

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

ВЛИЯНИЕ НИТРОГЛИЦЕРИНА НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ И КИСЛОРОДСВЯЗЫВАЮЩИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВНУТРИЭРИТРОЦИТАРНОГО ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА

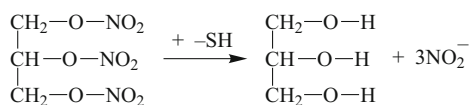
Е. А. Калаева, В. Г. Артюхов, О. В. Путинцева, А. И. Полюбезьева¹

Исследованы спектральные и кислородсвязывающие характеристики внутриэритроцитарного гемоглобина человека в присутствии нитроглицерина в концентрациях 5 нг/мл и 5 мкг/мл. Кратковременная инкубация (20 мин) эритроцитов с лекарственным препаратом индуцировала возрастание сродства гемоглобина к кислороду, ослабление кооперативных взаимодействий в молекулах гембелка, в результате чего количество O₂, отдаваемое тканям в процессе газообмена, уменьшилось на 23,96 % (5 нг/мл) и 26,68 % (5 мкг/мл), $p < 0,05$. Инкубация клеток в течение 24 ч приводила к окислению атома железа гема, накоплению метформы гемопротейда и частичному гемолизу. Нитроглицерин снижал интенсивность окислительных процессов, зависимости степени изменения физико-химических свойств гемоглобина от концентрации нитроглицерина не обнаружено.

Ключевые слова: артериально-венозная разность; гемоглобин; давление полунасыщения; кислородсвязывающие свойства; константа Хилла; кривая диссоциации оксигемоглобина; нитроглицерин; оксид азота; электронный спектр поглощения.

ВВЕДЕНИЕ

Нитроглицерин рассматривается в настоящее время как эталонный препарат в группе нитратов, применяемых для купирования приступов стенокардии [3, 7]. Нитраты являются пролекарствами. Активной группой нитроглицерина являются нитрит-ионы (NO₂⁻), которые в организме высвобождаются в ходе реакции:



Затем происходит восстановление NO₂⁻ до NO ферментативным (при участии редуктаз) или неферментативным (при участии низкомолекулярных тиолов или SH-групп белков, а также восстановленного гемоглобина) путем. Образовавшийся таким образом оксид азота оказывает вазодилаторное действие через активацию гуанилатциклазы. Согласно концепции цикла оксида азота, реакция восстановления NO₃⁻ → NO₂⁻ → NO ингибируется в присутствии кислорода [9], а при низкой концентрации O₂ в среде нитраты восстанавливаются до NO [5, 6]. Подтверждением преобладания в условиях гипоксии нитритредуктазных процессов служит, в частности, и тот факт, что нитроглицерин воздействует преимущественно на ве-

нозную часть сосудистого русла, т.е. NO образуется из NO₂⁻ в условиях дефицита кислорода.

При передозировке нитроглицерина (более 20 мкг/кг) возникает целый ряд побочных эффектов, в том числе метгемоглобинемия [8] вследствие нитрит-индуцированного окисления гемоглобина. Окисленный гемоглобин утрачивает способность связывать кислород в легких и переносить его к тканям и органам. Нарушение газотранспортной функции гемоглобина влечет за собой негативные последствия для организма, особенно при сердечно-сосудистой патологии. Поэтому выявление не только основных, но и побочных (в том числе токсических) эффектов препаратов-доноров NO является одним из актуальных направлений исследований в области фармакологии системы крови.

Гемоглобин претендует на роль основного переносчика NO в кровеносном русле. Однако сведения, касающиеся взаимодействия NO с эритроцитами и внутриклеточным гемоглобином, довольно противоречивы. Одни авторы [16] считают, что проницаемость эритроцитарной мембраны для NO сравнительно невысока. Скорость реакции NO с гемоглобином, находящимся в эритроцитах, в 800 раз меньше, чем с эквивалентным количеством свободного гемоглобина [17]. В то же время другими исследователями показано, что клеточная мембрана эритроцитов не является существенным барьером для NO и не лимитирует его взаимодействие с гемоглобином. Мембрана эритроцитов рассматривается как некий специализированный “насос” для NO, который активно регулирует его транспорт

¹ ФГБОУ ВО “Воронежский государственный университет”, Россия, 394006, Воронеж, Университетская пл., 1; fax: +7 (473) 220-87-55; e-mail: office@main.vsu.ru

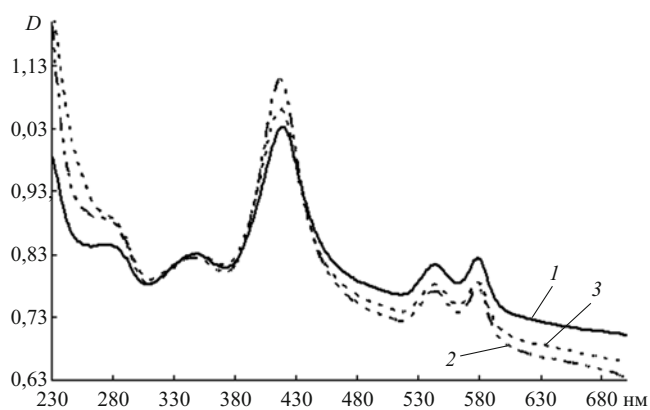


Рис. 1. ЭСП интактной и модифицированной нитроглицерином суспензии эритроцитов человека (инкубация 3 ч):

1 – нативные эритроциты (типичный пример); 2 – эритроциты + нитроглицерин (5 нг/мл) (типичный пример); 3 – эритроциты + нитроглицерин (5 мкг/мл) (типичный пример).

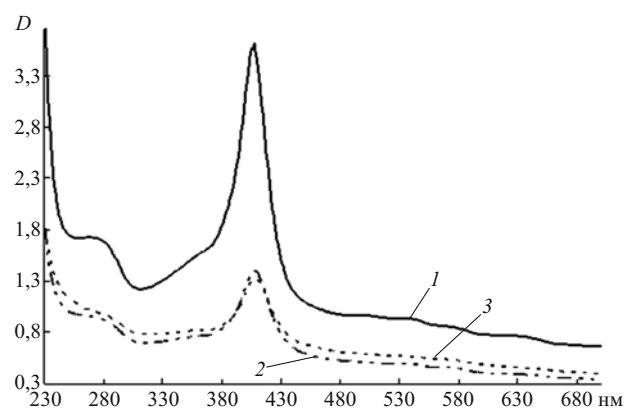


Рис. 2. ЭСП интактных и модифицированных нитроглицерином суспензий эритроцитов человека (инкубация 24 ч):

1 – нативные эритроциты (типичный пример); 2 – эритроциты + нитроглицерин (5 нг/мл) (типичный пример); 3 – эритроциты + нитроглицерин (5 мкг/мл) (типичный пример).

[14]. Молекулы оксида азота обладают достаточно высокими коэффициентами диффузии внутри эритроцита и с высокой аффинностью связываются с гемоглобином. Критическими факторами, определяющими скорость захвата NO эритроцитами, является ориентация мембрансвязанных молекул гемоглобина относительно плазматической мембраны и его внутриклеточное распределение [15].

Данные литературы о механизмах и продуктах взаимодействия гемоглобина человека с нитрит- и нитратсодержащими веществами также зачастую противоречат друг другу. Так, одни авторы указывают на то, что прямое восстановление нитрита в присутствии гемоглобина происходит при нейтральных значениях pH, при этом дезоксигемоглобин окисляется до метформы, а нитрит восстанавливается до NO [5]. Через 1,5 ч после однократного внутрибрюшинного введе-

ния 0,6 % раствора нитрита натрия в средней летальной дозе (90 мг/кг) в крови у экспериментальных животных регистрируется повышение уровня МгНв до $(53,4 \pm 2,8) \%$, а на 7 сут и в последующие сроки наблюдения его содержание не отличается от значений в контрольной группе $(1,4 \pm 0,1) \%$ [13]. Другие исследователи считают, что непосредственное окислительно-восстановительное взаимодействие между гемоглобином и нитратами в физиологических условиях практически отсутствует [11]. Причиной того, что нитрит-ионы не могут акцептировать электрон с молекулы оксигемоглобина, по-видимому, является наличие связанного с гемом кислорода, который препятствует осуществлению контакта между донорной орбиталью гема и акцепторной орбиталью NO_2^- [10]. Возможно, что условия проведения экспериментов, химические свойства и концентрации модифицирующих агентов,

Таблица 1. Спектральные характеристики нативных и модифицированных нитроглицерином эритроцитов человека ($M \pm m$)

Образец	Положение основных максимумов поглощения и оптическая плотность в них				
Эритроциты + Na-фосфатный буфер, pH 7,4, без инкубации	275 – 277 нм, $0,846 \pm 0,009$	346 – 347 нм, $0,831 \pm 0,060$	418 – 419 нм, $1,033 \pm 0,011$	542 – 545 нм, $0,814 \pm 0,040$	577 – 578 нм, $0,825 \pm 0,04$
Эритроциты + нитроглицерин 5 нг/мл, 20 мин	272 – 275 нм, $0,812 \pm 0,004$	348 – 350 нм, $0,798 \pm 0,050$	418 – 420 нм, $0,971 \pm 0,050$	542 – 545 нм, $0,786 \pm 0,006$	577 – 578 нм, $0,797 \pm 0,006$
Эритроциты + нитроглицерин 5 мкг/мл, 20 мин	272 – 275 нм, $0,809 \pm 0,016$	348 – 350 нм, $0,807 \pm 0,015$	418 – 420 нм, $0,971 \pm 0,020$	542 – 545 нм, $0,780 \pm 0,014$	577 – 578 нм, $0,791 \pm 0,014$
Эритроциты + нитроглицерин 5 нг/мл, 3 ч	-	345 – 348 нм, $0,842 \pm 0,015$	416 – 418 нм*, $1,061 \pm 0,020$	542 – 544 нм, $0,782 \pm 0,014$	577 – 578 нм, $0,786 \pm 0,014$
Эритроциты + нитроглицерин 5 мкг/мл, 3 ч	-	345 – 348 нм, $0,826 \pm 0,024$	416 – 418 нм*, $1,108 \pm 0,030$	542 – 544 нм, $0,772 \pm 0,021$	577 – 578 нм, $0,776 \pm 0,021$
Эритроциты + нитроглицерин 5 нг/мл, 24 ч	-	-	406 – 408 нм*, $1,399 \pm 0,013^*$	-	-
Эритроциты + нитроглицерин 5 мкг/мл, 24 ч	-	-	406 – 408 нм*, $1,323 \pm 0,015^*$	-	-
Эритроциты + Na-фосфатный буфер, pH 7,4, 24 ч	272 – 275 нм, $1,050 \pm 0,012^*$	-	406 – 408 нм*, $1,489 \pm 0,045^*$	-	630 нм*, $0,155 \pm 0,007$

* Отличия от контроля (эритроциты + Na-фосфатный буфер, pH 7,4, без инкубации) статистически достоверны ($p < 0,05$).

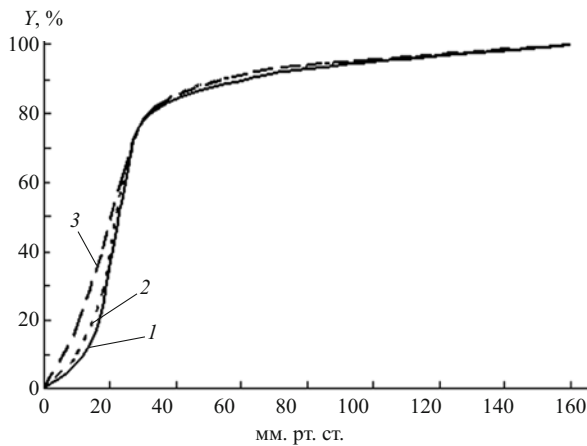


Рис. 3. Кривые диссоциации гемоглобина человека в составе эритроцитарных клеток:

1 — нативные эритроциты (типичный пример); 2 — эритроциты + нитроглицерин (5 нг/мл) (типичный пример); 3 — эритроциты + нитроглицерин (5 мкг/мл) (типичный пример).

наличие или отсутствие редуктаз и оксидаз в модельных системах вносят свой вклад в формирование наблюдаемого эффекта.

Таким образом, сведения о метаболизме оксида азота в крови достаточно разрознены и противоречивы, его аккумуляция отдельными форменными и неклеточными элементами окончательно не изучена. Поэтому выявление механизмов и динамики взаимодействия NO с внутриэритроцитарным гемоглобином, особенно, в условиях медикаментозной коррекции сердечно-сосудистой патологии, представляет несомненный теоретический и научно-практический интерес. В связи с изложенным выше мы исследовали спектральные и кислородсвязывающие характеристики внутриэритроцитарного гемоглобина человека в присутствии нитроглицерина.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования использовали суспензии эритроцитов в 0,1 моль/л Na-фосфатном буфере (рН 7,4) с концентрацией 10^6 кл/мл, полученные из свежезабранной крови доноров методом седиментации.

В экспериментах применяли препарат “Раствор нитроглицерина 0,1 % для инъекций № 10” (ГУ “Институт новых технологий” Отделения медицинских наук РАН, Россия). Данная лекарственная форма является водорастворимой, с пониженным содержанием глюкозы, не содержит спирта.

Раствор нитроглицерина добавляли к суспензии эритроцитов в конечных концентрациях 5 нг/мл и 5 мкг/мл. Образцы инкубировали в течение 20 мин, 3 и 24 ч при 37 °С в стерильных условиях.

Выделение оксигемоглобина (HbO_2) из эритроцитов крови доноров осуществляли по методу Drabkin в модификации Л. А. Блюменфельда [4]. К раствору оксигемоглобина (10 мкМ) добавляли нитроглицерин в ко-

Таблица 2. Соотношение величин оптической плотности в максимуме поглощения полосы Core и минимуме при 495 нм

Образец	Соотношение D_{Core}/D_{495}
HbO_2 контроль	$21,60 \pm 2,14$
HbO_2 + нитроглицерин 5 мкг/мл 24 ч	$11,40 \pm 2,35^*$
Эритроциты свежeweделенные	$1,33 \pm 0,09$
Эритроциты + нитроглицерин 5 нг/мл 20 мин	$1,29 \pm 0,08$
Эритроциты + нитроглицерин 5 мкг/мл 20 мин	$1,26 \pm 0,09$
Эритроциты + нитроглицерин 5 нг/мл 3 ч	$1,40 \pm 0,11$
Эритроциты + нитроглицерин 5 мкг/мл 3 ч	$1,50 \pm 0,10$
Эритроциты + нитроглицерин 5 нг/мл 24 ч	$2,59 \pm 0,61^*$
Эритроциты + нитроглицерин 5 мкг/мл 24 ч	$3,56 \pm 0,89^*$
Эритроциты 24 ч	$3,79 \pm 0,77^*$

* Отличия от контроля (свежeweделенные эритроциты) статистически достоверны ($p < 0,05$).

нечных концентрациях 5 нг/мл и 5 мкг/мл. Полученные образцы инкубировали в течение 20 мин, 3 и 24 ч при 37 °С в стерильных условиях.

Методика регистрации кривых диссоциации оксигемоглобина (КДО) подробно изложена в нашей работе [2]. Установка разработана на кафедре биофизики и биотехнологии Воронежского госуниверситета, принцип действия основан на линейной связи между степенью насыщения гемоглобина кислородом и изменением его оптической плотности при длине волны 555 нм.

Степень насыщения гемоглобина кислородом (Y) при заданном парциальном давлении O_2 (0; 3,19; 7,98; 15,96; 23,94; 31,92; 63,84; 159,60 мм рт. ст.) вычисляли по уравнению:

$$Y = \frac{A_{\text{Hb}} - A_x}{A_{\text{Hb}} - A_{\text{HbO}_2}}$$

где A_{Hb} — оптическая плотность дезоксигемоглобина; A_{HbO_2} — оптическая плотность раствора оксигемоглобина; A_x — оптическая плотность раствора гемоглобина при данном давлении (0; 3,19; 7,98; 15,96; 23,94; 31,92; 63,84; 159,60 мм рт. ст.).

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

Спектральные характеристики нативных и инкубированных с нитроглицерином суспензий эритроцитов и растворов гемоглобина исследовали с применением спектрофотометра UV-2401 PC (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн от 230 до 700 нм. Использовали кварцевые кюветы шириной 10 мм. Оптическую плотность растворов регистрировали на протяжении всего исследуемого диапазона длин волн через 1 нм при ши-

рине спектральной щели 1 нм. Объем контрольных (интактные образцы без инкубации) и опытных (модифицированные нитроглицерином образцы с инкубацией) выборки составлял от 6 до 10 образцов.

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью пакета прикладных статистических программ “Stadia 7.0 (Professional)”. Достоверность различий контрольных и опытных значений сравниваемых показателей определяли по *t*-критерию Стьюдента (при $p < 0,05$), поскольку все исследуемые показатели характеризовались нормальным распределением.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Электронные спектры поглощения (ЭСП) интактных эритроцитов человека характеризовались наличием 2 максимумов в ультрафиолетовой области (275 – 277 и 346 – 348 нм) и 3 полос поглощения в видимой части (418 – 419, 542 – 545 и 577 – 578 нм) спектра. После внесения нитроглицерина в концентрациях 5 нг/мл и 5 мкг/мл в суспензии эритроцитарных клеток и 20 мин инкубации образцов статистически значимых изменений в величинах оптической плотности и положении основных максимумов поглощения обнаружено не было (табл. 1).

Полоса Сорэ относится к главным характеристическим полосам поглощения гемоглобина, локализуется в области 400 – 430 нм и отражает переходы типа π - π^* порфиринового кольца и частично типа переноса заряда. Присоединение того или иного лиганда, изменение спинового состояния атома железа гема приводит к изменению положения основного максимума поглощения гемоглобина в видимой области спектра [2]. Сдвиг вправо полосы Сорэ (до 418 – 420 нм) и максимума при 346 – 347 нм (до 348 – 350 нм) может свидетельствовать о накоплении некоторого количества нитрозогемоглобина (HbNO) в эритроцитах.

Увеличение времени инкубации эритроцитов с модификатором до 3 ч индуцировало сглаживание пика поглощения при 275 нм и сдвиг полосы Сорэ до 416 нм (рис. 1), что указывает на начало активации

окислительных процессов [2]. Изменилось соотношение оптических плотностей в α - и β -полосах: интенсивность светопоглощения в них практически выровнялась, тогда как в интактных образцах суспензии эритроцитов β -полоса была более интенсивной. Это также может служить аргументом в пользу высказанного выше предположения об образовании нитрозогемоглобина в присутствии нитроглицерина [2].

После 24 ч инкубации эритроцитов с нитроглицерином резко изменилась форма ЭСП исследуемых образцов. Происходило сглаживание максимумов при 350, 542 и 577 нм, а при 275 нм выявлено искажение формы пика поглощения, полоса Сорэ сдвинулась в область коротких длин волн до 406 – 408 нм (рис. 2), что свидетельствует о накоплении метформы гемоглобина в эритроцитах [2].

ЭСП нативных эритроцитов после 24 ч инкубации значительно отличались от спектра свежевыведенных клеток и характеризовались повышенной интенсивностью светопоглощения во всем исследуемом диапазоне (рис. 2). Одновременно произошло сглаживание полос при 545 и 577 нм, переход максимума при 346 – 348 нм в “плечо” полосы Сорэ, которая сдвинулась в область коротких длин волн до 406 – 408 нм, также наблюдалось появление нового пика при 630 нм. Данные изменения в спектре интактных клеток через 24 ч хранения свидетельствуют о нарушении целостности эритроцитарных мембран и выходе гемоглобина во внеклеточное пространство. Появление максимума при 630 нм в совокупности с коротковолновым сдвигом полосы Сорэ позволяет сделать вывод об окислении гемового железа и переходе основной части белка в метгемоглобин (MtHb).

Таким образом, воздействие нитроглицерина на клеточную суспензию в течение 20 мин и 3 ч не оказывало существенного влияния на целостность клеток и физико-химические характеристики внутриэритроцитарного гемоглобина. Предположительно накапливалось некоторое не поддающееся исчислению количество нитрозоформы исследуемого гемопротеида.

Таблица 3. Влияние нитроглицерина (20 мин инкубации) на основные параметры сатурации оксигемоглобина в эритроцитах человека ($M \pm m$)

Параметры сатурации	P_{50} , мм рт. ст.	n	Y_{40} , %	Y_{100} , %	ABP, %
Эритроциты нативные	25,18 ± 0,51	2,22 ± 0,12	80,63 ± 0,77	95,29 ± 0,46	14,73 ± 0,62
Эритроциты + нитроглицерин 5 нг/мл	21,10 ± 0,74*	2,04 ± 0,06*	85,90 ± 1,21*	97,10 ± 1,00	11,20 ± 0,53*
Эритроциты + нитроглицерин 5 мкг/мл	20,30 ± 1,21*	1,85 ± 0,09*	85,30 ± 3,28*	96,00 ± 1,24	10,80 ± 3,50*

* Отличия от показателей нативных эритроцитов статистически достоверны ($p < 0,05$);

P_{50} — давление полунасыщения гемоглобина кислородом (парциальное давление кислорода, при котором молекулы гемоглобина наполовину насыщены лигандом);

n — константа Хилла (характеризует степень кооперативного взаимодействия между отдельными субъединицами молекулы гемоглобина);

Y_{40} — степень насыщения гемоглобина кислородом при парциальном давлении 40 мм рт. ст. (соответствует парциальному давлению кислорода в венозной крови);

Y_{100} — степень насыщения гемоглобина кислородом при парциальном давлении 100 мм рт. ст. (соответствует парциальному давлению кислорода в артериальной крови);

ABP — артериально-венозная разность ($ABP = Y_{100} - Y_{40}$), показывает долю кислорода, доступного для тканей при газообмене.

При длительном взаимодействии клеток крови с НГ в концентрациях 5 нг/мл и 5 мкг/мл (24 ч) происходит частичный гемолиз, так как соотношение $D_{\text{Сопе}}/D_{495}$ (табл. 2) было статистически достоверно выше контрольного (свежевыделенные эритроциты), но ниже такового, зарегистрированного для свободного оксигемоглобина, модифицированного нитроглицерином в течение 24 ч [1].

По-видимому, нитроглицерин оказывал протекторное действие на клетки крови, так как наблюдаемые негативные изменения структурных и спектральных свойств эритроцитов, инкубированных с нитроглицерином, указывающие на гемолиз и накопление МтНб, выражены слабее, чем в его отсутствие. Полученные нами данные о защитном эффекте нитроглицерина подтверждаются результатами исследований других авторов [12].

С целью выявления влияния нитроглицерина на функциональные характеристики интрацеллюлярного гемопротейда нами зарегистрированы кривые диссоциации гемоглобина в составе эритроцитарных клеток (рис. 3).

HbO_2 нативных эритроцитов характеризовался величиной давления полунасыщения $P_{50} = 25,18 \pm 0,51$ мм рт. ст. и константой Хилла $n = 2,22 \pm 0,12$. Содержание оксигенированного гемоглобина при парциальном давлении кислорода 40 мм рт. ст. (Y_{40}) составило $(80,63 \pm 0,77) \%$; при 100 мм рт. ст. (Y_{100}) — $(95,29 \pm 0,46) \%$, артериально-венозная разность содержания HbO_2 (АВР) равна $(14,73 \pm 0,62) \%$ (табл. 3).

Исследовать влияние суточной инкубации с нитроглицерином на физиологическую активность внутриэритроцитарного гембелка не представилось возможным, поскольку функциональная активность гемоглобина нарушается уже через несколько часов хранения, при этом наблюдается окисление гемопротейда и лизис клеток. Поэтому были проанализированы результаты недолговременного воздействия (20 мин) лекарственного препарата на функциональные свойства HbO_2 в составе эритроцитов.

После внесения нитроглицерина в клеточную суспензию в концентрациях 5 нг/мл и 5 мкг/мл наблюдались статистически достоверные изменения основных параметров сатурации (табл. 3). Значение величины полунасыщения гемоглобина при концентрации модификатора 5 нг/мл уменьшилось до $(21,1 \pm 0,74)$ мм рт. ст., константа Хилла в указанных условиях снизилась до $(2,04 \pm 0,06)$; отмечалось статистически достоверное падение величины АВР до $(11,20 \pm 0,53) \%$.

Увеличение концентрации нитроглицерина до 5 мкг/мл вызвало снижение величины P_{50} до $(20,30 \pm 1,21)$ мм рт. ст., константы Хилла — до $(1,85 \pm 0,09)$; содержание оксигенированного гемоглобина при парциальном давлении кислорода 40 мм рт. ст. составило $(85,30 \pm 3,28) \%$, а при 100 мм рт. ст. — $(96,00 \pm 1,24) \%$, артериально-венозная разность была

снижена относительно контроля на $26,68 \%$ ($p < 0,05$). Таким образом, нитроглицерин индуцировал возрастание сродства гемоглобина в составе клетки к кислороду (рис. 3), снижение значения константы Хилла характеризовало процесс ослабления кооперативного взаимодействия субъединиц внутри молекулы белка. Количество O_2 , отдаваемое тканям в процессе газообмена, уменьшалось в среднем на $23,96 \%$ (5 нг/мл) и $26,68 \%$ (5 мкг/мл), $p < 0,05$.

Суммируя изложенное выше, можно сделать следующее заключение. Нитроглицерин при недолговременном воздействии (0,3 – 3 ч) вызывал изменение кислородсвязывающих свойств внутриэритроцитарного гемоглобина и, вероятно, образование HbNO . При длительной экспозиции нитроглицерина (24 ч) происходило окисление гембелка и частичный лизис эритроцитарных клеток. Принимая во внимание факт, что при суточной инкубации эритроцитов в отсутствие лекарственного препарата были зарегистрированы аналогичные процессы, причем более высокой интенсивности, следует предположить, что в определенном диапазоне концентраций оксид азота способен оказывать протекторное действие на клетки крови в условиях гипоксии, истощения пула антиоксидантов и глюкозы. Выявленное нами снижение объема кислорода, доступного для тканей при газообмене, может негативно сказаться на состоянии организма, испытывающего дефицит O_2 вследствие нарушения работы сердечно-сосудистой системы. Поэтому мониторинг структурно-функционального состояния эритроцитов и внутриклеточного гемоглобина пациентов, длительное время регулярно принимающих нитроглицерин, необходим для выявления и своевременной коррекции воздействия лекарственного препарата на организм в условиях патологии.

ВЫВОДЫ

1. Воздействие нитроглицерина на суспензию эритроцитов крови человека в течение 20 мин и 3 ч не оказывает существенного влияния на целостность клеток и спектральные характеристики интрацеллюлярного гемоглобина. В эритроцитах предположительно накапливается некоторое количество HbNO .

2. При 24 ч инкубации клеток крови с нитроглицерином в концентрациях 5 нг/мл и 5 мкг/мл происходит частичный гемолиз и окисление внутриэритроцитарного гембелка до МтНб.

3. Нитроглицерин в концентрации 5 нг/мл после 20 мин инкубации вызывает уменьшение величины P_{50} на $16,20 \%$ ($p < 0,05$); константы Хилла — на $8,11 \%$ ($p < 0,05$); АВР — на $23,96 \%$ ($p < 0,05$) относительно интактных эритроцитов.

4. Увеличение концентрации НГ до 5 мкг/мл при 20 мин инкубации вызывает снижение P_{50} на $19,38 \%$ ($p < 0,05$); константы Хилла — на $16,67 \%$ ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, что свидетельствует о нарушении кислородтранспортной функции гемоглоби-

на в присутствии нитроглицерина. Повышение давления полунасыщения белка лигандом и снижение кооперативных взаимодействий в тетрамере гемоглобина приводит к уменьшению объема кислорода, доступно для тканей при газообмене, на 26,68 % ($p < 0,05$).

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках реализации ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы” (ФЦП ИР14 – 20) мероприятие 3.1.2. “Поддержка и развитие Центров коллективного пользования научным оборудованием” Соглашение № 14.593.21.0001, идентификатор проекта RFMEFI59314X0001.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Г. Артюхов, Е. А. Калаева, О. В. Путинцева, А. И. Полюбезьева, *Биомед. химия*, № 3, 251 – 258.
2. В. Г. Артюхов, О. В. Путинцева, Е. А. Калаева, В. С. Савостин, *Гемоглобин человека в условиях воздействия различных физико-химических агентов*, Издательско-полиграфический центр Воронеж. гос. ун-та, Воронеж (2013).
3. Ю. Б. Белоусов, В. Г. Кукес, В. К. Лепяхин, В. И. Петров, *Клиническая фармакология: национальное руководство*, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2013).
4. Л. А. Блюменфельд, *Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода*, Сов. наука, Москва (1957).
5. В. С. Кузенков, А. Л. Крушинский, В. П. Реутов, *Вестн. МГУ. Сер. 16: Биол.*, **1**, 3 – 6 (2011).
6. З. В. Куроптева, В. П. Реутов, Л. М. Байдер и др., *Докл. Академии наук*, **441**(3), 406 – 409 (2011).
7. В. П. Лупанов, *Мед. совет*, № 1 – 2, 25 – 29 (2011).
8. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Новая волна, Москва (2012).
9. В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина, В. Н. Швалев и др., *Успехи физиол. наук*, **43**(4), 73 – 93 (2012).
10. А. С. Садвакас, *Инновации в науке*, **17**, 155 – 162 (2013).
11. И. И. Степура, С. А. Маскевич, В. Ю. Титов, *Биохимия*, **77**(1), 53 – 70 (2012).
12. И. А. Тихомирова, А. О. Ослякова, *Вестник Северного (Арктического) федерального университета. Серия: Медико-биологические науки*, **2**, 63 – 69 (2014).
13. И. А. Шперлинг, Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий и др., *Вестн. Рос. воен.-мед. акад.*, **3**, 156 – 162 (2011).
14. A. Doctor, J. S. Stamler, *Comprehensive Physiol.*, **1**(1), 541 – 568 (2011).
15. S. M. Haldar, J. S. Stamler, *J. Clin. Invest.*, **123**(1), 101 – 110 (2013).
16. K. T. Huang, Z. Huang, D. B. Kim-Shapiro, *Nitric Oxide*, **16**(2), 209 – 216 (2007).
17. C. Liu, X. Liu, J. Janes, R. Stapley, et al, *Redox Biology*, **2**, 211 – 219 (2014).

Поступила 13.07.16

THE INFLUENCE OF NITROGLYCERIN ON SPECTRAL AND OXYGEN-BINDING CHARACTERISTICS OF HUMAN INTRACELLULAR HEMOGLOBIN

E. A. Kalaeva, V. G. Artyukhov*, O. V. Putintseva, and A. I. Polyubez'eva

Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394006 Russia

* e-mail: office@main.vsu.ru

The spectral and oxygen-binding characteristics of human intracellular hemoglobin in the presence of nitroglycerin at concentrations of 5 ng/mL and 5 µg/mL have been studied. Short incubation (20 min) of erythrocytes with the drug led increasing hemoglobin affinity to oxygen and weakening of cooperative interactions in hemoprotein molecules. As a result, the amount of O₂ supplied to tissues in the process of gas exchange decreased by 23.96% (5 ng/mL) and 26.68 % (5 µg/mL), $p < 0.05$. Incubation of cells for 24 h resulted in oxidation of the heme iron atom, accumulation of methemoglobin, and partial hemolysis. Nitroglycerin reduces the intensity of oxidative processes. However, no dependence of the degree of changes in the physical and chemical properties of hemoglobin on the concentration of nitroglycerin was found.

Keywords: arteriovenous oxygen difference; hemoglobin; half-saturation pressure; oxygen-binding properties; Hill's constant; oxyhemoglobin dissociation curve; nitroglycerin; nitric oxide; electronic absorption spectrum.