічній практиці. Більше того, неможливо оцінити зміни рівня цього аніона всередині еритроцитів. Вирішити цю проблему вдалося з використанням фериціанідної гемоглобін-оксидативної проби, що стабілізує нітрит-аніони у лізованій крові й еритроцитах [23]. Принцип методу полягає в тому, що фериціанід взаємодіє із *Hb*, формуючи Met*Hb* (Fe-2^{+}-*Hb* + фериціанід $\rightarrow$ Fe-3^{+}-*Hb* + фериціанід) [52]. На відміну від *Hb*, Met*Hb* не взаємодіє з нітрит-аніоном, з формуванням нітрату та не відновлює нітрит-іон до NO. Оскільки реакція *Hb* із нітрит-іоном відображає основний механізм їхньої деградації, додавання фериціаніду стабілізує нітрит-іони у крові загалом. Експериментально встановлено, що зазначений метод вимірювання вмісту нітрит-іонів у крові є чутливим, а результати досліджень – лінійними і відтворювальними [23].

Зокрема, показано, що у здорових людей приблизно 2/3 внутрішньосудинного нітрит-іона локалізовано в еритроцитах і більшість NO_2^- еритроцитів міститься в цитоплазмі. У цих людей рівень нітрит-іонів в еритроцитах становить 300 нмоль/л [19]. Встановлено також артеріовенозний градієнт для нітрит-іонів крові й еритроцитів [26]. Співвідношення концентрації нітрит-іонів у еритроцитах до концентрації нітрит-іонів у плазмі становить 0,7, і його рівень у крові загалом відображає підвищення активності NOS, спричиненої введенням ацетилхоліну та стресом *in vivo* [23].

На думку деяких дослідників, нітрит-іони є внутрішньосудинним депо оксиду азоту, а *Hb* діє як нітритредуктаза, здійснюючи внесок в еритроцит-залежну гіпоксичну вазодилатацію [21, 31]. Еритроцити можуть бути резервуаром для внутрішньосудинного нітрит-іона. На рівень нітрит-іонів також впливають наявність нітрат-іонів у раціоні та системні запальні процеси [28, 44].

Отже, NO може дифундувати в еритроцити, взаємодіючи із *Hb*O_2, формуючи при цьому нітрат і Met*Hb* (рис.5). При взаємодії NO із R*Hb* утворюється NO*Hb*. Внутрішньоеритроцитарний NO*Hb* може розщеплюватися, вивільнюючи NO з еритроцита [30]. S-нітрозогемоглобін (SNO*Hb*) також може бути біологічним джерелом NO [35].

Нітрит-іони, утворені у плазмі внаслідок окиснення внутрішньосудинного NO, можуть зворотно дифундувати в еритроцити, взаємодіяти з Hb та піддаватися окиснювальним і відновлювальним реакціям. Подібно до NO, внутрішньоеритроцитарний нітрит-іон взаємодіє із *Hb*O_2, утворюючи Met*Hb* і нітрат [39]. Реакція нітрит-іонів із R*Hb* формує NO або інші інтермедіати NO з біологічною активністю [21, 31, 50].

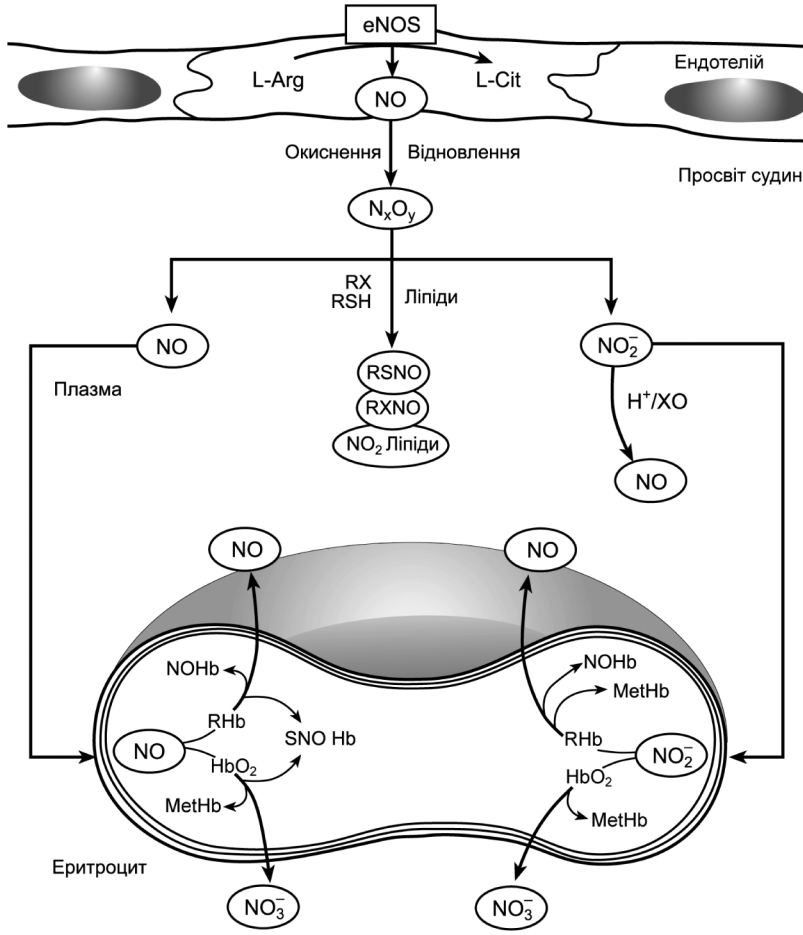

Рис. 5. Шляхи метаболізму оксиду азоту в еритроциті: L-Arg – L-аргінін; L-Cit – L-цитрулін; eNOS – ендотеліальна NO-синтаза; R*Hb* – дезоксигемоглобін; *Hb*O_2 – оксигемоглобін; NO*Hb* – нітрозилгемоглобін; Met*Hb* – метгемоглобін; SNO*Hb* – нітрозогемоглобін; NO_2-ліпіди – нітратні ліпіди; RSNO, RXNO – нітрозильовані білки

Fig. 5. Nitric oxide metabolic pathway in the erythrocyte: L-Arg – L-arginine, L-Cit – L-citrulline, eNOS – endothelial NO-synthase, R*Hb* – deoxyhemoglobin, *Hb*O_2 – oxyhemoglobin, NO*Hb* – nitrosylhemoglobin, Met*Hb* – methemoglobin, SNO*Hb* – nitrosohemoglobin, NO_2-ліпіди – nitrated lipids, RXNO – nitrosylated proteins

Ці реакції в еритроцитах є важливими модуляторами внутрішньосудинної NO-біоактивності, особливо за фізіологічної гіпоксії. Крім NO та нітрит-іонів, еритроцити містять ще кілька вазодилататорів – нітрозильовані білки, нітратні ліпіди, АТФ [18, 33, 35].

Біологічна роль нітрозильних комплексів гемоглобіну

NO бере участь практично у всіх процесах, які відбуваються в організмі. Для вільного NO характерний невеликий час життя (приблизно від 100 мс до кількох секунд у плазмі крові) та незначна відстань, на яку він дифундує від місця утворення

і проявляє свою біоактивність [8]. Основним депо оксиду азоту є внутрішньоклітинні комплекси, зокрема, динітрозильні залізосіркові комплекси, в утворенні яких задіяні тіолові групи білків або низькомолекулярних тіолів. Згадані NO-комплекси за фізіологічною активністю подібні до ендотеліального фактора розслаблення судин (EDRF, endothelium-derived relaxing factor) [8]. Оксид азоту може вивільнятися із ендотеліальних клітин у формі динітрозильних залізосіркових комплексів. Такі низькомолекулярні тіоли, як цистеїн або глутатіон, конкурують із тіоловими групами білків за їхнє утворення.

Депонування NO відбувається за умов підвищення його рівня в організмі. Це може бути наслідком як посилення синтезу ендогенного оксиду азоту, так і введення екзогенного NO. Посилення синтезу NO спостерігається за багатьох патологій, що сприяє формуванню адаптаційних процесів у живому організмі. Однак при надлишковій продукції NO втрачає свої захисні функції та виявляє вазодепресивну і цитотоксичну дію. Тому при надсинтезі NO його депонування зростає, а за умов нестачі – зменшується. Це може розглядатись як один із адаптаційних механізмів, пов'язаних зі зміною продукування оксиду азоту.

Депо NO, з одного боку, забезпечує захист від токсичної дії вільного NO за умов його гіперпродукції, а з іншого боку – може виконувати функції додаткового джерела оксиду азоту при його дефіциті. Ефективність депонування NO детермінована генетично і відповідає вродженому рівню продукції NO в організмі [63].

Можливість скерованого модулювання процесу утворення і розпаду депо NO є перспективним напрямом досліджень з метою виявлення етіології багатьох патологічних станів і методів їх корекції.

Особливо актуальним є створення медичних препаратів, які б могли конкурувати в організмі за зв'язування NO з гемоглобіном, білками, що містять негемове залізо, а також парні SH-групи і низькомолекулярні залізотіолові комплекси. Зокрема, у роботі Дмитренко [5] такі препарати використовували на моделі нітритного навантаження щурів. Це нітоксидел, диетилдитіокарбамат-Fe^{2+}, які конкурують з гемоглобіном за зв'язування NO та сприяють його виведенню з організму.

Тривалий час вважали, що основною реакцією NO з оксигемоглобіном, який становить головну фракцію *Hb* артеріальної (~90%) та венозної крові (70%), є реакція утворення нітрат-іона:

$$HbO_2 + NO \rightarrow MetHb + NO_3^-.$$

Пізніше було встановлено ділянку у глобіновому ланцюзі гемоглобіну, в якій NO зв'язується у формі S-нітрозотіолу, а саме S-нітрозогемоглобіну. Мас-спектрометричний і кристалографічний аналіз дав змогу ідентифікувати β^{93}-цистеїн як місце зв'язування NO з гемоглобіном [64]. При значних концентраціях нітрозотіолів *in vitro* утворюються й інші форми SNO*Hb*, в яких нітрозилюється цистеїн у положенні 12 і 104, відповідно, β- і α-ланцюгів. NO, який утворюється *in vitro* після додавання індуцибельної NO-синтази до еритроцитів, може перетворювати гемоглобін, який у них міститься, в SNOHb.

Отже, у реакціях з гемоглобіном NO утворює Met-Hb, нітрозилгемоглобін (NO*Hb* – нітрозування по Fe^{2+} у гемовій групі) та S-нітрозогемоглобін (SNO*Hb* – нітрозилювання по β-93-цистеїну) [7] (рис.6).

Біологічна функція NO-похідних *Hb* є досить широкою (транспорт і депонування оксиду азоту, його елімінація тощо). Вони також беруть участь у генезі багатьох

патологічних станів. Припускають, що SNO*Hb* діє як „алостерично контрольований буфер," котрий обмінює свою NO-групу з тіолами середовища, у тому числі з глутатіоном, діючи як вазодилататор, виконуючи роль критичного фактора постачання O_2. S-нітрозогемоглобін як у вільному стані, так і у складі еритроцитів має EDRF-подібні властивості. Нітрозильні комплекси гемоглобіну виявлені за різних патологічних станів. В експериментах *in vitro* було показано, що від 10 до 40% оксиду азоту бере участь в утворенні нітрозильних комплексів. Зміна конформації гемоглобіну (R-T перехід) супроводжується переносом частини NO від SH-групи цистеїну до гема або виділенням її у вільному стані [7, 63]. Отже, SNO*Hb*, NO*Hb*, а також нітрозильні комплекси негемового заліза утворюють великий пул депонованого оксиду азоту.

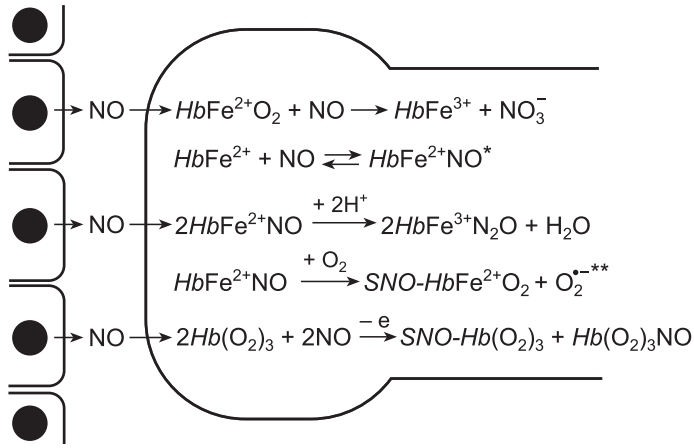

Рис. 6. Взаємодія NO, який утворюється в ендотелії, з внутрішньоеритроцитарним гемоглобіном.
* – реакція нітрозування (приєднання NO до Fe^{2+} у гемовій групі);
** – реакція нітрозилювання (приєднання NO до цистеїну глобінового ланцюга по місцю SH-групи)

Fig. 6. Interaction of NO formed in endothelium, with intererythrocytic hemoglobin.
*- nitrosation reaction (joining of NO to Fe^{2+} in heme group);
**- nitrosylation reaction (joining of NO to cysteine residue in globin chain at the SH-group)

Особливий інтерес дослідників до нітрозильних комплексів гемопротеїнів викликаний тим, що, по-перше, вони мають важливі біологічні функції, і, по-друге, їхнє утворення супроводжується змінами властивостей гема в результаті приєднання NO, які зручно реєструвати спектральними методами.

Утворення комплексів між гемом і NO викликає зміну основних фізичних властивостей гема. Нами було проведено експерименти з нітрозування *Hb* у системі *in vitro*. Нітрозування проводили у спеціальному сатураторі. При цьому через відновлений дитіонітом натрію гемолізат пропускали оксид азоту, який одержували шляхом відновлення нітроксильного іона при поєднанні розчинів $NaNO_2$ та аскорбінової кислоти [9].

Поступове перетворення R*Hb* в NO*Hb* спостерігали за характерними змінами поглинання у видимій ділянці спектра (рис. 7). Широка асиметрична смуга з максимумом при 555–560 нм замінялася двома смугами із максимумами поглинання 545,8 нм і 572,4 нм, які є характерними для нітрозилгемоглобіну [57].

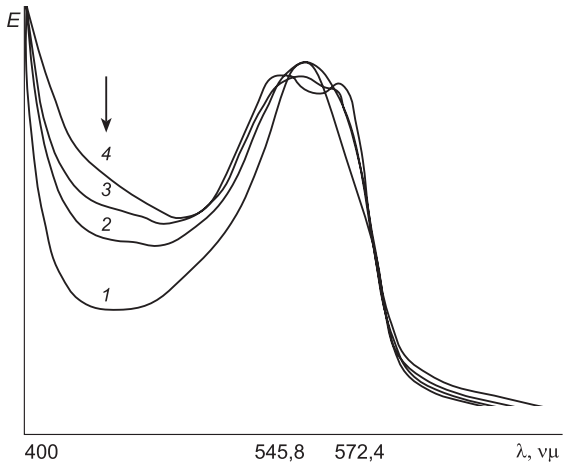

Рис. 7. Електронні спектри при переході R*Hb* в NO*Hb*:
1 – перша реєстрація R*Hb*; *2,3* – перехідні форми; *4* – остання реєстрація NO*Hb*

Fig. 7. The electronic spectra at transition of RHb to NO*Hb*:
1 – first recording of R*Hb*; *2, 3* – the transition forms; *4* – last recording of NO*Hb*

Ми також встановили, що електронний спектр (рис. 8, крива *2*) нітрозил-*Hb* щурів із індукованим стрептозотоцином діабетом порівняно з NO*Hb* контрольних тварин характеризувався гіпсохромним ефектом у межах смуги Соре [14].

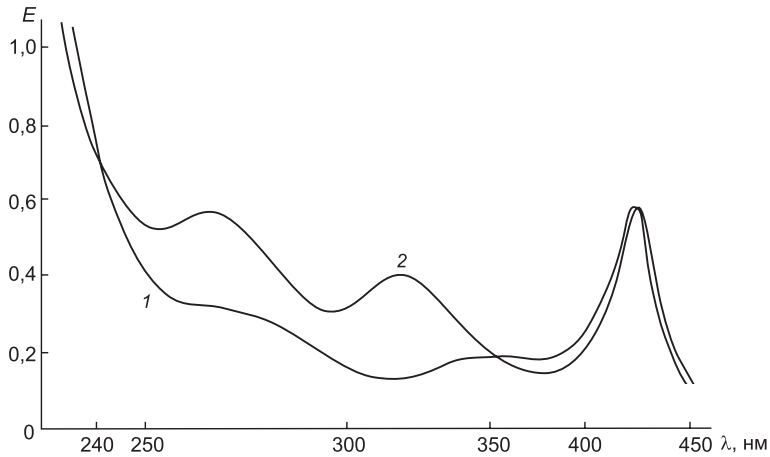

Рис. 8. Електронні спектри NO*Hb*: *1* – контроль; *2* – експериментальний цукровий діабет
Fig. 8. Electronic spectra of NO*Hb*: *1* – control; *2* – experimental diabetes mellitus

Ці зміни в електронному спектрі *Hb* зумовлені перерозподілом електронної густини у системі спряжених зв'язків протопорфіринового макроциклу й атома заліза. У вихідній дезоксигенованій формі гемоглобіну Fe^{2+} перебуває у високоспіновому стані, має координаційне число 5 і міститься за площиною гема на відстані 0,07 нм. При взаємодії NO з атомом Fe^{2+} у 6-му координаційному положенні залізо переходить у низькоспіновий стан, а кількість лігандів у координаційній сфері збільшується до шести.

Перехід у низькоспіновий стан супроводжується його зміщенням на 0,07 нм у площину гема, що спричиняє поетапний розрив сольових зв'язків між α-субодиницями і зміщенням субодиниць уздовж контактів $\alpha1$–$\beta2$ і $\alpha2$–$\beta1$.

Нітрозування R*Hb* щурів зі стрептозотоциновим діабетом супроводжувалося гіперхромним ефектом у ділянці поглинання ароматичних амінокислот. Воно реєструвалося за зміщенням максимуму поглинання з 268,3 до 274,9 нм і за появою широкої смуги поглинання при 334 нм порівняно з NO*Hb* контрольних тварин [15]. Зміни спектра поглинання в ультрафіолетовій ділянці відбуваються за рахунок взаємодії NO з білковою частиною молекули *Hb*, адже відомо, що при 320–360 нм поглинають світло S-нітрозотіольні похідні білків [56, 57]. Очевидно, ми реєстрували утворення SNO*Hb*, який є продуктом нітрозилювання цистеїну у 93 положенні β-ланцюга *Hb*. Це пов'язано з розгортанням білкової глобули, індукованим нітрозилюванням бокових груп амінокислотних залишків (цистеїну, тирозину) у складі гідрофобного ядра білкової молекули.

За умов ЦД 1-го типу переважає процес S-нітрозилювання *Hb*, який має адаптивний характер і спрямований на полегшення від'єднання NO з гема та постачання його до гіпоксичних тканин [14, 15].

SNO*Hb* є вазодилататором, активність якого алостерично модулюється O_2. Його оксигенована структура полегшує скорочення кровоносних судин, а дезоксигенована забезпечує вазорелаксантну активність. „Відчуваючи", таким чином, фізіологічний градієнт кисню у тканинах, *Hb* використовує пов'язані з конформацією зміни в положенні β-93 цистеїну для місцевих потреб кровоплину. Кисеньзалежний характер рівноваги між NO*Hb* і SNO*Hb* забезпечує оптимальний баланс між гіпоксичною вазодилатацією та гіпероксичною вазоконстрикцією [57].

Наявність кількох сполук гемоглобіну з NO може по-різному впливати на спорідненість гемоглобіну до кисню (СГК) в крові (рис. 9). NO може змінювати СГК за такими механізмами: перехід гемоглобіну з конформаційного стану R у T; підвищення рівня еритроцитарного Met*Hb*; утворення нітрозотіолів та додаткових продуктів окиснення гемоглобіну [63]. Метгемоглобін і SNO*Hb* підвищує СГК, а NO*Hb* її знижує, відповідно перші зміщують криву дисоціації оксигемоглобіну вліво, а останній – вправо (рис. 9).

Перенесення NO від S-нітрозотіолу на гемоглобін регулюється алостерично та функціонально пов'язане з приєднанням O_2. У міру зв'язування гемоглобіну з O_2

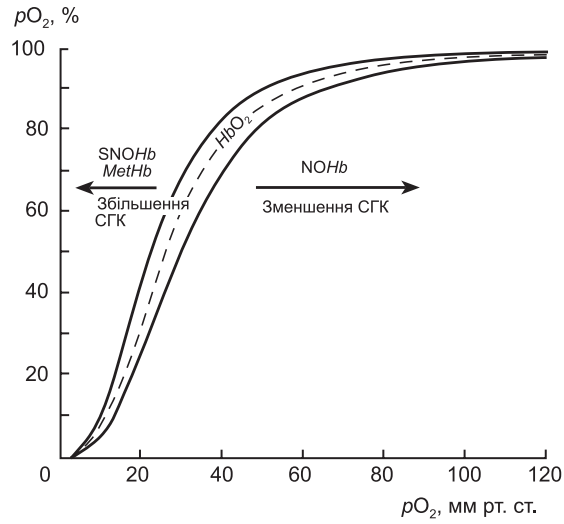

Рис. 9. Ефект NO-похідних сполук на положення кривої дисоціації оксигемоглобіну:
Met*Hb* – метгемоглобін; SNO*Hb* – нітрозогемоглобін; NO*Hb* – нітрозилгемоглобін; *Hb*O_2 – оксигемоглобін

Fig. 9. The effect of NO-derived compounds on the position of dissociation curve of oxyhemoglobin:
Met*Hb* – methemoglobin; SNO*Hb* – nitrosohemoglobin; NO*Hb* – nitrosylhemoglobin; *Hb*O_2 – oxyhemoglobin

в легенях його спорідненість до S-нітрозотіолу зростає, а при віддачі знижується, завдяки чому NO вивільняється у тканини. Існує O_2-залежна рівновага між SNO*Hb* і NO*Hb* (при відсутності низькомолекулярних тіолів типу цистеїну мішенню NO виступає гем з Fe^{2+}, а при їхній присутності відбувається перенесення NO-групи на цистеїновий залишок β-глобіну). Стан редокс-рівноваги між SNO*Hb* і NO*Hb* пов'язаний із алостеричним станом гемоглобіну. Після дезоксигенації більша частина SNO*Hb*O_2 перетворюється в NO*Hb*. Дезоксигенація полегшує як реакцію транснітрозування, у якій утворюються вазорелаксуючі нітрозотіоли, так і відновну реакцію запасання NO, в результаті якої утворюється нітрозилгемоглобін [64].

$$NOHb + 4O_2 \leftrightarrow SNOHb\ (O_2)_4 + e^-$$

Через ефект на СГК і регуляцію кровоплину NO та його похідні можуть впливати на процеси оксигенації тканин при різноманітних гіпоксіях. Кисеньзв'язувальні властивості крові впливають на стан L-аргінін/NO системи. У той же час вона може визначати функціональні властивості гемоглобіну шляхом модифікації його спорідненості до кисню через внутрішньоеритроцитарні механізми регуляції, кисеньзалежний характер утворення NO, регуляцію судинного тонусу, дію пероксинітриту (рис. 10) [7].

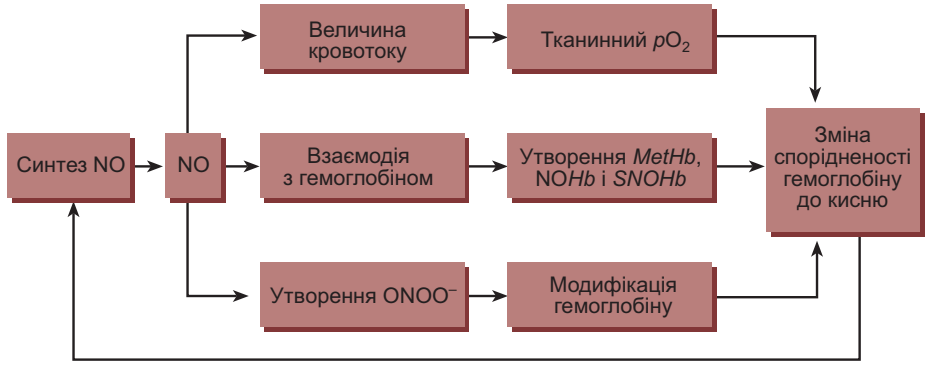

Рис. 10. Основні механізми реалізації ефекту NO на спорідненість гемоглобіну до кисню
Fig. 10. Major mechanisms of NO effect on the affinity of hemoglobin to oxygen

Аналіз даних літератури свідчить про те, що система L-аргінін/NO може брати участь у формуванні кисеньтранспортної функції крові при окиснювальному стресі та гіпоксії [55]. NO може визначати СГК і, відповідно, процеси оксигенації та дезоксигенації в капілярній сітці малого і великого кола кровообігу, а також модулювати інші функції крові.

ВИСНОВОК

Результати експериментальних досліджень, розглянуті в огляді, однозначно свідчать про важливу біологічну роль нітрозильних комплексів гемоглобіну. Еритроцит може вважатися головним резервуаром для нітрит-іонів, а гемоглобін еритроцитів є основним місцем депонування NO. У свою чергу, оксид азоту, взаємодіючи з гемоглобіном, модифікує кисеньзв'язувальні властивості цього основного білка еритроцитів. Наші дослідження щодо нітрозування та нітрозилювання гемоглобіну

еритроцитів за умов індукованого цукрового діабету вказують на те, що подальше вивчення особливостей модифікації білків організму продуктами метаболізму NO є перспективним напрямом як для пошуку шляхів корекції, так і для діагностики патологій різної етіології.

1. *Амосова К.М., Гула Н.М., Губський Ю.І.* та ін. Стан NO-системи в еритроцитах крові хворих з первинною легеневою гіпертензією та його зміни під час лікування дилтіаземом. **Серце і судини,** 2004; 2: 76–83.
2. *Білий О.І., Дудок К.П., Лук'янець В.М.* **Визначення вмісту гемоглобіну та його лігандних форм у цільній крові за методом абсорбційної спектроскопії.** Львів: Видавництво ЛДУ, 1998. 12 с.
3. *Борисенко Г.Г., Осипов А.Н., Казаринов К.Д.* Фотохимические реакции нитрозильных комплексов гемоглобина под действием низкоинтенсивного лазерного излучения в видимом диапазоне. **Биохимия**, 1997; 62 (6): 774–780.
4. *Горрен А.К.Ф., Майер Б.* Универсальная и комплексная энзимология синтазы оксида азота. **Биохимия**, 1998; 63(7): 870–880.
5. *Дмитренко Н.П., Холиан А.* Роль взаимодействия путей метаболизма формальдегида и оксида азота в механизме их токсического действия. Токсическое действие оксида азота. **Укр. біохім. журн**, 2005; 77 (5): 5–23.
6. *Дударев В.П.* **Роль гемоглобина в адаптации к гипоксии**. Киев: Наук. думка, 1979. 149 с.
7. *Зинчук В.В.* Участие оксида азота в формировании кислородсвязывающих свойств гемоглобина. **Успехи физиол. наук**, 2003; 34(2): 33–45.
8. *Осипов А.Н., Борисенко Г.Г., Владимиров Ю.А.* Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротеинов. **Успехи биол. химии,** 2007; 47: 259–292.
9. Пат. UA45158. Пристрій для отримання і дозованої подачі оксиду азоту і побудови кривих дисоціації оксигемоглобіну в присутності NO / Коробов В.М., Федорович А.М., Соколик Н.В. (Україна); опубл. 17.06.2002 р. Бюл. № 6.
10. *Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицин Н.С.* **Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих.** Москва: Наука, 1999. 165 с.
11. *Реутов В.П., Сорокина Е.Г.* NO-синтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота. **Биохимия**, 2000; 63(7): 1029–1040.
12. *Реутов В.П., Гоженко Е.А., Охотин В.Е.* и др. Роль оксида азота в регуляции работы миокарда. Цикл оксида азота и NO-синтазные системы в миокарде. **Актуальные проблемы транспортной медицины,** 2007; 4: 89–102.
13. *Сагач В.Ф., Доломан Л.Б., Коцюруба А.В.* та ін. Збільшений вміст стабільних метаболітів оксиду азоту в крові мешканців високогір'я. **Фізіол. журн**, 2002; 48 (5): 3–8.
14. *Сибірна Н.О., Люта М.Я., Бурда В.А.* та ін. Вплив системи L-аргінін: NO на динаміку вмісту лігандних форм та спектральні характеристики гемоглобіну за умов цукрового діабету 1 типу. **Медична хімія**, 2004; 6(3): 26–29.
15. *Сибірна Н.О., Люта М.Я., Бурда В.А., Федорович А.М.* Вплив аміногуанідину на фізико-хімічні властивості гемоглобіну за умов цукрового діабету 1-го типу. **Біологія тварин**, 2005; 7(1–2): 194–199.
16. *Сомова Л.М., Плехова Н.Г.* Оксид азота как медиатор воспаления. **Вестник ДВО РАН**, 2006; 2: 77–80.
17. *Сосунов А.А.* Оксид азота как межклеточный посредник. **Соросовский образоват. журн**, 2000; 6: 27–34.
18. *Baker P.R., Schopfer F.J., Sweeney S., Freeman B.A.* Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: synthesis, clinical identification, and quantitation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 2004; 101(32): 11577–11582.
19. *Bryan N.S., Rassaf T., Rodrigez J.* et al. Bound NO in human red blood cells: fact or artifact? **Nitric Oxide**, 2004; 10: 221–228.

20. *Chin S.Y., Padney K.N., Shi S.J.* et al. Increased activity and expression of Ca-dependent NOS in real cortex of ANG II-infused hypertensive rats. **Amer. J. Physiol**, 1999; 277(5): 798–804.
21. *Cosby K., Partovi K.S., Grawford J.H.* et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. **Nature Medicine,** 2003; 9: 1498-1505.
22. *Dejam A*., *Hunter C.J*., *Schechter A.N*., *Gladwin M.T*. Emerging role of nitrite in human biology. **Blood Cells Mol. Dis**, 2004; 32(3): 423–429.
23. *Dejam A., Hunter C.J., Pelletier M.M.* Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. **Blood**, 2005; 106(2): 734–739.
24. *Doyle M.P., Pickering R.A., DeWeert T.M.* et al. Kinetics and mechanism of the oxidation of human deoxyhemoglobin by nitrites. **Journ. of Biological Chemistry**, 1981; 256: 12393–12398.
25. *Espey M.G., Miranda K.M., Thomas D.D.* et al. A chemical perspective on the interplay between NO, reactive oxygen species and reactive nitrogen oxide species. **Ann. NY Acad. Sci**, 2002; 962: 195–206.
26. *Gladwin M.T., Ognibene F.P., Shelhamer J.H.* et al. Schlechter A.N. Nitric oxide transport on sickle cell hemoglobin: where does bind? **Free. Radic. Res,** 2001; 2: 175–180.
27. *Gorenflo M., Zheng C., Poge A.* et al. Metabolites of the L-arginine-NO-pathway in patients with left-to-right shunt. **Clin. Lab**, 2001; 47: 441–447.
28. *Grawford J.H., Chacko B.K., Pruitt H.M.* et al. Transduction of NO-bioactivity by the red blood cell in sepsis: novel mechanisms of vasdilatation during acute inlammatory disease. **Blood**, 2004; 104: 1375–1381.
29. *Gupta M. P., Van Evanoff, Hart C.M*. Nitric oxide attenuates hydrogen peroxide mediated injury to porcine pulmonary artery endothelial cells. **Am. Physiol. Soc,** 1997; 20: L1133–1141
30. *Herold S*., *Boccini F*. NO* release from MbFe(II)NO and HbFe(II)NO after oxidation by peroxynitrite. **Inorg. Chem**, 2006; 45(17): 6933–6943.
31. *Hunter C.J., Dejam A., Blood A.B.* et al. Inhaled nebulized nitrite is a hypoxia-sensitive NO-dependent selective pulmonary vasodilator. **Nature Medicine,** 2004; 10: 1122–1127.
32. *Ignarro L.J., Napoli C.* Novel features of nitric oxide synthase, and atherosclerosis. **Curr. Atheroscler. Rep**, 2004; 6: 281–287.
33. *Jagger J.E., Bateman R.M., Ellsworth M.L., Ellis C.G.* Role of erythrocyte in regulating local O_2 delivery mediated by hemoglobin oxygenation. **Am. Journ. of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**, 2001; 280(6): H2833–2839.
34. *Jansson E., Huang L., Malkey R.* et al. A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis. **Nature Chemical Biology**, 2008; 4(7): 411–417.
35. *Jia L., Bonaventura C., Bonaventura J., Stamler J.S.* S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. **Nature,** 1996; 380(6571): 221–226.
36. *Kelm M.* Flow-mediated dilatation in human circulation: diagnostic and therapeutic aspects. **Am. Journ. of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**, 2002; 282: H1–H5.
37. *Klebanoff S.J.* Myeloperoxidase: friend and foe. **J. Leukocyte Biol**, 2005; 77(1): 529–557.
38. *Kleinbongard P., Dejam A., Lauer T.* et al. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. **Free Radical Biology and Medicine,** 2003; 35: 790–796.
39. *Kosaka H., Tyuma I.* Mechanism of autocatalytic oxidation of oxyhemoglobin by nitrite. **Environmental Health Perspectives**, 1987; 73: 147–151.
40. *Kotsonis P., Frey A., Frohlich L.* Autoinhibition of neuronal nitric oxide synthase: distinct effects of reactive nitrogen and oxygen species on enzyme activity. **Biochem. J**, 1999; 340: 745–752.
41. *Lauer T., Preik M., Rassaf T.* et al. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA**, 2001; 98: 12814–12819.
42. *Li H., Cui H., Kundu T.* et al. Nitric oxide production from nitrite occurs primarily in tissues not in the blood critical role of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. **J. Biol. Chem**, 2008; 283(26): 17855–17863.

43. *Liy X., Miller M.J., Joshi M.S.* et al. Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erytrocytes. **J. Biol. Chem**, 1998; 273(30): 18709–18713.
44. *Lundberg J., Gladwin M., Ahluwalia A.* et al. Nitrate and nitrite in biology nutrition and therapeutics. **Nat. Chem. Biol**, 2009; 5 (12): 865–869.
45. *Lundberg J.O., Gladwin M.T., Ahluwalia A.* Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. **Nat. Chem. Biol**, 2009; 5(12): 865–869.
46. *Lundberg J.O., Weitzberg E.* The biological role of nitrate and nitrite: the times they are a-changin. **Nitric Oxide**, 2010; 22(2): 61–63.
47. *May J.M., Qu Z.-C., Xia L.* et al. Nitrite uptake and metabolism and oxidant stress in human erythrocytes. **Am. J. Physiol**, 2000; 279: C1946–C1954.
48. *Meulemans A., Delsenne F.* Measurement of nitrite and nitrate levels in biological samples by capillary electrophoresis. **Journ. of Chromatography B: Biomedical Applications**, 1994; 660; 401–404.
49. *Moncada S., Palmer R.M.J, Higgs E.A.* Nitric Oxide, biology, pathophysiology and pharmacologiy. **Pharmacological Reviews**, 1991; 43: 109–142
50. *Nagababy E., Ramasamy S.* Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction. **J. Biol. Chem**, 2003; 278: 46349–46356.
51. *Patel R.P., Hogg N., Spenser N.Y.* et al. Biochemical characterization of S-nitrosohemoglobin effects on oxygen binding and transnitrosation. **J. Biol. Chem**, 1999; 274(22): 15487–15492.
52. *Perrella M., Shrager R.I., Ripamonti M.* et al. Mechanism of the oxidation reaction of deoxyhemoglobin as studied by isolation of the intermediates suggests tertiary structure dependent cooperativity. **Biochemistry**, 1993; 32(19): 5233–5238.
53. *Reutov V.P., Okhotin V.E., Shuklin A.V.* Nitric oxide (NO) and NO cycle in myocardium: molecular, biochemical and physiological aspects. **Usp Fiziol Nauk**, 2007; 38(4): 39–58.
54. *Rhodes P.M., Leone A.M., Francis P.L.* et al. The L-arginine: nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1995; 209: 590–596.
55. *Snyder S.H., Jaffrey S.R.* Vessels vivified by Akt acting on NO syntase. **Nature Cel. Biol**, 1999; 1: E95–96.
56. *Stamler J.S., Simon D.I., Osborne J.A.* et al. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1992; 89(1): 444–448.
57. *Stamler J.S., Jia L., Eu J.P., McMahon T.J.* et al. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. **Science**, 1997; 276: 2034–2037.
58. *Taylor B.S, Alarcon L.H., Billiar T.R.* Inducible Nitric Oxide Synthase in the Liver: Regulation and Function. **Biochemistry**, 1997; 6(7): 766–795.
59. *Valance P., Patton S., Bhagat K.* et al. Direct measurement of nitric oxide in human beings. **Lancet**, 1995; 345: 153–154.
60. *Van Faassen E.E., Bahrami S, Feelisch M.* et al. Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology. **Med. Res. Rev**, 2009; 29(5): 683–741.
61. *Wang X., Tanus-Santos J.E., Reiter C.D.* Biological activity of nitric oxide in the plasmatic compartment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2004; 101: 1147–11482.
62. *Weitzberg E., Lundberg J.O.* NO generation from inorganic nitrate and nitrite: Role in physiology, nutrition and therapeutics. **Arch. Pharm. Res**, 2009; 32(8): 1119–1126.
63. *Zinchuk V.* Effect of NO-synthase inhibition on hemoglobin-oxygen affinity and lipid peroxidation in rabbits during fever. **Respiration**, 1999b; 66(5): 448–454.
64. *Zinchuk V.V., Dorokhina L.V., Maltsev A.N.* Prooxidant-antioxidant balance in rats under hypotermia combined with modified hemoglobin-oxygen affinity. **J. Therm. Biol**, 2002; 27(5): 345–352.

MOLECULAR MECHANISMS OF NITRIC OXIDE DEPOSITION IN ERYTHROCYTES

N. O. Sybirna, M. Ya. Lyuta, N. I. Klymyshyn

Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskyi St., Lviv 79005, Ukraine

Analysis of literature and obtained experimental data concerning the biological role of nitrosyl complexes of hemoglobin were carried out. The contemporary understanding of molecular mechanisms of forming, metabolism and deposition of nitric oxide was generalized. The enzymatic and non-enzymatic pathways of NO-forming were described, as well as the key enzymes of nitric oxide cycle and their regulation. The role of erythrocytes in NO deposition was thoroughly studied and biological functions of nitrosyl complexes of hemoglobin were investigated.

The review presents obtained data for nitrosation/nitrosylation of deoxyhemoglobin in the *in vitro* system and the characteristics of changes in electronic spectra of deoxyhemoglobin and nitrosylhemoglobin under experimental diabetes mellitus. Advisability and prospectiveness of further investigation of proteins' modification by products of NO-metabolism were substantiated in order to search for ways of correction and diagnostics of pathologies with various etiologies.

Key words: erythrocyte, nitric oxide, nitrosyle complexes of hemoglobin.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕПОНИРОВАНИЯ ОКСИДА АЗОТА В ЭРИТРОЦИТАХ

Н. А. Сибирная, М. Я. Лютая, Н. И. Климишин

Львовский национальный университет имени Ивана Франка
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина

На основе литературных и собственных экспериментальных данных проведены анализ и обобщение современных представлений о молекулярных механизмах образования, метаболизма и депонирования оксида азота. Описаны ферментативный и неферментативный пути биосинтеза NO, ключевые энзимы цикла оксида азота и регуляция их активности. Детально рассмотрены роль эритроцитов в депонировании NO и биологические функции нитрозильных комплексов гемоглобина.

В обзоре приведены результаты собственных исследований – нитрозирования/нитрозилирования дезоксигемоглобина в системе *in vitro,* охарактеризованы изменения в электронных спектрах дезокси- и нитрозилгемоглобина при экспериментальном сахарном диабете. Обоснованы целесообразность и перспективность дальнейшего изучения модификаций белков организма продуктами метаболизма NO для поиска путей коррекции и диагностики патологий различной этиологии.

Ключевые слова: эритроцит, оксид азота, нитрозильные комплексы гемоглобина.

Одержано: 21.05.2010