

УДК 615.152.21:616.153.915-39

ЗНАЧЕНИЕ L-АРГИНИН-NO СИСТЕМЫ В ФОРМИРОВАНИИ КИСЛОРОДТРАНСПОРТНОЙ ФУНКЦИИ КРОВИ

А.Н. Глебов, В.В. Зинчук

Кафедра нормальной физиологии

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Проводится анализ литературных и собственных данных о взаимодействии L-аргинин-NO системы и элементов крови, в частности, гемоглобина. Предполагается, что NO-зависимые механизмы модификации гемоглобина могут влиять на кислородтранспортную функцию крови при различных гипоксических состояниях.

Ключевые слова: L-аргинин-NO система, оксид азота, кровь, сродство гемоглобина к кислороду.

The analysis of literature and the obtained data of L-arginine-NO system and blood elements interaction in particular hemoglobin is being carried out. It is suggested that NO-dependent mechanisms of hemoglobin modification can affect the blood oxygen-carrying function in different hypoxia conditions.

Key words: L-arginine-NO system, oxide of nitrogen, blood, affinity of hemoglobin to oxygen.

Сродство гемоглобина к кислороду (СГК) определяет диффузию кислорода из альвеолярного воздуха в кровь, а затем на уровне капилляров в ткань [48]. Свойство гемоглобина обратимо связывать кислород является частным случаем общей закономерности взаимодействия протеинов с лигандами [27]. Субъединицы гемоглобина внутри тетрамера при переходе от R- к T-конформации (т.е. R- и T-состояния) обуславливают кооперативные свойства, проявляющиеся в S-образной форме кривой диссоциации оксигемоглобина. Такая форма кривой диссоциации оксигемоглобина (КДО) в обычных условиях обеспечивает процессы транспорта O_2 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 [49]. Механизм кооперативности основан на стереохимической перестройке контактов субъединиц на мобильной аллостерической поверхности в зависимости от степени оксигенации. Аллостерические регуляторы, такие как 2,3-дифосфоглицерат (2,3-ДФГ), Cl^- , H^+ , связываясь с молекулой гемоглобина в T-состоянии и облегчая соответственно высвобождение O_2 , проявляют свои эффекты при субэквивалентных количествах (т.е., когда их количество меньше, чем гемоглобина). Молекула гемоглобина, взаимодействуя с компонентами внутренней поверхности мембран эритроцитов, прежде всего с 43 кДа цитоплазматическим фрагментом – белок полосы 3 (анионообменный белок АЕ1), изменяет сродство к O_2 : преимущественно связывает его при низких pO_2 и высвобождает при насыщении 2,3-ДФГ, что позволяет рассматривать данный элемент мембраны как аллостерический регулятор функ-

ции гемоглобина [28]. Представляет интерес изучение взаимодействия гемоглобина с NO, так как он имеет гораздо более высокое сродство к гемической группе дезоксигемоглобина, чем O_2 и CO, что позволяет предполагать его конкурентное с кислородом за соответствующие участки на молекулах частично оксигенированного гемоглобина [46].

Сродство гемоглобина к кислороду определяется в значительной степени аллостерическим взаимодействием между гемоглобином и различными физиологическими модуляторами (H^+ , 2,3-ДФГ, CO_2 и др.), которые в совокупности на уровне клеточного компартмента крови образуют внутриэритроцитарную систему регуляции её кислородсвязывающих свойств. Исследования последних лет позволили предположить, что к факторам данной системы можно отнести монооксид азота (NO), образование которого происходит из аминокислоты L-аргинина под контролем фермента NO-синтазы и ряда кофакторов (L-аргинин-NO система). S-нитрозирование гемоглобина может быть сберегающим механизмом, обеспечивающим доставку NO в области с низким pH или pO_2 . Взаимодействие NO с гемоглобином ставит вопрос о паракринной и аутокринной функции NO. Транспорт NO как гормона в организме ограниченно проявляется при физиологических условиях, но в полной мере реализуется при фармакологических (высоких) уровнях NO [50].

Эритроцит не ограничивает взаимодействие гемоглобина с NO в физиологических условиях. На модели кишечника, в которой создавалась окклюзия верхней брыжеечной артерии и оценивалось образование $HbFe^{2+}NO$ и диэтилдитиокарбамата с железом, показано, что NO, высвобождаемый из

эндотелиальных клеток, диффундирует прежде всего не в ткань, а в кровь [24]. Реакция NO с гемической группой гемоглобина может быть частично ограничена гидрофобным компонентом клеточной мембраны, лимитируя процесс его диффузии в эритроцит [17]. NO переносится через клеточную мембрану посредством специального переносчика протеина AE1, или анион-обменника. Проницаемость эритроцитарной мембраны для NO сравнительно невысока, что может иметь значение для его реакции с гемоглобином [56]. Предполагается существование цитоскелетного барьера для диффузии NO, реализуемого через особые межбелковые поры в эритроцитарной мембране, пропускная способность которых регулируется и соответственно влияет на вход NO [40]. Скорость реакции NO с гемоглобином, находящимся в эритроцитах, в 800 раз меньше в сравнении с эквивалентным его количеством, находящимся в растворе [17]. В то же время есть мнение, что мембрана эритроцита не является барьером для NO и его производных и не лимитирует взаимодействие NO с гемоглобином [37].

В артериальной крови NO в реакции с оксигемоглобином образует нитрат и метгемоглобин, а в венозной - нитрозилгемоглобин ($\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$), способный при высоких $p\text{O}_2$ дезинтегрироваться с участием молекулярного кислорода до гемоглобина и NO_3^- [38]. Гемоглобин взаимодействует с NO через высокоаффинные Fe^{2+} -связывающие участки на геме, его сродство к NO в 8000 раз выше, чем к O_2 . $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ имеет шестикоординатную форму гемических групп [32]. Спектр ЭПР $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ в растворе является суперпозицией спектров T- и R-конформеров гемоглобина с преимущественным образованием T-формы, которые обусловлены обратимыми переходами от сильного (R) до слабого (T) взаимодействия Fe^{2+} -гем с гистидином [5]. Нитрозилгемоглобин характеризуется выраженным эффектом Бора, что может иметь особенно важное значение при ацидозе [58].

В глобиновой цепи гемоглобина NO связывается в форме S-нитрозотиола, а именно S-нитрозогемоглобина (SNO-Hb). Цистеин (93) β -белковой цепи идентифицировали как место связывания NO с гемоглобином [25]. При очень больших концентрациях нитрозотиолов *in vitro* образуются и другие формы SNO-Hb, у которых нитрозилируется аминокислота цистеин в положении 12 и 104 β - и α -белковых цепей соответственно [36]. S-нитрозилирование гемоглобина облегчает отсоединение NO от гема и поступление его к гипоксическим тканям. SNO-Hb выступает в роли акцептора или

донора электронов, внося тем самым вклад в редокс-равновесие гема, однако значение этих функций минимально в условиях покоя [46].

Переход NO от S-нитрозотиола на гемоглобин регулируется аллостерически и функционально зависит от присоединения O_2 . При связывании гемоглобина с O_2 в лёгких его сродство для S-нитрозотиола растёт, а при отдаче снижается, благодаря чему NO высвобождается в ткани. Существует O_2 -зависимое равновесие между SNO-Hb и $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ (при отсутствии низкомолекулярных тиолов, например, цистеина, мишенью NO является гем с Fe^{2+} , а в его присутствии следует перенос NO-группы на цистеиновый остаток β -глобина) [25]. Положение редокс-равновесия между SNO-Hb и $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ связано с аллостерическим состоянием гемоглобина. Большие концентрации нитрозильного гемоглобина обнаруживаются в деоксигенированной крови, и наоборот [47]. Существует цикл связывания O_2 и NO в лёгких и их высвобождения на периферии.

Различные по происхождению молекулы NO реагируют с SH-группами белков и, прежде всего, альбуминами с образованием долгоживущих комплексов RSNO, обладающих вазодилаторным действием. Среди этих соединений наиболее значимым является S-нитрозоглутатион. Внутри эритроцита существует равновесие между NO, связанным с тиолами в гемоглобине (SNO-Hb), и мембранным белком полосы 3, на которое влияет локальное $p\text{O}_2$, регулируя тем самым вазодилатацию в соответствии с метаболическими потребностями [52]. SH-группа S-нитрозотиола существенно защищает NO от гашения присоединением к гему. Равновесие между $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ и SNO-Hb связано с конформацией белка: образование SNO-Hb облегчается в R-структуре, а $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ преимущественно образуется в T-. Высвобождению NO из тиолов способствуют дезоксигенация и окисление гема (T-структура, высокоспиновая), что согласуется с термодинамическими особенностями его связывания [18]. Первичным аддуктом гемоглобина и NO, образуемого при дыхании NO, у нормальных индивидуумов является $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ и в небольшом количестве SNO-Hb [41]. Глутатион влияет на равновесие SNO-Hb и $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$, что оказывает эффект на процессы оксигенации и дезоксигенации крови в капиллярах малого и большого кругов кровообращения. NO, высвобождаемый из SNO-Hb в присутствии глутатиона, не вызывает заметных сосудистых эффектов в изолированном лёгком в связи с быстрым окислением NO и образованием метгемоглобина [22]. Главным продуктом взаимо-

действия восстановленного глутатиона с SNO-Hb *in vivo*, вероятно, является $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$, за счёт чего происходит модификация СГК, сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо. По мнению Gow A.J. et al. [55], взаимодействие NO с HbO_2 не уничтожает его активность, а более того, обеспечивает его сохранение («гемоглобин рационально вводит новую химию, когда его насыщение кислородом высоко, лимитируя окисление NO и сохраняя его биоактивность»).

Гемоглобин способен выполнять функцию депо NO в микроциркуляторной сети [53]. Предполагается существование транспортного и высвобождающего механизма O_2 и NO в плодно-плацентарной циркуляции; O_2 и NO диффундируют к фетальному гемоглобину и высвобождаются на уровне тканей плода [20]. В сосудистой сети нитрозотиолы, образуемые при опосредуемом NO нитрозировании тиолов, играют важную роль в транспорте, хранении и метаболизме NO [30]. Предполагается, что SNO-Hb действует как «аллостерически контролируемый буфер NO» [45], обменивающий свою NO-группу с тиолами среды, в том числе с глутатионом, и тем самым изменяет кровотоков (выполняет роль критического фактора, определяющего доставку O_2). Сравнительно стабильные вазоактивные соединения могут служить системой хранения NO. Депонирование оксида азота можно рассматривать как фактор адаптационной защиты; существует NO-индуцированная активация различных защитных факторов (белки теплового шока, простагландины, антиоксидантная система) [6]. Эндотоксемия резко повышает образование циркулирующих S-нитрозотиолов (через 5 часов после внутрибрюшинного введения крысам ЛПС уровень циркулирующего S-нитрозоальбумина возрос примерно в 3,4 раза, а SNO-Hb – в 25 раз по сравнению с контролем) [31]. Содержание S-нитрозированного гемоглобина и альбумина в крови по данным разных авторов колеблется от 30-50 нМоль до 2,5-7 мкМоль, что может быть результатом эффекта присутствия в плазме NO_2^- ; нестабильности SNO-Hb в присутствии гемоглобина [26]. В гемолизатах эритроцитов крыс с индуцированным стрептозотоцином диабетом был найден значимо больший уровень SNO-Hb, чем у контрольных крыс, что позволяет предполагать участие гликозилированного гемоглобина в процессах S-нитрозилирования, которое, в свою очередь, может нарушать функцию сосудов и участвовать в генезе диабетической микроангиопатии [23]. Обратимая секвестрация NO гемоглобином (через $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$) играет важную роль в развитии ряда заболеваний

почек [47]. При трансплантации печени обнаружен максимум $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ через 60 минут после операции, что отражает его участие в ишемически-реперфузионных повреждениях [42]. Предполагается, что большая уязвимость зрелых внутриэритроцитарных форм возбудителя малярии частично может быть опосредована через NO, его производные, а также их вклад в иммуноэффektorную функцию организма [54].

В тканях, сопровождающихся значительным стрессом (гипоксия), SNO-Hb может быть механизмом доставки NO [46]. Повышенное высвобождение NO из нитрозоформ при гипоксии снижает региональное сосудистое сопротивление [22], что является примером аллостерических свойств гемоглобина, которые улучшают транспорт O_2 путём приведения в соответствие кровотока региональным потребностям в O_2 . Нитрозилирование гема и нитрозирование цистеина (93) в полипептидной цепи гемоглобина играют важную роль в транспорте и метаболизме NO кровью. Образование SNO-Hb может способствовать высвобождению NO из гема [46]. Взаимодействие между NO и гемоглобином важно для регуляции функций обеих молекул, однако при нахождении гемоглобина в плазме доминирующим становится гашение NO. Процессы деоксигенации SNO-окси-Hb в капиллярах обуславливают аллостерический переход гемоглобина (из R-состояния в T-), что инициирует выход NO [14]. При физиологическом дефиците кислорода в тканях гемоглобин за счёт конформационных изменений в положении цистеина (93) β -белковой цепи приводит местный кровоток в соответствие с кислородными потребностями [14].

Эритроциты, секвестрируя NO в терминальных артериолах и капиллярах, уменьшают его участие в вазодилатации и тем самым, казалось бы, противодействуют реализации кислородтранспортной функции крови. Однако кислородзависимый характер равновесия между $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ и SNO-Hb обеспечивает соответствие кровотока с его потребностью, т.е. оптимальный баланс между потребностью в O_2 и его доставкой.

Эритроциты несут примерно в 1000 раз больше NO, чем это требуется для регуляции кровотока или дилатации кровеносных сосудов [16]. Высвобождение нитрозотиолов в большом объеме (из гемоглобина) при каждом артериовенозном цикле несовместимо с жизнью, так как оно должно вызывать угрожающую для жизни гипотензию и шунтирование крови (регуляция кровотока требует лишь малых наномолярных количеств нитрозотиолов); также это создавало бы в организме непере-

носимую метаболическую нагрузку. Гемоглобин регулирует вытеснение NO, а так как на кровотоки влияют наномолярные уровни нитрозотиолов, его образование для расширения кровеносных сосудов и доставки O₂ намного важнее, чем связанное с ним изменение оксигенации крови, которое может происходить лишь при его уровнях выше физиологических. Значение NO-соединений с гемоглобином необходимо оценивать через их эффект на СГК [2].

Различные соединения NO-производных с гемоглобином могут по-разному влиять на СГК всей крови [2]. Метгемоглобин и SNO-Hb повышают СГК, а HbFe²⁺NO его снижает; соответственно, первые смещают кривую диссоциации оксигемоглобина влево, а последний – вправо. NO изменяет СГК через переход гемоглобина из конформационного состояния R в T, повышение уровня эритроцитарного метгемоглобина, образование нитрозотиолов и дополнительных продуктов окисления гемоглобина [24]. p50 SNO-Hb имеет значение менее 10 мм рт. ст. [15], для раствора SNO-Hb (с 30% нитрозилированием цистеина (93) в β-белковой цепи) – 4,3±0,27 мм рт. ст. [42], а для HbFe²⁺NO его величина составляет 39,6±1,5 мм рт. ст. [32]. L-аргинин и ингибитор NO-синтазы (N^G-нитро-L-аргинин) при лихорадке, индуцированной введением ЛПС, увеличивает p50_{станд} с 33,7±1,1 до 37,1±1,3 мм рт. ст., что, в частности, обусловлено различными эффектами NO-производных гемоглобина на СГК. Высокие дозы нитроглицерина (источник NO) вызывают увеличение образования HbFe²⁺NO, коррелирующего с ростом значения p50 и соответствующим сдвигом кривой диссоциации оксигемоглобина вправо [32]. В наших опытах у животных, получавших L-аргинин и подвергавшихся гипотермии, отмечается наименьший сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина влево [59]. Введение нитроглицерина внутрибрюшинно крысам приводило к увеличению метгемоглобина на 217,1% и p50 на 29,2%, а в условиях введения липополисахарида и предварительного повышения СГК эти эффекты донора NO усиливались [4]. После введения эндотоксина отмечалось уменьшение величины стандартного p50 на 10,9% (p<0,05) [1]. Развитие окислительного стресса у кроликов характеризовалось тем, что с учётом реальных значений pH, pCO₂ и температуры тела через 240 мин. после введения ЛПС реальное p50 возрастало на 9,6% (p<0,05), после введения ингибитора NO-синтазы при окислительном стрессе p50_{реал} увеличивался на 42,1% (p<0,05), что отражает более выраженный сдвиг реальных кривых диссоциации оксигемоглобина вправо [60]. У больных серповид-

ноклеточной анемией, дышавших воздухом с низким содержанием NO в течение 45 минут, а также при инкубации такой крови с NO в течение 5 минут отмечались близкие изменения СГК (значение p50 уменьшалось примерно на 15%), у здоровых таких изменений не было, что, возможно, связано с малым объемом выборки [35]. Это предполагает единый механизм формирования кислородсвязывающих свойств крови с участием NO, реализуемый на эритроцитарном уровне. Обработка крови различными концентрациями NO либо донорами NO (соль Анжели и др.) повышает СГК, линейно коррелирующее с уровнем метгемоглобина, что предполагает ведущую роль последнего в модификации транспорта кислорода кровью [19].

При вдыхании воздуха, содержащего 80 промилей NO, уровень HbFe²⁺NO возрастал в 10 раз до микромолярной области, а SNO-Hb существенно не изменялся и не имел значимых артериовенозных градиентов [21]. Концентрация SNO-Hb и HbFe²⁺NO в крови такова, что на каждые из этих дериватов приходится 1000 тетрамеров обычного гемоглобина, и это делает относительно малым их влияние на кислородсвязывающие свойства крови в обычных условиях [29], но при концентрациях NO выше физиологических условий (при низком pH, добавлении инозитолгексафосфата, низкой температуре) это вполне возможно. Их влияние на модуляцию кислородсвязывающих свойств крови проявляется при высоких концентрациях (5 и более %), но в то же время их эффект может иметь важное значение для процессов газообмена на уровне капилляра [2, 59].

Одним из субстратов, необходимых для синтеза NO, является O₂ (константа Михаэлиса для него в этой реакции лежит в физиологической области), что позволяет предполагать его лимитирующую роль для образования NO [34]. При pO₂<30 мм рт. ст. ферментативный синтез NO снижается [33]. O₂ является важным фактором, определяющим активность NO-синтазы при гипоксии в тканях или в сосудистом русле. Её активность может ингибироваться гипоксией [57]. В гепатоцитах крыс выявлен механизм кислородной регуляции экспрессии гена индуцибельной изоформы NO-синтазы: низкое pO₂ индуцирует синтез NO, что может иметь значение для формирования резистентности этих клеток к ишемическому повреждению [44]. Концентрация HbFe²⁺NO, судя по его ЭПР-спектроскопии в артериальной и смешанной венозной крови нормоксических и гипоксических овец при ингаляции NO, зависит от уровня O₂ и NO. Существует выраженная отрицательная корреля-

ция между уровнем $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ и степенью насыщения крови кислородом [43]. Метаболический цикл NO может активироваться при различных гипоксических состояниях, так как в условиях дефицита O_2 восстановленные гемсодержащие белки переносят электроны на ионы NO_2^- , восстанавливая их до NO [7].

NO взаимодействует с O_2^- с образованием пероксинитрита (мощного окислителя) [51], который может быть модификатором свойств гемоглобина через различные реакции [39]. Существуют два основных типа реакций пероксинитрита с гемоглобином – с гемом или аминокислотами полипептидных цепочек (тирозин, цистеин) [8]. В обычных условиях внутриэритроцитарный гемоглобин взаимодействует с нитрит-ионами с преимущественным 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 [9]. ONOO^- обуславливает прямое окисление железа, а также нитрование остатков тирозина на молекуле гемоглобина [12]. Гемоглобин может обеспечивать защиту от пероксинитрита, выполняя функцию внутриклеточного антиоксиданта. Его способность связывать NO не только в результате образования комплексов с гемовым железом, но и путем образования комплексов с тиоловыми группами, обеспечивает защиту клеток и субклеточных структур от избыточного образования NO. Существует определенная связь между СГК и процессами его аутоокисления и окислительной модификацией. Гемоглобин выступает в роли редокс-активного соединения, осуществляющего псевдопероксидазный каталитический цикл, возникающий между Fe^{3+} и Fe^{4+} при поглощении гемоглобином H_2O_2 [11]. Гемоглобин, регулируя содержание NO в том или ином регионе организма, формирует определённый уровень прооксидантно-антиоксидантного состояния. При нормальных физиологических условиях, когда количество образуемого NO невелико, прооксидантные эффекты ONOO^- и H_2O_2 угнетаются антиоксидантной функцией NO. В условиях сдвига прооксидантно-антиоксидантного баланса, чрезмерного образования O_2^- и, соответственно, ONOO^- и H_2O_2 реализуется прооксидантный эффект NO [10]. СГК, регулируя уровень NO, может вносить вклад в равновесие между ним и O_2^- в сосудистой сети [3].

NO может модифицировать СГК через внутриэритроцитарные механизмы регуляции, кислород-зависимый характер образования NO, регуляцию

сосудистого тонуса, действие пероксинитрита. Это может иметь важное значение для процессов газообмена за счет гетерогенности эндотелия по NO-образующей функции и особенностей объемного содержания крови в различных отделах сердечно-сосудистой системы (в терминальных артериолах и капиллярах) [2]. Анализ литературы и результаты выполненных нами исследований свидетельствуют о том, что L-аргинин-NO система может участвовать в формировании кислородтранспортной функции крови. Предполагается, что NO-зависимые механизмы модификации гемоглобина могут влиять на сродство гемоглобина к кислороду при различных гипоксических состояниях.

Данная работа выполнена частично благодаря финансовой поддержке Фонда фундаментальных исследований РБ (№ Б03-019).

Литература

1. Глебов А.Н. Кислородтранспортная функция крови и прооксидантно-антиоксидантное состояние организма при окислительном стрессе / А.Н. Глебов, В.В. Зинчук // Весті АН РБ. Сер. Мед.-біял. нав. - 2002. - №2. - С.71-74.
2. Зинчук В.В. Участие оксида азота в формировании кислородсвязывающих свойств гемоглобина / В.В. Зинчук // Успехи физиол. наук. - 2003. - Т.34, №2. - С.33-45.
3. Зинчук В.В. Внутриэритроцитарные механизмы регуляции кислородсвязывающих свойств при окислительном стрессе / В.В. Зинчук, А.Н. Глебов // Проблемы интеграции функций в физиологии и медицине. Мат. междунар. конф. – Минск. ПЧУП: «Бизнес-софсет», 2004. - С.145-147.
4. Зинчук В.В. Прооксидантно-антиоксидантное состояние организма при введении липополисахарида в условиях коррекции сродства гемоглобина к кислороду и L-аргинин-NO-системы / В.В. Зинчук // Бюллетень экп. биологии и медицины. - 2001. - Т.131, №1. - С.39-42.
5. Изменение спектров ЭПР нитрозильных комплексов гемопротеинов крови при низкоинтенсивном тотальном облучении мышей / Е.М. Миль, В.В. Каспаров, В.И. Бинюков и др. // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2000. – Т. 40, № 3. – С. 305-309.
6. Малышев И.Ю. Стресс, адаптация и оксид азота / И.Ю. Малышев, Е.Б. Манухина // Биохимия. – 1998. – Т. 63, № 7. – С. 992-1006.
7. Меньщикова Е.Б. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, В.П. Реутов // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 4. – С. 485-503.
8. Стародубцева М.Н. Механизмы реакций гемоглобина с пероксинитритом в водно-солевом растворе / М.Н. Стародубцева, С.Н. Черенкевич // Весті АН РБ. Сер. Мед.-біял. нав. – 2003. – № 2. – С. 86-90.
9. Стародубцева М.Н. Повреждения эритроцитов, инициированные взаимодействием нитрит-ионов с гемоглобином / М.Н. Стародубцева, В.А. Игнатенко, С.Н. Черенкевич // Биофизика. – 1999. – Т. 44, № 6. – С. 1068-1072.
10. Alayash A.I. Hemoglobin-based blood substitutes and the hazards of blood radicals / A.I. Alayash // Free Rad. Res. – 2000. – Vol. 33. – P. 341-348.
11. Alayash A.I. Hemoglobin-based blood substitutes: oxygen carriers, pressor agents, or oxidants? / A.I. Alayash // Nature Biotechnology. – 1999. – Vol. 17. – P. 545-549.
12. Alayash A.I. Peroxynitrite-mediated heme oxidation and protein modification of native and chemically modified hemoglobins / A.I. Alayash, B.A.B. Ryan, R.E. Cashion // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1998. - Vol. 349, №1. – P.65-73.
13. Biochemical characterization of S-nitrosohemoglobin effects on oxygen binding and transnitrosation / R.P. Patel, N. Hogg, N.Y. Spencer et al. // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274, № 22. – P. 15487-15492.
14. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient / J.S. Stamler, L. Jia, J.P. Eu et al. // Science. – 1997. – Vol. 276. - P.2034-2037.

15. Bonaventura C. Effects of S-nitrosation on oxygen binding by normal and sickle cell hemoglobin / C. Bonaventura, G. Ferruzzi, S. Tesh, R.D. Stevens // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, №35. – P.2474-2478.
16. Carter T.D. Potency and kinetics of nitric oxide-mediated vascular smooth muscle relaxation determined with flash photolysis of ruthenium nitrosyl chlorides / T.D. Carter, N. Bettache, D. Ogden // *Br. J. Pharmacol.* – 1997. – Vol. 122. – P.971-973.
17. Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes / X. Liu, M.J. Miller, M.S. Joshi et al. // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273, № 30. – P. 18709-18713.
18. Eaton W. Is cooperative oxygen binding by hemoglobin really understood? / W. Eaton, E.R. Henry, J. Hofrichter, A. Mozzarelli // *Nat. Struct. Biol.* – 1999. – Vol. 6. – P. 353-358.
19. Effect of nitric oxide and nitric oxide donors on red blood cell oxygen transport / B.W. Hrinchenko, A.I. Alayash, D.A. Wink et al. // *Br. J. Haematol.* – 2000. – Vol. 110. – P. 412-419.
20. Effect of nitric oxide on the transport and release of oxygen in fetal blood / M.E. Clementi, F. Orsini, M.E. Schinina et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – Vol. 302, №3. – P.512-519.
21. Effects of inhaled nitric oxide on regional blood flow are consistent with intravascular nitric oxide delivery / R.O. Cannon, A.N. Schechter, J.A. Panza et al. // *J. Clin. Invest.* – 2001. – Vol. 108, №2. – P. 279-287.
22. Effects of S-nitrosation of hemoglobin on hypoxic pulmonary vasoconstriction and nitric oxide flux / S. Deem, M.T. Gladwin, J.T. Berg et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* – 2001. – Vol. 163, №5. – P. 1164-1170.
23. Enhancement of S-nitrosylation in glycosylated hemoglobin / J. Padron, C. Peiro, E. Cercas et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – Vol. 271, №1. – P.217-221.
24. Experimental evidence suggesting that nitric oxide diffuses from tissue into blood but not from blood into tissue / A.V. Kozlov, B. Sobhian, G. Costantino et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2001. – Vol. 1536, №2-3. – P. 177-184.
25. Functional coupling of oxygen binding and vasoactivity in S-nitrosohemoglobin / T.J. McMahon, A.E. Stone, J. Bonaventura et al. // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275, №22. – P. 16738-16745.
26. Gladwin M.T. Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm / M.T. Gladwin, J.R. Lancaster, B.A. Freeman, A.N. Schechter // *Nat. Med.* – 2003. – Vol. 9, № 5. – P. 496-500.
27. Hsia C.C.W. Mechanisms of disease: Respiratory function of hemoglobin / C.C.W. Hsia // *New England J. of Medicine.* – 1998. – Vol. 338, №4. – P.239-247.
28. Human erythrocyte membrane band 3 protein influences hemoglobin cooperativity / Y. Zhang, L.R. Manning, J. Falcones et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 41. – P. 39565-39571.
29. Jia L. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control / L. Jia, C. Bonaventura, J. Bonaventura, J.S. Stamler // *Nature.* – 1996. – Vol. 380. – P. 221-226.
30. Jourdain D. Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood / D. Jourdain, K. Hallen, M. Feelisch, M.B. Grisham // *Free. Radic. Biol. Med.* – 2000a. – Vol. 28, №3. – P. 409-417.
31. Jourdain D. S-nitrosothiol formation in blood of lipopolysaccharide-treated rats / D. Jourdain, L. Gray, M.B. Grisham // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000b. – Vol. 273, №1. – P. 22-26.
32. Kosaka H. Physiological role of nitric oxide as an enhancer of oxygen transfer from erythrocytes to tissues / H. Kosaka, A. Seiyama // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. – Vol. 218, №3. – P.749-752.
33. Kourembanas S. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium / S. Kourembanas, P.A. Marsden, L.P. McQuillan, D.V. Faller // *J. Clin. Invest.* – 1991. – Vol. 88, №3. – P.1054-1057.
34. LeCras T.D. Nitric oxide production in the hypoxic lung / T.D. LeCras, I.F. McMurtry // *Am. J. Physiol.* – 2001. – Vol. 280, №4. – P. L575-L582.
35. Low concentrations of nitric oxide increase oxygen affinity of sickle erythrocytes in vitro and in vivo / C.A. Head, C. Brugnara, R. Martinez-Ruiz et al. // *J. Clin. Invest.* – 1997. – Vol.100, №5. – P.1193-1198.
36. Mamone G. In vitro formation of S-nitrosohemoglobin in red cells by inducible nitric oxide synthase / G. Mamone, N. Sannolo, A. Malorni, P. Ferranti // *FEBS. Lett.* – 1999. – Vol. 462, №3. – P.241-245.
37. May J.M. Nitrite uptake and metabolism and oxidant stress in human erythrocytes / J.M. May, Z.C. Qu, L. Xia, C.E. Cobb // *Am. J. Physiol. Cell.* – 2000. – Vol. 279. – P. C1946-C1954.
38. Metabolism and excretion of nitric oxide in humans / A. Wennmalm, G. Bentin, A. Edlund et al. // *Circ. Res.* – 1993. – Vol. 73. – P. 1121-1127.
39. Minetti M. Peroxynitrite induces long-lived tyrosyl radical in oxyhemoglobin of red blood cells through a reaction involving CO₂ and a ferryl species / M. Minetti, G. Scorza, D. Pietraforte // *Biochemistry.* – 1999. – Vol. 38. – P.2078-2087.
40. Modulation of nitric oxide bioavailability by erythrocytes / K.T. Huang, T.H. Han, D.R. Hyduke et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – Vol. 98, № 20. – P. 11771-11776.
41. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease / M.T. Gladwin, J.H. Shelhamer, F.P. Ognibene et al. // *Br. J. Haematol.* – 2002. – Vol. 6, № 2. – P. 436-444.
42. Nitric oxide level profile in human liver transplantation / S. Battista, G. Mengozzi, F. Bar et al. // *Dig. Dis. Sci.* – 2002. – № 3. – P. 528-534.
43. Nitrosyl hemoglobin in blood of normoxic and hypoxic sheep during nitric oxide inhalation / Y. Takahashi, H. Kobayashi, Tanaka N. et al. // *Am. J. Physiol.* – 1998. – Vol. 43. – P. H349-H357.
44. Oxygen regulation of rat hepatocyte iNOS gene expression / C. Vargiu, S. Belliardo, C. Cravanzola et al. // *J. of Hepatology.* – 2000. – Vol. 32, № 4. – P.567-573.
45. Perutz M.F. Blood. Taking the pressure off / M.F. Perutz // *Nature.* – 1996. – Vol. 380, № 6571. – P. 205-206.
46. Relative role of heme nitrosylation and beta-cysteine 93 nitrosation in the transport and metabolism of nitric oxide by hemoglobin in the human circulation / M.T. Gladwin, F.P. Ognibene, L.K. Pannell et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97, № 18. – P.9943-9948.
47. Reversible sequestration of nitric oxide by hemoglobin during hemodialysis in end-stage renal disease / E.S. Kang, D.E. Miles, M.T. Tevlin et al. // *American J. of the Med. Sciences.* – 2001. – Vol. 321, № 2. – P.113-123.
48. Samaja M. Blood gas transport at high altitude / M. Samaja // *Respiration.* – 1997. – Vol. 64. – P.422-428.
49. Samaja M. Oxygen transport in blood at high altitude: role of the hemoglobin-oxygen affinity and impact of the phenomena related to hemoglobin allosterism and red cell function / M. Samaja, T. Crespi, M. Guazzi, K.D. Vandegriff // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 2003. – № 90. – P. 351-359.
50. Schechter A.N. Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide / A.N. Schechter, M.T. Gladwin // *New Engl. J. Med.* – 2003. – Vol. 349, № 4. – P.402-405.
51. Squadrito G.L. The formation of peroxynitrite in vivo from nitric oxide and superoxide / G.L. Squadrito, W.A. Pryor // *Chem. Biol. Interact.* – 1995. – P. 203-206.
52. Stamler J.S. S-Nitrosothiols in the blood. Roles, amounts, and methods of analysis / J.S. Stamler // *Circ. Rec.* – 2004. – № 94. – P. 414-417.
53. Stepuro I. Glutathione oxidation under the action of sodium nitrite on hemoglobin / I. Stepuro, N. Chaikovskaya, T. Piletskaya, A. Solodunov // *Pol. J. Pharmacol.* – 1994. – Vol. 46. – P.601-607.
54. TaylorRobinson A.W. The sequestration hypothesis: an explanation for the sensitivity of malaria parasites to nitric oxide-mediated immune effector function in vivo / A.W. TaylorRobinson // *Med. Hypotheses.* – 2000. – Vol. 54, № 4. – P.638-641.
55. The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide / A.J. Gow, B.P. Luchsinger, J.R. Pawloski et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – Vol. 96, № 16. – P.9027-9032.
56. Vaughn M.W. Erythrocyte consumption of nitric oxide: competition experiment and model analysis / M.W. Vaughn, K.T. Huang, L. Kuo, J.C. Liao // *Nitric. Oxide.* – 2001. – Vol. 5, № 1. – P. 18-31.
57. Whorton A.R. Regulation of nitric oxide synthesis by oxygen in vascular endothelial cells / A.R. Whorton, D.B. Simonds, C.A. Piantadosi // *Am. J. Physiol.* – 1997. – Vol. 16. – P.L1161-1166.
58. Yonetani T. Electron paramagnetic resonance and oxygen binding studies of alpha-Nitrosyl hemoglobin. A novel oxygen carrier having no-assisted allosteric functions / T. Yonetani, A. Tsuneshige, Y. Zhou, X. Chen // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P.20323-20333.
59. Zinchuk V.V. Blood oxygen transport in rats under hypothermia combined with modification of the L-arginine-NO pathway / V.V. Zinchuk, L.V. Dorokhina // *Nitric. Oxide.* – 2002. – Vol. 6, № 1. – P. 29-34.
60. Zinchuk V.V. Body prooxidant-antioxidant state under the oxidative stress combined with a modification of L-arginine-NO pathway / V.V. Zinchuk, A.N. Glebov // *International conference «Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and human health».* – Smolensk, 2003. – P. 34.