

## S-НИТРОЗОГЛУТАТИОН В ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ (75 : 1) ИНГИБИРУЕТ КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩУЮ ФУНКЦИЮ ОКСИГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА

О. В. Путинцева, Е. А. Калаева, В. Г. Артюхов, Е. В. Гостева

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 05.09.2018 г.

**АННОТАЦИЯ.** S-нитрозотиолы могут выполнять функцию переносчика и протектора одного из универсальных регуляторов клеточного и тканевого метаболизма – оксида азота. Механизмы транспорта и регуляторные возможности молекул S-нитрозоглутатиона (GSNO) тесно связаны с железосодержащими белками, в частности, с гемоглобином. Комплексы гемоглобина с оксидом азота способны обмениваться NO-группами с тиолами, в том числе с глутатионом, что приводит к изменению просвета сосудов, скорости и интенсивности кровотока. Кроме того, нитрозоглутатион может оказывать непосредственное влияние на кислородтранспортные свойства гемоглобина, регулируя процессы ассоциации-диссоциации гемоглобина с лигандами. Анализ функциональных свойств гемоглобина человека, модифицированного S-нитрозоглутатионом, являлся целью данной работы. Было исследовано влияние GSNO в концентрациях  $1.0 \cdot 10^{-4}$ ,  $5.0 \cdot 10^{-4}$  и  $7.5 \cdot 10^{-4}$  моль/л на функциональные свойства оксигемоглобина человека. Оценку кислородсвязывающей активности гемоглобина проводили по величинам давления полунасыщения и константе Хилла; дополнительно рассчитывали содержание оксигемоглобина в интактном и модифицированных образцах гембелка при парциальных давлениях кислорода 3.19; 7.98; 15.96; 23.94; 31.92; 40.00; 63.84; 95.76; 100.00 мм рт. ст. и артериально-венозную разность содержания оксигемоглобина. Расчет тестируемых показателей проводили с помощью разработанных нами математических моделей на основе метода кусочно-линейной аппроксимации. Показано, что при низкой концентрации GSNO ( $1.0 \cdot 10^{-4}$  моль/л) преобладали процессы нитрозилирования Cys93β гемоглобина, усиление кооперативных взаимодействий, снижение сродства гемоглобина к кислороду на начальных этапах оксигенации. При повышении содержания S-нитрозоглутатиона ( $5.0 \cdot 10^{-4}$  моль/л) происходило частичное нитрозилирование гема, повышение сродства гемоглобина к кислороду при высоком парциальном давлении O<sub>2</sub>. В условиях избытка GSNO и отсутствия доступных для NO сайтов связывания на гемоглобине преобладали окислительные процессы с участием кислорода и оксида азота, следствием которых являлось накопление MnHb и утрата гемоглобином функциональной активности. Таким образом, типы изменения функциональных свойств оксигемоглобина в растворе зависели от концентрации модификатора и определялись природой продуктов взаимодействия гембелка с нитрозотиолом.

**Ключевые слова:** гемоглобин, кислородсвязывающие свойства, кривые диссоциации оксигемоглобина, S-нитрозоглутатион, оксид азота, параметры сатурации.

Глутатион (γ-глутамилцистеинилглицин) представляет собой атипичный трипептид: остаток цистеина присоединен к γ-карбоксильной группе глутаминовой кислоты. Глутатион является естественным компонентом эритроцитов. В норме в клетке содержится около  $4.0 \cdot 10^{-3}$  моль/л восстановленного (GSH) и  $5.0 \cdot 10^{-6}$  моль/л окисленного (GSSG) глутатиона [1]. Синтезированный в эритроцитах γ-глутамилцистеинилглицин обеспечивает окислительно-восстановительный статус и

поддерживает ряд ферментативных систем в активном состоянии. Сам трипептид входит в состав глутатионредуктазной метаболической системы.

Кроме GSH и GSSG, в крови человека обнаруживается S-нитрозоглутатион (GSNO). В плазме концентрация GSNO составляет 14.0 мкмоль/л. Это один из наиболее стабильных S-нитрозотиолов, время полураспада которого достигает недели [2].

Многие исследователи рассматривают S-нитрозотиолы как транспортную форму одного из универсальных регуляторов клеточного

и тканевого метаболизма – оксида азота [3, 4]. S-нитрозотиолы (RSNO) могут выступать в качестве протекторов NO при переносе его как внутри клетки, так и между клетками и тканями, тем самым повышая эффективность действия этого уникального регулятора клеточного метаболизма. Включение NO в форме ионов нитрозония  $\text{NO}^+$  в низкомолекулярные тиолы существенно расширяет круг внутриклеточных биомолекул, с которыми он может вступать в реакции [5].

Механизмы транспорта и регуляторные возможности молекул GSNO тесно связаны с железосодержащими белками, и в частности с гемоглобином. Предполагается, что комплексы гемоглобина с оксидом азота действуют как «аллостерически контролируемый буфер NO» [6], обмениваясь NO-группами с тиолами, в том числе с глутатионом, и тем самым изменяя кровоток, выполняя роль критического фактора, определяющего доставку  $\text{O}_2$ .

Анализ функциональных свойств гемоглобина человека, модифицированного S-нитрозоглутатионом, явился целью данной работы.

## МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектами исследования являлись растворы оксигемоглобина человека в 0.1 моль/л Na-фосфатном буфере (pH 7.4), полученные из эритроцитов крови доноров по методу [7] с модификацией [8].

Для получения S-нитрозоглутатиона к водному раствору восстановленного глутатиона (GSH) добавляли водный раствор нитрита натрия ( $\text{NaNO}_2$ ) в молярном соотношении 1:1. Полученную смесь реагентов инкубировали 20 мин. при комнатной температуре [9]. Концентрацию S-нитрозоглутатиона определяли по величине оптической плотности при 335 нм ( $\epsilon = 774$  л/моль·см) [10]. Раствор S-нитрозоглутатиона добавляли к раствору оксигемоглобина человека ( $1.0 \cdot 10^{-5}$  моль/л) до конечной концентрации  $1.0 \cdot 10^{-4}$ ,  $5.0 \cdot 10^{-4}$  и  $7.5 \cdot 10^{-4}$  моль/л. При этом соотношение молекул гембелка и S-нитрозоглутатиона составляло 1 : 10, 1 : 50 и 1 : 75 соответственно.

Методика регистрации кривых диссоциации оксигемоглобина (КДО) подробно изложена в наших работах [11, 12]. Для регистрации КДО использовали спектрофотометрический метод, основанный на линейной связи между степенью насыщения гемоглобина кислородом и изменением его спектральных характеристик. Степень перехода оксиформы в дезоксиформу контролировали спектрофотометрически, рассчитывая соотношение оптических плотностей при длинах

волн 555 и 540 нм [13]. Парциальное давление кислорода в тонометре рассчитывали по формуле (1):

$$p\text{O}_2 = P_{\text{возд.}} \cdot F/100 \quad (1),$$

где  $p\text{O}_2$  – парциальное давление кислорода, мм рт.ст.;  $P_{\text{возд.}}$  – давление воздуха в тонометре, мм рт.ст.; F – содержание кислорода в воздухе, %.

Степень насыщения гемоглобина кислородом (Y) вычисляли по формуле (2):

$$Y = \frac{A_{\text{Hb}} - A_x}{A_{\text{Hb}} - A_{\text{HbO}_2}}, \quad (2),$$

где  $A_{\text{Hb}}$  – оптическая плотность раствора дезоксигемоглобина;  $A_{\text{HbO}_2}$  – оптическая плотность раствора оксигемоглобина;  $A_x$  – оптическая плотность раствора гемоглобина при данном давлении.

При построении кривых диссоциации оксигемоглобина по оси абсцисс откладывали парциальное давление кислорода (мм рт. ст.), а по оси ординат – насыщение гемоглобина кислородом (%).

Значение константы Хилла ( $\alpha$ ) определяли графически как тангенс угла наклона касательной к кривой зависимости  $\lg[Y/(1-Y)] - \lg p\text{O}_2$  в точке полунасыщения ( $P_{50}$ ).

Помимо традиционной оценки функциональной активности гемоглобина по величинам  $P_{50}$  и константы Хилла, для учета сложного характера взаимодействий дериватов гемоглобина между собой и для уточнения, в какой фазе оксигенации происходят те или иные изменения, нами было рассчитано содержание оксигемоглобина в интактном и модифицированных образцах гембелка при парциальных давлениях кислорода 3.19; 7.98; 15.96; 23.94; 31.92; 40.00; 63.84; 95.76; 100.00 мм рт. ст. Расчет проводили с помощью ранее разработанных нами математических моделей на основе метода кусочно-линейной аппроксимации [14].

Дополнительную информацию о кислород-транспортной функции гемоглобина позволяет получить величина артериально-венозной разности (разности содержания  $\text{HbO}_2$  в артериальной (при  $p\text{O}_2=100.00$  мм рт. ст.) и венозной (при  $p\text{O}_2=40.00$  мм рт. ст.) крови, отражающая эффективность газообмена.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакета прикладных статистических программ «Stadia 7.0 (Professional)». Процедуры группировки и обработки данных подробно изложены в нашей работе [15]. Статистическую значимость различий величин контрольных и опытных значений определяли по t-критерию Стьюдента (при  $P < 0.05$ ), поскольку все исследуемые признаки характеризовались нормальным распределением.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ кривых диссоциации нативного оксигемоглобина человека позволил установить, что функция насыщения гембелка кислородом подчиняется S-образной зависимости, а на графике можно условно выделить 3 фазы процесса оксигенации (рис. 1). Нативные образцы  $\text{HbO}_2$  характеризовались величиной  $P_{50} = 21.57 \pm 0.78$  мм рт. ст. и константой Хилла  $\alpha = 2.36 \pm 0.35$ . Содержание оксигенированного гемоглобина при парциальном давлении кислорода 40.00 мм рт. ст. составило  $84.35 \pm 0.98$  %, при 100.00 мм рт. ст. –  $97.13 \pm 0.87$  %, артериально-венозная разность содержания  $\text{HbO}_2$  (ABP) была равна  $12.32 \pm 0.76$  % (табл. 1).

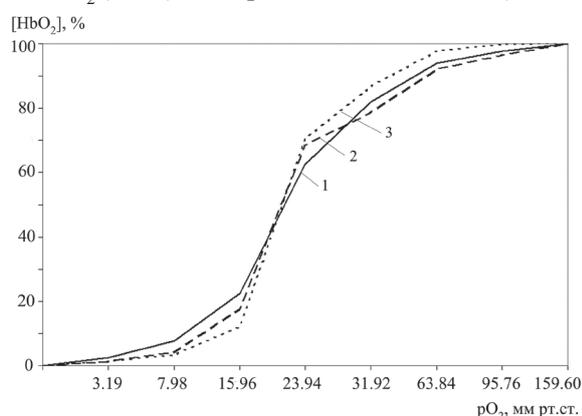


Рис. 1. Кривые диссоциации нативного и модифицированного нитрозоглутатионом оксигемоглобина человека. Обозначения: 1 –  $\text{HbO}_2$  интактный (контроль); 2 –  $\text{HbO}_2 + \text{GSNO}$  (1 : 10); 3 –  $\text{HbO}_2 + \text{GSNO}$  (1 : 50).

Добавление к раствору оксигемоглобина нитрозоглутатиона в концентрации  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л приводило к статистически достоверному повышению величины  $Y_{40}$  до  $88.53 \pm 0.62$  % и одновременному снижению ABP до  $8.92 \pm 0.61$  % по сравнению с интактными образцами. Полученные результаты свидетельствуют о том, что модифицированный нитрозоглутатионом в указанной концентрации гемоглобин обладает повышенным сродством к кислороду в сравнении с нативным белком. Показатели  $P_{50}$ ,  $\alpha$  и  $Y_{100}$  не претерпели изменений по отношению к контролю.

Сатурационные кривые модифицированного гемопротейда имели более крутой изгиб по сравнению с контрольной КДО (рис. 1).

Гемоглобин, модифицированный S-нитрозоглутатионом в концентрации  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л, на начальных этапах сатурации (3.19 - 15.96 мм рт. ст.) демонстрировал снижение сродства к кислороду по сравнению с нативным гемоглобином. При 23.94 мм рт. ст. насыщенность модифицированного гемопротейда кислородом оказалась выше контрольных величин, а при дальнейшем увеличении парциального давления кислорода сравнивалась с аналогичными показателями интактного белка (табл. 2).

При повышении содержания модификатора в растворе в 5 раз отмечалось статистически достоверное изменение всех расчетных параметров КДО по сравнению с интактным гембелком. Так, произошло снижение величин  $P_{50}$  и ABP до  $18.12 \pm 0.47$  мм рт. ст. и  $10.12 \pm 0.38$  % соответственно; показатели  $Y_{40}$

Таблица 1

Основные параметры сатурации оксигемоглобина человека, модифицированного GSNO в различных концентрациях

Параметры сатурации	$\text{HbO}_2$	$\text{Hb-GSNO}$ (1:10)	$\text{Hb-GSNO}$ (1:50)
$P_{50}$ , мм рт. ст.	$21.57 \pm 0.78$	$21.16 \pm 0.41$	$18.12 \pm 0.47$ *
$\alpha$	$2.36 \pm 0.35$	$2.46 \pm 0.28$	$3.29 \pm 0.24$ *
$Y_{40}$ , %	$84.35 \pm 0.98$	$88.53 \pm 0.62$ *	$89.61 \pm 0.94$ *
$Y_{100}$ , %	$97.13 \pm 0.87$	$97.34 \pm 0.59$	$99.87 \pm 0.19$ *
ABP, %	$12.32 \pm 0.76$	$8.92 \pm 0.61$ *	$10.12 \pm 0.38$ *

Примечание: \* - отличия от контроля (нативного оксигемоглобина) статистически достоверны ( $P < 0.05$ )

Таблица 2

Параметры динамики насыщения кислородом оксигемоглобина человека, модифицированного GSNO в различных концентрациях

$p\text{O}_2$ , мм рт. ст.	$\text{HbO}_2$	$\text{Hb-GSNO}$ (1:10)	$\text{Hb-GSNO}$ (1:50)
0	0	0	0
3.19	$2.56 \pm 0.97$	$1.33 \pm 0.84$ *	$1.26 \pm 0.63$ *
7.98	$7.68 \pm 2.36$	$4.17 \pm 0.91$ *	$3.29 \pm 0.76$ *
15.96	$22.42 \pm 3.93$	$17.63 \pm 0.25$ *	$12.11 \pm 0.59$ *
23.94	$62.50 \pm 3.45$	$68.31 \pm 0.93$ *	$70.37 \pm 1.11$ *
31.92	$81.90 \pm 2.39$	$78.67 \pm 0.69$	$86.72 \pm 0.93$ *
63.84	$93.98 \pm 0.81$	$92.12 \pm 0.95$	$97.65 \pm 0.26$ *
95.76	$97.61 \pm 0.43$	$96.53 \pm 0.32$	$99.83 \pm 0.23$ *
159.6	100	100	100

Примечание: \* - отличия от контроля (нативного оксигемоглобина) статистически достоверны ( $P < 0.05$ )

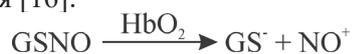
и  $Y_{100}$  возросли до  $89.61 \pm 0.94 \%$  и  $99.87 \pm 0.19 \%$ , а константа Хилла – до  $3.29 \pm 0.24$ . Обнаруженные изменения свидетельствуют об усилении межсубъединичных взаимодействий и повышении сродства гемоглобина к кислороду в присутствии GSNO в концентрации  $5.0 \cdot 10^{-4}$  моль/л. Было выявлено значительное снижение насыщения гембелка кислородом в диапазоне значений парциального давления  $O_2$  от 3.19 до 15.96 мм рт. ст., и его повышение при увеличении  $pO_2$  до 23.94 – 95.76 мм рт. ст.

Таким образом, модификация гемоглобина S-нитрозоглутатионом приводила к усилению гем-гемовых взаимодействий. Вследствие этого возникали стерические препятствия, и сродство гемоглобина к кислороду на начальных этапах сатурации снижалось. Однако в области физиологически значимых величин парциального давления  $O_2$  интенсивность присоединения лиганда заметно возрастала и оказывалась выше контрольных значений. Артериально-венозная разность оставалась сниженной по сравнению с нативными образцами гемоглобина.

При повышении концентрации нитрозоглутатиона в растворе до  $7.5 \cdot 10^{-4}$  моль/л зарегистрировать кривые диссоциации гембелка не удалось: наблюдалась полная потеря функциональной активности белка.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что молекулы S-нитрозоглутатиона при взаимодействии с оксигемоглобином подвергаются разложению по гетеролитическому механизму в результате реакции транснаитрозилирования [16]:



Согласно данным литературы [17-20] и полученным нами ранее результатам [21], оксигенированный гемоглобин преимущественно присоединяет NO к цистеину-β93 апобелка. Это приводит к снижению сродства гемоглобина к кислороду, что и было обнаружено нами на начальных этапах оксигенации модифицированного S-нитрозоглутатионом гемоглобина человека.

При увеличении концентрации GSNO в отсутствии доступных для нитрозилирования остатков цистеина, мишенью NO является гем  $Fe^{2+}$ . Оксид азота активно присоединяется к нему, частично вытесняя кислород. За счет этого формируются гибридные молекулы  $Hb-(Fe-O_2)_x(Fe-NO)_y$ , обладающие повышенным сродством к кислороду. Усиление кооперативного эффекта и аффинности гемоглобина к лиганду приводило к более интен-

сивному связыванию кислорода при высоких значениях его парциального давления в присутствии модификатора. На зарегистрированных нами КДО эта перестройка сопровождается формированием более крутого, по сравнению с контролем, изгиба кривой.

Избыток высвобождаемого при разложении S-нитрозоглутатиона NO при отсутствии свободных сайтов связывания в молекуле гемоглобина способен взаимодействовать с  $O_2$  с образованием пероксинитрита, который обуславливает прямое окисление железа гема в гемоглобине. Так, ранее нами было установлено, что в присутствии высоких концентраций S-нитрозоглутатиона ( $1.0 \cdot 10^{-3}$  моль/л) наблюдается резкое возрастание в образцах гемопротеида содержания метгемоглобина [22]. Результатом взаимодействия пероксинитрита с гемоглобином является накопление метгемоглобина и потеря гемопротеидом функциональной активности.

Суммировать полученные результаты можно в виде следующей схемы:

Концентрация S-нитрозоглутатиона, моль/л	Наблюдаемый эффект
$1.0 \cdot 10^{-4}$	$HS-HbFe^{2+}O_2 + NO \rightarrow NOS-HbFe^{2+}O_2$ (нитрозилирование Cys93β гемоглобина, усиление кооперативных взаимодействий, снижение сродства гемоглобина к кислороду на начальных этапах оксигенации)
$5.0 \cdot 10^{-4}$	$NOS-HbFe^{2+}O_2 \rightarrow NO-Hb(Fe^{2+}O_2)_4 + NO \rightarrow Hb(Fe^{2+}O_2)_x(Fe^{2+}NO)_y$ (частичное нитрозилирование гема, повышение сродства гемоглобина к кислороду при высоком парциальном давлении $O_2$ )
$7.5 \cdot 10^{-4}$	$NO + O_2 \rightarrow ONOO^-$ (усиление окислительных процессов, накопление $MtHbFe^{3+}$ )

Таким образом, изменения функциональных свойств оксигемоглобина человека в присутствии S-нитрозоглутатиона зависят от концентрации модификатора и определяются природой продуктов взаимодействия гемопротеида с низкомолекулярным нитрозотиолом.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашкинази И.Я. Физиология системы крови. Физиология эритропоэза. Ленинград, Наука, 1979. С. 274-275.
2. Недоспасов А.А., Беда Н.В. // Природа. 2005. № 7. С. 35-42.
3. Jourd'heuil D., Hallén K., Feelisch M.,

Grisham M.B. // Free Radic. Biol. Med. 2000. Vol. 28. No 3, pp. 409 – 417.

4. Hill K.E., Hunt R.W. Jr., Jones R., Hoover R.L., Burk R.F. // Biochem. Pharmacol. 1992. Vol. 43, pp. 561-566.

5. Шумаев К.Б., Заббарова И.В., Рууге Э.К., Ванин А.Ф. // Биофизика. 2003. Т. 48. № 1. С. 5 – 10.

6. Perutz M.F. // Nature. 1996. Vol. 380, No 1371, pp. 205 – 206.

7. Блюменфельд Л.А. Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода. Москва, Советская наука, 1957. 132 с.

8. Drabkin D. // J. Biol. Chem. 1946. Vol. 164, No 2, pp. 703-723. Availible at: <http://www.jbc.org/content/164/2/703.full.pdf+html> (accessed 23.07.2018)

9. Степуро И.И., Чайковская Н.А., Воеводич В.П. // Биохимия. 1997. Т.62. № 9. С. 1130.

10. Ванин А.Ф. // Биохимия. 1995. Т. 60. № 1. С. 593-602.

11. Артюхов В.Г., Калаева Е.А., Путинцева О.В., Полубезьева А.И. // Биомедицинская химия. 2016. Т. 62. № 3. С. 251-258.

12. Калаева Е.А., Артюхов В.Г., Путинцева О.В., Полубезьева А.И. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2016. Т.79. №9. С.12-17.

13. Столяр О.Б., Петренко О.И., Коробов В.Н. // Вестник Львовского университета, серия биологическая. 1979. Вып. 2. Молекулярные механизмы

биологического действия ионизирующих излучений. С. 64 – 75.

14. Артюхов В.Г., Калаева Е.А., Путинцева О.В., Преображенский А.П. // Биофизика. 2007. Т. 52. № 1. С. 24-32.

15. Калаева Е.А., Артюхов В.Г., Калаев В.Н. Теоретические основы и практическое применение математической статистики в биологических исследованиях и образовании. Воронеж, Издательский дом ВГУ, 2016. 284 с.

16. R. P. Patel, N. Hogg, N. Y. Spencer, B. Kalyanaraman, S. Matalon, V. M. Darley-Usmar // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274, No 22, pp. 15487-15429.

17. Ванин А.Ф. // Биофизика. 2006. Т. 51. № 6. С. 965-967. №14.

18. Зинчук В.В., Борисюк М.В. // Усп. физиол. наук. 1999. Т. 30. № 3. С. 38-48.

19. Stamler J.S., Jia L., Eu J.P., McMahon T.J., Demchenko I.T., Bonaventura J., Gernert K., Piantadosi C.A. // Science. 1997. Vol. 276, pp. 2034-3037.

20. Jia L., Bonaventura C., Bonaventura J., Stamler J.S. // Nature. 1996. Vol. 380, pp. 221-226.

21. Калаева Е.А. Дисс. канд. биол. наук. Воронеж, 2001. 152 с.

22. Артюхов В.Г., Путинцева О.В., Калаева Е.А., Савостин В.С. Гемоглобин человека в условиях воздействия различных физико-химических агентов. Воронеж. Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета. 2013. 364 с.

*Воронежский Государственный Университет*  
Путинцева О. В., доктор биологических наук,  
профессор кафедры биофизики и биотехнологии  
Тел.: +7 (473) 220-85-86  
E-mail: o.v.putinseva@gmail.com

\*Калаева Е. А., кандидат биологических наук,  
доцент кафедры биофизики и биотехнологии  
Тел.: +7 (473) 220-85-86  
E-mail: kalaevae@gmail.com

Артюхов В. Г., доктор биол. наук, профессор,  
зав. кафедрой биофизики и биотехнологии  
Тел.: +7 (473) 220-89-81  
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Гостева Е. В., студент кафедры биофизики и  
биотехнологии

*Voronezh State University*  
Putintseva O. V., PhD., DSci., Full Professor,  
Department of Biophysics and Biotechnology  
Ph.: +7 (473) 220-85-86  
E-mail: o.v.putinseva@gmail.com

\*Kalaeva E. A., Ph.D.(biology), Associate  
Professor, Dept. of Biophysics and Biotechnology  
Ph.: +7 (473) 220-85-86  
E-mail: kalaevae@gmail.com

Artyukhov V. G., PhD (Biology), Full professor,  
Head of the Biophysics and Biotechnology department  
Ph.: +7 (473) 220-89-81  
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Gosteva E. V., student, Department of Biophysics  
and Biotechnology

## **S-NITROSOGLUTATHION IN HIGH CONCENTRATIONS (75: 1) INHIBITS OXYGEN-BINDING FUNCTION OF HUMAN OXYGEMOGLOBIN**

**O. V. Putintseva, E. A. Kalaeva, V. G. Artyukhov, E. V. Gosteva**

*Voronezh State University*

**Abstract.** S-nitrosothiols can act as carrier and protector of one of the universal regulators of cellular and tissue metabolism - nitric oxide. Mechanisms of transport and regulatory capabilities of S-nitrosoglutathione molecules (GSNO) are closely related to iron-containing proteins, in particular, with hemoglobin. Complexes of hemoglobin with nitric oxide are able to exchange NO-groups with thiols, including with glutathione, which leads to a change in the inner diameter of the vessels, the speed and intensity of the blood flow. In addition, nitrosoglutathione can directly affect the oxygen transport properties of hemoglobin, regulating the association - dissociation processes of hemoglobin with ligands. Analysis of the functional properties of human hemoglobin, modified with S-nitrosoglutathione, was the aim of this work. The effect of GSNO at concentrations of  $1.0 \cdot 10^{-4}$ ,  $5.0 \cdot 10^{-4}$  and  $7.5 \cdot 10^{-4}$  mol/l on the functional properties of human oxyhemoglobin was investigated. The oxygen-binding activity of hemoglobin was estimated from the values of the half-saturation pressure and the Hill constant; the oxyhemoglobin content was also calculated in intact and modified samples of the hemoprotein at partial oxygen pressures of 3.19; 7.98; 15.96; 23.94; 31.92; 40.00; 63.84; 95.76; 100.00 mm hg and arterial-venous difference in the content of oxyhemoglobin. The calculation of tested parameters was carried out using mathematical models developed by us on the basis of the piecewise linear approximation method. It was shown that with low concentration of GSNO ( $1.0 \cdot 10^{-4}$  mol/l), the processes of nitrosylation of Cys93 $\beta$  hemoglobin predominated, increased cooperative interactions, decreasing in the affinity of hemoglobin for oxygen in the initial stages of oxygenation. With increasing in the content of S-nitrosoglutathione ( $5.0 \cdot 10^{-4}$  mol/l), partial nitrosylation of the heme occurred, increasing in the affinity of hemoglobin for oxygen at a high partial pressure of O<sub>2</sub>. In conditions of excess of GSNO and absence of binding sites of hemoglobin, available for NO, oxidative processes involving oxygen and nitrogen oxide predominated, which resulted in accumulation of MtHb and loss of hemoglobin functional activity. Thus, the types of changes in the functional properties of oxyhemoglobin in the solution depended on the concentration of the modifier and were determined by the nature of the products of interaction of the hemoprotein with nitrosothiol.

**Keywords:** hemoglobin, oxygen-binding properties, dissociation curves of oxyhemoglobin, S-nitrosoglutathione, nitric oxide, parameters of saturation.

### **REFERENCES**

1. Ashkinazi I.Ya. Fiziologiya sistemy krovi. Fiziologiya eritropoeza. Leningrad, Nauka, 1979, p. 274.
2. Nedospasov A.A., Beda N.V. Priroda, 2005, No 7, pp. 35-42.
3. Jourd'heuil D., Hallén K., Feilisch M., Grisham M.B. Free Radic. Biol. Med, 2000, Vol. 28, No 3, pp. 409-417. DOI: 10.1016/S0891-5849(99)00257-9. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584999002579?via%3Dihub> (accessed 23.07.2018).
4. Hill K.E., Hunt R.W. Jr., Jones R., Hoover R.L., Burk R.F. Biochem. Pharmacol, 1992, Vol. 43, pp. 561-566. DOI: 10.1016/0006-2952(92)90579-8. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0006295292905798> (accessed 23.07.2018).
5. Shumaev K.B., Zabbarova I.V., Ruuge E.K., Vanin A.F. Biofizika, 2003, Vol. 48, No 1, pp. 5-10.
6. Perutz M.F. Nature, 1996, Vol. 380, No 1371, pp. 205 – 206. DOI: 10.1038/380205b0. Available at: <https://www.nature.com/articles/380205b0> (accessed 23.07.2018).
7. Blyumenfel'd L.A. Gemoglobin i obratimoe prisoedinenie kisloroda. Moskva, Sovetskaya nauka, 1957, 132 p.
8. Drabkin D. J. Biol. Chem, 1946, Vol. 164, No 2, pp. 703-723. Available at: <http://www.jbc.org/content/164/2/703.full.pdf+html> (accessed 23.07.2018).
9. Stepuro I.I., Chaikovskaya N.A., Voevodich V.P. Biokhimiya, 1997, Vol.62, No 9, pp. 1130.
10. Vanin A.F. Biokhimiya, 1995, Vol. 60, No 1, pp. 593-602.
11. Artyukhov V.G., Kalaeva E.A., Putintseva O.V., Polyubez'eva A.I. Biomeditsinskaya khimiya, 2016, Vol. 62, No 3, pp. 251-258.
12. Kalaeva E.A., Artyukhov V.G., Putintseva O.V., Polyubez'eva A.I. Eksperimental'naya i

klinicheskaya farmakologiya, 2016, Vol. 79, No 9, pp.12-17.

13. Stolyar O.B., Petrenko O.I., Korobov V.N. Vestnik L'vovskogo universiteta, seriya biologicheskaya, 1979, Pt. 2. Molekulyarnye mekhanizmy biologicheskogo deistviya ioniziruyushchikh izlucheni, pp. 64-75.

14. Artyukhov V.G., Kalaeva E.A., Putintseva O.V., Preobrazhenskii A.P. Biofizika, 2007, Vol. 52, No 1, pp. 24-32.

15. Kalaeva E.A., Artyukhov V.G., Kalaev V.N. Teoreticheskie osnovy i prakticheskoe primenenie matematicheskoi statistiki v biologicheskikh issledovaniyakh i obrazovanii. Voronezh, Izdatel'skii dom VGU, 2016, 284 p.

16. Patel R. P., Hogg N., Spencer N. Y., Kalyanaraman B., Matalon S., Darley-Usmar V. M. J. Biol. Chem, 1999, Vol. 274, No 22, pp. 15487-15429. DOI: 10.1074/jbc.274.22.15487. Available at: <http://www.jbc.org/content/274/22.toc> (accessed 26.07.2018).

17. Vanin A.F. Biofizika, 2006, Vol. 51, No 6, pp. 965-967.

18. Zinchuk V.V., Borisyuk M.V. Usp. fiziol. nauk, 1999, Vol. 30, No 3, pp. 38-48.

19. Stamler J.S., Jia L., Eu J.P., McMahon T.J., Demchenko I.T., Bonaventura J., Gernert K., Piantadosi C.A. Science, 1997, Vol. 276, pp. 2034-3037. DOI: 10.1126/science.276.5321.2034. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/276/5321/2034.long> (accessed 26.07.2018).

20. Jia L., Bonaventura C., Bonaventura J., Stamler J.S. Nature, 1996, Vol. 380, pp. 221-226. DOI: 10.1038/380221a0. Available at: <https://www.nature.com/articles/380221a0> (accessed 26.07.2018).

21. Kalaeva E.A. Diss. kand. biol. nauk. Voronezh, 2001, 152 p.

22. Artyukhov V.G., Putintseva O.V., Kalaeva E.A., Savostin V.S. Gemoglobin cheloveka v usloviyakh vozdeistviya razlichnykh fiziko-khimicheskikh agentov. Voronezh, Izdatel'sko-poligraficheskii tsentr Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta, 2013, 364 p.