



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



МНОЖЕСТВЕННЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ФОРМЫ ГЕМОГЛОБИНА В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА: СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД И ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Топунов А.Ф., Космачевская О.В.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук. Ленинский пр., 33, строение 2, Москва, 119071, Россия
e-mail: aftopunov@yandex.ru

Резюме

Рассматриваются основные функциональные формы эритроцитарного гемоглобина, обнаруживаемые в организме человека, в том числе окисленный гемоглобин и формы, возникающие при действии реакционно активных соединений в условиях окислительного, нитрозативного и карбонильного стрессов. Особое внимание уделено формам гемоглобина, которые до сих пор мало используются в медицинской практике (например, мембраносвязанный гемоглобин). Объясняется необходимость и возможность их практического применения в диагностике, в том числе в компьютерных диагностических системах.

Ключевые слова: гемоглобин, множественные формы, активные формы кислорода и азота, гликозилирование, метгемоглобин, мембраносвязанный гемоглобин.

Цитирование: Топунов А.Ф., Космачевская О.В. Множественные функциональные формы гемоглобина в организме человека: современный взгляд и практическое использование. *Биомика*. 2018. Т.10(3). С.251-267. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-34

THE MULTIPLICITY OF HEMOGLOBIN FUNCTIONAL FORMS IN HUMAN ORGANISM: THE MODERN VIEW AND PRACTICAL APPLICATIONS

Topunov A.F., Kosmachevskaya O.V.

Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences. Leninsky prospekt, 33, build. 2, Moscow, 119071, Russia, e-mail: aftopunov@yandex.ru

Resume

The main functional forms of erythrocytic hemoglobin found in human organism are considered. Among them are oxidized hemoglobin, and forms appearing under the action of reactive compounds at oxidative, nitrosative and carbonyl stress conditions. The special attention is paid to hemoglobin forms, which are still little used in medical practice (*e.g.*, membrane-bound one). The necessity and possibility of their use in diagnostics is explaining, *i.e.* in computer diagnostic systems.

Keywords: hemoglobin, multiply forms, reactive oxygen and nitrogen species, glycosylation, methemoglobin, membrane-bound hemoglobin

Citation: Topunov A.F., Kosmachevskaya O.V. The multiplicity of hemoglobin functional forms in human organism: the modern view and practical applications. *Biomics*. 2018. V.10(3). P.251-267. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-34

Введение

Для диагностики многих болезней чрезвычайно информативными являются данные о состоянии гемоглобина и содержащих его эритроцитов, поскольку очень многие факторы способны влиять на это состояние, в том числе и вызывать нарушения в области гематологии. Среди гематологических заболеваний выделяют гемоглобинопатии (гемоглинозы), к которым относят патологические состояния, обусловленные нарушением нормальной структуры и функционирования гемоглобина (Hb). Для выявления подобных заболеваний необходимо иметь информацию о гемоглобинах, синтезирующихся и функционирующих в организме человека, в том числе их модифицированные формы, возникающие в условиях окислительного, нитрозативного и карбонильного стрессов и при действии ряда токсических соединений.

Гемоглобин – гемопротеид, состоящий из простетической группы гема и белковой части (определенным образом упакованных аминокислотных последовательностей). Нормальный эритроцитарный гемоглобин – тетрамер, состоящий из 4-х субъединиц, двух α - и двух β -типа (рис. 1).

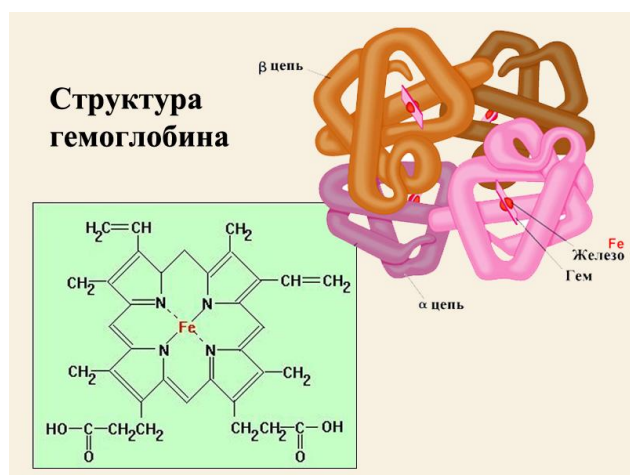


Рис. 1. Структура эритроцитарного гемоглобина и железосодержащего гема

Fig. 1. Structure of erythrocyte hemoglobin and iron-containing heme

В зависимости от природы факторов, вызывающих нарушение нативной структуры гемоглобина, выделяют наследственные и приобретенные гемоглинопатии. Наследственные обусловлены мутациями в генах, кодирующих белковые цепи Hb, наиболее известной является серповидно-клеточная анемия [Perutz et al., 1951; Ingram, 1956]. В настоящее время известно несколько сотен аномальных гемоглобинов, однако не все они приводят к клиническим проявлениям

[Космачевская, Топунов, 2009]. Приобретенные гемоглинопатии связаны с действием различных химических агентов (модификаторов) на гемоглобин. Изменения структуры гемоглобина могут приводить к нарушению кислород-переносящей функции и стабильности эритроцитов, а также затрудняют их прохождение по микрососудам. В результате это может привести к гемолитической анемии и местной ишемии тканей.

Патогенез гемоглинопатий обусловлен существованием множественных связей между структурой Hb и свойствами эритроцита (форма, объем, деформируемость, агрегация), что сказывается на реологических свойствах крови и гемолитической устойчивости эритроцитарных клеток. Диагностика гемоглинопатий требует использования различных современных микроскопических, биохимических, физико-химических и молекулярно-генетических методов, то есть является результатом комплекса междисциплинарных исследований. В практику клинических лабораторий введены методы анализа различных показателей, отражающих свойства гемоглобина, эритроцитов и крови в целом. Наряду с показателями, включенными в общий анализ крови, имеются дополнительные диагностические маркеры, позволяющие получить более полную информацию о состоянии пациента. На основе анамнеза и комплексного анализа всех показателей ставится диагноз и производится выбор программы лечения.

Восстановление гемоглобина и метгемоглобинемия

Отметим, что гемоглины поддерживаются в физиологически активном восстановленном состоянии (с 2-х валентным железом гема) благодаря специфическим NADH- и NADPH-зависимым редуктазам [Топунов, Голубева, 1989; Топунов, Петрова, 2001; Топунов, Космачевская, 2017].

Наличие гемоглинов и редуктаз как индивидуальных белков позволяет гемоглинам выполнять две функции – доставку O_2 и защиту от NO. В случае недостаточной активности этих ферментов проявляется такое заболевание как метгемоглобинемия, когда заметная доля Hb находится в окисленном состоянии. Это заболевание может быть как наследственным, когда синтез необходимой редуктазы идет недостаточно активно, так и вызываться действием различных химических соединений [Наследственные анемии и гемоглинопатии, 1983; Топунов, Голубева, 1989; Топунов, Космачевская, 2017]. Интересно, что второй вид заболевания в англоязычной литературе традиционно называется «лекарственной» («drug») метгемоглобинемией, поскольку к нему может

приводить применение многих лекарственных препаратов.

Еще в 1920-е годы было показано, что метгемоглобин (**metHb**) отличается от нормального гемоглобина валентностью железа гема ((II) у нормального, (III) у MetHb), что явилось очень важным фактом для исследования процесса его восстановления. Была высказана гипотеза, что эритроциты больных метгемоглобиномией недостаточно способны к восстановлению MetHb, который нормально образуется в клетках. В работе Скотта и Гриффита 1959 г. было показано, что в эритроцитах больных наследственной метгемоглобиномией недостаточно активен фермент, восстанавливающий MetHb с NADH в качестве донора электронов, [Scott, Griffith 1959]. Это можно считать началом исследования

метгемоглобинредуктазы (**мет-Hb-редуктазы**), фермента, восстанавливающего окисленный гемоглобин. Важным этапом в изучении процесса ферментативного восстановления Hb явилось установление идентичности мет-Hb-редуктазы и цитохром b_5 -редуктазы. Было показано, что мет-Hb-редуктаза эритроцитов способна восстанавливать окисленный Hb⁺ при участии NADH как донора электронов и цитохрома b_5 как промежуточного переносчика электронов. Была показана идентичность NADH-мет-Hb-редуктазы эритроцитов и цитохром b_5 -редуктазы других тканей и органов [Kuma et al., 1976]. Мет-Hb-редуктаза и цитохром b_5 -редуктаза внесены в номенклатуру ферментов как один и тот же фермент под названием NADH: феррицитохром b_5 -оксидоредуктаза (К.Ф.1.6.2.2.).



Рис. 2. Места проживания групп населения с повышенным распространением наследственной метгемоглобиномии. 1 – эскимосы Аляски; 2 – индейцы-атабаски Аляски; 3 – индейцы навахо; 4 – якуты бассейна реки Вилуй.

Fig. 2. Places of residence of population groups with increased prevalence of hereditary methemoglobinemia. 1 – the Eskimos of Alaska; 2 – the Indians-Athabasca of Alaska; 3 - Navajo Indians; 4 - Yakuts of the Viluy river basin

На рис. 2 показана составленная нами карта эндемичных зон распространения наследственной метгемоглобинемии, связанной с недостаточной активностью мет-Hb-редуктазы. Этническими группами, у которых обнаружено высокое распространение этого заболевания, являются эскимосы и индейцы-атабаски Аляски, индейцы навахо и якуты бассейна реки Виллой. Все они живут в Северном полушарии, причем в районах Крайнего Севера, кроме индейцев навахо, однако и их присутствие в этом списке не случайно. Навахо и атабаски относятся к одной языковой семье (на-дене), и в места сегодняшнего проживания они переселились из Аляски и Северо-Западной Канады в 14-м веке.

В России наследственная метгемоглобинемия отмечена в виде эндемических очагов в Якутии в бассейне реки Виллой [Наследственные анемии и гемоглобинопатии, 1983]. У коренных жителей республики (якутов-саха) необычайно высокое распространение этого заболевания, её частота составляет 1:5700 человек. Накопление этого заболевания могло произойти благодаря так называемому «эффекту основателя» – популяционно-генетическому явлению, связанному с ограниченной репродуктивной численностью у предковых изолированных популяций.

Интересно, что в 1950-е годы повышенное распространение наследственной метгемоглобинемии было описано лишь у эскимосов Аляски и их соседей атабасков, поэтому не исключено, что в будущем будут описаны и другие группы с повышенным распространения наследственной метгемоглобинемии. Могут быть перспективными исследования других изолированных популяций, у которых может проявляться «эффект основателя».

Так как цитохром b_5 -редуктаза эритроцитов (мет-Hb-редуктаза) идентична цитохром b_5 -редуктазе других тканей, существует два типа недостаточности этого фермента: «эритроцитарный», когда недостаточность наблюдается только в эритроцитах, и «основной», когда она наблюдается также и в других тканях; генетические механизмы этих проявлений пока до конца не выяснены. Особо выделяется метгемоглобинемия, связанная с умственной неполноценностью больных [Mansouri, 1985]. Такое нарушение может быть связано с тем, что цитохром b_5 -редуктаза, как и цитохром b_5 , участвуют в обмене жирных кислот, и при недостаточной активности фермента происходит нарушение такого обмена, что пагубно сказывается на деятельности нервных клеток. Соответственно, возможна и метгемоглобинемия, связанная с недостатком самого цитохрома b_5 .

Интересно, что еще одна энзимопатия – дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (фабизм) является фактором риска для приобретенной метгемоглобинемии, поэтому популяции, для которых она характерна (средиземноморского и африканского происхождения), обладают повышенным риском для проявления метгемоглобинемии данного типа.

Взаимодействие гемоглобина с различными соединениями

Важным фактором, влияющим на состояние гемоглобина в организме, являются посттрансляционные модификации белка, среди которых можно отметить связывание Hb с различными химическими соединениями. Опишем некоторые известные виды таких взаимодействий, влияющих на функционирование гемоглобина и, через него, эритроцитов в организме.

Взаимодействие с оксидом азота и его производными

Гемоглобины способны взаимодействовать с активными формами кислорода и азота, то есть функционировать в условиях окислительного и нитрозативного стрессов, что важно как при патогенезе, так и при действии на организм неблагоприятных факторов. Имеется большое число публикаций, в которых показано, что первичная функция гемоглобинов, вероятно, заключалась в защите клеток от нитрозативного стресса и в модулировании сигнальной функции NO. Например, общей для основных групп известных Hb является реакция превращения NO в NO₃.

В организме животных оксид азота образуется в результате NO-синтазной реакции, при окислении L-аргинина в L-цитруллин. Поскольку для ферментативного окисления L-аргинина требуется кислород, NO-синтазный механизм ингибируется при гипоксии. В то же время, дефицит O₂ является фактором, обеспечивающим активную работу нитритредуктазных систем, связанных с Hb, Mb и электронтранспортными цепями. При гипоксии восстановление ионов NO₂⁻ в NO идет в крови и в клетках тканей с помощью дезоксигенированных гемоглобина (**deoxyHb**) и миоглобина (**deoxyMb**) соответственно.

Показано, что Mb (одно-субъединичный мышечный гемоглобин) проявляет NO-диоксигеназную активность и защищает митохондриальную цитохром c-оксидазу от инактивации оксидом азота, причем эту функцию он выполняет не только в скелетных и сердечных мышцах, где Mb много, но и в гладких мышцах, где Mb синтезируется в низких концентрациях [Qiu et al., 1998; Ascenzi, Brunori, 2001; Kreutzer, Jue, 2004; Rassaf et al., 2007]. То есть Mb может не только

генерировать NO при гипоксии благодаря нитритредуктазной активности, но и окислять его до NO_3^- при нормальной концентрации O_2 . Mb в этом случае выполняет роль сенсора кислорода, изменяя активность терминальных оксидаз, а также энергетический статус клеток сердца в ответ на понижение концентрации O_2 .

В последнее время активно разрабатывается гипотеза, что эритроцитарный Hb является одним из важнейших элементов системы метаболизма NO и его доноров внутри организма. Согласно так называемой «нитритной гипотезе», NO_2^- является потенциальным источником NO в эритроцитах, поскольку, как было описано выше, при гипоксии Hb проявляет нитритредуктазную активность, в результате которой образуется NO [Rifkind et al., 2006]. Было показано, что Hb-SNO (гемоглобин, у которого NO присоединен к остатку цистеина) оказывает сосудорасширяющее действие и усиливает кровоток в сосудах [Stamler et al., 1997]. Доля образующихся нитрозогемоглобина (HbNO) и Hb-SNO зависит от насыщения Hb кислородом. Предполагается, что при физиологических условиях деохиHb может работать как S-нитрозотиол-синтаза, используя в качестве субстрата нитрит [Angelo et al., 2006].

Особый интерес представляют модификации гемоглобина, возникающие при одновременном действии на белок и активных форм азота и активных карбонильных соединений, то есть в условиях карбонильного стресса (см. ниже). Нам удалось показать, что в этом случае возможно образование как нитрозо-, так и нитригемоглобина, причем появление той или иной модификации Hb может зависеть как от соотношения концентраций действующих агентов, так и от условий протекания реакции [Kosmachevskaya et al., 2013, 2014].

Помимо связывания NO гемоглобинами по железу гема и по $\text{cys}\beta 93$, существует еще один путь. С участием тиоловой группы цистеина $\beta 93$ могут формироваться динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) [Vanin et al., 1998; Gow et al., 1999]. Общая формула тиолсодержащих ДНКЖ — $\{(\text{RS-})_2\text{Fe}^+(\text{NO}^+)_2\}$. В нашей совместной работе с Национальным медицинским исследовательским центром кардиологии Минздрава РФ и Институтом химической физики им. Н.Н. Семенова РАН было показано, что низкомолекулярные тиолсодержащие ДНКЖ разрушаются под действием супероксида и других активных окислителей [Шумаев и др., 2006], что может объяснять малое содержание этих комплексов в организме. Также нами было показано, что Hb-ДНКЖ действуют как сайт-специфические антиоксиданты, защищающие участки белка, с которым они связаны, от окислительной модификации [Shumaev et al., 2008a,b]. Было также

показано, что ДНКЖ могут образовываться в активной биологической системе — в митохондриях сердца [Шумаев и др., 2010]. Таким образом, можно сделать вывод, что ДНКЖ могут функционировать как физиологические доноры NO, а HbNO, Hb-SNO и ДНКЖ образуют пул депонированного NO в организме.

Обобщая существующие данные о взаимодействии различных гемоглобинов с оксидом азота, можно выделить 3 основных типа реакций. Это нитритредуктазная реакция, диоксигеназная реакция [Gardner et al., 1998], при которой происходит окисление NO оксигенированным Hb с образованием NO_3^- , и денитрозилазная реакция [Hausladen et al., 2001], т.е. взаимодействие нитрозилированного Hb (включая Hb-SNO) с O_2 с образованием NO_3^- . В условиях гипоксии преимущественное протекание той или иной реакции зависит от концентраций O_2 и NO, а также от сродства Hb к этим лигандам. Диоксигеназная реакция может катализироваться как эритроцитарным HbO₂ [Gow et al., 1999], так и мышечным MbO₂ [Eich et al., 1996].

Взаимодействие с активными формами кислорода

Большое внимание уделяется взаимодействию гемоглобинов с перекисью водорода (H_2O_2) и другими активными формами кислорода, поскольку эти белки проявляют пероксидазную активность (восстанавливают различные перекиси) и могут инициировать свободнорадикальное окисление биомолекул под действием H_2O_2 [Reeder, Wilson, 2005]. Так, обнаружено, что в результате реакции оксиHb с избытком H_2O_2 происходит быстрое образование окисленного metHb, содержащего трехвалентное железо в геме и неспособного связывать и переносить кислород. MetHb также может образовываться и в результате автоокисления Hb. Дегградация metHb в присутствии H_2O_2 сопровождается высвобождением железа, взаимодействие которого с H_2O_2 приводит к генерации гидроксильного радикала $\text{OH}^\bullet$. С другой стороны, взаимодействие оксигенированного гемоглобина (oxyHb) и metHb с H_2O_2 при определенных условиях протекает через стадию образования феррил-формы $\{\text{Гем}^{++}(\text{FeIV})-\text{OH}\}$ со свободным радикалом на порфириновом кольце. Эта форма, в отличие от классических пероксидаз, нестабильна, характеризуется высокой окисляющей активностью и индуцирует реакции свободнорадикального окисления липидов. При окислении липидов образуются алкоксильные ($\text{RO}^\bullet$) и алкилпероксильные ($\text{ROO}^\bullet$) радикалы и гидроперекиси липидов (ROOH), которые также могут окислять metHb с образованием новых порций феррилгемоглобина. То есть, гемоглобины могут инициировать перекисное окисление

полиненасыщенных жирных кислот, что приводит к образованию простагландиноподобных молекул, обладающих потенциальной сосудосокращающей активностью [Reeder, Wilson, 2005]. Отметим, что для определения 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 [Григорьева и др., 2013].

При автоокислении oxyHb образуется супероксид-анион-радикал $\text{O}_2^{\cdot-}$, который при взаимодействии с NO образует пероксинитрит (ONOO^-), являющийся намного более сильным окислителем. Правда, считается, что образование ONOO^- в эритроцитах не является распространенным явлением.

Известно, что гемопротеиды являются основными мишенями действия пероксинитрита. Его взаимодействие с oxyHb и oxyMb приводит к образованию их мет-форм, повреждению порфиринового кольца (основной структурной части гема) с последующей деградацией гема, включающей окисление железа и нитрирование остатков тирозина. Нитрирование Hb приводит к изменению конформации белка, в результате чего гем выходит из гидрофобного кармана, и повышается вероятность его высвобождения и разрушения [Alayash et al., 1998]. В работе [Li et al., 2004] показано, что взаимодействие ONOO^- с гемопротеидами зависит от концентрации CO_2 , pH и температуры. Наличие CO_2 , пониженная температура и щелочная среда способствуют распаду ONOO^- .

Взаимодействие с сульфидами

Гемоглобины обладают также способностью связывать сульфиды с помощью гемовой группы. В работе [McCutcheon et al., 1960] показано, что при избыточном поступлении H_2S в организм человека, он образует комплексы с гемоглобином, что приводит к образованию сульфгемоглобина (**sulfHb**). Сульфгемоглобинемия может быть следствием приема лекарств (сульфонамидов, фенасетина, ацетанилида) [Park, Nagel, 1984] и в некоторых случаях результатом затрудненной дефекации. В нормальной крови **sulfHb** отсутствует, при патологиях его концентрация находится в диапазоне 1-10% [Discombe, 1960]. Описано и возникновение сульфгемоглобинемии у новорожденных при действии сульфида серы, выделяемого бактерией *Morganella morganii*, живущей в кишечнике [Murphy et al., 2015]. Гемоглобин человека может также связывать сульфиды по остатку Цис-93 β -цепей.

Гликозилирование гемоглобина

Очень важным видом посттрансляционной модификации гемоглобина является гликозилирование (связывание с активными карбонильными соединениями, в том числе, с сахарами). Неферментативному гликозилированию, как правило, подвергаются долгоживущие белки, такие, как гемоглобины и сывороточный альбумин [Chandalia, Krishnaswamy, 2002]. Hb был первым белком, для которого было описано существование этого процесса [Kunkel, Wallenius, 1955], а в дальнейшем было показана его взаимосвязь с диабетом [Rahbar, 1968]. Гликозилированный гемоглобин человека типа A обозначают как HbA1. Эта фракция гемоглобина не является патологической и у здоровых людей составляет 5-7% [Dolhofer et al., 1981]. В зависимости от природы сахара, связанного с гемоглобином, различают как минимум три субфракции HbA1: A1a, A1b и A1c. Например, HbA1a1 образуется в результате взаимодействия с фруктозо-1,6-дифосфатом, HbA1a2 — глюкозо-6-фосфатом, HbA1c — глюкозой [Галенок и др., 1989]. Фосфорилированные сахара, например, глюкозо-6-фосфат, присутствующий в эритроцитах, взаимодействует с гемоглобином в 20 раз быстрее, чем глюкоза [Chandalia, Krishnaswamy, 2002].

Неферментативное гликозилирование представляет собой реакцию химической конденсации белка с моносахаридом и дальнейшее превращение этого соединения. Химическая конденсация является реакцией соединения альдегидной группы глюкозы (а также многих других альдоз и кетоз) с аминогруппой аминокислоты белка, при этом образуется альдимин или Шиффово основание. Данная стадия гликозилирования обратима. В дальнейшем эта промежуточная форма гликозилированного гемоглобина подвергается перегруппировки Амадори с образованием стабильной кетоаминной формы – конечного продукта гликозилирования, который присутствует в эритроцитах до конца их жизни.

Как правило, местом гликозилирования гемоглобина является аминная группа N-концевой аминокислоты (валин) обеих β -цепей гемоглобина A (HbA1c). Есть данные, что углеводы способны присоединяться и к ϵ -аминогруппе некоторых остатков лизина как α -, так и β -цепей [Shapiro et al., 1980]. Содержание в крови неферментативно гликозилированных белков повышается при таких заболеваниях, как сахарный диабет, галактоземия, мелитургия (повышенная экскреция углеводов с мочой), атеросклероз и др. [Галенок и др., 1989], при этом содержание HbA1c является маркером нарушений углеводного обмена [Fluckiger et al., 1977]. Могут образовываться и продукты гликозилирования «пост-Амадори» с желтой или

коричневой окраской, образующейся при окислении восстанавливающих сахаров пероксидом водорода или пероксинитритом. Это может приводить к конформационным перестройкам и фрагментации белковой молекулы [Yim et al., 1995]. К продуктам «пост-Амадори» также относятся глиоксаль, метилглиоксаль и 3-дезоксиглюкозоны. Их накопление в организме приводит к так называемому «карбонильному стрессу». Отметим, что функционирование одного из самых активных карбонильных соединений – метилглиоксаля в эукариотических клетках подробно описано в обзоре [Космачевская и др., 2017].

Взаимодействие с «необычными» лигандами

Помимо способности взаимодействовать с низкомолекулярными лигандами (O_2 , CO и NO), гемоглобины могут формировать прочные комплексы и с довольно крупными молекулами, например, с гетероциклическими соединениями с атомом азота в гетероцикле, в частности, с изохинолином и никотиновой кислотой. Гемоглобины также способны образовывать комплексы и с алкилизонидами и нитрозоароматическими соединениями. Существуют данные, что комплексы с Hb могут образовывать алкильные радикалы, такие, как метильный, этильный, *n*-пропильный, *трет*-бутильный, изобутильный [Talbot et al., 1971]. Также гемоглобины могут взаимодействовать с нитрозоароматическими соединениями, например, с нитрозобензолом [Murayama, 1960] и нитрозотолуолом. Все эти соединения относят к «необычным» лигандам Hb. Взаимодействия гемоглобина с нитрозобензолом является комплексным, так как лиганд связывается не только с железом гема, но и с белком [Scheler, 1960]. Еще одной группой веществ, связывающихся с глобиновой частью Hb, являются некоторые производные пиридоксала и имидазол [Benesch, Benesch, 1981; Андреюк, Кисель, 1997]. Комплексы гемоглобинов с гетероциклическими соединениями могут образовываться как результат присутствия в окружающей среде токсичных веществ и при связывании некоторых лекарственных препаратов. Например, такие комплексы были обнаружены в крови людей, работающих на химических заводах, как результат их хронического отравления [Scheler, 1960]. Роль таких реакций до конца не выяснена, хотя в определенных условиях может оказаться очень важной.

Мембраносвязанный гемоглобин

Отдельно следует выделить мембраносвязанную форму гемоглобина (MBHb). Мембраносвязанный гемоглобин является тонким индикатором структурно-

функционального состояния эритроцитов. Несмотря на важность этой формы Hb, она до сих пор мало используется для диагностических целей. Поэтому расскажем о ней подробнее.

У ряда организмов мембраносвязанные гемоглобины описаны как основные, постоянно находящиеся в таком состоянии [Космачевская, Топунов, 2009]. Однако еще до их открытия при попытке получить тени эритроцитов гипотоническим лизисом был установлен факт связывания эритроцитарного Hb с мембранами. Первое упоминание о содержании Hb в эритроцитарных мембранах можно найти в работах Андерсона и Тёрнера, которые показали, что отмые мембраны эритроцитов содержат около 3% Hb [Anderson, Turner, 1960]. Позднее Фунг и Эйзингер в своих исследованиях подтвердили факт взаимодействия Hb с мембранами эритроцитов в физиологических условиях [Fung, 1981; Eisinger et al., 1982]. По данным Токтамысовой и Биржановой, доля ассоциированного с мембранами Hb в нативных эритроцитах в зависимости от ряда факторов может изменяться в диапазоне от 7 до 10% [Токтамысова, Биржанова, 1990], согласно другим данным – от 1,1 до 5,2% [Nash, Meiselman, 1983]. Количественное содержание гемоглобина в мембранах эритроцитов, измеренное с помощью двумерного электрофореза, составляет $17,40 \pm 0,74$ мкг на 1 мг общего белка мембран и является наименьшим, по сравнению с количественным содержанием других мембранных белков [Громов и др., 1988]. Расчеты доли мембраносвязанного Hb, сделанные разными авторами, давали чаще всего значения от 3 до 5 %, хотя иногда разброс составлял 2-7 %. Различия в данных о содержании MBHb можно объяснить использованием различных методических подходов для определения Hb в мембранах.

Взаимодействовать с мембранами Hb может разными способами. Наиболее важным является электростатическое связывание deoxyHb по цитоплазматическому домену анионтранспортного белка полосы 3 (CDB3 – Cytoplasmic Domain of Band 3 protein) [Shaklai et al., 1977; Fung, 1981; Eisinger et al., 1982; Segal et al., 2012] (рис. 3).

Можно назвать также ковалентную пришивку к мембранным компонентам дисульфидными связями и адсорбцию к мембранным липидам с помощью гидрофобных взаимодействий. Также Hb может связываться с другими белками цитоскелета: спектрином и гликофоорином. Связывание Hb с мембраной может быть обратимым и необратимым. С применением флуоресцентных зондов было показано, что Hb за счет электростатических взаимодействий обратимо с высоким сродством связывается с CDB3 [Shaklai et al., 1981; Demehin et

al., 2002]. Необратимым является ковалентное связывание Нб с компонентами мембраны вследствие действия различных окислительных агентов, вызывающих образование свободных радикалов и оксоферрильных форм гемоглобина, инициирующих процессы перекисного окисления липидов [Shaklai,

Ranney, 1978; Kriebardis et al., 2007]. Доля необратимо связанного Нб возрастает при различных формах гемоглобинопатий, как наследственных (серповидно-клеточная анемия, талассемии), так и индуцированных окислительными агентами.

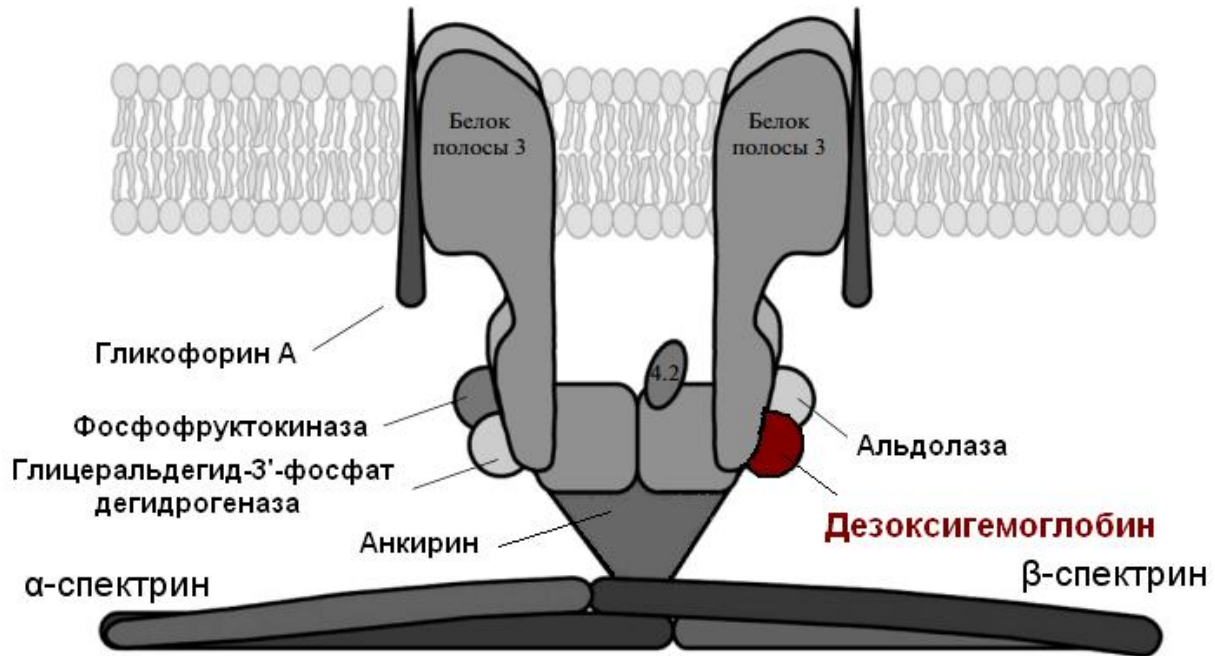


Рис. 3. Связывание гемоглобина с трансмембранным белком полосы 3 [по Лунева и др., 2015].

Fig. 3. Hemoglobin binding to the transmembrane Band 3 protein [after Luneva et al., 2015].

Обратимый характер связывания Нб с мембранами служит указанием на возможную физиологическую значимость этого процесса. Данные последних лет показывают, что связывание гемоглобина с мембранными компонентами имеет множественное биологическое значение. Это и регуляция метаболизма глюкозы и свойств цитоскелета в зависимости от концентрации кислорода, и формирование сигнала об окислительном повреждении или старении эритроцита, а также участие в сигнальном пути гипоксической вазодилатации. Перечисленные функции гемоглобин реализует при участии CDB3. Обратимое связывание Нб с мембранами может быть адаптивной реакцией, направленной на стабилизацию липидного бислоя мембран и/или регуляцию его упруго-механических свойств. Примембранным белковым слоям в настоящее время приписывают несколько функций: участие в процессах транспорта веществ, в иммунологическом поведении клеток, их адгезивных свойствах, контактном ингибировании и т.д.

Помимо основной функции, связанной с доставкой кислорода к клеткам тканей, эритроциты участвуют в регуляции капиллярного кровотока (локального внутрисосудистого давления). Локальный кровоток является фактором, определяющим регуляцию метаболизма тканей. Описаны три возможных механизма вовлечения эритроцитов в регуляцию тонуса сосудов. Это аллостерически регулируемое высвобождение NO с участием SH-групп β-субъединицы Нб (гипотеза SNO-Hb) [Jia et al., 1996; Stamler et al., 2008], восстановление нитрит-ионов deoxyHb (гипотеза нитритной вазодилатации) [Huang et al., 2005; Gladwin et al., 2006; Shiva, 2013] и стимуляция эритроцитарным ATP синтеза NO эндотелиоцитами (гипотеза высвобождения ATP) [Sprague et al., 2001; Ramdani, Langsley, 2014]. Каждый из перечисленных механизмов реализуется в условиях сниженного парциального давления кислорода (pO_2). Наряду с гипоксией выброс ATP из эритроцитов может быть вызван их механической деформацией при прохождении через капилляры, закислением среды и

избыточным количеством CO_2 в крови [Лунева и др., 2015]. Однако механизм высвобождения АТР до сих пор не понятен.

Учитывая способность гемоглобина активно участвовать в элиминации, образовании и транспорте NO и АТР, была сформулирована гипотеза, что эритроцит является не только переносчиком кислорода, но и регулятором его доставки к тканям в условиях гипоксии. В настоящее время в научную практику введен термин «эритрокринная функция», обозначающий роль эритроцитов в метаболизме сигнальных метаболитов.

Поскольку гемоглобин помимо способности к связыванию газов обладает рядом ферментативных активностей (пероксидазная, нитритредуктазная, NO-диоксигеназная и др.), то можно было предположить, что связывание Hb с мембранами переключает его функцию с транспортной на каталитическую. Так, было показано, что деохиHb, связанный с CDB3, может восстанавливать нитрит-ионы и, таким образом, быть источником NO [Salhany, 2008]. Показано, что MBHb по сравнению с цитозольным гемоглобином имеет более высокое сродство к O_2 , более низкий коэффициент Хилла и гораздо более высокую пероксидазную активность [Tsuneshige et al., 1987].

Мы полагаем, что использование данных о мембраносвязанном гемоглобине в качестве дополнительного биохимического показателя существенно расширит возможности диагностики заболеваний системы кровообращения. Оценка его уровня может быть полезна для ранней диагностики и лечения многих патологических процессов.

Однако для использования данных о MBHb в диагностике необходимо иметь удобный и точный метод его определения. В настоящее время концентрацию MBHb в эритроцитах определяют следующими методами: спектрофотометрической оценкой гемоглобина, ассоциированного с тенями эритроцитов [Токтамысова, Биржанова, 1990]; SDS-электрофорезом белков теней в ПААГ с последующей денситометрией полосы Hb [Sears, Lewis, 1980], измерением тушения гемоглобином флуоресценции зондов, встроенных в мембрану и специфически взаимодействующих с белком полосы 3 [Eisinger et al., 1982]. Количественная оценка Hb в геле является трудоемким и к тому же не очень точным методом. Измерения флуоресценции чувствительны и обеспечивают возможность детектировать низкие концентрации Hb, но для этой процедуры требуются дорогостоящие реактивы. Наиболее удобным и дешевым является спектрофотометрический способ, однако этот подход не позволяет определять низкие концентрации MBHb. Поэтому перед нами стояла задача

разработать простую, чувствительную и недорогую методику спектрофотометрической оценки содержания MBHb в эритроцитах.

Прототипами предложенного нами способа определения MBHb послужили два методических подхода. Первый — спектрофотометрическая оценка MBHb, второй — метод измерения концентрации гемоглобина в щелочном растворе пиридина [Riggs, 1981]. Суть нашей методики заключается в определении связанного с тенями эритроцитов Hb после полного гемолиза клеток. Для перевода гемоглобина в растворимую форму было предложено использовать 30%-ый щелочной раствор пиридина [Космачевская, Топунов, 2007], что позволило одновременно солиubilизировать мембраны и перевести Hb в удобную для спектрофотометрической детекции форму — пиридингемохромоген. Разработанная методика позволяет быстро и надежно определять количество MBHb в пробах крови и имеет высокую точность, позволяя обнаруживать менее 0,1% MBHb в пробе.

Разработанная методика была испытана в модельных экспериментах с суспензией эритроцитов и на цельной крови здоровых доноров и пациентов Национального медицинского исследовательского центра (НМИЦ) онкологии им. Н.Н. Блохина. Был установлен диапазон нормальных значений для MBHb: 3,3%—4,9%, соответствующей высокой гемолитической устойчивости эритроцитов. Были обнаружены сдвиг содержания MBHb у онкобольных, подвергавшихся химиотерапии, в сторону превышения диапазона нормальных значений, который можно объяснить как с позиций развития интоксикации, вызванной приемом противоопухолевых препаратов, так и с позиций развития адаптации к анемии, сопровождающей болезнь.

Интересно, что ферменты, восстанавливающие гемоглобин (мет-Hb-редуктазы), тоже могут быть двух видов, растворимыми и мембраносвязанными [Топунов, Голубева, 1989], причем их соотношение различно в эритроцитах разных животных. Как правило, растворимая редуктаза является NADH-, а мембраносвязанная — NADPH-зависимой.

Заключение

Из всего описанного выше видно, что в организме человека, как и у многих животных, можно обнаружить множественные продукты различных посттрансляционных модификаций гемоглобина (для описания таких белков в последнее время стал употребляться термин «протеоформы» [Lisitsa et al., 2014]). Отметим также, что к настоящему времени известно 12 генов, кодирующих различные гемоглобины в организме человека, часть которых функционируют постоянно, а другие

сменяют друг друга в процессе индивидуального развития. В связи с этим нами был предложен термин «ГемоглобинОм», объединяющий все формы гемоглобинов, существующие в организме [Топунов и др., 2013].

Эритроциты несут информацию не только о физико-химических сдвигах в системе крови, но и о функциональном состоянии организма как единого целого и степени его адаптации. Они являются высокочувствительными датчиками метаболического состояния системы крови, способными воспринимать и аккумулировать повреждения, поскольку время их жизни составляет 120 ± 20 дней. Наиболее удобными индикаторами, отражающими функциональное состояние эритроцита, являются показатели, связанные с гемоглобином. Например, стандартный клинический анализ крови включает такие показатели как концентрация Hb, гематокрит, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроците. При необходимости проводят измерение окисленного metHb и гликозилированного HbA_{1c}, коррелирующие с уровнем метгемоглобинемии и гликемии.

Данные о различных функциональных и множественных формах гемоглобина могут быть использованы и в компьютерной диагностике. Нами ведется разработка компьютерной экспертной системы диагностики анемий и гемоглобинопатий с использованием различных гематологических показателей. Работа по созданию экспертной системы «BLOOD» проводится совместно с кафедрой компьютерных медицинских систем Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ» и клинко-диагностической лабораторией НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина [Насыбуллина и др., 2015]. Предложена пилотная версия системы. По результатам проведенных экспериментов с использованием данных анализов пациентов НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина можно утверждать, что система в полной мере реализует все заявленные функции и верно определяет диагноз.

В усовершенствованной диагностической экспертной системе «BLOOD», работа над которой продолжается в настоящее время, будет использован расширенный перечень показателей, связанных с гемоглобином и характеризующих исследуемую объектную среду. К количественным характеристикам объекта будут относиться значения концентраций билирубина, внеклеточного Hb и др. в плазме крови, количество эритроцитов, ширина эритроцитометрической кривой и др., содержание общего гемоглобина, окисленного гемоглобина, различных модифицированных форм (карбоксиHb,

sulfHb, нитриHb, гликированный Hb и др.). Для различения ряда заболеваний будут учитываться концентрации ферритина и железа в сыворотке крови, свободного гемоглобина в плазме крови и число ретикулоцитов. Мы также подчеркиваем важность использования такого показателя, как доля metHb. В дополнение к стандартным количественным характеристикам, мы считаем необходимым ввести в клиническую практику еще одну диагностическую характеристику – количество мембраносвязанного гемоглобина.

Разрабатываемая система выступает в качестве инструмента поддержки принятия решений врачом при диагностике данных заболеваний. Предполагаются реализация и апробация предложенных в работе алгоритмов и методик в виде автоматизированного программно-информационного диагностического комплекса в сфере здравоохранения, а также для обучения и повышения квалификации медицинского персонала.

Литература

1. Андреюк Г.М., Кисель М.А. Образование гемихрома при взаимодействии гемоглобина с полярными производными фосфатидилхолина. *Биоорганическая химия*. 1997. Т. 23(4). С. 290-293.
2. Галенок В.А., Боднар П.Н., Диккер В.Е., Ромашкан С.В. Гликозилированные протеины. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние. 1989. 258 с.
3. Григорьева Д.В., Горудко И.В., Соколов А.В., Космачевская О.В., Топунов А.Ф., Буко И.В., Константинова Е.Э., Черенкевич С.Н., Панасенко О.М. Определение пероксидазной активности гемоглобина в плазме крови. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013. Т. 155(1). С. 129-132.
4. Громов П.С., Захаров С.Ф., Шишкин С.С., Ильинский Р.В. Двумерная карта мембранных белков эритроцитов человека. *Биохимия*. 1988. Т. 53(8). С. 1316-1326.
5. Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Метод определения содержания гемоглобинподобных белков в гетерогенных смесях. *Прикл. биохимия и микробиология*. 2007. Т. 43(3). С. 347-353.
6. Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Гемоглобины – разнообразие структур и функций. *Прикл. биохимия и микробиология*. 2009. Т. 45(6). С. 627-653.
7. Космачевская О.В., Шумаев К.Б., Топунов А.Ф. Сигнальное и регуляторное действие метилглиоксала в эукариотических клетках. *Прикл. биохимия и микробиология*. 2017. Т. 53(3). С. 253-270.
8. Лунева О.Г., Сидоренко С.В., Максимов Г.В., Григорчик Р., Орлов С.Н. Эритроциты как регуляторы сосудистого тонуса. *Биологические мембраны*. 2015. Т. 32(4). С. 223-234.

9. Наследственные анемии и гемоглобинопатии. (Ред.: Токарев Ю.Н., Холлан С.Р., Корраля-Альмонте Х.С.) М.: Медицина. 1983. 336 с.
10. Насыбуллина Э.И., Никитаев В.Г., Проничев А.И., Блиндарь В.Н., Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Экспертная система диагностики гемоглобинопатий с использованием данных о состоянии крови, эритроцитов и гемоглобина. *Краткие сообщения по физике*. 2015. Т. 42(7). С. 22-27.
11. Токтамысова З.С., Биржанова Н.Х. О мембраносвязанном гемоглобине. *Биофизика*. 1990. Т. 35(6). С. 1019-1020.
12. Топунов А.Ф., Голубева Л.И. Редуктазы, восстанавливающие кислородпереносящие гемопротеиды: гемоглобин, миоглобин и левоглобин. *Успехи биологической химии*. 1989. Т. 30. С. 239-252.
13. Топунов А.Ф., Космачевская О.В. Ферментативное восстановление гемоглобина и метгемоглобинемия. *Материалы Сухумской международной научно-практической конференции: 90 лет НИИЭПуТ АНА «Актуальные вопросы экспериментальной биологии и медицины.» 20-22 сентября 2017 г., Сухум, Абхазия*. С. 413-421.
14. Топунов А.Ф., Космачевская О.В., Шумаев К.Б. ГемоглобинОм – набор всех гемоглобинов организма. *Труды XXI международной конференции и дискуссионного научного клуба «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии»*. Украина, Крым, Ялта-Гурзуф, с 05 по 15 июня 2013 года. С. 150-152.
15. Топунов А.Ф., Петрова Н.Э. Гемоглобины: эволюция, распространение и гетерогенность. *Успехи биологической химии*. 2001. Т. 41. С. 199-228.
16. Шумаев К.Б., Губкин А.А., Губкина С.А., Гудков Л.Л., Свириева И.В., Тимошин А.А., Топунов А.Ф., Ванин А.Ф., Рууге Э.К. Взаимодействие динитрозильных комплексов железа с интермедиатами окислительного стресса. *Биофизика*. 2006. Т. 51(3). С. 423-428.
17. Шумаев К.Б., Свириева И.В., Губкина С.А., Кривова Т.С., Топунов А.Ф., Ванин А.Ф., Рууге Э.К. Образование динитрозильных комплексов железа в митохондриях сердца. *Биофизика*. 2010. Т. 55(3). С. 460-466.
18. Alayash A.I., Ryan B.A., Cashon R.E. Peroxynitrite-mediated heme oxidation and protein modification of native and chemically modified hemoglobins. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998. V. 349(1). P. 65-73. DOI: 10.1006/abbi.1997.0449
19. Anderson H.M., Turner J.C. Relation of hemoglobin to the red cell membrane. *J. Clin. Invest.* 1960. V. 39(1). P. 1-7. DOI: 10.1172/JCI104007
20. Angelo M., Singel D., Stamler J. An S-nitrosothiol (SNO) synthase function of hemoglobin that utilizes nitrite as a substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103(22). P. 8366-8371. DOI: 10.1073/pnas.0600942103
21. Ascenzi P., Brunori M. Myoglobin: a pseudo-enzymatic scavenger of nitric oxide. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2001. V. 29(5). P. 183-185. DOI: 10.1016/S1470-8175(01)00082-0
22. Benesch B.R., Benesch R.E. Preparation and properties of hemoglobin modified with derivatives of pyridoxal. *Methods in Enzymology*. 1981. V. 76. P. 147-159. DOI: 10.1016/0076-6879(81)76123-8
23. Chandalia H.B., Krishnaswamy P.R. Glycated hemoglobin. *Current Science*. 2002. V. 83(12). P. 1522-1532.
24. Demehin A.A., Abugo O.O., Jayakumar J.R., Rifkind J.M. Binding of hemoglobin to red cell membranes with eosin-5-maleimide-Labeled Band 3: analysis of centrifugation and fluorescence data. *Biochemistry*. 2002. V. 41(27). P. 8630-8637. DOI: 10.1021/bi012007e
25. Discombe G. Sulphaemoglobinaemia and glutathione. *Lancet*. 1960. V. 276(7146). P. 371-372. DOI: 10.1016/S0140-6736(60)91518-X
26. Dolhofer R., Renner R., Wieland O.H. Different behaviour of haemoglobin Ala-c and glycosylalbumin levels during recovery from diabetic ketoacidosis and non-acidotic coma. *Diabetologia*. 1981. V. 21(3). P. 211-215.
27. Eich R.F., Li T., Lemon D.D., Doherty D.H., Curry S.R., Aitken J.F., Mathews A.J., Johnson K.A., Smith R.D., Phillips G.N., Olson J.S. Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. *Biochemistry*. 1996. V. 35(22). P. 6976-6983. DOI: 10.1021/bi960442g
28. Eisinger J., Flores J., Salhany J.M. Association of cytosol hemoglobin with the membrane in intact erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1982. V. 79(2). P. 408-412. DOI: 10.1073/pnas.79.2.408
29. Fluckiger R., Berger W., Winterhalter K.H. Haemoglobin A_{1c}, a reliable index of diabetic control. *Diabetologia*. 1977. V. 13. P. 393-396.
30. Fung L.W. Spin-label detection of hemoglobin-membrane interaction at physiological pH. *Biochemistry*. 1981. V. 20(25). P. 7162-7166. DOI: 10.1021/bi00528a017
31. Gardner P.R., Gardner A.M., Martin L.A., Salzman A.L. Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95(18). P. 10378-10383.
32. Gladwin M.T., Raat N.J., Shiva S., Dezfulian C., Hogg N., Kim-Shapiro D.B., Patel R.P. Nitrite as a vascular endocrine nitric oxide reservoir that contributes to hypoxic signaling, cytoprotection, and vasodilation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006. V. 291(5). P. H2026-H2035. DOI: 10.1152/ajpheart.00407.2006
33. Gow A.J., Luchsinger B.P., Pawloski J.R., Singel D.J., Stamler J.S. The oxyhemoglobin reaction of nitric

- oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96(16). P. 9027-9032. DOI: 10.1073/pnas.96.16.9027
34. Hausladen A., Gow A., Stamler J.S. Flavohemoglobin denitrosylase catalyzes the reaction of a nitroxyl equivalent with molecular oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98(18). P. 10108-10112. DOI: 10.1073/pnas.181199698
35. Herold S., Kalinga S., Matsui T., Watanabe Y. Mechanistic studies of the isomerization of peroxynitrite to nitrate catalyzed by distal histidine metmyoglobin mutants. *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126(22). P. 6945-6955. DOI: 10.1021/ja0493300
36. Huang Z., Shiva S., Kim-Shapiro D.B., Patel R.P., Ringwood L.A., Irby C.E., Huang K.T., Ho C., Hogg N., Schechter A.N., Gladwin M.T. Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. *J. Clin. Invest.* 2005. V. 115(8). P. 2099-2107. DOI: 10.1172/JCI24650
37. Ingram V. A specific chemical difference between globins of normal and sickle-cell anemia hemoglobins. *Nature*. 1956. V. 178(4537). P. 792-794. DOI: 10.1038/178792a0
38. Jia L., Bonaventura C., Bonaventura J., Stamler J.S. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature*. 1996. V. 380(6571). P. 221-226. DOI: 10.1038/380221a0
39. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Nasybullina E.I., Gubkina S.A., Topunov A.F. Interaction of S-nitrosoglutathione with methemoglobin under conditions of modeling carbonyl stress. *Hemoglobin*. 2013. V. 37(3). P. 205-218. DOI: 10.3109/03630269.2013.773911
40. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Nasybullina E.I., Topunov A.F. Formation of nitri- and nitrosylhemoglobin in systems modeling the Maillard reaction. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2014. V.52(1). P. 161-168. DOI: 10.1515/cclm-2012-0792
41. Kreutzer U., Jue T. The role of myoglobin as a scavenger of cellular NO in myocardium. *J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004. V. 286(3). P. H985-H991. DOI: 10.1152/ajpheart.00115.2003
42. Kriebardis A.G., Antonelou M.H., Stamoulis K.E., Economou-Petersen E., Margaritis L.H., Papassideri I.S. Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. *J. Cell. Mol. Med.* 2007. V. 11(1). P. 148-155. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2007.00008.x
43. Kuma F., Prough R.A., Masters B.S.S. Studies on methemoglobin reductase. Immunochemical similarity of soluble methemoglobin reductase and cytochrome b₅ of human erythrocytes with NADH-cytochrome b₅ reductase and cytochrome b₅ of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1976. V. 172(2). P. 600-607. DOI: 10.1016/0003-9861(76)90113-2
44. Kunkel H.G., Wallenius G. New hemoglobins in normal adult blood. *Science*. 1955. V. 122(3163). P. 288. DOI: 10.1126/science.122.3163.288
45. Li D.-J., Luo H., Wang L.-L., Zou G.-L. Potential of peroxynitrite to promote the conversion of oxyhemoglobin to methemoglobin. *Acta Biochimica Biophysica Sinica*. 2004. V. 36(2). P. 87-92.
46. Lisitsa A., Moshkovskii S., Chernobrovkin A., Ponomarenko E., Archakov A. Profiling proteoforms: Promising follow-up of proteomics for biomarker discovery. *Expert Review of Proteomics*. 2014. V. 11(1). P.121-129. DOI: 10.1586/14789450.2014.878652
47. Mansouri A. Methemoglobinemia. *American Journal of Medical Sciences*. 1985. V. 289(5). P. 200-209.
48. McCutcheon A.D., Melb M.D., Flack E.H. Sulphaemoglobinaemia and glutathione. *Lancet*. 1960. V. 276(7144). P. 240-242. DOI: 10.1016/S0140-6736(60)91429-X
49. Murayama M. The combining power of normal human hemoglobin for nitrosobenzene. *J. Biol. Chem.* 1960. V. 235(4). P. 1024-1028.
50. Murphy K., Ryan C., Dempsey E.M., O'Toole P.W., Ross R.P., Stanton C., Ryan C.A. Neonatal sulfhemoglobinemia and hemolytic anemia associated with intestinal *Morganella morganii*. *Pediatrics*. 2015. V. 136(6). P. e1641-e1645. DOI: 10.1542/peds.2015-0996
51. Nash G.B., Meiselman H.J. Red cell and ghost viscoelasticity. Effects of hemoglobin concentration and *in vivo* aging. *Biophys. J.* 1983. V. 43(1). P. 63-73. DOI: 10.1016/S0006-3495(83)84324-0
52. Qiu Y., Sutton L., Riggs A.F. Identification of myoglobin in human smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273(36). P. 23426-23432. DOI: 10.1074/jbc.273.36.23426
53. Park C.M., Nagel R.L. Sulfhemoglobinemia. Clinical and molecular aspects. *N. Engl. J. Med.* 1984. V. 310(24). P. 1579-1584. DOI: 10.1056/NEJM198406143102407
54. Perutz M.F., Liquori A.M., Eirich F. X-ray and solubility studies of the haemoglobin of sickle-cell anaemia patients. *Nature*. 1951. V. 167(4258). P. 929-931.
55. Rahbar S. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clin. Chim. Acta*. 1968. V. 22(2). P. 296-298. DOI: 10.1016/0009-8981(68)90372-0
56. Ramdani G., Langsley G. ATP, an extracellular signaling molecule in red blood cells: a messenger for malaria? *Biomed. J.* 2014. V. 37(5). P. 284-292. DOI: 10.4103/2319-4170.132910
57. Rassaf T., Flogel U., Drexhage C., Hendgen-Cotta U., Kelm M., Schrader J. Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function. *Circ. Res.* 2007. V. 100(12). P. 1749-1754. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.152488

58. Reeder B., Wilson M. Hemoglobin and myoglobin associated oxidative stress: From molecular mechanisms to disease states. *Curr. Med. Chem.* 2005. V. 12(23). P. 2741-2751. DOI: 10.2174/092986705774463021
59. Rifkind J.M., Nagababu E. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. *Antioxid. Redox Signal.* 2013. V. 18(17). P. 2274-2283. DOI: 10.1089/ars.2012.4867
60. Rifkind J., Nagababu E., Ramasamy S. Nitric oxide redox reactions and red cell biology. *Antioxid. Redox Signal.* 2006. V. 8(7-8). P. 1193-1203. DOI: 10.1089/ars.2006.8.1193
61. Riggs A. Preparation of blood hemoglobins of vertebrates. *Methods in Enzymology.* 1981. V. 76. P. 5-29. DOI: 10.1016/0076-6879(81)76111-1
62. Sallhany J.M. 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.* 2008. V. 47. P. 6059-6072. DOI: 10.1021/bi8000819
63. Sears D.A., Lewis P.C. Measurement of hemoglobin chains bound to the erythrocyte membrane. *J. Lab. Clin. Med.* 1980. V. 96(2). P. 318-327.
64. Shapiro R., Mc Manus M.J., Zalut C., Bunn H.F. Sites of nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin A. *J. Brit. Chem.* 1980. V. 255(7). P. 3120-3127.
65. Shiva S. Nitrite: A physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function. *Redox Biology.* 2013. V. 1(1). P. 40-44. DOI: 10.1016/j.redox.2012.11.005
66. Scheler W. Binding of nitrosobenzene and nitrosobenzene derivatives to hemoglobin and hemoglobin compounds. *Acta Biol. Med. Germ.* 1960. V. 5. P. 382-397.
67. Scott E.M., Griffith I.V. The enzymatic defect of hereditary methemoglobinemia: diaphorase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1959. V. 34. P. 584-586. DOI: 10.1016/0006-3002(59)90324-5
68. Sega M.F., Chu H., Christian J., Low P.S. Interaction of deoxyhemoglobin with the cytoplasmic domain of murine erythrocyte band 3. *Biochemistry.* 2012. V. 51(15). P. 3264-3272. DOI: 10.1021/bi201623v
69. Shaklai N., Yguerabide J., Ranney H.M. Classification and localization of hemoglobin binding sites on the red blood cell membrane. *Biochemistry.* 1977. V. 16(25). P. 5593-5597. DOI: 10.1021/bi00644a032
70. Shaklai N., Sharma V.S., Ranney H.M. Interaction of sickle cell hemoglobin with erythrocyte membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981. V. 78(1). P. 65-68. DOI: 10.1073/pnas.78.1.65
71. Shaklai N., Ranney H.R. Interaction of hemoglobin with membrane lipids: a source of pathological phenomena. *Isr. J. Med. Sci.* 1978. V. 14(11). P. 1152-1156.
72. Shumaev K.B., Gubkin A.A., Serezhenkov V.A., Lobysheva I.I., Kosmachevskaya O.V., Ruuge E.K., Lankin V.Z., Topunov A.F., Vanin A.F. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and hemoglobin-bound dinitrosyl iron complexes. *Nitric Oxide.* 2008a. V. 18(1). P. 37-46. DOI: 10.1016/j.niox.2007.09.085
73. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F. Dinitrosyl iron complexes bound with haemoglobin as markers of oxidative stress. *Methods in Enzymology.* 2008b. V. 436. P. 441-457. DOI: 10.1016/S0076-6879(08)36025-X
74. Sprague R.S., Ellsworth M.L., Stephenson A.H., Lonigro A.J. Participation of cAMP in a signal-transduction pathway relating erythrocyte deformation to ATP release. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2001. V. 281(4). P. C1158-C1164. DOI: 10.1152/ajpcell.2001.281.4.C1158
75. Stamler J.S., Jia L., Eu J.P., McMahon T.J., Demchenko I.T., Bonaventura J., Gernert K., Piantadosi C.A. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science.* 1997. V. 276(5321). P. 2034-2037. DOI: 10.1126/science.276.5321.2034
76. Stamler J.S., Singel D.J., Piantadosi C.A. SNO-hemoglobin and hypoxic vasodilation. *Nature Medicine.* 2008. V. 14(10). P. 1008-1009. DOI: 10.1038/nm1008-1008
77. Talbot B., Brunori M., Antonini E., Wyman J. Studies on the reaction of isocyanides with haemproteins. I. Equilibria and kinetics of the binding to the isolated chains of human haemoglobin. *J. Mol. Biol.* 1971. V. 58(1). P. 261-276. DOI: 10.1016/0022-2836(71)90245-2
78. Tsuneshige A., Imai K., Tyuma I. The binding of hemoglobin to red cell membrane lowers its oxygen affinity. *J. Biochem.* 1987. V. 101(3). P. 695-704.
79. Vanin A.F., Serezhenkov V.A., Mikoyan V.D., Genkin M.V. The 2.03 signal as an indicator of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands. *Nitric Oxide.* 1998. V. 2(4). P. 224-234. DOI: 10.1006/niox.1998.0180
80. Yim H.-S., Kang S.-O., Hah Y.-C., Chock P.B., Yim M.B. Free radicals generated during the glycation reaction of amino acids by methylglyoxal. A model study of protein-cross-linked free radicals. *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270(47). P. 28228-28233. DOI: 10.1074/jbc.270.47.28228

References

1. Andreyuk G.M., Kisel' M.A. The formation of hemichrome upon interaction of hemoglobin with polar phosphatidylcholine derivatives. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 1997. V. 23(4). P. 268-271.

2. Galenok V.A., Bodnar P.N., Dikker V.E., Romashkan S.V. Glikozilirovannye proteiny. *Novosibirsk: Nauka. Sib. otdelenie*. 1989. 258 p. [Glycosylated proteins]. (In Russian)
3. Grigorieva D.V., Gorudko I.V., Sokolov A.V., Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F., Buko I.V., Konstantinova E.E., Cherenkevich S.N., Panasenkov O.N. Measurement of Plasma Hemoglobin Peroxidase Activity. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2013. V. 155(1). P. 118-121. DOI: 10.1007/s10517-013-2094-4
4. Gromov P.S., Zakharov S.F., Shishkin S.S., Ilinskii R.V. Two-dimensional map of human-erythrocyte membrane-proteins. *Biochemistry (Moscow)*. 1988. V. 53(8). P. 1146-1155.
5. Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. Method of determination of the content of hemoglobin-like proteins in heterogenic mixtures. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2007. V. 43(3). P. 313-319. DOI: 10.1134/S0003683807030131
6. Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. Hemoglobins: Diversity of structures and functions. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2009. V. 45(6). P. 563-587. DOI: 10.1134/S0003683809060015
7. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Topunov A.F. Signal and regulatory effects of methylglyoxal in eukaryotic cells. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2017. V. 53(3). P. 273-289. DOI: 10.1134/S0003683817030103
8. Luneva O.G., Sidorenko S.V., Maksimov G.V., Grygorczyk R., Orlov S.N. Erythrocytes as regulators of blood vessel tone. *Biochemistry, Supplemental Series A*. 2015. V. 9(3). P. 161-171. DOI: 10.1134/S1990747815040078
9. Nasledstvennye anemii i gemoglobinopatii. (Red.: Tokarev Ju.N., Hollan S.R., Korralja-Al'monte H.S.) *M.: Medicina*. 1983. 336 p. [Hereditary anemias and hemoglobinopathies. (Eds.: Tokarev Ju.N., Hollan S.R., Korralja-Al'monte H.S.)]. (In Russian)
10. Nasybullina E.I., Nikitaev V.G., Pronichev A.N., Blindar V.N., Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. Expert diagnostic system for hemoglobinopathies using the data on blood, erythrocyte, and hemoglobin state. *Bulletin of the Lebedev Physics Institute*. 2015. V. 42(7). P. 206-208. DOI: 10.3103/S1068335615070039
11. Toktamyssova Z.S., Birshanova N.H. O membranosvjazannom gemoglobine. *Biofizika*. 1990. V. 35(6). P. 1019-1020. [On the membrane-bound hemoglobin]. (In Russian)
12. Topunov A.F., Golubeva L.I. Reduktazy, vosstanavlivajushhie kislorodperenosjashhie gemoproteidy: gemoglobin, mioglobin i legoglobin. [Reductases reducing oxygen-carrying hemoproteins: hemoglobin, myoglobin and leghemoglobin]. *Uspehi biologicheskoy himii*. [Advances in Biological Chemistry]. 1989. V. 30. P. 239-252. (In Russian)
13. Topunov A.F., Kosmachevskaya O.V. Fermentativnoe vosstanovlenie gemoglobina i metgemoglobinemija. [Enzymatic reduction of hemoglobin and methemoglobinemia]. *Materialy Suhumskoj mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii: Aktual'nye voprosy jeksperimental'noj biologii i mediciny* [Proceedings of the Sukhum International scientific-practical conference: Actual issues of experimental biology and medicine]. Sukhum, 2017. P. 413-421. (In Russian)
14. Topunov A.F., Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B. GemoglobinÓm – nabor vseh gemoglobinov organizma. [Hemoglobinome – the enlistment of all organism's hemoglobins]. *Trudy XXI mezhdunarodnoj konferencii «Novye informacionnye tehnologii v medicine, biologii, farmakologii i jekologii»*. Ukraina, Krym, Jalta-Gurzuf, 2013. [Proceedings of 21th International conference: New information technologies in medicine, biology, pharmacology and ecology. Ukraine, Crimea, Yalta-Gurzuf, 2013]. P. 150-152. (In Russian)
15. Topunov A.F., Petrova N.E. Gemoglobiny: jevoljucija, rasprostranenie i geterogennost'. [Hemoglobins: evolution, widespreading and heterogeneity]. *Uspehi biologicheskoy himii*. [Advances in Biological Chemistry]. 2001. V. 41. P. 199-228. (In Russian)
16. Shumaev K.B., Gubkin A.A., Gubkina S.A., Gudkov L.L., Sviryaeva I.V., Timoshin A.A., Topunov A.F., Vanin A.F., Ruuge E.K. The interaction between dinitrosyl iron complexes and intermediates of oxidative stress. *Biophysics*. 2006. V. 51(3). P. 423-428. DOI: 10.1134/S0006350906030134
17. Shumaev K. B., Sviryaeva I. V., Gubkina S. A., Krivova T. S., Topunov A. F., Vanin A. F., Ruuge E. K. Formation of dinitrosyl iron complexes in cardiac mitochondria. *Biophysics*. 2010. V. 55(3). P. 406-411. DOI: 10.1134/S0006350910030097
18. Alayash A.I., Ryan B.A., Cashon R.E. Peroxynitrite-mediated heme oxidation and protein modification of native and chemically modified hemoglobins. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998. V. 349(1). P. 65-73. DOI: 10.1006/abbi.1997.0449
19. Anderson H.M., Turner J.C. Relation of hemoglobin to the red cell membrane. *J. Clin. Invest.* 1960. V. 39(1). P. 1-7. DOI: 10.1172/JCI104007
20. Angelo M., Singel D., Stamler J. An S-nitrosothiol (SNO) synthase function of hemoglobin that utilizes nitrite as a substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103(22). P. 8366-8371. DOI: 10.1073/pnas.0600942103
21. Ascenzi P., Brunori M. Myoglobin: a pseudo-enzymatic scavenger of nitric oxide. *Biochemistry and*

- Molecular Biology Education*. 2001. V. 29(5). P. 183-185. DOI: 10.1016/S1470-8175(01)00082-0
22. Benesch B.R., Benesch R.E. Preparation and properties of hemoglobin modified with derivatives of pyridoxal. *Methods in Enzymology*. 1981. V. 76. P. 147-159. DOI: 10.1016/0076-6879(81)76123-8
 23. Chandalia H.B., Krishnaswamy P.R. Glycated hemoglobin. *Current Science*. 2002. V. 83(12). P. 1522-1532.
 24. Demehin A.A., Abugo O.O., Jayakumar J.R., Rifkind J.M. Binding of hemoglobin to red cell membranes with eosin-5-maleimide-Labeled Band 3: analysis of centrifugation and fluorescence data. *Biochemistry*. 2002. V. 41(27). P. 8630-8637. DOI: 10.1021/bi012007e
 25. Discombe G. Sulphaemoglobinaemia and glutathione. *Lancet*. 1960. V. 276(7146). P. 371-372. DOI: 10.1016/S0140-6736(60)91518-X
 26. Dolhofer R., Renner R., Wieland O.H. Different behaviour of haemoglobin A1a-c and glycosylalbumin levels during recovery from diabetic ketoacidosis and non-acidotic coma. *Diabetologia*. 1981. V. 21(3). P. 211-215.
 27. Eich R.F., Li T., Lemon D.D., Doherty D.H., Curry S.R., Aitken J.F., Mathews A.J., Johnson K.A., Smith R.D., Phillips G.N., Olson J.S. Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. *Biochemistry*. 1996. V. 35(22). P. 6976-6983. DOI: 10.1021/bi960442g
 28. Eisinger J., Flores J., Salhany J.M. Association of cytosol hemoglobin with the membrane in intact erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1982. V. 79(2). P. 408-412. DOI: 10.1073/pnas.79.2.408
 29. Fluckiger R., Berger W., Winterhalter K.H. Haemoglobin A_{1c}, a reliable index of diabetic control. *Diabetologia*. 1977. V. 13. P. 393-396.
 30. Fung L.W. Spin-label detection of hemoglobin-membrane interaction at physiological pH. *Biochemistry*. 1981. V. 20(25). P. 7162-7166. DOI: 10.1021/bi00528a017
 31. Gardner P.R., Gardner A.M., Martin L.A., Salzman A.L. Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95(18). P. 10378-10383.
 32. Gladwin M.T., Raat N.J., Shiva S., Dezfulian C., Hogg N., Kim-Shapiro D.B., Patel R.P. Nitrite as a vascular endocrine nitric oxide reservoir that contributes to hypoxic signaling, cytoprotection, and vasodilation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006. V. 291(5). P. H2026-H2035. DOI: 10.1152/ajpheart.00407.2006
 33. Gow A.J., Luchsinger B.P., Pawloski J.R., Singel D.J., Stamler J.S. The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96(16). P. 9027-9032. DOI: 10.1073/pnas.96.16.9027
 34. Hausladen A., Gow A., Stamler J.S. Flavohemoglobin denitrosylase catalyzes the reaction of a nitroxyl equivalent with molecular oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98(18). P. 10108-10112. DOI: 10.1073/pnas.181199698
 35. Herold S., Kalinga S., Matsui T., Watanabe Y. Mechanistic studies of the isomerization of peroxynitrite to nitrate catalyzed by distal histidine metmyoglobin mutants. *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126(22). P. 6945-6955. DOI: 10.1021/ja0493300
 36. Huang Z., Shiva S., Kim-Shapiro D.B., Patel R.P., Ringwood L.A., Irby C.E., Huang K.T., Ho C., Hogg N., Schechter A.N., Gladwin M.T. Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. *J. Clin. Invest.* 2005. V. 115(8). P. 2099-2107. DOI: 10.1172/JCI24650
 37. Ingram V. A specific chemical difference between globins of normal and sickle-cell anemia hemoglobins. *Nature*. 1956. V. 178(4537). P. 792-794. DOI: 10.1038/178792a0
 38. Jia L., Bonaventura C., Bonaventura J., Stamler J.S. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature*. 1996. V. 380(6571). P. 221-226. DOI: 10.1038/380221a0
 39. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Nasybullina E.I., Gubkina S.A., Topunov A.F. Interaction of S-nitrosoglutathione with methemoglobin under conditions of modeling carbonyl stress. *Hemoglobin*. 2013. V. 37(3). P. 205-218. DOI: 10.3109/03630269.2013.773911
 40. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Nasybullina E.I., Topunov A.F. Formation of nitri- and nitrosylhemoglobin in systems modeling the Maillard reaction. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2014. V. 52(1). P. 161-168. DOI: 10.1515/cclm-2012-0792
 41. Kreutzer U., Jue T. The role of myoglobin as a scavenger of cellular NO in myocardium. *J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004. V. 286(3). P. H985-H991. DOI: 10.1152/ajpheart.00115.2003
 42. Kriebardis A.G., Antonelou M.H., Stamoulis K.E., Economou-Petersen E., Margaritis L.H., Papassideri I.S. Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. *J. Cell. Mol. Med.* 2007. V. 11(1). P. 148-155. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2007.00008.x
 43. Kuma F., Prough R.A., Masters B.S.S. Studies on methemoglobin reductase. Immunochemical similarity of soluble methemoglobin reductase and cytochrome b₅ of human erythrocytes with NADH-cytochrome b₅ reductase and cytochrome b₅ of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1976. V. 172(2). P. 600-607. DOI: 10.1016/0003-9861(76)90113-2
 44. Kunkel H.G., Wallenius G. New hemoglobins in normal adult blood. *Science*. 1955. V. 122(3163). P. 288. DOI: 10.1126/science.122.3163.288
 45. Li D.-J., Luo H., Wang L.-L., Zou G.-L. Potential of peroxynitrite to promote the conversion of

- oxyhemoglobin to methemoglobin. *Acta Biochimica Biophysica Sinica*. 2004. V. 36(2). P. 87-92.
46. Lisitsa A., Moshkovskii S., Chernobrovkin A., Ponomarenko E., Archakov A. Profiling proteoforms: Promising follow-up of proteomics for biomarker discovery. *Expert Review of Proteomics*. 2014. V. 11(1). P.121-129. DOI: 10.1586/14789450.2014.878652
47. Mansouri A. Methemoglobinemia. *American Journal of Medical Sciences*. 1985. V. 289(5). P. 200-209.
48. McCutcheon A.D., Melb M.D., Flack E.H. Sulphaemoglobinaemia and glutathione. *Lancet*. 1960. V. 276(7144). P. 240-242. DOI: 10.1016/S0140-6736(60)91429-X
49. Murayama M. The combining power of normal human hemoglobin for nitrosobenzene. *J. Biol. Chem*. 1960. V. 235(4). P. 1024-1028.
50. Murphy K., Ryan C., Dempsey E.M., O'Toole P.W., Ross R.P., Stanton C., Ryan C.A. Neonatal sulfhemoglobinemia and hemolytic anemia associated with intestinal *Morganella morganii*. *Pediatrics*. 2015. V. 136(6). P. e1641-e1645. DOI: 10.1542/peds.2015-0996
51. Nash G.B., Meiselman H.J. Red cell and ghost viscoelasticity. Effects of hemoglobin concentration and *in vivo* aging. *Biophys. J*. 1983. V. 43(1). P. 63-73. DOI: 10.1016/S0006-3495(83)84324-0
52. Qiu Y., Sutton L., Riggs A.F. Identification of myoglobin in human smooth muscle. *J. Biol. Chem*. 1998. V. 273(36). P. 23426-23432. DOI: 10.1074/jbc.273.36.23426
53. Park C.M., Nagel R.L. Sulfhemoglobinemia. Clinical and molecular aspects. *N. Engl. J. Med*. 1984. V. 310(24). P. 1579-1584. DOI: 10.1056/NEJM198406143102407
54. Perutz M.F., Liguori A.M., Eirich F. X-ray and solubility studies of the haemoglobin of sickle-cell anaemia patients. *Nature*. 1951. V. 167(4258). P. 929-931.
55. Rahbar S. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clin. Chim. Acta*. 1968. V. 22(2). P. 296-298. DOI: 10.1016/0009-8981(68)90372-0
56. Ramdani G., Langsley G. ATP, an extracellular signaling molecule in red blood cells: a messenger for malaria? *Biomed. J*. 2014. V. 37(5). P. 284-292. DOI: 10.4103/2319-4170.132910
57. Rassaf T., Flogel U., Drexhage C., Hendgen-Cotta U., Kelm M., Schrader J. Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function. *Circ. Res*. 2007. V. 100(12). P. 1749-1754. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.152488
58. Reeder B., Wilson M. Hemoglobin and myoglobin associated oxidative stress: From molecular mechanisms to disease states. *Curr. Med. Chem*. 2005. V. 12(23). P. 2741-2751. DOI: 10.2174/092986705774463021
59. Rifkind J.M., Nagababu E. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. *Antioxid. Redox Signal*. 2013. V. 18(17). P. 2274-2283. DOI: 10.1089/ars.2012.4867
60. Rifkind J., Nagababu E., Ramasamy S. Nitric oxide redox reactions and red cell biology. *Antioxid. Redox Signal*. 2006. V. 8(7-8). P. 1193-1203. DOI: 10.1089/ars.2006.8.1193
61. Riggs A. Preparation of blood hemoglobins of vertebrates. *Methods in Enzymology*. 1981. V. 76. P. 5-29. DOI: 10.1016/0076-6879(81)76111-1
62. Salhany J.M. 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*. 2008. V. 47. P. 6059-6072. DOI: 10.1021/bi8000819
63. Sears D.A., Lewis P.C. Measurement of hemoglobin chains bound to the erythrocyte membrane. *J. Lab. Clin. Med*. 1980. V. 96(2). P. 318-327.
64. Shapiro R., Mc Manus M.J., Zalut C., Bunn H.F. Sites of nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin A. *J. Brit. Chem*. 1980. V. 255(7). P. 3120-3127.
65. Shiva S. Nitrite: A physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function. *Redox Biology*. 2013. V. 1(1). P. 40-44. DOI: 10.1016/j.redox.2012.11.005
66. Scheler W. Binding of nitrosobenzene and nitrosobenzene derivatives to hemoglobin and hemoglobin compounds. *Acta Biol. Med. Germ*. 1960. V. 5. P. 382-397.
67. Scott E.M., Griffith I.V. The enzymatic defect of hereditary methemoglobinemia: diaphorase. *Biochim. Biophys. Acta*. 1959. V. 34. P. 584-586. DOI: 10.1016/0006-3002(59)90324-5
68. Sega M.F., Chu H., Christian J., Low P.S. Interaction of deoxyhemoglobin with the cytoplasmic domain of murine erythrocyte band 3. *Biochemistry*. 2012. V. 51(15). P. 3264-3272. DOI: 10.1021/bi201623v
69. Shaklai N., Yguerabide J., Ranney H.M. Classification and localization of hemoglobin binding sites on the red blood cell membrane. *Biochemistry*. 1977. V. 16(25). P. 5593-5597. DOI: 10.1021/bi00644a032
70. Shaklai N., Sharma V.S., Ranney H.M. Interaction of sickle cell hemoglobin with erythrocyte membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981. V. 78(1). P. 65-68. DOI: 10.1073/pnas.78.1.65
71. Shaklai N., Ranney H.R. Interaction of hemoglobin with membrane lipids: a source of pathological phenomena. *Isr. J. Med. Sci*. 1978. V. 14(11). P. 1152-1156.
72. Shumaev K.B., Gubkin A.A., Serezhenkov V.A., Lobysheva I.I., Kosmachevskaya O.V., Ruuge E.K.,

- Lankin V.Z., Topunov A.F., Vanin A.F. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and hemoglobin-bound dinitrosyl iron complexes. *Nitric Oxide*. 2008a. V. 18(1). P. 37-46. DOI: 10.1016/j.niox.2007.09.085
73. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F. Dinitrosyl iron complexes bound with haemoglobin as markers of oxidative stress. *Methods in Enzymology*. 2008b. V. 436. P. 441-457. DOI: 10.1016/S0076-6879(08)36025-X
74. Sprague R.S., Ellsworth M.L., Stephenson A.H., Lonigro A.J. Participation of cAMP in a signal-transduction pathway relating erythrocyte deformation to ATP release. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2001. V. 281(4). P. C1158-C1164. DOI: 10.1152/ajpcell.2001.281.4.C1158
75. Stamler J.S., Jia L., Eu J.P., McMahon T.J., Demchenko I.T., Bonaventura J., Gernert K., Piantadosi C.A. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science*. 1997. V. 276(5321). P. 2034-2037. DOI: 10.1126/science.276.5321.2034
76. Stamler J.S., Singel D.J., Piantadosi C.A. SNO-hemoglobin and hypoxic vasodilation. *Nature Medicine*. 2008. V. 14(10). P. 1008-1009. DOI: 10.1038/nm1008-1008
77. Talbot B., Brunori M., Antonini E., Wyman J. Studies on the reaction of isocyanides with haemproteins. I. Equilibria and kinetics of the binding to the isolated chains of human haemoglobin. *J. Mol. Biol.* 1971. V. 58(1). P. 261-276. DOI: 10.1016/0022-2836(71)90245-2
78. Tsuneshige A., Imai K., Tyuma I. The binding of hemoglobin to red cell membrane lowers its oxygen affinity. *J. Biochem.* 1987. V. 101(3). P. 695-704.
79. Vanin A.F., Serezhenkov V.A., Mikoyan V.D., Genkin M.V. The 2.03 signal as an indicator of dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands. *Nitric Oxide*. 1998. V. 2(4). P. 224-234. DOI: 10.1006/niox.1998.0180
80. Yim H.-S., Kang S.-O., Hah Y.-C., Chock P.B., Yim M.B. Free radicals generated during the glycation reaction of amino acids by methylglyoxal. A model study of protein-cross-linked free radicals. *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270(47). P. 28228-28233. DOI: 10.1074/jbc.270.47.28228