

## АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ И ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ФУНКЦИИ ЭРИТРОЦИТАРНОГО ГЕМОГЛОБИНА\*

### Обзор

© 2019 О.В. Космачевская, А.Ф. Топунов\*\*

*Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071 Москва, Россия;  
электронная почта: aftopunov@yandex.ru*

Поступила в редакцию 24.04.18

После доработки 24.07.18

Принята к публикации 24.07.18

В обзоре описаны плейотропные эффекты эритроцитарного гемоглобина (Hb) и их значимость для здоровья человека. Гемоглобин наиболее известен как переносчик кислорода, однако его биохимические функции этим не ограничиваются. Рассмотрены следующие аспекты функционирования Hb: 1) каталитические функции, обусловленные гемовым (нитритредуктазная, NO-диоксигеназная, монооксигеназная, алкилгидропероксидазная) и белковым (эстеразная, липоксигеназная) компонентами молекулы; 2) участие в метаболизме оксида азота; 3) образование мембраносвязанной формы Hb и ее роль в регуляции метаболизма эритроцита; 4) физиологические функции продуктов катаболизма гемоглобина (железо, СО, билирубин, пептиды). Особое внимание уделено участию гемоглобина в трансдукции сигнала внутри эритроцита. С помощью Hb осуществляется связь между различными метаболическими параметрами эритроцита: кислородными условиями, образованием АТФ, регуляцией рН, окислительно-восстановительным балансом и состоянием цитоскелета. Полифункциональность гемоглобина можно рассматривать как выражение принципа биохимической экономии.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** гемоглобин, эритроциты, мембраносвязанный гемоглобин, оксид азота, капиллярный кровоток, пероксидазная активность, гем.

DOI: 10.1134/S0320972519010019

Гемоглобины (Hb) – очень древние белки, обнаруженные у представителей всех царств живой природы. Они выполняют самые разнообразные функции: транспортную, каталитическую, сигнальную. В настоящее время белки гемоглобинового типа относят к одному суперсемейству [1]. Структурные и функциональные особенности различных гемоглобинов были рассмотрены в

обзорах [2, 3]. В данной статье мы сфокусировали наше внимание на Hb эритроцитов.

Эритроцитарный гемоглобин является одним из наиболее изученных белков животных. Его основная функция связана с транспортом «дыхательных» газов: кислорода и углекислого газа, поэтому он и получил название «дыхательный пигмент». Перенос кислорода гемоглобином изучен достаточно хорошо (хотя и здесь есть нерешенные вопросы), в отличие от других его функций. Известны следующие дополнительные функции эритроцитарного Hb: регуляция доставки кислорода к тканям, регуляция кислородзависимого метаболизма оксида азота (NO), структурных и функциональных свойств эритроцита, поддержание рН крови, преобразование тепла, диспропорционирование перекисей и другие каталитические активности. Ряд функций физиологически оправдан, другие являются всего лишь следствием химических и термодинамических свойств белка. В первом случае функциональные свойства Hb развились эволюционно с целью увеличения адаптацион-

Принятые сокращения: Hb – гемоглобин; metHb – окисленный гемоглобин; nitrosylHb – гемоглобин, нитрозилированный по железу гема; nitrosoHb – гемоглобин, нитрозилированный по SH-группе цистеина; oхuHb – оксигенированный гемоглобин; deoхuHb – деоксигенированный гемоглобин; ferrylHb – «суперокисленный» феррилгемоглобин с 4-валентным железом гема; oхoferrylHb – радикальная форма феррилгемоглобина; МВHb – мембраносвязанный гемоглобин; ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа; рO<sub>2</sub> – парциальное давление кислорода; ЛНП – липопротеины низкой плотности; Band3 – белок полосы 3; CDВ3 – цитоплазматический домен белка полосы 3; Hр – гаптоглобин.

\* Статья на английском языке опубликована в томе 83, вып. 12, 2018.

\*\* Адресат для корреспонденции.

ного потенциала организма, во втором – они либо нейтральны, либо пагубны. Некоторые из описанных функций являются общими для всех белков гемоглобинового суперсемейства, другие присущи исключительно Hb эритроцитов.

Часто полагают, что дополнительные функции белков ответственны за негативные побочные эффекты, и очень редко обсуждается их использование для нужд организма. Гемоглобину в этом отношении повезло – известны и положительные, и отрицательные аспекты его функционирования. Целью данного обзора являлось обобщение информации о функциональном многообразии эритроцитарного гемоглобина и определение ситуаций, при которых его дополнительные и альтернативные функции могут быть полезны или вредны для организма.

### ФУНКЦИИ ЭРИТРОЦИТАРНОГО ГЕМОГЛОБИНА

**Регуляция метаболизма оксида азота.** Долгое время оксид азота в отношении гемоглобина рассматривали лишь как еще одно химическое соединение, способное прочно связываться с гемовой группой. Только после выяснения того, что NO является эндогенным регулятором сердечно-сосудистой, нервной и иммунной систем [4, 5], началось активное исследование взаимодействия Hb с этой молекулой. Уже нет сомнений, что взаимодействие с NO – это всеобщая и, возможно, первичная функция всех известных гемоглобинов, а обратимо связывают кислород далеко не все представители этого суперсемейства. Филогенетический анализ показал, что первые гемоглобины появились у живых организмов задолго до появления атмосферного кислорода [6]. Вполне убедительной представляется и точка зрения, что Hb присутствовал уже у LUCA (Last Universal Common Ancestor) – последнего универсального общего предка всех организмов, ныне живущих на Земле.

Функции NO в биологической системе разнообразны. С одной стороны, этот газомедиатор регулирует многие физиологические процессы, а с другой, NO и его метаболиты ( $\text{NO}_2$  и  $\text{ONOO}^-$ ) могут неферментативно модифицировать биомолекулы. Направленность биологического эффекта определяется концентрацией NO, поэтому помимо систем, производящих NO, необходимы механизмы, регулирующие его концентрацию, которая не должна выходить за границы физиологической нормы. Основными биохимическими регуляторами концентрации NO являются именно гемоглобины. У прокариот и низших эукариот – это флавогемоглобины (Fgb) [7], у растений – несимбиотические Hb [8], у живот-

ных – нейро- и цитоглобины [9]. Эритроцитарный гемоглобин и миоглобин также могут осуществлять детоксикацию NO [7].

**Реакции гемоглобина с оксидом азота и его метаболитами.** По своей способности взаимодействовать с NO и его метаболитами гемоглобины являются уникальными белками. Эритроцитарный Hb может связывать NO разными способами: по железу гемовой группы с образованием nitrosylHb ( $\text{hem-[Fe}^{\text{II}}\text{NO}]$ ), по SH-группе Cys $\beta$ 93 с образованием S-nitrosoHb (SNO-Hb) [10, 11] и по той же группе – с образованием динитрозильных комплексов железа (Hb-ДНКЖ) [12–14]. Связанные с Hb S-нитрозотиолы и ДНКЖ являются формами депонирования оксида азота, с помощью которых NO защищается от окисления и перемещается с током крови из артериального сегмента кровообращения в венозный [10, 11], где из-за низкой концентрации кислорода – одного из субстратов NO-синтазы – невозможен эндотелиальный синтез NO. В то же время в венозном сегменте NO может образовываться из нитритов при гипоксии. В этом случае с помощью S-нитрозотиолов и ДНКЖ он переносится уже в артериальный сегмент. ДНКЖ при этом не только участвуют в депонировании оксида азота, но и способны осуществлять адресную передачу NO- или  $[\text{Fe-NO}_2]$ -группы на белки-мишени. Кроме того, ДНКЖ, связанные с Hb, действуют как сайт-специфические антиоксиданты, препятствующие окислению химических групп, с которыми они связываются, в первую очередь SH-групп цистеина Cys $\beta$ 93 [14]. При этом гемоглобин может взаимодействовать с NO и его метаболитами в различных окислительно-восстановительных состояниях.

Описано несколько реакций, катализируемых гемоглобинами (табл. 1). Рассмотрим наиболее значимые для физиологии реакции Hb с NO.

NO-диоксигеназная реакция (1) протекает с чрезвычайно высокой скоростью и является наиболее распространенным типом взаимодействия гемовой группы глобинов с NO. Благодаря ей удаляется избыток NO из кровеносного русла, а образующийся при этом нитрат-анион выводится из организма через почки. Для некоторых гемоглобинов, например, для Fgb, окисление NO является основной функцией [7]. Считается, что древние гемоглобины функционировали как эффективные специализированные системы детоксикации NO, и лишь впоследствии, с появлением аэробного дыхания, когда возникла необходимость повысить растворимость кислорода в биологических жидкостях, способность Hb связывать кислород была эволюционно адаптирована для осуществления его запасаения и транспорта [1].

Таблица 1. Реакции, катализируемые гемоглобинами

№	Название реакции	Уравнение реакции
1	NO-диоксигеназная реакция (NOD-реакция)	$\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2] + \text{NO} \rightarrow \text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{III}}] + \text{NO}_3^-$ ( $k = 8,9 \pm 0,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ )
2	Нитритредуктазная реакция	$\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{II}}] + \text{H}^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{III}}] + \text{NO} + \text{OH}^-$
3	Нитритангидразная реакция	$\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{III}}] + \text{NO}_2^- + \text{NO} \leftrightarrow \text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{II}}] + \text{N}_2\text{O}_3$
4	Изомеризация перокси-нитрита в нитрат	$\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{III}}] + \text{ONOO}^- \leftrightarrow \text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{III}}\text{---ONOO}] \rightarrow \text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{III}}] + \text{NO}_3^-$ ( $k_{\text{cat}} = 1,2 \pm 0,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ )
5	Денитрозилазная реакция	$2\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}] \leftrightarrow 2\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}^-] \xrightarrow{2\text{H}^+} 2\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{III}}] + \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$
6	Восстановительное нитрозилирование	$\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{III}}] + \text{NO} \leftrightarrow \text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{III}}\text{NO}] \xrightarrow{\text{OH}^-} \text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{II}}] + \text{NO}_2^- + \text{H}^+$ $\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{II}}] + \text{NO} \rightarrow \text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}]$ ( $k_{\text{cat}} = 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ )
7	Окисление нитрита	$4\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2] + 4\text{NO}_2^- + 4\text{H}^+ \rightarrow 4\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{III}}] + \text{NO}_3^- + \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$
8	Окислительное денитрозилирование	$\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}] + \text{O}_2 \rightarrow \text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{III}}] + \text{NO}_3^-$
9	Нитрозилирование	$\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{II}}] + \text{NO} \rightarrow \text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}]$ ( $k = 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ )

Примечание. Константы скоростей реакций взяты из работ Gow et al. [15] и Herold et al. [16].

Эритроциты участвуют в транспорте и депонировании NO и его метаболитов, а также имеют собственные системы синтеза этой молекулы [17]. Учитывая высокую скорость взаимодействия охуHb с NO, возникает вопрос — каким образом артериальные эритроциты обеспечивают его сохранение. Была высказана точка зрения, что NO депонируется внутри эритроцита в форме nitrosylHb ( $\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}]$ ), который образуется через metHb-путь, сочетающий NOD-реакцию и реакцию восстановительного нитрозилирования (6) [15]. Образование  $\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}]$  в эритроцитах при физиологических концентрациях NO было экспериментально подтверждено. NitrosylHb может также образовываться в реакции прямого нитрозилирования  $\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{II}}]$  (9) [15]. Связь NO с железом гема настолько прочна, что препятствует образованию железопорфириновых комплексов с  $\text{O}_2$  или CO, однако *in vivo*, вероятнее всего, происходит частичное нитрозилирование, что делает связь Fe—NO аллостерически регулируемой [15]. При насыщении молекулы Hb кислородом переход nitrosylHb из T- в R-конформацию сопровождается переносом NO на SH-группы Cys $\beta$ 93. На основании этого Stamler сформулировал гипотезу nitrosylHb-зависимой гипоксической вазодилатации, суть которой сводится к тому, что механизмы, регулирующие

аллостерическое связывание кислорода, одновременно регулируют и высвобождение NO из nitrosylHb [10, 15, 18, 19]. Свой подход Stamler обосновывает представлениями о так называемом « $\Delta\text{SH}$ -эффекте», обозначающем существующие аллостерические взаимодействия между электронным состоянием гема (сайт связывания  $\text{O}_2$ ) и Cys $\beta$ 93 (сайт связывания NO) [20, 21].

Следующей по значимости является нитритредуктазная реакция (2), которая важна для поддержания необходимого уровня NO в кровотоке при гипоксии [22, 23]. Максимальную нитритредуктазную активность Hb проявляет в состоянии полунасыщения [24], т.е. эта реакция протекает по механизму аллостерического автокатализа (R-state autocatalysis) [23, 25].

В отличие от нитритредуктазной реакции, скорость NO-диоксигеназной реакции (1) для T- и R-конформеров одинакова (для Hb(T)  $K_{\text{ox}} = 18,7 \pm 2,3 \text{ мкМ}^{-1} \text{ c}^{-1}$ , для Hb(R)  $K_{\text{ox}} = 17,5 \pm 5,5 \text{ мкМ}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ). Независимость этой реакции от кооперативного взаимодействия субъединиц свидетельствует об универсальности диоксигеназной функции, которая присуща и мономерным, и тетрамерным формам гемоглобинов [26].

Реакция окисления нитрита оксигемоглобином (7) интересна с точки зрения токсикологии, поскольку протекает в крови при нитратно-нит-

ритных интоксикациях. Несмотря на длительную историю изучения, ее механизм до конца не ясен, известно только, что это многоэтапный процесс, сопровождающийся образованием промежуточных продуктов:  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{NO}_2$  [27, 28].

**Гемоглобинзависимые механизмы NO-сигналикации.** Многообразие способов взаимодействия гемоглобинов с NO и его метаболитами необходимо для поддержания баланса NO и  $\text{O}_2$  в живых системах. Помимо NOD-реакции, в настоящее время большое внимание в регулировании соотношения  $[\text{NO}]/[\text{O}_2]$  в кровеносном русле уделяется нитритредуктазной реакции. Хотя константа скорости восстановления нитритов дезокси-гемоглобином низка, есть мнение, что эта реакция может быть дополнительным путем образования NO у млекопитающих при гипоксии, когда ингибируется работа NO-синтаз [23, 29–32].

Концепция нитритзависимой вазодилатации признается многими исследователями, хотя ключевая роль эритроцитарного Hb в этом процессе до сих пор оспаривается. Реакции  $\text{oxyHb}$  и  $\text{deoxyHb}$  с NO являются диффузионно контролируемыми, а их длительность исчисляется микросекундами ( $k \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) [7], в то время как восстановление  $\text{NO}_2^-$  дезокси-гемоглобином длится от минут до часов ( $k \sim 5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Из этого следует, что большая часть образующегося из нитритов NO будет быстро окислена оксигемоглобином или прочно связана с гемовым железом  $\text{deoxyHb}$ , поэтому физиологическое значение нитритредуктазной реакции, катализируемой  $\text{deoxyHb}$ , остается под вопросом. Следует отметить, что вазодилатационное действие нитритов сохраняется и при отсутствии эритроцитов [33]. Поэтому наиболее вероятно образование NO при участии иных нитритредуктазных систем (ксантинооксидаза, ферменты дыхательной цепи), а роль Hb заключается в регуляции направления метаболических потоков NO в зависимости от кислородного статуса клетки [1, 32]. Высказана гипотеза, что Hb участвует в процессе гипоксической вазодилатации в качестве сенсора парциального давления кислорода ( $p\text{O}_2$ ) и тем самым определяет уровень гипоксии [34].

Существуют экспериментальные подтверждения справедливости концепции нитритзависимой гипоксической вазодилатации. Было показано, что поступление нитратов с пищей приводит к увеличению кровотока за счет локального вазодилатационного эффекта [35–37]. Для объяснения этого эффекта предложен альтернативный механизм, основанный на регуляции гемоглобином синтеза и экспорта АТФ в просвет капилляра, где он действует на пуринергические рецепторы клеток эндотелия, стимулирующие синтез NO эндотелиальной NO-синтазой [38].

Подробнее этот механизм рассмотрен ниже в подразделе «Регуляция капиллярного кровотока».

**Гемоглобиновая буферная система.** Известной функцией Hb является контроль кислотно-основного равновесия в крови [39–41]. Вклад гемоглобиновой буферной системы в поддержание необходимого значения pH составляет ~30–35% буферной емкости крови. Буферная функция Hb тесно связана с аллостерически регулируемым транспортом  $\text{O}_2$  и  $\text{CO}_2$  [41]. Еще Perutz показал, что за буферные свойства в гемоглобине ответственны His148  $\beta$ -цепи и His122  $\alpha$ -цепи, степень ионизации которых регулируется аллостерически [42].

Влияние pH/ $\text{CO}_2$  на сродство Hb к кислороду известно как эффект Бора (Бора–Вериги), а влияние насыщения Hb кислородом на связывание  $\text{H}^+/\text{CO}_2$  – как эффект Холдейна. В работе Туума [40] была проведена оценка физиологической значимости этих эффектов для облегчения транспорта  $\text{O}_2$  и  $\text{CO}_2$ . Эффект Бора имеет физиологическое значение для тканей с высоким уровнем метаболизма, так, работающая мышца получает за счет этого дополнительно 20% кислорода. Эффект Бора важен и для плаценты, где происходит газообмен между кровью материнского организма и плода. Закисление материнской крови и защелачивание крови плода увеличивает степень дезоксигенации Hb на 45%. Вклад эффекта Холдейна в общий физиологический транспорт  $\text{CO}_2$  во взрослом организме составляет 33%, в то время как в плаценте – 46% [40]. Эффект Бора характеризует эффективность гемоглобиновой буферной системы [43]. Интересно, что, обрабатывая кожу углекислым газом, в организме человека можно вызвать так называемый искусственный эффект Бора [44].

**Участие в теплообмене.** Еще одна функция эритроцитарного Hb связана с его способностью участвовать в общем теплообмене организма [39]. На способность гемоглобина транспортировать тепло обратили внимание еще в 1937 г. В целом при оксигенации каждая грамм-молекула Hb выделяет ~60 ккал тепла [39], что значительно превышает поглощаемое при дезоксигенации. Обратимость реакции обеспечивается конформационными переходами от R- к T-состоянию молекулы Hb в цикле оксигенации–дезоксигенации.

Далеко не все исследователи видят в существовании температурной зависимости оксигенации Hb какой-либо биологический смысл, однако термодинамические свойства гемоглобина все же необходимо учитывать при изучении физиологии дыхания. В тканях с более высокой температурой сдвиг кривой диссоциации  $\text{oxyHb}$  может быть заметным, что сказывается на снаб-

жении тканей кислородом. Было высказано предположение, что теплопреобразовательная функция Hb может иметь физиологическое значение при плацентарном теплообмене между организмом матери и плодом [45], поскольку при диссоциации O<sub>2</sub> от HbA поглощается больше тепла, чем высвобождается при связывании O<sub>2</sub> с фетальным гемоглобином (HbF). Обсуждается и возможность участия Hb в стабилизации температуры тела у птиц во время длительного полета [45].

**Связывание гемоглобина с мембраной.** Способность связывания эритроцитарного гемоглобина с мембраной была описана достаточно давно при попытке получить тени эритроцитов с помощью гипотонического лизиса [46, 47]. Имеются разноречивые сведения о содержании мембраносвязанного гемоглобина (Membrane-Bound Hemoglobin – MBHb) в эритроцитах, что объясняется различным физиологическим состоянием клеток и способом приготовления теней (рН, ионная сила). Доля Hb, перешедшего из растворимого в мембраносвязанное состояние, по данным разных авторов, варьирует от 0,5 до 12% [48–54].

Функционирование Hb внутри эритроцита тесно связано с взаимодействием с белком полосы 3 (Band3). Это основной интегральный белок мембран эритроцитов, осуществляющий анион-транспортную функцию (anion exchanger 1 – AE1). Мономерный Band3 состоит из трех доменов [55]. С-Концевой домен связывает карбоангидразу II, N-концевой (CDB3 – Cytoplasmic Domain of Band 3 protein) – гликолитические ферменты, гемоглобин и гемихромы (окисленные денатурированные формы Hb).

Описаны разные пути взаимодействия Hb с мембраной: электростатическое связывание deoxyHb по CDB3 [56–60], ковалентная пришивка к мембранным компонентам дисульфидными связями [61, 62], адсорбция на мембранных липидах с помощью гидрофобных взаимодействий. Гемоглобин может связываться и с белками цитоскелета: спектрином и гликофоорином [56, 63]. Отметим, что предпочтительно связывается с мембраной частично окисленный Hb [64], что может иметь физиологическое значение, поскольку в примембранной области происходит восстановление metHb мембраносвязанной NADPH-зависимой metHb-редуктазой [65].

При действии различных окислительных агентов, вызывающих образование свободных радикалов и оксоферрильных форм Hb, происходит необратимое ковалентное связывание окисленных форм гемоглобина с компонентами мембраны [66–68], причем показана прямая корреляция доли связанного Hb и уровня окислительного стресса.

Обратимое связывание белков с мембранами является одним из механизмов изменения их каталитических и регуляторных свойств [69]. Показано, что MBHb по сравнению с цитозольным гемоглобином имеет более высокое сродство к O<sub>2</sub>, более низкий коэффициент Хилла ( $1,5 \pm 0,08$  против  $2,5 \pm 0,1$ ) и гораздо более высокую пероксидазную ( $0,917 \pm 0,038$  против  $0,378 \pm 0,028$  мкмоль/с на 1 мг белка) [70, 71] и нитритредуктазную активности [72].

**Регуляция анион-транспортных свойств Band3.** Гемоглобин связывается с CDB3 через центральную полость молекулы, образованную парно одинаковыми субъединицами, которая также является сайтом связывания аллостерического регулятора Hb – 2,3-дифосфоглицериновой кислоты (2,3-DPG). Предполагается, что deoxyHb по отношению к Band3 выступает в роли гетеротропного аллостерического эффектора, модулирующего его анион-транспортные свойства [45]. В свою очередь, Band3/AE1 является своеобразным аллостерическим регулятором Hb, индуцирующим переход в T-конформацию, тем самым благоприятствуя дезоксигенации гемоглобина.

Показано, что в эритроцитах газообмен происходит в окрестности комплекса Band3 [55]. Контакт карбоангидразы с CDB3 обеспечивает высвобождение протонов при образовании угольной кислоты в зоне этого комплекса, где они за счет эффекта Бора способствуют дезоксигенации Hb. Кроме того, deoxyHb может связываться с CDB3, что приводит к ряду физиологических эффектов, обсуждаемых ниже.

**Регуляция метаболизма глюкозы.** Конформационные изменения Hb при дезоксигенации благоприятствуют его связыванию с CDB3 [38, 50, 57, 58, 73]. Ферменты гликолиза (альдолаза, фосфофруктокиназа и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) образуют мультиферментный комплекс (метаболон) на внутренней поверхности мембраны эритроцитов [74]. Увеличение доли deoxyHb при гипоксии приводит к вытеснению ферментов гликолиза с сайта связывания с CDB3 и их переходу в растворимое активное состояние [50, 55, 73]. Таким образом, при дезоксигенации Hb происходит переключение метаболизма эритроцита с пентозофосфатного пути на гликолитический [55, 75, 76]. С одной стороны, это способствует возрастанию уровня внутриклеточного АТФ и, одновременно, 2,3-DPG, а с другой, уменьшает поток глюкозы, поступающей в пентозофосфатный путь, в котором образуется NAD(P)H, необходимый для восстановления metHb и антиоксидантных ферментов. Благодаря этому связывание deoxyHb с CDB3 может приводить к изменениям метабо-

лического статуса эритроцита в ответ на вариации кислородных условий в клетке.

**Регуляция капиллярного кровотока.** Помимо основной функции, связанной с доставкой кислорода к различным тканям, эритроциты участвуют в регуляции капиллярного кровотока. Описаны три возможных механизма участия эритроцитов в регуляции тонуса сосудов: нитрозоHb-зависимая вазодилатация [10, 19], нитритная вазодилатация [23, 31, 32] и высвобождение сигнального АТР из эритроцитов [77–79]. Каждый из перечисленных механизмов реализуется в условиях пониженного  $pO_2$  и модулируется гемоглобином.

**Регуляция транспорта NO через мембрану эритроцита.** Образованный или депонированный в эритроцитах NO при низком  $pO_2$  необходимо экспортировать в просвет сосуда, в этом процессе активное участие принимает Hb. Как уже отмечалось, Hb при дезоксигенации взаимодействует с CDB3, что сопровождается переносом NO-группы на vicinaльные остатки цистеина CDB3 (Cys201 и Cys317) [80]. Затем NO может перемещаться за счет анионообменных свойств Band3/AE1, поскольку показано участие AE1 в транспорте метаболитов оксида азота:  $NO_2^-$  и  $ONOO^-$  [81, 82]. Известно, что SNO-Hb находится в равновесии с низкомолекулярными нитрозотиолами (R-SNO), поэтому и они могут принимать участие в дальнейшем транспорте NO [10, 83]. Таким образом, экспорт NO из эритроцита модулируется физиологическим градиентом  $pO_2$ .

Регулирующее действие на газообмен Hb может оказывать и путем изменения структуры цитоскелета через связь с CDB3. NO, так же как  $O_2$  и  $CO_2$ , являясь незаряженной гидрофобной молекулой, проходит через мембрану эритроцита. Как известно, диффузия малых газообразных молекул ( $O_2$ , NO,  $CO_2$ ) в эритроцитах ограничена субмембранным барьером, образованным сетью взаимодействий между компонентами мембраны и цитоскелета [84]. Размер пор между белками в субмембранном барьере варьирует в зависимости от состояния цитоскелета. Усиление контакта цитоскелета с мембраной стягивает цитоскелетную сеть и закрывает поры, снижая диффузию газов, что представляется вполне вероятным при регуляции гемоглобином поступления NO в эритроциты [64, 85–87]. Вблизи мембраны могут существовать области с повышенной концентрацией metHb, благоприятные для реакции окислительного нитрозилирования [88]. В работе Salhany [72] была показана способность deoxyHb, связанного с CDB3, восстанавливать нитрит-ионы и, таким образом, являться источником NO. Более быстрая кинетика нитритредуктазной реакции для Hb, связанного с CDB3, предполагает преимущественную

генерацию NO на внутренней поверхности мембраны эритроцита, а связывание metHb и nitrosylHb с компонентами субмембранного барьера может изменять его свойства, уменьшать или увеличивать проницаемость для NO.

**Гипоксическое высвобождение АТР.** Bergfeld и Forrester в 1992 г. обнаружили, что в условиях гипоксии происходит выброс АТР из эритроцитов [89]. АТР связывается с P2Y-пуриnergическими рецепторами на поверхности эндотелиальных клеток, активирует синтез NO и других сосудорасширяющих факторов, способствуя увеличению скорости капиллярного кровотока и эффективности доставки  $O_2$  к тканям. Ключевым компонентом сигнального пути высвобождения АТР является Hb [90]. Связывание deoxyHb с CDB3 приводит к активации гетеротримерного G-белка и запуску каскада реакций сигнального пути, на заключительном этапе которого происходит активация регулятора трансмембранной проводимости CFTR и высвобождение АТР через паннексиновые каналы [91, 92]. Наряду с гипоксией, выброс АТР из эритроцитов может быть вызван их механической деформацией при прохождении через капилляры, закислением среды и избыточным количеством  $CO_2$  в крови [93].

**Нитритзависимое высвобождение АТР.** На различных экспериментальных моделях было показано, что увеличение синтеза и высвобождения АТР в присутствии нитрита коррелировало со снижением артериального давления [38], причем этот эффект не был связан с нитритредуктазной реакцией Hb и сопровождался увеличением содержания МВHb ( $9,9 \pm 0,2$  мкМ по сравнению с  $2,0 \pm 0,6$  мкМ в контроле). Было предложено объяснение участия Hb в нитритзависимом высвобождении АТР: более высокие уровни МВHb, индуцированные взаимодействием Hb с нитритом, приводят к активации ферментов гликолиза и усилению синтеза АТР. В какой именно форме Hb в данном случае связывается с мембраной, пока непонятно, вероятно, это низкоспиновый комплекс metHb- $NO_2$ . Индукция перераспределения Hb из растворимого в мембраносвязанное состояние нитритом наблюдалась и в наших экспериментах с изолированными эритроцитами [54], причем нитрозотиолы в тех же концентрациях, что и нитрит-ионы, не приводили к образованию дополнительного МВHb.

**Регуляция деформируемости эритроцитов.** Было показано, что Hb и Band3 участвуют в remodelировании цитоскелета эритроцитов в микроциркуляторном русле в зависимости от кислородных условий [94, 95]. Образование комплекса deoxyHb с CDB3 в непосредственной близости от места связывания белков-анкиринов, соединяющих Band3 с цитоскелетом, при-

водит к вытеснению анкирина из комплекса с этим белком [94], что вызывает высвобождение спектрин/актинового цитоскелета из комплекса с мембраной. Кратковременное ослабление мембрано-цитоскелетных взаимодействий может быть физиологически оправдано, однако при длительной деоксигенации приводит к везикуляции мембраны и гемолизу. В то же время нельзя исключить, что этот негативный на первый взгляд процесс имеет и определенную физиологическую целесообразность. Иногда внутрисосудистый гемолиз одиночных эритроцитов рассматривается как источник АТФ для местной пуринергической регуляции кровотока при физических нагрузках и гипоксии [93, 96–98].

#### **Поддержание циркадных ритмов эритроцита.**

Еще одна интересная функция Hb может быть связана с поддержанием циркадных ритмов в эритроцитах. В 2011 г. появилась работа, в которой было показано, что изолированные эритроциты человека поддерживают колебания некоторых метаболических параметров (PrxII–SO<sub>2</sub>H, metHb, NADH, NAD(P)H, АТФ) с околосуточным ритмом [99]. Эта работа была первым свидетельством существования независимого от транскрипции циркадного ритма, основанного на посттрансляционных процессах. Ключевым игроком в этом процессе является гиперокисленный пероксиредоксин II (PrxII–SO<sub>2</sub>H) [99, 100]. Причины колебаний содержания PrxII–SO<sub>2</sub>H остаются неизвестными. Поскольку основным источником H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в эритроцитах является автоокисление Hb, было предложено несколько гипотез о роли этого белка в организации циркадных ритмов. Поскольку димерная форма Hb характеризуется более высокой скоростью автоокисления, O'Neill et al. [99] сделали предположение, что в эритроцитах существует циркадная модуляция равновесия тетрамерной и димерной форм Hb. В поддержку этого тезиса свидетельствует наличие обратимого низкоамплитудного окисления гемоглобина в эритроцитах. Другая точка зрения основывается на том, что дезоксигенация Hb и, следовательно, образование H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> происходят преимущественно в примембранной области, где и осуществляется окисление PrxII до PrxII–SO<sub>2</sub>H. Причиной колебаний уровня PrxII–SO<sub>2</sub>H является процесс передачи O<sub>2</sub> к тканям, подчиняющийся суточному ритму [101]. Мы полагаем, что в организации циклических изменений задействован и комплекс Hb с CDB3.

#### **Формирование сигнала смерти и эриптоза.**

Увеличение содержания связанных с мембраной окисленных форм Hb не всегда имеет негативные последствия. В некоторых случаях оно может быть физиологическим процессом, направленным на элиминацию старых, поврежденных

и инфицированных эритроцитов, которые селективно удаляются из системы кровообращения фагоцитами и макрофагами [102, 103].

Существует несколько гипотез, объясняющих роль Hb в формировании сигнала смерти. В соответствии с одной из них, специфическое связывание metHb и гемихромов с Band3 активирует ряд сигнальных путей, направленных на маркировку эритроцитов для последующего фагоцитоза [102–106]. Пусковым механизмом является сополимеризация окисленных форм Hb с CDB3, вызывающая кластеризацию Band3 и изменение его антигенных свойств. Скорее всего, в высокоафинном связывании с SDB3 участвует карбонилированная форма metHb [107].

В этой связи можно также упомянуть активный эриптоз эритроцитов, инфицированных малярийным плазмодием (*Plasmodium falciparum*), который способствует их быстрому удалению из кровотока, тем самым защищая организм от распространения инфекции [45, 108].

**Перестройка мембраны с целью удаления гемихромов.** Денатурированные формы Hb также являются индикаторами окислительного стресса в эритроцитах [103, 109] и участвуют в механизме удаления гемихромов [110]. Рассмотрим последовательность событий, приводящую к формированию сигнала о редокс-условиях внутри клетки. Сначала происходит окисление близкорасположенных цистеинов (Cys201 и Cys317) в Band3 с образованием межмолекулярной дисульфидной связи [80]. Такая сшивка вызывает конформационные изменения в Band3, что делает возможным специфическое взаимодействие с Sук-киназой, фосфорилирующей остаток тирозина в CDB3 [109, 110]. Связывание гемихромов также индуцирует образование дисульфидной связи.

Вызванное гемихромами гиперфосфорилирование Band3 снижает его сродство к анкирину и способствует диссоциации от спектрин-актинового цитоскелета [109, 111], в результате чего происходит ремоделирование и дестабилизация мембраны. По-видимому, это явление играет ключевую роль в высвобождении мембранных микрочастиц, нагруженных гемихромами. В больших количествах такие частицы содержатся в крови больных талассемией [110].

### **ФУНКЦИИ ГЕМОГЛОБИНА, ВЫШЕДШЕГО ИЗ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ГЕМОЛИЗЕ**

**Пероксидазная, алкилгидропероксидазная и монооксигеназная активности гемоглобина.** Среди побочных функций Hb можно отметить его спо-

способность осуществлять диспропорционирование перекиси водорода ( $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ), каталитическое разложение органических гидроперекисей (ROOH) и биотрансформацию ксенобиотиков. Каталитические свойства гемоглобина объясняются наличием в его составе гемовой группы (железопорфирина), эффективность каталитического действия которой определяется способностью к автоокислению, т.е. переносу электронной и спиновой плотности с атома железа на кислород ( $\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{III}}-\text{O}_2^-]$ ) [112]. Такой активированный кислород способен оторвать атом водорода от молекулы углеводорода. У гемоглобина оксигенированная форма более стабильна, чем у гемсодержащих пероксидаз и цитохрома P450, поскольку функциональной направленностью Hb является прежде всего транспорт кислорода, а не его активация.

Окисление Hb сопровождается образованием ряда активных форм кислорода и так называемых активных форм железа, к которым относят сверхокисленные формы гемовых групп: феррильные (порфирин- $\text{Fe}^{\text{IV}}$ ), оксоферрильные (порфирин- $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ) и перферрильные (порфирин- $\text{Fe}^{\text{V}}$ ). Реакции, описывающие окисление гемоглобина, представлены в табл. 2. При автоокислении Hb образуется его окисленная форма (metHb) и супероксидный анион-радикал (1). Двухэлектронное окисление охуHb пероксидом водорода приводит к образованию оксоферрилгемоглобина (охоферрилHb) (2). В реакции metHb с  $\text{H}_2\text{O}_2$  образуется охоферрилHb с катион-радикалом на порфирине или белковой части молекулы (как правило, образуются тиольные и феноксильные радикалы на остатках цистеина и тирозина соответственно [113]) (3). В охоферрилHb внутримолекулярный перенос электронов от атома железа на аминокислотные остатки глобина может приводить к образованию metHb с катион-радикалом на белковой части (4). В результате рекомбинации глобиновых и порфириноцентрированных радикалов образуются пе-

рекренно-сшитые мультимеры Hb (5), которые агрегируют с образованием включений, так называемых телец Гейнца. Окси- и дезоксигемоглобин (деохуHb) представляют собой физиологические формы гемоглобина, а metHb, ferrylHb, охоферрилHb и перекренно-сшитый Hb – патологические.

Образующийся в перечисленных выше реакциях metHb может быть восстановлен цитохромом  $b_5$ , осуществляющим прямую передачу электрона на железо гема, сам же цитохром восстанавливается ферментативно NADH-цитохром- $b_5$ -редуктазой (metHb-редуктазой) (КФ 1.6.2.2) [65] и неферментативно через редокс-кофактор эндогенными антиоксидантами (например, аскорбатом). В качестве такого редокс-кофактора при восстановлении охоферрилHb выступает остаток тирозина  $\alpha$ -субъединицы (Tyr $\alpha$ 42) [117]. Описанный путь наиболее эффективен при низких концентрациях восстановителя. Эти данные могут отчасти объяснить преждевременное повреждение  $\beta$ -субъединиц в результате атаки  $\text{H}_2\text{O}_2$  [114].

Пероксидазные реакции Hb подобны процессам, катализируемым классическими гемсодержащими пероксидазами и каталазами, поскольку в молекуле Hb в пятом координационном положении порфирина также находится остаток гистидина. Для Hb показана способность окисления ксенобиотиков с использованием гидроперекисей ( $\text{H}_2\text{O}_2$  и ROOH). К таким реакциям относятся деалкилирование N-алкиламинов (диметиланилин, диметил-*n*-толуидин, аминопирин) и ароматическое гидроксилирование (ацетанилид, *n*-толуидин, анилин и др.). Для органических субстратов окисляющим агентом является комплекс I ( $\text{Gem}^+ - [\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]$ ), образующийся в реакции деохуHb и metHb с перекисями. Этот механизм характерен для «классических» пероксидаз, однако, в отличие от них, комплекс I гемоглобина нестабилен и быстро превращается в комплекс II ( $\text{Gem} - [\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]$ ), что

Таблица 2. Пути окисления гемоглобина: автоокисление и окисление в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$

№	Реакции окисления гемоглобина	Окисленная форма гемоглобина
1	$\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{II}}-\text{O}_2] \rightarrow \text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{III}}] + \text{O}_2^-$	metHb
2	$\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{II}}-\text{O}_2] + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}] + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	охоферрилHb
3	$\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{III}}] + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Hb}^{\cdot+}-[\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}] + \text{H}_2\text{O}$	охоферрилHb с катион-радикалом порфирина или глобина
4	$\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}] + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{Hb}^{\cdot+}-[\text{Fe}^{\text{III}}] + \text{H}_2\text{O}$	metHb с катион-радикалом глобина
5	$\text{Hb}^{\cdot+}-[\text{Fe}^{\text{III}}] + \text{Hb}^{\cdot+}-[\text{Fe}^{\text{III}}] \rightarrow [\text{Fe}^{\text{III}}]-\text{Hb}^+-\text{Hb}^+-[\text{Fe}^{\text{III}}]$	ковалентный перекренно-сшитый мультимер metHb

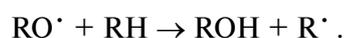
Примечание. Таблица составлена на основе данных работ Jia et al. [114], Vallelian et al. [115] и Umbreit [116].

сопровождается либо окислительным повреждением гема (разрыв порфиринового кольца, ковалентная пришивка гема к белку и его высвобождение), либо миграцией электрона на белковую часть молекулы, а длительное участие Hb в таких реакциях приводит к полному его разрушению [118]. Отметим, что для выявления именно пероксидазной активности Hb нами совместно с сотрудниками Института физико-химической медицины (Москва), Белорусского государственного университета и Научно-практического центра «Кардиология» (Минск) был разработан спектрофотометрический метод с использованием *o*-дианизидина в качестве субстрата и специфического ингибитора миелопероксидазы – гидразида 4-аминобензойной кислоты [119].

При стехиометрических соотношениях концентраций гемоглобина и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у Hb были выявлены следующие изменения: окисление аминокислотных остатков (в первую очередь Cysβ93) в β-цепи, уменьшение доли α-спиральных участков и снижение эллиптичности в области Core (по данным CD-спектроскопии), что указывает на 70%-ную потерю гема; образование аддуктов гема (порфирина) с белком в α-цепи и перекрестно-сшитых молекул Hb [114]. При этом в классических пероксидазах гем ковалентно связан с белковой частью молекулы фермента, что предотвращает его высвобождение и участие в неконтролируемых редокс-превращениях [120], а комплекс II принимает электроны от восстановителей, субстратов и продуктов реакции.

Была высказана интересная точка зрения, что наблюдаемая в Hb пришивка гема к белку является защитным механизмом, направленным на стабилизацию молекулы в условиях окислительного стресса [118]. Таким защитным механизмом можно считать и необратимую окислительную модификацию аминокислотных остатков белка, которые, принимая на себя свободные радикалы, защищают окружающие биомолекулы от воздействия окислителей. Существует мнение, что образование внутримолекулярных дисульфидных и дитиозинового сшивков является своеобразным способом защиты самого белка от дальнейшего окисления [121].

Разложение органических гидропероксидов с участием Hb протекает по автокаталитически радикальному механизму [112]:



Катализируемое гемоглобином окисление ксенобиотиков может быть прямым (через активированный кислород, связанный с железом гема), и опосредованным (через супероксид или пероксид водорода, образуемые при автоокислении Hb-[Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub>]). В первом случае Hb проявляет монооксигеназные свойства. Наиболее распространен второй путь окисления [116].

Теперь рассмотрим монооксигеназную реакцию, катализируемую гемоглобином. Окисление субстрата в этой реакции идет по двухэлектронному механизму через два последовательных одноэлектронных этапа. Один электрон поступает от железа, второй – от субстрата, в результате образуются metHb и H<sub>2</sub>O. Субстратами монооксигеназной реакции являются производные ароматических нитрозосоединений, гидроксиламина и фенола (анилин, фенилгидразин, фенилгидроксиламин, нитрозобензол, пирогаллол и др.) [113, 116, 122, 123].

О способности гемоглобинов катализировать разложение перекисей известно с середины XX века [124], однако до сих пор нет однозначного мнения о том, имеют ли пероксидазные свойства Hb физиологическое значение. Некоторые считают, что не следует искать биологическое объяснение этому процессу, его просто следует учитывать, особенно при патологиях и интоксикациях. Наряду с этим имеются данные, свидетельствующие о способности внеклеточного Hb (deoxyHb и metHb) защищать клетки от окислительного стресса, вызванного высокими концентрациями H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [118, 125]. Наиболее вероятно, что биологические последствия реакции Hb с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> определяются балансом между элиминацией H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (антиоксидантная защита) и продукцией свободных радикалов (окислительное повреждение). На это равновесие влияют различные факторы: концентрация низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбиновой и мочевой кислот, глутатиона), наличие молекул, специфически связывающих Hb или гем (гаптоглобина и гемопексина).

#### Другие каталитические активности гемоглобина.

Гемоглобин, так же как пероксидаза и каталаза, катализирует присоединение тиола (глутатиона, цистеина) к флавоноидам через образование связей C-S [126]. В некоторых работах была показана эстеразная активность гемоглобина. Так, например, Hb катализирует гидролиз *n*-нитрофенилацетата со скоростью, промежуточной между скоростью, рассчитанной для бычьего альбумина и карбоангидразы [127]. Он также катализирует гидролиз кофермента А до пантотеновой кислоты и аденозина [126]. Предположительно, в катализе задействованы гистидины β-субъединицы [127]. При низких концентрациях

(0,01–1 мкМ) Hb катализирует квазилипоксигеназную реакцию с очень высокой субстратной специфичностью, сопоставимой с истинными липоксигеназами. Образование липолипидпероксидов было продемонстрировано в реакции со свободной линолевой кислотой, ее сложным моноэфиром глицерина или линолеиловым спиртом [128].

Поскольку по каталитическим свойствам гемоглобин, как правило, значительно уступает истинным ферментам, и не всегда очевидна биологическая целесообразность этих свойств, его часто относят к так называемым ферментомиметикам. Например, константа скорости пероксидазной реакции, катализируемой Hb, намного ниже констант скоростей у классических пероксидаз. В литературе применительно к Hb обычно употребляют термин «псевдопероксидазная активность», тем самым подчеркивается второстепенность этой функции для белков-переносчиков кислорода.

**Патофизиологические эффекты гемоглобина в сердечно-сосудистой системе.** Способность Hb вступать в реакцию с  $H_2O_2$  и органическими гидроперекисями играет противоречивую роль в функционировании кровеносной системы [114, 118, 129]. С одной стороны, каталитические свойства внеклеточного Hb могут инициировать развитие различных заболеваний и усугублять их течение, вызывать эндотелиальную дисфункцию, повреждение сосудов и воспалительную реакцию [125, 130]. Неблагоприятные эффекты Hb наиболее отчетливо проявляются при гемолитических анемиях различного генеза, малярии, массовых переливаниях крови и тяжелых инфекциях. С другой стороны, Hb может выступать в роли дополнительного защитного и антиоксидантного фактора.

Реакциями Hb с NO и  $H_2O_2$  обусловлены и его патофизиологические эффекты в сердечно-сосудистой системе. Элиминация NO гемоглобином в NO-диоксигеназной реакции повышает вероятность развития гипертензии [131]. При повреждении тканей и развитии воспалительной реакции в высоких концентрациях продуцируется  $H_2O_2$  с участием NAD(P)H-оксидаз. В этих условиях может происходить окисление липопротеинов низкой плотности (ЛНП) и жирных кислот (например, арахидоновой кислоты) с образованием различных биологически активных соединений [132]. Наиболее благоприятной средой для реакций перекисного окисления с участием внеклеточного Hb являются атеросклеротические бляшки.

Известны два механизма повреждения эндотелия гемоглобином. Первый связан с индукцией острого воспалительного ответа продуктами

денатурации и деградации Hb (ferrylHb, катион-радикал порфирина или глобина, свободный гем), второй – с цитотоксическими эффектами окисленных ЛНП [125].

Показано, что белок острой фазы гаптоглобин (Hp) может функционировать как молекулярный переключатель функций Hb с провоспалительной и цитотоксической на защитную антиоксидантную. Hp образует стабильный внеклеточный комплекс с Hb, и этот комплекс затем может связываться с рецептором CD163 моноцитов и макрофагов [125–130]. Защитная функция Hp также проявляется в стабилизации структуры Hb, предотвращении разворачивания и агрегации его молекулы [133]. Гемоглобин в комплексе с гаптоглобином сохраняет пероксидазную активность, используя в качестве восстановителей аскорбат и NO [134]. Такой стабилизированный и защищенный от автоокислительного повреждения Hb может функционировать как полноценная пероксидаза [125]. Гаптоглобин также препятствует переносу радикалов от гемоглобина на ЛНП. Другими словами, Hb в комплексе с Hp может реализовать свой антиоксидантный потенциал без сопутствующих окислительных эффектов.

### ФУНКЦИИ ГЕМОГЛОБИНА, ОПОСРЕДОВАННЫЕ ПРОДУКТАМИ ЕГО РАСПАДА

**Гемоглобин как источник биологически активных веществ.** Разрушение эритроцитов и деградация Hb происходят в макрофагах печени и красной пульпы селезенки при участии гемоксигеназы-1 (HO-1). Гены, кодирующие HO-1, содержат электрофил-респонсивные элементы (EpARE – electrophile responsive element). Этот факт указывает на то, что синтез HO-1 и катаболизм гема находятся в тесной взаимосвязи со стрессовыми условиями и являются частью общей системы биологической защиты клеток [135, 136]. Фермент HO-1 катализирует распад гема до CO, биливердина и  $Fe^{2+}$ . Все три продукта в высоких концентрациях токсичны, а в низких, напротив, оказывают полезное воздействие [137, 138]. На рис. 1 приведена обобщенная схема деструктивных и защитных эффектов, опосредованных внеклеточным гемоглобином и продуктами его катаболизма.

**Защитное действие продуктов катаболизма Hb.** В настоящее время уже доказано, что один из продуктов распада гемоглобина – CO – выполняет в организме функции газотрансмиттера, сигнальные эффекты которого во многом пересекаются с действием NO и  $H_2S$  [139, 140]. В низ-

ких концентрациях ( $\leq 0,025\%$  в воздухе) СО обладает антигипертензивным действием и обеспечивает защиту от ишемической травмы сердца, печени и почек [139].

Биливердин восстанавливается биливердин-редуктазой до билирубина. В низких концентрациях циркулирующий в плазме билирубин в комплексе с альбумином защищает клетки сосудов и некоторых тканей от токсичного действия перекисных соединений, после чего поступает в печень и инактивируется. В опытах *in vitro* было показано, что в микромолярных концентрациях билирубин действует как высокоэффективный липофильный антиоксидант, подавляя свободнорадикальное окисление липосом [141, 142]. Цитопротекторное действие билирубина включает следующие эффекты [143–145]:

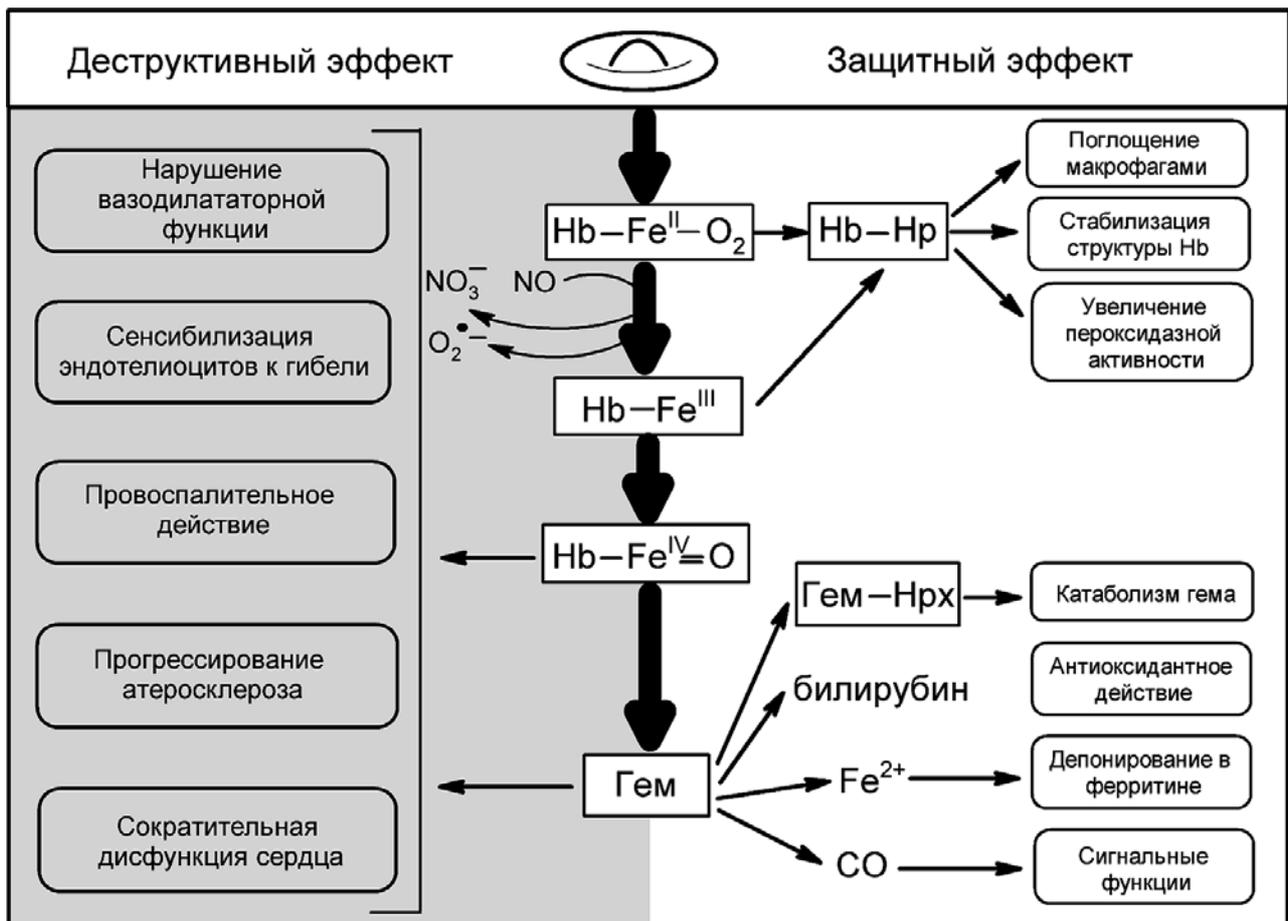
- 1) снижение эндотелиоцитами экспрессии молекул клеточной адгезии (Р-селектина и ICAM-1);
- 2) увеличение экспрессии антиапоптотических молекул;
- 3) подавление провоспалительных факторов;

4) снижение степени инфильтрации трансплантата нейтрофилами и макрофагами;

5) ингибирование в трансплантате экспрессии индуцибельной синтазы оксида азота и провоспалительных цитокинов.

Гем и ferrylHb были идентифицированы в макрофагах и эндотелиоцитах среди триггеров индукции экспрессии цистатион- $\gamma$ -лиазы [146], синтезирующей  $H_2S$ . Было показано, что  $H_2S$  заметно ингибирует окисление Hb, препятствуя образованию высокоокисленных форм гемопротеида и перекисному окислению липидов [146]. Ионы железа стимулируют синтез ферритина – белка, связывающего  $Fe^{2+}$  и таким образом обеспечивающего его вывод из окислительно-восстановительных реакций. Кроме того, железо регулирует экспрессию многих генов, вовлеченных в его метаболизм, и участвует в регуляции активности ферментов системы протеостаза в клетке [147].

Сам гем индуцирует экспрессию генов, кодирующих гемоксигеназу HO-1, а такая экспрес-



**Рис. 1.** Деструктивные и защитные эффекты, опосредованные внеклеточным гемоглобином и продуктами его катаболизма. Hp – гаптоглобин, Hb–Hp – комплекс гемоглобина с гаптоглобином; Hpx – гемопепсин, Гем–Hpx – комплекс гема с гемопепсином

сия стимулирует противовоспалительное, антиапоптотическое, антипролиферативное и антигипертензивное действия [140, 148, 149].

**Деструктивное действие продуктов катаболизма Hb.** Различные патологические состояния сопровождаются лизисом эритроцитов и выходом Hb в сосудистое русло, где он быстро окисляется до metHb и ferrylHb, из которых впоследствии высвобождается гемовая группа, обладающая прооксидантными и провоспалительными свойствами. Внеклеточный Hb и продукты его окисления и распада ответственны за многие патофизиологические эффекты массового внутрисосудистого гемолиза [150–152], которые были рассмотрены ранее. Действие гема приводит к ряду провоспалительных эффектов: активации и миграции лейкоцитов, повышению содержания молекул адгезии и индукции цитокинов и белков острой фазы [138, 153].

В ряде работ показано существование в клетках млекопитающих рецепторов, способных связывать гем [154, 155]. В частности, гем активирует клетки врожденной иммунной системы и клетки сосудистого эндотелия через связывание с Toll-like рецепторами (TLR) [155, 156]. Через один из таких рецепторов (TLR4) гем стимулирует передачу сигналов в эндотелиоцитах, что приводит к дегрануляции тельца Вейбла–Палада, активации NF-κB и окклюзии сосудов [157]. Также показана способность гема регулировать функционирование внутриклеточных Ca<sup>2+</sup>-зависимых калиевых каналов высокой проводимости (Slo1 BK) [158].

Для предотвращения неблагоприятного действия гема в плазме содержится белок гемопексин (Hpx) [156]. Также гем может катаболизироваться при участии гемоксигеназы и ферритина, индукция которых в клетках сосудистого эндотелия происходит в ответ на гем.

**Гемоглобин как источник железа.** Около 60–70% железа организма входит в состав Hb эритроцитов. Суточная потребность в железе для обеспечения гемопоэза практически полностью (92–96%) покрывается железом, освобожденным из Hb в ходе эритрофагоцитоза [159]. Как правило, разрушаются старые и поврежденные эритроциты, но иногда могут погибать и нормальные эритроциты, например, при дефиците железа [160]. Такая ситуация возникает у новорожденных [161]. В течение первых часов внеутробной жизни общая концентрация Hb в крови повышается до 165–225 г/л, через несколько дней его содержание уменьшается до 195 г/л, к концу первого месяца достигает 160 г/л, а к 2–3 месяцам – нормальных для взрослых людей величин 100–130 г/л. Считается, что перегрузка эритроцитов новорожденного гемоглобином в

первые дни жизни физиологически оправдана: избыток Hb обеспечивает организм железом в течение 3–4 месяцев [161]. Такое снижение концентрации Hb в первые месяцы жизни рассматривают как физиологическую анемию (трименонредукцию). Генез этого состояния обусловлен прекращением эритропоэза, укороченной продолжительностью жизни эритроцитов, содержащих фетальный Hb, и увеличением рO<sub>2</sub> артериальной крови. В случае низкой активности глюкозилтрансферазы трименонредукцию может сопровождать синдром гипербилирубинемии. В этом случае говорят о физиологической желтухе новорожденных. Существует и точка зрения, что билирубин защищает от окислительного стресса младенца, вышедшего в богатый кислородом внешний мир [162], поэтому вполне оправданно рассматривать физиологическую анемию и физиологическую желтуху новорожденных как адаптационную реакцию к жизни во внеутробном состоянии.

**Гемоглобин как источник биологически активных пептидов.** Еще в 1980-х гг. были обнаружены биологически активные «неклассические пептиды», образующиеся в крови в результате ферментативной деградации Hb [163]. Эти короткие пептиды с 4–8 аминокислотами получили название геморфинов и неокиоторфинов. Многие функции пептидов – производных Hb – описаны в обзорной статье Gomes et al. [164], мы остановимся на наиболее важных функциях с нашей точки зрения. Физиологические функции этих пептидов связаны с их действием на опиоидные рецепторы, по отношению к которым они являются антагонистами. Так, например, выделенный из α-цепи Hb пептид гемопрессин функционирует как антагонист каннабиноидного рецептора CB1 [165].

Геморфины представляют собой короткие пептиды из N-концевой области β-цепи Hb, содержащие фрагмент Tyr–Pro–Trp–Thr [166]. Наиболее изученный LVV-геморфин 7, помимо опиоидных рецепторов, с высоким сродством связывается с рецептором ангиотензина IV (AT4R), вызывая множественные биологические эффекты [167]. Было показано участие LVV-геморфина 7 в регуляции артериального давления [168], что, в частности, обусловлено ингибированием ренин-ангиотензиновой системы [169]. У лошадей было показано увеличение уровня LVV-геморфина 7 в плазме крови после высокоскоростных тренировок [170]. Считается, что при интенсивных физических нагрузках этот опиоид участвует в регуляции болевых ощущений, воспаления и артериального давления. Высказано предположение, что LVV-геморфин 7 может играть определенную роль в обучении и

формировании памяти. Так, было показано, что его внутримозговое введение улучшает пространственное обучение у крыс [171].

Можно предположить существование в организме целого набора пептидов — производных гемоглобина, однако пока не для всех этих пептидов установлены функции.

## ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Несмотря на то, что гемоглобин изучен достаточно хорошо, остается еще много нерешенных вопросов, связанных с его функционированием. Одни из них представляют интерес для общей и теоретической биологии, другие актуальны для практической медицины. К первой группе относится изучение молекулярных механизмов передачи сигнала от гемоглобина на другие компоненты клетки, что тесно связано с изучением механизмов адаптации эритроцитов, их повреждений и устойчивости, ко второй — разработка методов стабилизации эритроцитов и использование данных о разных функциональных формах гемоглобина в клинико-биохимической диагностике.

**Гемоглобин как сигнал-трансдуцирующая молекула.** Структура Hb была эволюционно адаптирована для транспорта кислорода, но она не строго специализирована для выполнения только одной этой задачи и может быть также использована для катализа и передачи сигнала. Эритроцитарный Hb не является классическим сигналом-трансдуцирующим белком, в то же время его функционирование в организме в качестве переносчика кислорода сопряжено с сенсорной функцией. Детекция кислорода осуществляется по такому же механизму, как его транспорт, т.е. с участием аллостерических свойств гемоглобина. Сигнальная функция Hb направлена в первую очередь на регуляцию периферического кровотока, осуществляемую с помощью двух основных механизмов: высвобождения сигнальных метаболитов (NO, АТФ, АДФ, аденозин,  $K^+$ , NAD(P)H, PGE2) и изменения механических свойств мембраны, т.е. реологических свойств эритроцитов. Начальным этапом в цепи передачи сигнала является образование комплекса deoxyHb—CDB3, однако последовательность дальнейших событий пока неизвестна. Не идентифицированы промежуточные компоненты этого пути, модулирующие такие свойства клетки, как деформируемость и лизис.

В качестве возможных регуляторов деформируемости и устойчивости эритроцитов рассматриваются доноры NO. Изучается влияние ДНКЖ с глутатионовыми лигандами на различ-

ные характеристики эритроцитов. Показано, что ДНКЖ увеличивают деформируемость эритроцитов и замедляют их детергент-индуцированный гемолиз [172, 173]. Нами было показано, что комплексы ДНКЖ—GS оказывают стабилизирующее действие на популяцию эритроцитов, предрасположенных к лизису. Возможно, они участвуют в регуляции распада эритроцитов в зависимости от кислородных и редокс-условий. Результаты этих исследований могут найти применение при разработке способов стабилизации эритроцитов при фотодинамической терапии и консервировании донорской крови, а также помогут в раскрытии механизмов внутрисосудистого гемолиза как источника АТФ для местной пуринергической регуляции кровотока [93, 96–98].

**Адаптация эритроцитов.** Адаптационные возможности эритроцитов млекопитающих ограничены цитоплазматическими механизмами, в которых Hb играет ключевую роль. К таким механизмам можно отнести посттрансляционные модификации, стабилизирующие белок в R-конформации, что повышает его сродство к кислороду и, следовательно, снижает вероятность автоокисления и генерации супероксидного анион-радикала. К цитоплазматическим механизмам регуляции также относятся процессы, увеличивающие ассоциацию гемоглобина с компонентами мембраны, что одновременно стабилизирует и белок, и мембрану. В качестве примера можно привести факт повышения прочности мембран эритроцитов диабетических больных. Методом тушения флуоресценции зонда, встроенного в мембрану, было показано, что Hb связывается с мембранами, полученными из эритроцитов диабетических больных, с более высоким сродством по сравнению с мембранами здоровых людей [174]. Благодаря этому мембрана приобретает повышенную устойчивость по отношению к активным формам кислорода, образование которых сопровождает течение болезни.

**Использование данных о функциональных формах гемоглобина в клинико-биохимической диагностике.** Отметим также, что данные о различных функциональных и модифицированных формах Hb могут быть использованы и для диагностики заболеваний крови, в т.ч. гемоглобинопатий. Нами ведется работа по созданию компьютерной диагностической экспертной системы, разработана и проверена ее пилотная версия [175]. База знаний системы включает данные по качественным и количественным показателям крови, среди которых предложенный нами новый для гематологической практики показатель — количество мембраносвязанного гемоглобина. Установлено, что повышенный уровень МВНб

коррелирует с различными патологическими состояниями организма. Но для использования этого параметра в практической медицине необходим простой и точный метод измерения МВНб, и нужно знать границы нормы для этого показателя. Такой метод был разработан в нашей лаборатории, и с его помощью были определены границы нормы МВНб. Также нами проводится изучение взаимосвязи содержания МВНб с другими биохимическими показателями, в частности с данными общего анализа крови.

На основании известных сведений о функционировании Нб можно сделать вывод, что гемоглобин способен аккумулировать информацию о состоянии эритроцита и плазмы крови, функционируя как сигнальная молекула. Сигнально-регуляторные функции Нб обусловлены его конформационными переходами, связанными с циклом оксигенации–дезоксигенации, а также с изменением валентного состояния железа. Поэтому дополнительные функции гемоглобина отчетливо проявляются в условиях гипоксии и/или окислительного стресса, когда происходит конформационный R-T-переход, и возрастает доля его окисленных нефизиологических форм (рис. 2).

Гемоглобин в окси- и дезоксиформах обладает разными физико-химическими характеристиками. Различаются растворимость, ионизация боковых и активность SH-групп, способ-

ность связывать 2,3-DPG и  $\text{CO}_2$  и связываться с компонентами мембраны и цитоскелета, спектральные, термодинамические и другие свойства. Энергию конформационного перехода гемоглобин трансформирует в биологический сигнал. Поскольку триггером конформационного перехода в организме является  $\text{pO}_2$ , то одновременно с транспортом кислорода Нб «сигнализирует» различным метаболическим системам о кислородных условиях.

Окисленные нефизиологические формы гемоглобина (metHb, ferrylHb и перекрестно-сшитые мультимеры Нб) участвуют в редокс-зависимой передаче сигнала (рис. 2). В этом смысле Нб подобен древним гемоглобинам бактерий и простейших, работающим как сенсоры газов или редокс-условий в комплексе с мембранными сигнал-трансдуцирующими белками [2, 3, 6, 176].

Сигнальная функция внутриэритроцитарного гемоглобина во многом связана с метаболизмом NO и АТФ (рис. 3). Продукты катаболизма Нб также являются сигнальными молекулами. Именно благодаря способности Нб активно участвовать в образовании и транспорте этих молекул вполне оправдано введение в научный обиход термина «эритрокринная функция».

Проводя разбор функций эритроцитарного Нб, мы стремились показать, какими широкими возможностями располагает этот белок в качестве носителя информации. Полифункциональность гемоглобина можно рассматривать как

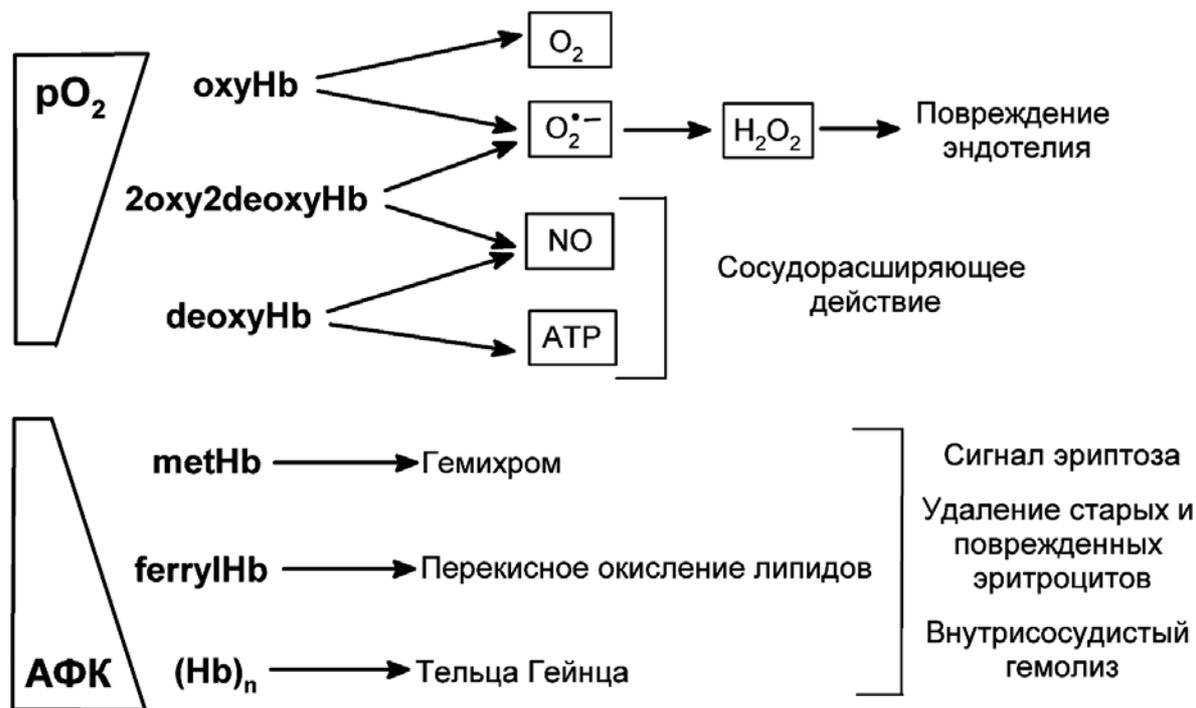


Рис. 2. Состояние внутриклеточного гемоглобина (степень оксигенации и окислительно-восстановительное состояние) определяет состояние эритроцитов и сосудистого эндотелия

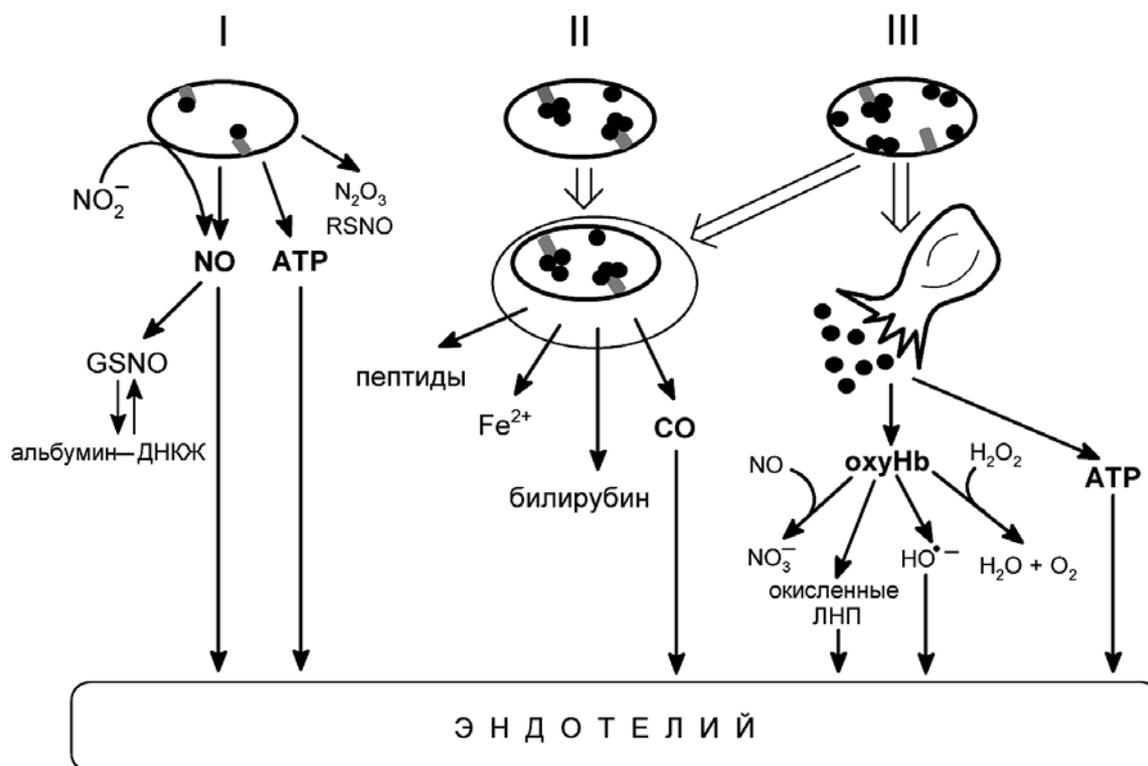


Рис. 3. Участие гемоглобина в реализации эритрокринной функции; I – нормально функционирующие эритроциты, II и III – старые или поврежденные эритроциты: фагоцитоз (II) и внутрисосудистый гемолиз (III)

выражение принципа биохимической экономии. Джозеф Баркрофт – один из основоположников науки о дыхательной функции крови – назвал гемоглобин «самым удивительным веществом в мире». Изучение гемоглобинов разных организмов показало, что природа использует практически весь заложенный в этом белке функциональный потенциал [2]. Даже его светопоглощающие свойства нашли применение: в глазке самок нематоды *Mermis nigrescens* кристаллы Hb выполняют функцию светофильтра [177].

Наличие дополнительных функций у гемоглобина является важным для выживаемости организмов, поскольку расширяет границы нормы их адапционного ответа. Интересно, что основные и дополнительные функции Hb менялись в процессе эволюции. Так, основная в настоящее время кислородсвязывающая функция эритроцитарного Hb являлась, скорее всего, альтернативной для гемоглобинов в «докислородную» эпоху и лишь впоследствии была приспособлена для обеспечения организма кислородом, необходимым для его энергетических нужд.

Недооценивание биологической значимости побочных функций белков может приводить к недостаточному пониманию важности многих биологических процессов. Например, механизм нитритредуктазной реакции гемоглобина опи-

сан более 80 лет назад [178], реакция активно применяется в пищевой промышленности для придания мясным продуктам привлекательного розового цвета. Однако она долгое время не рассматривалась как физиологически значимая, и только после открытия биологической активности NO исследователи стали соотносить процессы, проходящие в мясе, с реакциями, идущими в организме человека [179].

Отметим, что рассмотрение функционального разнообразия Hb эритроцитов подтверждает формирующуюся в настоящее время точку зрения на белки как на полифункциональные биомолекулы. Демонстрируя на примере гемоглобина многообразие функций белков, мы подчеркиваем, что для выяснения роли того или иного белка в организме необходимо исследовать не только то, что он делает чаще и лучше всего, но и то, что он может делать дополнительно, например, при изменении условий. Только в этом случае мы сможем дать наиболее полное объяснение состояния организма *in vivo* с помощью данных, полученных в опытах *in vitro*.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Tejero, J., and Gladwin, M.T. (2014) The globin superfamily: functions in nitric oxide formation and decay, *Biol. Chem.*, **395**, 631–639.
- Kosmachevskaya, O.V., and Topunov, A.F. (2009) Hemoglobins: diversity of structures and functions, *Appl. Biochem. Microbiol.*, **45**, 563–587.
- Vinogradov, S.N., and Moens, L. (2008) Diversity of globin function: enzymatic, transport, storage and sensing, *J. Biol. Chem.*, **283**, 8773–8777.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G., and Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature*, **327**, 524–526.
- Hill, B.G., Dranka, B.P., Bailey, S.M., Lancaster, J.R.Jr., and Darley-Usmar, V.M. (2010) What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology, *J. Biol. Chem.*, **285**, 19699–19704.
- Vinogradov, S.N., Fernandez, I., Hoogewijs, D., and Arredondo-Peter, R. (2011) Phylogenetic relationships of 3/3 and 2/2 hemoglobins in Archaeplastida genomes to bacterial and other eukaryote hemoglobins, *Mol. Plant*, **4**, 42–58.
- Gardner, P.R. (2005) Nitric oxide dioxygenase function and mechanism of flavohemoglobin, hemoglobin, myoglobin and their associated reductases, *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 247–266.
- Perazzoli, M., Dominici, P., Romero-Puertas, M.C., Zago, E., Zeier, J., Sonoda, M., Lamb, C., and Delledonne, M. (2004) Arabidopsis nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity, *Plant Cell*, **16**, 2785–2794.
- Gardner, A.M., Cook, M.R., and Gardner, P.R. (2010) Nitric-oxide dioxygenase function of human cytoglobin with cellular reductants and in rat hepatocytes, *J. Biol. Chem.*, **285**, 23850–23857.
- Jia, L., Bonaventura, C., Bonaventura, J., and Stamler, J.S. (1996) S-Nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control, *Nature*, **380**, 221–226.
- Doctor, A., Platt, R., Sheram, M.L., Eischeid, A., McMahon, T., Maxey, T., Doherty, J., Axelrod, M., Kline, J., Gurka, M., Gow, A., and Gaston, B. (2005) Hemoglobin conformation couples erythrocyte S-nitrosothiol content to O<sub>2</sub> gradients, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 5709–5714.
- Timoshin, A.A., Vanin, A.F., Orlova, T.R., Sanina, N.A., Ruuge, E.K., Aldoshin, S.M., and Chazov, E.I. (2007) Protein-bound dinitrosyl-iron complexes appearing in blood of rabbit added with a low-molecular dinitrosyl-iron complexes: EPR studies, *Nitric Oxide*, **16**, 286–293.
- Shumaev, K.B., Gubkin, A.A., Serezhnikov, V.A., Lobysheva, I.I., Kosmachevskaya, O.V., Ruuge, E.K., Lankin, V.Z., Topunov, A.F., and Vanin, A.F. (2008) Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and hemoglobin bound dinitrosyl iron complexes, *Nitric Oxide*, **18**, 37–46.
- Shumaev, K.B., Kosmachevskaya, O.V., Timoshin, A.A., Vanin, A.F., and Topunov, A.F. (2008) Dinitrosyl iron complexes bound with haemoglobin as markers of oxidative stress, *Methods Enzymol.*, **436**, 445–461.
- Gow, A.J., and Stamler, J.S. (1998) Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions, *Nature*, **391**, 169–173.
- Herold, S., Exner, M., and Nauser, T. (2001) Kinetic and mechanistic studies of the NO<sup>•</sup>-mediated oxidation of oxy-myoglobin and oxyhemoglobin, *Biochemistry*, **40**, 3385–3395.
- Cortese-Krott, M.M., and Kelm, M. (2014) Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: key to a new erythrocrine function? *Redox Biol.*, **2**, 251–258.
- Stamler, J.S. (2004) S-Nitrosothiols in the blood roles, amounts, and methods of analysis, *Circ. Res.*, **94**, 414–417.
- Stamler, J.S., Singel, D.J., and Piantadosi, C.A. (2008) SNO-hemoglobin and hypoxic vasodilation, *Nat. Med.*, **14**, 1008–1009.
- Benesch, R.E., and Benesch, R. (1962) The influence of oxygenation on the reactivity of the –SH groups of hemoglobin, *Biochemistry*, **1**, 735–738.
- Сандалова Т.П., Игнатенко Т.В. (1984) *Окисление гемоглобина с модифицированными SH-группами*, АН СССР, Сиб. отд., Ин-т физики им. Л.В. Киренского, Красноярск, Препринт № 308Ф.
- Doyle, M.P., Pickering, R.A., DeWeert, T.M., Hoekstra, J.W., and Pater, D. (1981) Kinetics and mechanism of the oxidation of human deoxyhemoglobin by nitrites, *J. Biol. Chem.*, **256**, 12393–12398.
- Huang, K.T., Keszler, A., Patel, N., Patel, R.P., Gladwin, M.T., Kim-Shapiro, D.B., and Hogg, N. (2005) The reaction between nitrite and deoxyhemoglobin. Reassessment of reaction kinetics and stoichiometry, *J. Biol. Chem.*, **280**, 31126–31131.
- Helms C., and Kim-Shapiro, D.B. (2013) Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling, *Free Radic. Biol. Med.*, **61**, 464–472.
- Gladwin, M.T., Grubina, R., and Doyle, M.P. (2009) The new chemical biology of nitrite reactions with hemoglobin: R-state catalysis, oxidative denitrosylation, and nitrite reductase/angidrase, *Acc. Chem. Res.*, **42**, 157–167.
- Cantu-Medellin, N., Vitturi, D.A., Rodriguez, C., Murphy, S., Dorman, S., Shiva, S., Zhou, Y., Jia, Y., Palmer, A.F., and Patel, R.P. (2011) Effects of T-state and R-state stabilization on deoxyhemoglobin nitrite reactions and stimulation of nitric oxide signaling, *Nitric Oxide*, **25**, 59–69.
- Keszler, A., Pikhova, B., Schechter, A.N., and Hogg, N. (2008) The reaction between nitrite and oxyhemoglobin: a mechanistic study, *J. Biol. Chem.*, **283**, 9615–9622.
- Zavodnik, I.B., Lapshina, E.A., Rekawiecka, K., Zavodnik, L.B., Bartosz, G., and Bryszewska, M. (1999) Membrane effects of nitrite-induced oxidation of human red blood cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1421**, 306–316.
- Nagababu, E., and Rifkind, J.M. (2007) Measurement of plasma nitrite by chemiluminescence without interference of S-, N-nitroso and nitrated species, *Free Radic. Biol. Med.*, **42**, 1146–1154.
- Nagababu, E., Ramasamy, S., Abernethy, D.R., and Rifkind, J.M. (2003) Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction, *J. Biol. Chem.*, **278**, 46349–46356.
- Gladwin, M.T., Raat, N.J., Shiva, S., Dezfulian, C., Hogg, N., Kim-Shapiro, D.B., and Patel, R.P. (2006) Nitrite as a vascular endocrine nitric oxide reservoir that contributes to hypoxic signaling, cytoprotection, and vasodilation, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **291**, 2026–2035.
- Shiva, S. (2013) Nitrite: a physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function, *Redox Biol.*, **1**, 40–44.
- Dalsgaard, T., Simonsen, U., and Fago, A. (2007) Nitrite-dependent vasodilation is facilitated by hypoxia and is independent of known NO-generating nitrite reductase activities, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **292**, 3072–3078.
- Crawford, J.H., Isbell, T.S., Huang, Z., Shiva, S., Chacko, B.K., Schechter, A.N., Darley-Usmar, V.M., Kerby, J.D., Lang, J.D.Jr., Kraus, D., Ho, C., Gladwin, M.T., and Patel, R.P. (2006) Hypoxia, red blood cells, and nitrite regu-

- late NO-dependent hypoxic vasodilation, *Blood*, **107**, 566–574.
35. Cosby, K., Partovi, K.S., Crawford, J.H., Patel, R.P., Reiter, C.D., Martyr, S., Yang, B.K., Waclawiw, M.A., Zalos, G., Xu, X., Huang, K.T., Shields, H., Kim-Shapiro, D.B., Schechte, A.N., Cannon, R.O.3<sup>rd</sup>, and Gladwin, M.T. (2003) Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation, *Nat. Med.*, **9**, 1498–1505.
  36. Rifkind, J.M., Nagababu, E., Barbiro-Michaely, E., Ramasamy, S., Pluta, R.M., and Mayevsky, A. (2007) Nitrite infusion increases cerebral blood flow and decreases mean arterial blood pressure in rats: a role for red cell NO, *Nitric Oxide*, **16**, 448–456.
  37. Richards, J.C., Racine, M.L., Hearon, C.M.Jr., Kunkel, M., Luckasen, G.J., Larson, D.G., Allen, J.D., and Dinunno, F.A. (2018) Acute ingestion of dietary nitrate increases muscle blood flow via local vasodilation during handgrip exercise in young adults, *Physiol. Rep.*, **6**, e13572.
  38. Cao, Z., Bell, J.B., Mohanty, J.G., Nagababu, E., and Rifkind, J.M. (2009) Nitrite enhances RBC hypoxic ATP synthesis and the release of ATP into the vasculature: a new mechanism for nitrite-induced vasodilation, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **297**, 1494–1503.
  39. Иржак Л.И. (1975) *Гемоглобины и их свойства*, Наука, Москва, 240 с.
  40. Tyuma, I. (1984) The Bohr effect and the Haldane effect in human hemoglobin, *Jpn. J. Physiol.*, **34**, 205–216.
  41. Jensen, F.B. (2004) Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> transport, *Acta Physiol. Scand.*, **182**, 215–227.
  42. Perutz, M.F. (1970) Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin: haem–haem interaction and the problem of allostery, *Nature*, **228**, 726–734.
  43. Камшилов И.М., Запруднова Р.А. (2013) Эффект Бора в характеристике буферных свойств гемоглобина рыб, *Труды Карельского научного центра РАН*, № 3, 190–193.
  44. Sakai, Y., Miwa, M., Oe, K., Ueha, T., Koh, A., Niikura, T., Iwakura, T., Lee, S.Y., Tanaka, M., and Kurosaka, M. (2011) A novel system for transcutaneous application of carbon dioxide causing an «artificial Bohr effect» in the human body, *PLoS One*, **6**, e24137.
  45. Giardina, B., Messina, I., Scatena, R., and Castagnola, M. (1995) The multiple functions of haemoglobin, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **30**, 165–196.
  46. Anderson, H.M., and Turner, J.C. (1959) Preparation and the haemoglobin content of red cell «ghosts», *Nature*, **183**, 112–113.
  47. Anderson, H.M., and Turner, J.C. (1960) Relation of hemoglobin to the red cell membrane, *J. Clin. Invest.*, **39**, 1–7.
  48. Gromov, P.S., Zakharov, S.F., Shishkin, S.S., and Ilinskii, R.V. (1988) Two-dimensional map of human-erythrocyte membrane-proteins, *Biochemistry (Moscow)*, **53**, 1146–1155.
  49. Токтамысова З.С., Биржанова Н.Х. (1990) О мембраносвязанном гемоглобине, *Биофизика*, **35**, 1019–1020.
  50. Chu, H., and Low, P.S. (2006) Mapping of glycolytic enzyme-binding sites on human erythrocyte band 3, *Biochem. J.*, **400**, 143–151.
  51. Пивоваров Ю.И., Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г., Сергеева А.С., Бабушкина И.В., Корякина Л.Б., Андреева Е.О. (2016) Уровень мембраносвязанного гемоглобина и белки мембраны эритроцитов у больных гипертонической болезнью, осложненной и не осложненной метаболическим синдромом, *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*, **1**, 61–67.
  52. Чуйко Е.С., Орлова Г.М., Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г. (2015) Мембраносвязанный гемоглобин и метгемоглобин эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца, *ЭНИ Забайкальский медицинский вестник*, № 3, 9–12.
  53. Созарукова М.М., Владимиров Г.К., Измайлов Д.Ю. (2015) Мембранно-связанный гемоглобин эритроцитов как возможный источник свободных радикалов, *Материалы международной научной конференции «Science and practice: new discoveries» (Karlov Vary–Moscow, 24–25 October 2015)*, Международный центр научно-исследовательских проектов, Киров, с. 771–780.
  54. Насыбуллина Э.И., Космачевская О.В., Топунов А.Ф. (2018) Влияние метаболитов оксида азота на образование мембраносвязанного гемоглобина в условиях карбонильного стресса, *Труды Карельского научного центра РАН*, № 4, 93–104.
  55. De Rosa, M.C., Alinovi, C.C., Galtieri, A., Scatena, R., and Giardina, B. (2007) The plasma membrane of erythrocytes plays a fundamental role in the transport of oxygen, carbon dioxide and nitric oxide and in the maintenance of the reduced state of the heme iron, *Gene*, **398**, 162–171.
  56. Shaklai, N., Yguerabide, J., and Ranney, H.M. (1977) Classification and localization of hemoglobin binding sites on the red blood cell membrane, *Biochemistry*, **16**, 5593–5597.
  57. Sega, M.F., Chu, H., Christian, J., and Low, P.S. (2012) Interaction of deoxyhemoglobin with the cytoplasmic domain of murine erythrocyte band 3, *Biochemistry*, **51**, 3264–3272.
  58. Walder, J.A., Chatterjee, R., Steck, T.L., Low, P.S., Musso, G.F., Kaiser, E.T., Rogers, P.H., and Arnone, A. (1984) The interaction of hemoglobin with the cytoplasmic domain of band 3 of the human erythrocyte membrane, *J. Biol. Chem.*, **259**, 10238–10246.
  59. Shaklai, N., Sharma, V.S., and Ranney, H.M. (1981) Interaction of sickle cell hemoglobin with erythrocyte membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 65–68.
  60. Demehin, A.A., Abugo, O.O., Jayakumar, J.R., and Rifkind, J.M. (2002) Binding of hemoglobin to red cell membranes with eosin-5-maleimide-labeled band 3: analysis of centrifugation and fluorescence data, *Biochemistry*, **41**, 8630–8637.
  61. Chan, E., and Desforges, J.F. (1976) The role of disulfide bonds in Heinz body attachment to membranes, *Br. J. Haematol.*, **33**, 371–378.
  62. Sharma, R., and Premachandra, B.R. (1991) Membrane-bound hemoglobin as a marker of oxidative injury in adult and neonatal red blood cells, *Biochem. Med. Metab. Biol.*, **46**, 33–44.
  63. Datta, P., Chakrabarty, S., Chakrabarty, A., and Chakrabarty, A. (2008) Membrane interactions of hemoglobin variants, HbA, HbE, HbF and globin subunits of HbA: effects of aminophospholipids and cholesterol, *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 1–9.
  64. Giardina, B., Scatena, R., Clementi, M.E., Ramacci, M.T., Maccari, F., Cerroni, L., and Condo, S.G. (1991) Selective binding of met-hemoglobin to erythrocytic membrane: a possible involvement in red blood cell aging, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **307**, 75–84.
  65. Топунов А.Ф., Голубева Л.И. (1989) Редуктазы, восстанавливающие кислородпереносящие гемопротеиды: гемоглобин, миоглобин и левоглобин, *Усп. биол. химии*, **30**, 239–252.
  66. Shaklai, N., and Ranney, H.R. (1978) Interaction of hemoglobin with membrane lipids: a source of pathological phenomena, *Isr. J. Med. Sci.*, **14**, 1152–1156.
  67. Kumar, S., and Bandyopadhyay, U. (2005) Free heme toxicity and its detoxification systems in human, *Toxicol. Lett.*, **157**, 175–188.
  68. Kriebardis, A.G., Antonelou, M.H., Stamoulis, K.E., Economou-Petersen, E., Margaritis, L.H., and Papassi-

- deri, I.S. (2007) Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells, *J. Cell. Mol. Med.*, **11**, 148–155.
69. Luckey, M. (2008) *Membrane structural biology with biochemical and biophysical foundations*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, N.Y., USA.
70. Tsuneshige, A., Imai, K., and Tyuma, I. (1987) The binding of hemoglobin to red cell membrane lowers its oxygen affinity, *J. Biochem.*, **101**, 695–704.
71. Korobov, V.M. (1999) Effect of carnosine on the erythrocyte membrane in normal states and in diabetes, *Ukr. Biokhim. Zh.*, **72**, 94–96.
72. Salhany, J.M. (2008) Kinetics of reaction of nitrite with deoxy hemoglobin after rapid deoxygenation or predeoxygenation by dithionite measured in solution and bound to the cytoplasmic domain of band 3 (SLC4A1), *Biochemistry*, **47**, 6059–6072.
73. Chu, H., Breite, A., Ciraolo, P., Franco, R.S., and Low, P.S. (2008) Characterization of the deoxyhemoglobin binding site on human erythrocyte band 3: implications for O<sub>2</sub> regulation of erythrocyte properties, *Blood*, **111**, 932–938.
74. Puchulu-Campanella, E., Chu, H., Anstee, D.J., Galan, J.A., Tao, W.A., and Low, P.S. (2013) Identification of the components of a glycolytic enzyme metabolon on the human red blood cell membrane, *J. Biol. Chem.*, **288**, 848–858.
75. Messana, I., Orlando, M., Cassiano, L., Pennacchietti, L., Zuppi, C., Castagnola, M., and Giardina, B. (1996) Human erythrocyte metabolism is modulated by the O<sub>2</sub>-linked transition of hemoglobin, *FEBS Lett.*, **390**, 25–28.
76. Weber, R.E., Voelter, W., Fago, A., Echner, H., Campanella, E., and Low, P.S. (2004) Modulation of red cell glycolysis: interactions between vertebrate hemoglobins and cytoplasmic domains of band 3 red cell membrane proteins, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **287**, 454–464.
77. Sprague, R.S., Stephenson, A.H., and Ellsworth, M.L. (2007) Red not dead: signaling in and from erythrocytes, *Trends Endocrin. Metab.*, **18**, 350–355.
78. Ellsworth, M.L., Ellis, C.G., Goldman, D., Stephenson, A.H., Dietrich, H.H., and Sprague, R.S. (2009) Erythrocytes: oxygen sensors and modulators of vascular tone, *Physiology (Bethesda)*, **24**, 107–116.
79. Ramdani, G., and Langsley, G. (2014) ATP, an extracellular signaling molecule in red blood cells: a messenger for malaria? *Biomed. J.*, **37**, 284–292.
80. Thevenin, B.J.-M., Willardson, B.M., and Low, P.S. (1989) The redox state of cysteines 201 and 317 of the erythrocyte anion exchanger is critical for ankyrin binding, *J. Biol. Chem.*, **264**, 15886–15892.
81. Soszynski, M., and Bartosz, G. (1997) Penetration of erythrocyte membrane by peroxy nitrite: participation of the anion exchange protein, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **43**, 319–325.
82. Shingles, R., Roh, M.H., and McCarty, R.E. (1997) Direct measurement of nitrite transport across erythrocyte membrane vesicles using the fluorescent probe, 6-methoxy-N-(3-sulfopropyl) quinolinium, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **29**, 611–616.
83. Matsumoto, A., and Gow, A.J. (2011) Membrane transfer of S-nitrosothiols, *Nitric Oxide*, **25**, 102–107.
84. Huang, Z., Louderback, J.G., Goyal, M., Azizi, F., King, S.B., and Kim-Shapiro, D.B. (2001) Nitric oxide binding to oxygenated hemoglobin under physiological conditions, *Biochim. Biophys. Acta*, **1568**, 252–260.
85. Kuhn, V., Diederich, L., Keller, T.C.S.IV, Kramer, C.M., Luckstadt, W., Panknin, C., Suvorava, T., Isakson, B.E., Kelm, M., and Cortese-Krott, M.M. (2017) Red blood cell function and dysfunction: redox regulation, nitric oxide metabolism, anemia, *Antioxid. Redox Signal.*, **26**, 718–742.
86. Vaughn, M.W., Huang, K.-T., Kuo, L., and Liao, J.C. (2000) Erythrocytes possess an intrinsic barrier to nitric oxide consumption, *J. Biol. Chem.*, **275**, 2342–2344.
87. Han, T.H., Hyduke, D.R., Vaughn, M.W., Fukuto, J.M., and Liao, J.C. (2002) Nitric oxide reaction with red blood cells and hemoglobin under heterogeneous conditions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7763–7768.
88. Gladwin, M.T., Crawford, J.H., and Patel, R.P. (2004) The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation, *Free Radic. Biol. Med.*, **36**, 707–717.
89. Bergfeld, G.R., and Forrester, T. (1992) Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia, *Cardiovasc. Res.*, **26**, 40–47.
90. Jagger, J.E., Bateman, R.M., Ellsworth, M.L., and Ellis, C.G. (2001) Role of erythrocyte in regulating local O<sub>2</sub> delivery mediated by hemoglobin oxygenation, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **280**, 2833–2839.
91. Sprague, R.S., Ellsworth, M.L., Stephenson, A.H., and Lonigro, A.J. (2001) Participation of cAMP in a signal-transduction pathway relating erythrocyte deformation to ATP release, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **281**, 1158–1164.
92. Olearczyk, J.J., Stephenson, A.H., Lonigro, A.J., and Sprague, R.S. (2004) Heterotrimeric, G protein G<sub>i</sub> is involved in a signal transduction pathway for ATP release from erythrocytes, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **286**, 940–945.
93. Лунева О.Г., Сидоренко С.В., Максимов Г.В., Григорчик Р., Орлов С.Н. (2015) Эритроциты как регуляторы сосудистого тонуса, *Биол. мембраны*, **32**, 223–234.
94. Stefanovic, M., Puchulu-Campanella, E., Kodippili, G., and Low, P.S. (2013) Oxygen regulates the band 3-ankyrin bridge in the human erythrocyte membrane, *Biochem. J.*, **449**, 143–150.
95. Ito, H., Murakami, R., Sakuma, S., Tsai, C.D., Gutschmann, T., Brandenburg, K., Poschl, J.M., Arai, F., Kaneko, M., and Tanaka, M. (2017) Mechanical diagnosis of human erythrocytes by ultra-high speed manipulation unraveled critical time window for global cytoskeletal remodeling, *Sci. Rep.*, **7**, 43134.
96. Sikora, J., Orlov, S.N., Furuya, K., and Grygorczyk, R. (2014) Hemolysis is a primary ATP-release mechanism in human erythrocytes, *Blood*, **124**, 2150–2157.
97. Luneva, O.G., Sidorenko, S.V., Ponomarchuk, O.O., Tverskoy, A.M., Cherkashin, A.A., Rodnenkov, O.V., Alekseeva, N.V., Deev, L.I., Maksimov, G.V., Grygorczyk, R., and Orlov, S.N. (2016) Deoxygenation affects composition of membrane-bound proteins in human erythrocytes, *Cell Physiol. Biochem.*, **39**, 81–88.
98. Grygorczyk, R., and Orlov, S.N. (2017) Effects of hypoxia on erythrocyte membrane properties-implications for intravascular hemolysis and purinergic control of blood flow, *Front. Physiol.*, **8**, 1110.
99. O'Neill, J.S., and Reddy, A.B. (2011) Circadian clocks in human red blood cells, *Nature*, **469**, 498–503.
100. Cho, C.S., Yoon, H.J., Kim, J.Y., Woo, H.A., and Rhee, S.G. (2014) Circadian rhythm of hyperoxidized peroxiredoxin II is determined by hemoglobin autoxidation and the 20S proteasome in red blood cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 12043–12048.
101. Латенков В.П. (1986) Суточные ритмы кислотно-щелочного баланса и газового состава крови, *Бюлл. экп. биол. мед.*, **101**, 614–616.
102. Klei, T.R., Meinderts, S.M., van den Berg, T.K., and van Bruggen, R. (2017) From the cradle to the grave: the role of macrophages in erythropoiesis and erythrophagocytosis, *Front. Immunol.*, **8**, 73.
103. Badior, K.E., and Casey, J.R. (2018) Molecular mechanism for the red blood cell senescence clock, *IUBMB Life*, **70**, 32–40.

104. Waugh, S.M., and Low, P.S. (1985) Hemichrome binding to band 3: nucleation of Heinz bodies on the erythrocyte membrane, *Biochemistry*, **24**, 34–39.
105. McPherson, R.A., Sawyer, W.H., and Tilley, L. (1992) Rotational diffusion of the erythrocyte integral membrane protein band 3: effect of hemichrome binding, *Biochemistry*, **31**, 512–518.
106. Bosman, G.J. (2016) The proteome of the red blood cell: an auspicious source of new insights into membrane-centered regulation of homeostasis, *Proteomes*, **4**, E35.
107. Arashiki, N., Kimata, N., Manno, S., Mohandas, N., and Takakuwa, Y. (2013) Membrane peroxidation and methemoglobin formation are both necessary for band 3 clustering: mechanistic insights into human erythrocyte senescence, *Biochemistry*, **52**, 5760–5769.
108. Briglia, M., Rossi, M.A., and Faggio, C. (2017) Eryptosis: ally or enemy, *Curr. Med. Chem.*, **24**, 937–942.
109. Pantaleo, A., Ferru, E., Pau, M.C., Khadjavi, A., Mandili, G., Matte, A., Spano, A., De Franceschi, L., Pippia, P., and Turrini, F. (2016) Band 3 erythrocyte membrane protein acts as redox stress sensor leading to its phosphorylation by p<sup>72</sup> Syk, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 6051093.
110. Ferru, E., Pantaleo, A., Carta, F., Mannu, F., Khadjavi, A., Gallo, V., Ronzoni, L., Graziadei, G., Cappellini, M.D., and Turrini, F. (2014) Thalassaemic erythrocytes release microparticles loaded with hemichromes by redox activation of p72Syk kinase, *Haematologica*, **99**, 570–578.
111. Ferru, E., Giger, K., Pantaleo, A., Campanella, E., Grey, J., Ritchie, K., Vono, R., Turrini, F., and Low, P.S. (2011) Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3, *Blood*, **117**, 5998–6006.
112. Голубчиков О.А., Березин Б.Д. (1986) Прикладные аспекты порфиринов, *Усп. химии*, **55**, 1361–1389.
113. Maples, K.R., Eyer, P., and Mason, R.P. (1990) Aniline-, phenylhydroxylamine-, nitrosobenzene-, and nitrobenzene-induced hemoglobin thiyl free radical formation *in vivo* and *in vitro*, *Mol. Pharmacol.*, **37**, 311–318.
114. Jia, Y., Buehler, P.W., Boykins, R.A., Venable, R.M., and Alayash, A.I. (2007) Structural basis of peroxide-mediated changes in human hemoglobin: a novel oxidative pathway, *J. Biol. Chem.*, **282**, 4894–4907.
115. Vállelian, F., Pimenova, T., Pereira, C.P., Abraham, B., Mikolajczyk, M.G., Schoedon, G., Schoedon, G., Zenobi, R., Alayash, A.I., Buehler, P.W., and Schaer, D.J. (2008) The reaction of hydrogen peroxide with hemoglobin induces extensive alpha-globin crosslinking and impairs the interaction of hemoglobin with endogenous scavenger pathways, *Free Radic. Biol. Med.*, **45**, 1150–1158.
116. Umbreit, J. (2007) Methemoglobin – it's not just blue: a concise review, *Am. J. Hematol.*, **82**, 134–144.
117. Silkstone, G.G., Silkstone, R.S., Wilson, M.T., Simons, M., Bulow, L., Kallberg, K., Ratanasopa, K., Ronda, L., Mozzarelli, A., Reeder, B.J., and Cooper, C.E. (2016) Engineering tyrosine electron transfer pathways decreases oxidative toxicity in hemoglobin: implications for blood substitute design, *Biochem. J.*, **473**, 3371–3383.
118. Widmer, C.C., Pereira, C.P., Gehrig, P., Vállelian, F., Schoedon, G., Buehler, P.W., and Schaer, D.J. (2010) Hemoglobin can attenuate hydrogen peroxide-induced oxidative stress by acting as an antioxidative peroxidase, *Antioxid. Redox. Signal.*, **12**, 185–198.
119. Grigorieva, D.V., Gorudko, I.V., Sokolov, A.V., Kosmachevskaya, O.V., Topunov, A.F., Buko, I.V., Konstantinova, E.E., Cherenkevich, S.N., and Panasenkov, O.N. (2013) Measurement of plasma hemoglobin peroxidase activity, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **155**, 118–121.
120. Huang, L., Wojciechowski, G., and Ortiz de Montellano, P.R. (2006) Role of heme-protein covalent bonds in mammalian peroxidases: protection of the heme by a single engineered heme-protein link in horseradish peroxidase, *J. Biol. Chem.*, **281**, 18983–18988.
121. Grutzner, A., Garcia-Manyes, S., Kotter, S., Badilla, C.L., Fernandez, J.M., and Linke, W.A. (2009) Modulation of titin-based stiffness by disulfide bonding in the cardiac titin N2-B unique sequence, *Biophys. J.*, **97**, 825–834.
122. Golly, I., and Hlavica, P. (1983) The role of hemoglobin in the N-oxidation of 4-chloroaniline, *Biochim. Biophys. Acta*, **760**, 69–76.
123. Miyazaki, K., Arai, S., Iwamoto, T., Takasaki, M., and Tomoda, A. (2004) Metabolism of pyrogallol to purpurogallin by human erythrocytic hemoglobin, *Tohoku J. Exp. Med.*, **203**, 319–330.
124. George, P., and Irvine, D.H. (1951) Reaction of methmyoglobin with hydrogen peroxide, *Nature*, **168**, 164–165.
125. Schaer, D.J., Buehler, P.W., Alayash, A.I., Belcher, J.D., and Vercellotti, G.M. (2013) Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins, *Blood*, **121**, 1276–1284.
126. Nagakubo, T., Kumano, T., Hashimoto, Y., and Kobayashi, M. (2018) Hemoglobin catalyzes CoA degradation and thiol addition to flavonoids, *Sci. Rep.*, **8**, 1282.
127. Elbaum, D., and Nagel, R.L. (1981) Esterase activity of hemoglobin. Differences between HB A and HB S, *J. Biol. Chem.*, **256**, 2280–2283.
128. Kuhn, H., Gotze, R., Schewe, T., and Rapoport, S.M. (1981) Quasi-lipoxygenase activity of haemoglobin. A model for lipoxygenases, *Eur. J. Biochem.*, **120**, 161–168.
129. Rother, R.P., Bell, L., Hillmen, P., and Gladwin, M.T. (2005) The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease, *J. Am. Med. Ass.*, **293**, 1653–1662.
130. Schaer, C.A., Deuel, J.W., Bittermann, A.G., Rubio, I.G., Schoedon, G., Spahn, D.R., Wepf, R.A., Vállelian, F., and Schaer, D.J. (2013) Mechanisms of haptoglobin protection against hemoglobin peroxidation triggered endothelial damage, *Cell Death Differ.*, **20**, 1569–1579.
131. Reiter, C.D., Wang, X., Tanus-Santos, J.E., Hogg, N., Cannon, R.O., Schechter, A.N., and Gladwin, M.T. (2002) Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease, *Nat. Med.*, **8**, 1383–1289.
132. Grinshtein, N., Bamm, V.V., Tsemakhovich, V.A., and Shaklai, N. (2003) Mechanism of low-density lipoprotein oxidation by hemoglobin-derived iron, *Biochemistry*, **42**, 6977–6985.
133. Cooper, C.E., Schaer, D.J., Buehler, P.W., Wilson, M.T., Reeder, B.J., Silkstone, G., Svistunenko, D.A., Bulow, L., and Alayash, A.I. (2012) Haptoglobin binding stabilizes hemoglobin ferryl iron and the globin radical on tyrosine beta145, *Antioxid. Redox. Signal.*, **18**, 2264–2273.
134. Kapralov, A., Vlasova, I.I., Feng, W., Maeda, A., Walson, K., Tyurin, V.A., Huang, Z., Aneja, R.K., Carcillo, J., Bayar, H., and Kagan, V.E. (2009) Peroxidase activity of hemoglobin-haptoglobin complexes. Covalent aggregation and oxidative stress in plasma and macrophages, *J. Biol. Chem.*, **284**, 30395–30407.
135. Choi, A.M., and Alam, J. (1996) Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury, *J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **15**, 9–19.
136. Bianchetti, C.M., Yi L., Ragsdale, S.W., and Philips, G.N.Jr. (2007) Comparison of apo- and heme-bound crystal structures of a truncated human heme oxygenase-2, *J. Biol. Chem.*, **282**, 37624–37631.
137. Rytter, S.W., and Tyrrell, R.M. (2000) The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity: heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties, *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 289–309.

138. Wagener, F.A., Volk, H.D., Willis, D., Abraham, N.G., Soares, M.P., Adema, G.J., and Figdor, C.G. (2003) Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation, *Pharmacol. Rev.*, **55**, 551–571.
139. Shimizu, T., Huang, D., Yan, F., Stranova, M., Bartosova, M., Fojtikova, V., and Martinkova, M. (2015) Gaseous O<sub>2</sub>, NO, and CO in signal transduction: structure and function relationships of heme-based gas sensors and heme-redox sensors, *Chem. Rev.*, **115**, 6491–6533.
140. Stec, D.E., Drummond, H.A., and Vera, T. (2008) Role of carbon monoxide in blood pressure regulation, *Hypertension*, **51**, 597–604.
141. Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N., and Ames, B.N. (1987) Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance, *Science*, **235**, 1043–1046.
142. Baranano, D.E., Rao, M., Ferris, C.D., and Snyder, S.H. (2002) Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16093–16098.
143. Fondevila, C., Shen, X.D., Tsuchiyashi, S., Yamashita, K., Csizmadia, E., Lassman, C., Busuttill, R.W., Kupiec-Weglinski, J.W., and Bach, F.H. (2004) Biliverdin therapy protects rat livers from ischemia and reperfusion injury, *Hepatology*, **40**, 1333–1341.
144. Spetzler, V., Goldaracena, N., Kathis, J.M., Marquez, M., Selzner, M., and Selzner, N. (2017) Elevated preoperative serum bilirubin improves reperfusion injury and survival postliver transplantation, *Transplant. Direct*, **3**, e187.
145. Li, J.J., Zou, Z.Y., Liu, J., Xiong, L.L., Jiang, H.Y., Wang, T.H., and Shao, J.L. (2017) Biliverdin administration ameliorates cerebral ischemia reperfusion injury in rats and is associated with proinflammatory factor downregulation, *Exp. Ther. Med.*, **14**, 671–679.
146. Potor, L., Nagy, P., Mehes, G., Hendrik, Z., Jeney, V., Petho, D., Vasas, A., Palinkas, Z., Balogh, E., Gyetvai, A., Whiteman, M., Torregrossa, R., Wood, M.E., Olvaszto, S., Nagy, P., Balla, G., and Balla, J. (2018) Hydrogen sulfide abrogates hemoglobin-lipid interaction in atherosclerotic lesion, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2018, 3812568.
147. Korovila, I., Hugo, M., Castro, J.P., Weber, D., Hohn, A., Grune, T., and Jung, T. (2017) Proteostasis, oxidative stress and aging, *Redox Biol.*, **13**, 550–567.
148. Otterbein, L.E., Soares, M.P., Yamashita, K., and Bach, F.H. (2003) Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme, *Trends Immunol.*, **24**, 449–455.
149. Konrad, F.M., Zwergel, C., Ngamsri, K.C., and Reutershan, J. (2017) Anti-inflammatory effects of heme oxygenase-1 depend on adenosine A2A- and A2B-receptor signaling in acute pulmonary inflammation, *Front. Immunol.*, **8**, 1874.
150. Guarda, C.C.D., Santiago, R.P., Fiuza, L.M., Aleluia, M.M., Ferreira, J.R.D., Figueiredo, C.V.B., Yahouedehou, S.C.M.A., Oliveira, R.M., Lyra, I.M., and Goncalves, M.S. (2017) Heme-mediated cell activation: the inflammatory puzzle of sickle cell anemia, *Expert. Rev. Hematol.*, **10**, 533–541.
151. Righy, C., Turon, R., Freitas, G., Japiassu, A.M., Faria Neto, H.C.C., Bozza, M., Oliveira, M.F., and Bozza, F.A. (2018) Hemoglobin metabolism by-products are associated with an inflammatory response in patients with hemorrhagic stroke, *Rev. Bras. Ter. Intensiva*, **30**, 21–27.
152. Merle, N.S., Grunenwald, A., Figueres, M.L., Chauvet, S., Daugan, M., Knockaert, S., Robe-Rybikine, T., Noe, R., May, O., Frimat, M., Brinkman, N., Gentinetta, T., Miescher, S., Houillier, P., Legros, V., Gonnet, F., Blanc-Brude, O.P., Rabant, M., Daniel, R., Dimitrov, J.D., and Roumenina, L.T. (2018) Characterization of renal injury and inflammation in an experimental model of intravascular hemolysis, *Front. Immunol.*, **9**, 179.
153. Dutra, F.F., and Bozza, M.T. (2014) Heme on innate immunity and inflammation, *Front. Pharmacol.*, **5**, 115.
154. Shayeghi, M., Latunde-Dada, G.O., Oakhill, J.S., Laf-tah, A.H., Takeuchi, K., Halliday, N., Khan, Y., Warley, A., McCann, F.E., Hider, R.C., Frazer, D.M., Anderson, G.J., Vulpe, C.D., Simpson, R.J., and McKie, A.T. (2005) Identification of an intestinal heme transporter, *Cell*, **122**, 789–801.
155. Figueiredo, R.T., Fernandez, P.L., Mourao-Sa, D.S., Porto, B.N., Dutra, F.F., Alves, L.S., Oliveira, M.F., Oliveira, P.L., Graca-Souza, A.V., and Bozza, M.T. (2007) Characterization of heme as activator of Toll-like receptor, *J. Biol. Chem.*, **282**, 20221–20229.
156. Lin, T., Kwak, Y.H., Sammy, F., He, P., Thundivalappil, S., Su, G., Chao, W., and Shaw, H. (2010) Warren synergistic inflammation is induced by blood degradation products with microbial Toll-like receptor agonists and is blocked by hemopexin, *J. Infect. Dis.*, **202**, 624–632.
157. Belcher, J.D., Chen, C., Nguyen, J., Milbauer, L., Abdulla, F., Alayash, A.I., Smith, A., Nath, K.A., Heibel, R.P., and Vercellotti, G.M. (2014) Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease, *Blood*, **123**, 377–390.
158. Horrigan, F.T., Heinemann, S.H., and Hoshi, T. (2005) Heme regulates allosteric activation of the Slo1 BK channel, *J. Gen. Physiol.*, **126**, 7–21.
159. Milto, I.V., Suhodolo, I.V., Klimenteva, T.K., and Prokopieva, V.D. (2016) Molecular and cellular bases of iron metabolism in humans, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 549–564.
160. Lang, E., Bissinger, R., Qadri, S.M., and Lang, F. (2017) Suicidal death of erythrocytes in cancer and its chemotherapy: a potential target in the treatment of tumor-associated anemia, *Int. J. Cancer*, **141**, 1522–1528.
161. Кривенцев Ю.А., Никулина Д.М. (2018) *Биохимия: строение и роль белков гемоглобинового профиля*, Юрайт, Москва, 73 с.
162. Lane, N. (2002) *Oxygen: the molecule that made the world*, Oxford Univ. Press, Oxford, UK.
163. Brantl, V., Gramsch, C., Lottspeich, F., Mertz, R., Jaeger, K.H., and Herz, A. (1986) Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins, *Eur. J. Pharmacol.*, **125**, 309–310.
164. Gomes, I., Dale, C.S., Casten, K., Geigner, M.A., Gozzo, F.C., Ferro, E.S., Heimann, A.S., and Devi, L.A. (2010) Hemoglobin-derived peptides as novel type of bioactive signaling molecules, *AAPS J.*, **12**, 658–669.
165. Heimann, A.S., Gomes, I., Dale, C.S., Pagano, R.L., Gupta, A., de Souza, L.L., Luchessi, A.D., Castro, L.M., Giorgi, R., Rioli, V., Ferro, E.S., and Devi, L.A. (2007) Hemopressin is an inverse agonist of CB1 cannabinoid receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 20588–20593.
166. Nyberg, F., Sanderson, K., and Glamsta, E.L. (1997) The hemorphins: a new class of opioid peptides derived from the blood protein hemoglobin, *Biopolymers*, **43**, 147–516.
167. Moeller, I., Albiston, A.L., Lew, R.A., Mendelsohn, F.A., and Chai, S.Y. (1999) A globin fragment, LVV-hemorphin-7, induces [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation in a neuronal cell line via the AT<sub>4</sub> receptor, *J. Neurochem.*, **73**, 301–308.
168. Cejka, J., Zelezna, B., Velek, J., Zicha, J., and Kunes, J. (2004) LVV-hemorphin-7 lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats: radiotelemetry study, *Physiol. Res.*, **53**, 603–607.
169. Fruitier-Arnaudin, I., Cohen, M., Bordenave, S., Sannier, F., and Piot, J.M. (2002) Comparative effects of angiotensin IV and two hemorphins on angiotensin-converting enzyme activity, *Peptides*, **23**, 1465–1470.
170. Collinder, E., Nyberg, F., Sanderson-Nydahl, K., Gottlieb-Vedi, M., and Lindholm, A. (2005) The opioid haemorphin-7 in horses during low-speed and high-speed treadmill exercise to fatigue, *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.*, **52**, 162–165.

171. Lee, J., Albiston, A.L., Allen, A.M., Mendelsohn, F.A., Ping, S.E., Barrett, G.L., Murphy, M., Morris, M.J., McDowall, S.G., and Chai, S.Y. (2004) Effect of I.C.V. injection of AT4 receptor ligands, NLE1-angiotensin IV and LVV-hemorphin 7, on spatial learning in rats, *Neuroscience*, **124**, 341–349.
172. Шамова Е.В., Бичан О.Д., Дрозд Е.С., Горудко И.В., Чижик С.А., Шумаев К.Б., Черенкевич С.Н., Ванин А.Ф. (2011) Регуляция функциональных и механических свойств тромбоцитов и эритроцитов донорами монооксида азота, *Биофизика*, **56**, 265–271.
173. Мартусевич А.К., Соловьева А.Г., Перетягин С.П., Давыдюк А.В. (2014) Влияние динитрозильных комплексов железа на метаболические параметры крови животных с экспериментальной термической травмой, *Биофизика*, **59**, 1173–1179.
174. Bryszewska, M. (1988) Interaction of normal and glycated human haemoglobin with erythrocyte membranes from normal and diabetic individuals, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **26**, 809–813.
175. Nasybullina, E.I., Nikitaev, V.G., Pronichev, A.N., Blindar, V.N., Kosmachevskaya, O.V., and Topunov, A.F. (2015) Expert diagnostic system for hemoglobinopathies using the data on blood, erythrocyte, and hemoglobin state, *Bulletin of the Lebedev Physics Institute*, **42**, 206–208.
176. De Henau, S., and Braeckman, B.P. (2016) Globin-based redox signaling, *Worm*, **5**, e1184390.
177. Burr, A.H., Hunt, P., Wagar, D.R., Dewilde, S., Blaxter, M.L., Vanfleteren, J.R., and Moens, L. (2000) A hemoglobin with an optical function, *J. Biol. Chem.*, **275**, 4810–4815.
178. Brooks, J. (1937) The action of nitrite on haemoglobin in the absence of oxygen, *Proc. Royal Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci.*, **123**, 368–382.
179. Gladwin, M.T. (2004) Haldane, hot dogs, halitosis, and hypoxic vasodilation: the emerging biology of the nitrite anion, *J. Clin. Invest.*, **113**, 19–21.

## ALTERNATE AND ADDITIONAL FUNCTIONS OF THE ERYTHROCYTE HEMOGLOBIN

O. V. Kosmachevskaya and A. F. Topunov\*

*Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology,  
Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia;  
E-mail: aftopunov@yandex.ru*

Received April 24, 2018

Revision received July 24, 2018

Accepted July 24, 2018

The review considers pleiotropic effects of erythrocytic hemoglobin (Hb) and their significance for human health. Hemoglobin is mostly known as an oxygen carrier, but its biochemical functions are not limited to this. The following aspects of Hb functioning are examined: 1) catalytic function conditioned by the heme component (nitrite reductase, NO dioxygenase, monooxygenase, alkyl hydroperoxidase) and by the protein one (esterase, lipoxigenase); 2) participation in nitric oxide metabolism; 3) formation of the membrane-bound form and its role in regulation of erythrocyte metabolism; 4) physiological functions of Hb catabolism products (iron, CO, bilirubin, peptides). Special attention is paid to the Hb participation in signal transduction inside erythrocyte. The interconnections between various metabolic erythrocyte processes involving Hb are considered: oxygen conditions, ATP formation, pH regulation, redox balance and the cytoskeleton state. Hemoglobin polyfunctionality can be regarded as an expression of the principle of biochemical economy.

**Keywords:** hemoglobin, erythrocytes, membrane-bound hemoglobin, nitric oxide, capillary blood flow, peroxidase activity, heme