

## ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ УМЕРЕННЫМИ ДОЗАМИ НИТРИТОМ НАТРИЯ В ОПЫТАХ *in vitro*

Гусейнова С.Я., Гусейнов Т.М., Дадашов М.З.

*Институт Биофизики, НАН Азербайджана*

*ул. З. Халилова, 117, г. Баку, AZ 1141, Азербайджан; e-mail: thuseynov@physics.ab.az*

Поступила в редакцию: 25.06.2018

**Аннотация.** В работе изучены влияния умеренно-хронических доз нитрита натрия на окислительной модификации Hb и эритроцитов, изменения активности каталазы, глутатионпероксидазы (ГП) и интенсивность перекисное окисления липидов (ПОЛ). Анализ спектральных линий раман спектроскопии показывает, что способность Hb связывать кислород  $\nu_{1580}/\nu_{1548}$  в суспензии эритроцитов, обработанных  $\text{NaNO}_2$  существенно выше, чем в контроле и этот эффект прямо зависит от концентрации  $\text{NaNO}_2$  и значителен уже при минимальных концентрациях  $\text{NaNO}_2$  (0,07 мМ), а относительная способность Hb отдавать лиганды  $\nu_{1375}/\nu_{1580}$  также зависит от дозы, но в противоположную сторону. Проявления симметричных и асимметричных колебаний пиррольных колец Hb ( $\nu_{1375}/\nu_{1172}$ ) с увеличением дозы нитрита повышается на ~ 14 %, что указывает о наличие конформационных изменений пиррольных колец, связанных с окислительной модификацией Hb. Накопление metHb также зависит от дозы и достигает своего максимума на 30-40 минутах, это сопровождается интенсификацией процессов ПОЛ и увеличением доли мембрансвязанного Hb. Характерно, что развитие окислительного процесса сопровождается уменьшением активности каталазы, а активность ГП изменяется неоднозначно и при повышенных содержаниях  $\text{NaNO}_2$  несколько растет. Констатируя указанные факты можно сказать, что уже относительно малые концентрации нитрита натрия могут влиять на конформацию Hb, приводящую к изменению его сродства к  $\text{O}_2$ . Это стимулирует окислительную модификацию Hb, что отражается в росте накопления metHb и потери активности каталазы и ГП, а при больших концентрациях нитрита и к росту активности ГП.

**Ключевые слова:** эритроциты, гемоглобин, каталаза, глутатионпероксидаза, ПОЛ, нитрит натрия.

### ВВЕДЕНИЕ

Широкое использование нитритов-нитратов в сельскохозяйственной промышленности, пищевой промышленности и огромное количество промышленных выхлопных газов, содержащих окислы азота, представляет токсикологическую угрозу здоровью человека [1]. Длительное нитритное интоксикация сопровождается нарушением прооксидантно-антиоксидантного равновесия, т.е. развитием в той или иной мере окислительного стресса. Здесь одним из главных аспектов является изменения состояния компонент системы антиокислительной (АО) защиты, в том числе и важных АО ферментов супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГП), каталазы и др. и окислительная модификация гемоглобина (Hb) и эритроцитов в целом [2, 3, 4]. Кроме того, Hb и его производные как гемопропротеиды обладают пероксидазной активностью и поэтому могут существенно влиять на развития окислительных процессов [5].

Разнообразие и тяжесть возникающих нарушений в организме человека при нитритных интоксикациях, особенно малыми - «хроническими» дозами, диктуют необходимость детального исследования компонентов крови, в том числе изменений структуры, конформации,  $\text{O}_2$ -связывающих свойств Hb, состояние антиперекисных ферментов от окислительных эффектов малотоксичных доз нитритов. Т.е. тех доз, которые не приводят к явным структурно-функциональным нарушениям в Hb и эритроцитах, приводящих к развитию гипоксии в организме. В свете этого, для исследования индуцированных окислительных модификаций эритроцитов и Hb и нарушений функционирования эритроцитов мы поставили цель исследовать воздействия нитритов на эритроциты. Наряду с другими методами мы использовали спектральные данные полученные с помощью Раман спектроскопии (РС). Использование РС позволяет детально изучить основные структурно-функциональные показатели Hb, такие как строение молекулы, колебания метиновых мостиков, сродство к кислороду, способность захватывать или отдавать лиганды и т.д. [6, 7]. Любой эффект, в том числе изменение валентности атомов железа в геме, вызывающий изменения в распределении электронов на  $\pi$  орбиталах порфирина, оказывает влияние на частоту соответствующих полос РС [8]. Соответствие изменений интенсивностей характеристических пиков РС к изменениям соотношений metHb/общего Hb, и наличие линейной корреляции между ними теоретически обеспечили бы возможность количественного исследования нитритной метгемоглобинемии [9].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах были использованы натрий хлористый, нитрит натрия, натрий фосфат однозамещенный и двухзамещенный, сернокислая железа, молибдат аммония, трихлоруксусная кислота («Реахим», хч, Россия), восстановленный глутатион, 5'-5' дитиобисбензойная кислота, 2-тиобарбитуровая кислота (Sigma, USA).

В опытах *in vitro* была использована кровь доноров, взятая из локтевой вены в пробирки с гепарином (20 ед./мл крови). Основным объектом исследования являлись эритроциты и Hb человека. Путем центрифугирования 800 g в течение 15 мин проводили отделение плазмы крови от эритроцитов. Для получения суспензии эритроцитов осадок эритроцитов трижды отмывали в десятикратном объеме натрий-фосфатном буферном растворе (НФБ) (10 мМ НФБ pH 7,4, 0,14 мМ NaCl), центрифугировали при 800 g в течение 15 мин с последующим удалением надосадочной жидкости. Гемолиз эритроцитов достигался путем разбавления эритроцитарной массы дистиллированной водой в соотношении 1:9 с последующим замораживанием, оттаиванием и центрифугированием при 10000 g. Нитритное воздействие осуществлялось нитритом натрия, конечная концентрация в инкубационной среде составлял от 0,07 до 0,70 мМ время воздействия от 0 до 60 мин. Воздействие на эритроцитарную суспензию в опытах с привлечением РС, осуществлялось использованием  $\text{NaNO}_2$  в трех конечных концентрациях - 0,07, 0,15 и 0,35 мМ (время инкубации до 60 минут при 25 °C). Эти концентрации были взяты для прослеживания ранних стадий окислительного процесса Hb, вызванного нитритом. РС Hb регистрировали с помощью микроскопической системы 3D-конфокал раманспектрометра Nanofinder 30 (Japan). Для возбуждения раман спектров использовался лазер с длиной волны 532 нм, мощность излучения 10 мВт, объектив 50 х.

Для оценки соотношений окисленных нитритом форм Hb в эритроцитах проведены две серии опытов с сроками инкубирования образцов (30 и 60 мин) при температуре 37 °C. Каждая серия включала в себя один контрольный и опытные образцы. Контрольный образец содержал 2,0 мл суспензии эритроцитов + 0,2 мл забуференный физраствор, а в опытные образцы – по 2,0 мл суспензии эритроцитов и  $\text{NaNO}_2$  (0,2 мл) с различными конечными концентрациями. Накопление metHb оценивали по полуэмпирическим формулам, предложенным в [10]. Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) эритроцитов оценивали по накоплению окрашенных продуктов окисления, реагирующих в цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [11]. Определения активности каталазы осуществляли стандартным методом с использованием молибден аммония [12], а активность глутатионпероксидазы определяли по методу Моина [13]. Все измерения выполняли на спектрофотометре СФ-46 (Россия).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием t-критерия при уровне значимости  $p < 0,05$  [14].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

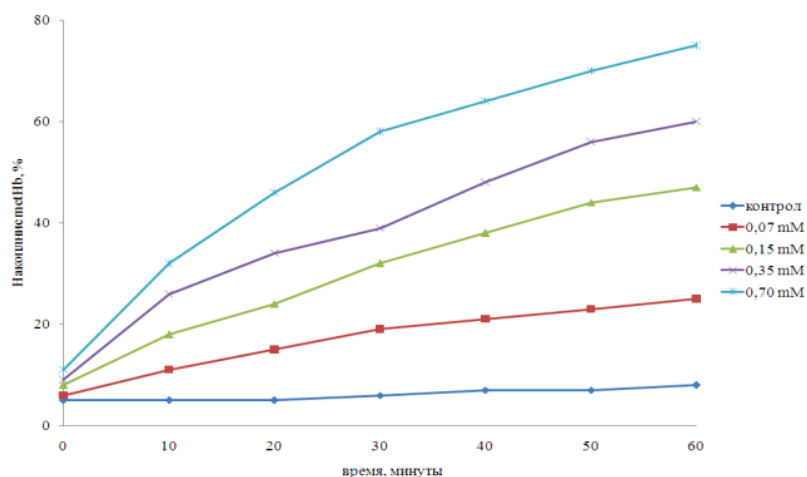
Присоединяя и отдавая лиганды Hb изменяет свою конформацию, что отражается на его физико-химических и функциональных свойствах [15]. Изучение динамики этих конформационных изменений Hb в присутствии различных лигандов является необходимым звеном в понимании механизмов его модификаций, механизмов развития и путей предотвращения его патологических состояний. Как лиганд,  $\text{O}_2$  является одним из "аллостерических" эффекторов молекулы Hb [16, 17]. Подобно  $\text{O}_2$  NO также принимает участие в "аллостерических" превращениях Hb [16]. NO обладает более высоким сродством к атому железа ( $\text{Fe}^{2+}$ ) порфирина, чем  $\text{O}_2$ , и эффективно конкурирует с ним за связывание Hb. Связывание NO с атомом  $\text{Fe}^{2+}$  Hb, способно изменить конформацию гемопорфирина и как, следствие изменяет сродство Hb к  $\text{O}_2$  [17, 18]. Наличие полос в Раман-спектре Hb отражает его структурно-функциональное состояние [19, 20].

Анализ спектральных линий, полученных в наших опытах показывает, что способность Hb связывать кислород I1580/I1548 в суспензии эритроцитов, обработанных нитритом существенно выше, чем в контроле (281, 291 и 300%) и прямо зависит от концентрации нитритов, кроме того этот эффект значителен уже при минимальных концентрациях нитрита (0,07 мМ). А относительная способность Hb отдавать лиганды I1375/I1580 в зависимости от дозы составляло 94,5, 92,7 и 92,2 % по отношению к контролю. Повышения сродства обеспечивает большое взаимодействие между Hb и  $\text{O}_2$ , снижая эффективность отдачи  $\text{O}_2$ .

Выраженность симметричных и асимметричных колебаний пиррольных колец Hb (I1375/I1172) с увеличением дозы нитрита повышается на ~ 14 %, что указывает о наличие конформационных изменений пиррольных колец, связанных с окислительной модификацией Hb.

Процесс индуцированного нитритами окисления гемоглобина представлен на рисунке 2. Из него видно, что уже на 10 мин инкубирования в среде содержащей суспензии эритроцитов гематокрит 5 %,  $t = 37$  °C, 10 мМ НФБ, pH 7.4) имеет место заметное накопление metHb, которое достигает максимума на 30-40 минуте. Величина этого эффекта коррелирует с конечной концентрацией нитрита (рис. 1).

Окисленное состояние Hb и избыток внутритроцитарного metHb способствует встраиванию Hb в эритроцитарную мембрану, увеличивая долю мембранносвязанного Hb, последствием же является нарушение структуры мембран эритроцитов. И на этот счет в литературе имеются сведения о том, что образующиеся под воздействием окислительных факторов агрегаты Hb и его дериватов, содержащих гем в состоянии от Fe (III) до Fe (IV), локализуются в примембранном слое и частично внедряется в мембраны эритроцитов, вызывая окислительную модификацию мембран [21, 22, 23].



**Рисунок 1.** Дозозависимое нитрит-индуцированное накопление *metHb* в инкубационной среде, 10 мМ НФБ pH 7,4, 0,14 мМ, NaCl,  $t = 37^\circ\text{C}$ , с суспензией эритроцитов в присутствии 0,07-0,7 мМ NaNO<sub>2</sub>

При этом было показано, что чем выше уровень окисленности гема, то есть доли высоких форм окисленности иона железа, тем выше доля мембраносвязанного Hb, образующие кластеры совместно с полосой 3 AE1 эритроцитарной мембраны [24].

С целью установления связи между развитием окислительной модификации и накоплением мембраносвязанного Hb (мсHb) были поставлены специальные опыты по оценке содержания мсHb в образцах подвернутых обработке нитритом. В отобранных аликвотных пробах со сроком инкубирования 0, 15, 30, 60 минут определяли суммарное содержания Hb и его дериватов в супернатантах после центрифугирования при 12000  $g \times 10$  мин. При этом изменения качественного состава мсHb оценивали посредством изменения спектральных пиков поглощения при 540, 576 нм (оxiHb) и 630 нм (*metHb*). По убыли соответствующих экстинций Hb в образцах до и после центрифугирования оценивали и соотношение оxiHb и *metHb* конечных и начальных экстинций, а также суммарного мсHb в них (табл. 1).

Снижение содержания Hb супернатантах свидетельствует о повышении мсHb как в гемолизатах, так и в эритроцитах. Проведенные нами предварительные опыты показали, что при малых конечных концентрациях (0,07 мМ и 0,14 мМ) нитриты не оказывает заметного влияния на образования мембранного Hb. В связи с этим мы рассматривали влияние нитрита натрия еще и с использованием более высокой дозы (7,0 мМ) на состояние содержания мембранного Hb в суспензии эритроцитов до и после сепарации (центрифугированием 12000  $G \times 30$  мин) мембран эритроцитов (табл.1). Оказалось, что около 2/3 общего мсHb приходится на мембраносвязанный *metHb*.

После центрифугирования содержание общего Hb в супернатантах эритроцитов уменьшается на ~ 8 %, что свидетельствует об их перемещении в примембранное пространство эритроцитов. Из данных таблицы 1 видно, что как увеличение конечной концентрации нитрита в среде инкубирования, так и увеличение ее длительности приводят к увеличению доли мембранного Hb.

**Таблица 1.** Влияние нитрита натрия на суммарный мембраносвязанный гемоглобин (в %) в изолированных эритроцитах при инкубации Na-фосфатном буфере (pH 7,4, гематокрит  $\approx 10\%$ ,  $t = 37^\circ\text{C}$ )

Образцы (n=8)	NaNO <sub>2</sub> (mM)				
	0,07	0,15	0,35	0,70	7,00
Контрольный Hb	0,60 ± 0,12	0,60 ± 0,12	0,60 ± 0,12	0,60 ± 0,12	0,60 ± 0,12
После 15 минут	0,70 ± 0,11	0,77 ± 0,15	1,41 ± 0,31*	2,13 ± 0,32**	4,17 ± 0,36**
После 30 минут	0,82 ± 0,12*	0,90 ± 0,17*	2,22 ± 0,26*	3,31 ± 0,42**	6,78 ± 0,73
После 60 минут	0,85 ± 0,20*	0,97 ± 0,72**	2,97 ± 0,23**	4,87 ± 0,36**	8,43 ± 0,65**

уровень значимости \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$

**Таблица 2.** Изменение показаний МДА, активности ГП и каталазы в эритроцитах, инкубированных при  $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7,4$ , в среде содержащей  $\text{NaNO}_2$  в интервале конечных концентраций от 0 до 7,0 мМ

Время инкуб		МДА нМ/1г Hb			Активность ГП мкМ GSH/мин/1г Hb			Активность каталазы мкМ/мин		
		15 мин	30 мин	60 мин	15 мин	30 мин	60 мин	15 мин	30 мин	60 мин
n=8	Контроль	3,75 ± 0,75	3,47 ± 0,69	3,55 ± 0,71	220 ± 31	240 ± 48	250 ± 35	2,6 ± 0,5	2,8 ± 0,6	2,5 ± 0,5
NaNO <sub>2</sub>	0,07 мМ	3,50 ± 0,70	3,05 ± 0,61	2,82 ± 0,56	205 ± 29	230 ± 37	240 ± 38	2,7 ± 0,3	2,9 ± 0,6	2,5 ± 0,5
	0,15 мМ	3,21 ± 0,64	2,50 ± 0,50	2,25 ± 0,45	200 ± 18	217 ± 23	225 ± 27	2,4 ± 0,3	2,2 ± 0,4	2,2 ± 0,3
	0,35 мМ	3,42 ± 0,68	3,54 ± 0,70	3,65 ± 0,52	210 ± 24	295 ± 25	230 ± 22	2,3 ± 0,3	2,1 ± 0,4	1,9 ± 0,3
	0,70 мМ	4,15 ± 0,83	4,72 ± 0,67	4,91 ± 0,98	240 ± 26	260 ± 20	225 ± 29	2,1 ± 0,4	1,7 ± 0,3	1,6 ± 0,3
	7,00 мМ	5,12 ± 1,02	5,56 ± 1,11	5,85 ± 1,17	365 ± 41	335 ± 35	310 ± 24	1,9 ± 0,3	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,2

Уровень значимости \* $p < 0,05$

Повышение уровня мембраносвязанного Hb обуславливает нарушение структурно-функционального состояния мембран эритроцитов и создает условия для еще большего заглубления Hb и MetHb в липидный бислой [21-24], а конечном счете вызовет структурную модификацию мембран эритроцитов, определяющая развитие гемолиза и интенсификация ПОЛ. Как видно из таблицы 2 нитриты в зависимости от содержания нитритов по-разному могут действовать на ПОЛ. В частности, малые конечные концентрации 0,07, 0,15 мМ нитритов ингибирует развитие ПОЛ, а 0,35 мМ не оказывает статистически достоверного влияния, выше: 0,70 мМ - ускоряют ПОЛ.

Действительно, согласно имеющимся данным в литературе липидное окисление может быть инициировано ферриловым Hb (Fe IV), образованным при взаимодействии Hb с пероксидами [25]. При этом Hb (Fe IV) вступает в реакцию с NO, фактически ингибирует реакцию Фентона, прекращая генерацию опасных гидроксильных радикалов (OH $\cdot$ ). В этом случае оказалось, что NO может снижать содержание феррилового гема и тем самым предотвращать окисление липидов мембран. Кроме того, имеются мнения, что образующиеся комплексы metHb-NO обладают определенными АО свойствами, в том числе пероксидазной активностью, ослабляющие генерацию пероксидов [5, 26-28]. В случае больших концентраций нитритов (в нашем случае 0,7 мМ и выше) пероксидазные свойства нитритного гемоглобина недостаточны для предотвращения окислительной модификации Hb, образующийся мембранный Hb [28-30].

Развитие окислительного стресса, в том числе и индуцированного нитритом натрия, неразрывно связано с активностью антиперекисных ферментов, в первую очередь каталазы и ГП. И если об участие каталазы в развитии окислительного процесса в эритроцитах в литературе имеется много сведений и приводятся различные механизмы о участии этого фермента в нитритном отравлении [31, 32], то для случая ГП эти сведения обрывочны и по существу, нет приемлемых гипотез объяснений механизма ее участия в нем [33, 34]. В частности, наиболее часто цитируются работы [Asahi M, 34] проведенные на клетках U937, в которой показано, что азотсодержащие соединения (SNAP) предположительно генерирующие NO, угнетает ГП активность, что приводит к росту ПОЛ [34]. Механизм этого эффекта связывается с окислением Se-цистеина до Se-цистин-цистина

Ранее нами было показано, что нитрит натрия, внесенный в инкубационную среду, содержащую изолированную суспензию эритроцитов человека, в конечной концентрации от 0,5 до 1,0 мМ приводит уже в первые 30 мин к существенному росту метгемоглобина, близкого к максимуму. Было показано, что активность ГП фермента незначительно меняется, а активность каталазы угнетается весьма заметно [35]. В настоящей работе мы провели аналогичное исследование, только здесь конечные концентрации были выбраны в более широком диапазоне от 0,07-0,70 мМ.

Из наших нынешних результатов (табл. 2) видно, что все эти дозы начиная с минимальной 0,07 мМ в той или иной мере приводят к угнетению каталазной активности. Однако, для ГП эти изменения не однозначны и при минимальной концентрации 0,07-0,15 мМ имеет место тенденции к уменьшению активности. Характерным оказалось и то, что активность каталазы при всех использованных конечных концентрациях нитрита однозначно уменьшается, особенно при относительно высоких концентрациях, коррелируя с заметным ростом мембранного Hb и ростом ПОЛ. Однако, активность ГП при повышенных содержаниях  $\text{NaNO}_2$  несколько растет. Следует иметь в виду о том, что при увеличении концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$ , сопровождающееся увеличением содержания metHb происходит ингибирования всех трех основных эритроцитарных пероксидутилизующих ферментов (каталаза, глутатионпероксидаза и пероксиредоксин-2). Однако, если каталаза не связывается с

эритроцитарными мембранами, и ее действие носит опосредственный характер на ПОЛ, то глутатионпероксидаза и пероксиредоксин-2 тесно взаимодействуют с мембранами [33].

Здесь, интересным оказалось то, что нитриты принимают непосредственное участие в регуляции ПОЛ, при низких и умеренных концентрациях в инкубационной среде подавляют ПОЛ и только при высоких концентрациях 0,7 мМ и выше оно несколько превышает контрольный уровень (~ 30 %), при том, что накопление metHb имеет место при всех концентрациях нитрита и достигает высоких значений до 50 % уже в первый час инкубирования. Резюмируя результаты исследования можно полагать, что нитриты уже в относительно малой концентрации могут влиять на конформацию гемоглобина, приводящую к изменению сродства его к кислороду. Последнее стимулирует окислительную модификацию гемоглобина, что отражается в накоплении метгемоглобина и потери активности каталазы и изменении активности ГП, а при больших концентрациях нитрита и к росту ПОЛ.

#### Список литературы / References:

1. Mensinga T.T., Gerrit J.A., Speijers J.M. Health Implications of Exposure to Environmental Nitrogenous Compounds. *Toxicological Reviews*, 2003, vol. 22, iss. 1, pp 41-51.
2. Spagnuolo C., Rinelli P., Coletta M., Chiancone E., Ascoli F., Oxidation reaction of human oxyhemoglobin with nitrite: a reexamination. *Biochim Biophys Acta.*, 1987, vol. 5, no. 911, iss. 1, pp. 59-65.
3. May J.M., Zhi-Chao Qu, Li Xia, Charles E.C. Nitrite uptake and metabolism and oxidant stress in human erythrocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2000, v. 279, no. 6, pp 1946-1954
4. Zavodnik I.B., Lapshina E.A., Rekawiecka K., Zavodnik L.B., Bartosz G., Bryszewska M. Membrane effects of nitrite-induced oxidation of human red blood cells. *Biochim Biophys Acta*, 1999, vol. 15, no. 1421, iss. 2, pp. 306-16.
5. Widmer C.C., Pereira C.P., Gehrig P., Vallelian F., Schoedon G, Buehler P.W, Schaer D.J. Hemoglobin can attenuate hydrogen peroxide-induced oxidative stress by acting as an antioxidative peroxidase. *Antioxid Redox Signal*, 2010, vol. 12, no. 2, pp. 185-98.
6. Uskokovich-Markovich S., Jelich-Stankov M., Holclajtner-Antunovich I., Durdevich P. Raman spectroscopy as a new biochemical diagnostic tool. *J. Med. Biochem*, 2013, vol. 32, no. 2, pp. 96-103.
7. Кэри П. *Применение спектроскопии КР и РКР в биохимии*. М.: Мир, 1985, 272 с. [Cary P. *Application of spectroscopy of the RC and RKC in biochemistry*. Moscow: Mir, 1985, 272 p. (in Russ)]
8. Соловьев К.Н., Гладков Л.Л., Старухин А.С. *Спектроскопия порфиринов: Колебательные состояния*. Минск: Наука и техника, 1985, 415 с. [Soloviev K.N., Gladkov L.L., Starukhin A.S. *Spectroscopy of porphyrins: Oscillatory states*. Minsk: Science and Technology, 1985, 415 p. (in Russ)]
9. Максимов Г.В., Максимова Н.В., Чурие А.А. и др. Исследование изменений конформации порфирина гемоглобина при первичной гипертензии. *Биохимия*, 2001, т. 66, вып. 3, с. 365-370. [Maksimov G.V., Maksimova N.V., Churie A.A. Research of changes in the conformation of porphyrin hemoglobin in primary hypertension. *Biochemistry*, 2001, vol. 66, iss. 3, p. 365-370. (In Russ.)]
10. Winterbourn C.C. Oxidative reactions of hemoglobin. *Methods Enzymol.*, 1990, vol. 186, pp. 265-272.
11. Szebeni J., Winterbourn C. C., Carrell R. W. Oxidative interactions between haemoglobin and membrane lipid. A liposome model. *Biochem. J.*, 1984, vol. 220, no. 3, pp. 685-692.
12. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. *Лаб. Дело*, 1986, no. 12, с. 724-727. [Moin V.M. A simple and specific method for determining the activity of glutathione peroxidase in erythrocytes. *Lab. Delo*, 1986, no. 12, pp. 724-727. (In Russ.)]
13. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы. *Лаб. дело*, 1988, т. 64, № 3, с. 16-17. [Korolyuk M.A. Method for determination of catalase activity. *Lab. Delo*, 1988, т. 64, no. 3, с. 16-17. (In Russ.)]
14. Лакин Г.Ф. *Биометрия*. М.: Высшая школа, 1990, 352 с. [Lakin G.F. *Biometriya*. Moscow, 1990, 352 p. (in Russ.)]
15. Иржак Л.И. *Hb и их свойства*. М.: Наука, 1975, 239 с. [Irjak L.I. *Hb and their properties*. Moscow: Nauka, 1975, 352 с. (In Russ.)]
16. Duke researchers discover central role of Nitric Oxide in hemoglobin action. *Duke Medicine News and Communication*, 2004, vol. 3.
17. Рубан М.К., Вашанов Г.А., Лавриненко И.А. Структурно-функциональные модификации нитрозилированного Hba, индуцированные оксигенацией. *Вестник ВГУ, Серия: Биология. Фармация*, 2010, № 1, с. 56-61. [Ruban M.K, Vashanov G.A, Lavrinenko I.A. Structural and functional modifications of nitrosylated Hba, induced by oxygenation. *Digest VSU, Series: Biology. Pharmacia*, 2010, no. 1, p. 56-61. (In Russ.)]
18. Hobbs A.I., Gladwin M.T., Patel R.P., Williams D.L.H., Butler A.R. Haemoglobin: NO transporter, NO inactivator or NO of the above. *TRENDS in Pharmacological Science*, 2002, vol. 23, p. 406-411.
19. Ramser K, Logg K, Goksör M, Enger J, Käll M, Hanstorp D. Resonance Raman spectroscopy of optically trapped functional erythrocytes. *J Biomed Opt.*, 2004, vol. 9, no. 3, pp. 593-600.
20. Podstawka E, Rajani C, Kincaid JR, Proniewicz LM. Resonance Raman studies of heme structural differences in subunits of deoxyhemoglobin. *Biopolymers*, 2000, vol. 57, no. 4, pp. 201-207.
21. Tsuneshige A, Imai K, Tyuma I. The binding of hemoglobin to red cell membrane lowers its oxygen affinity. *J Biochem.*, 1987, vol. 101, no. 3, pp. 695-704.
22. Kirschner-Zilber I, Setter E, Shaklai N. Association of hemoglobin chains with the cell membrane as a cause of red cell distortion in thalassemia. *Biochem Med Metab Biol.*, 1987, vol. 38, no. 1, no. 19-31.

23. Welbourn E.M, Wilson M.T, Yusof A, Metodiev M.V, Cooper C.E. The mechanism of formation, structure and physiological relevance of covalent hemoglobin attachment to the erythrocyte membrane. *Free Radical Biology and Medicine*, 2017, vol. 103, pp. 95-106.
24. Осипов А. Н., Борисенко Г. Г., Владимиров Ю. А. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротеинов. *Успехи биологической химии*, 2007, т. 47, с. 259-292. [Osipov A.N., Borisenko G.G., Vladimirov Yu. A. Biological role of nitrosyl complexes of hemoproteins. *Uspekhi biologicheskoy khimii*, 2007, vol. 47, p. 259-292. (In Russ.)]
25. Giulivi C, Davies K.J. Hydrogen peroxide-mediated ferrylhemoglobin generation in vitro and in red blood cells. *Methods Enzymol.*, 1994, vol. 231, pp. 490-6.
26. Ansari F.A., Mahmood R. Sodium nitrite enhances generation of reactive oxygen species that decrease antioxidant power and inhibit plasma membrane redox system of human erythrocytes. *Cell Biol Int.*, 2016, vol. 40, vol. 8, pp. 887-894.
27. Montenegro M.F., Pinheiro L.C., Amaral J.H., Marçal D.M., Palei A.C., Costa-Filho A.J., Tanus-Santos J.E. Antihypertensive and antioxidant effects of a single daily dose of sodium nitrite in a model of renovascular hypertension. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 2012, vol. 385, no. 5, no. 509-17.
28. Hogg N., Kalyanaraman B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta.*, 1999, vol. 1411, no. 2-3, pp. 378-384.
29. Violi F., Marino R., Milite M.T., Loffredo L. Nitric oxide and its role in lipid peroxidation. *Diabetes Metab Res Rev.*, 1999, vol. 15, no. 4, pp. 283-288
30. Шугалей И.В., Львов С.Н., Целинский И.В., Баев В.И. Влияние интоксикации нитритом натрия на активность ферментов антиоксидантной защиты и процессы пероксидации в эритроцитах мыши. *Укр. биохим. журнал*, 1992, т. 64, вып. 2, с. 111-114. [Shugaley I.V., Lvov S.N., Tselinsky I.V., Baev V.I. Influence of sodium nitrite intoxication on the activity of antioxidant defense enzymes and peroxidation processes in mouse erythrocytes. *Ukr. biochem. Journal*, 1992, vol. 64, iss. 2, p. 111-114. (In Russ.)]
31. Титов В.Ю., Петренко М.Ю., *Взаимодействие нитрита с каталазой как важный элемент его токсичности. Биохимия*, 2003, т. 68, вып. 6, с. 769-777. [Titov V.Yu., Petrenko M.Yu., Interaction of nitrite with catalase as an important element of its toxicity. *Biochemistry*, 2003, vol. 68, iss. 6, pp. 769-777. (In Russ.)]
32. Titov V.Yu., Osipov A.N. Nitrite and nitroso compounds can serve as specific catalase inhibitors. *Redox Report*, 2017, vol. 22, no. 2, pp. 91-97.
33. Rocha S., Gomes D., Lima M., Bronze-da-Rocha E., Santos-Silva A. Peroxiredoxin 2, glutathione peroxidase, and catalase in the cytosol and membrane of erythrocytes under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress. *Free Radic Res.*, 2015, vol. 49, no. 8, pp. 990-1003.
34. Asahi M., Fujii J., Suzuki K., Seo H.G., Kuzuya T., Hori M., Tada M., Fujii S., Taniguchi N. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity. *J Biol Chem.*, 1995, vol. 270, no. 36, pp. 21035-21039.
35. Гусейнова С.Я., Гулиева Р.Т., Дадашов М.З., Джафаров А.И., Яхьяева Ф.Р., Гусейнов Т.М. Окислительная модификация гемоглобина изолированных эритроцитов в инкубационной среде, содержащей нитрит натрия и селенит натрия. *Вестник Новосибирского государственного педагогического университета*, 2016, т. 5, № 33, с. 207-217. [Huseynova S.Ya., Guliyeva R.T., Dadashov M.Z., Jafarov A.I., Yakhyaeva F.R., Huseynov T.M. Oxidative modification of hemoglobin of isolated erythrocytes in incubation medium containing sodium nitrite and sodium selenite. *Bulletin of the Novosibirsk State Pedagogical University*, 2016, vol. 5, no. 33, pp. 207-217. (In Russ.)]

**OXIDATIVE MODIFICATION OF ERYTHROCYTES MODERATELY DOSES OF SODIUM NITRITE *in vitro* TESTS****Huseynova S.Ya., Huseynov T.M., Dadashov M.Z.**

Institute of Biophysics, NAS of Azerbaijan

Z. Khalilov str., 117, Baku, AZ 1141, Azerbaijan; e-mail: thuseynov@physics.ab.az

**Abstract.** The work explored the influence of moderately chronic doses of NaNO<sub>2</sub> on the oxidative modification of Hb and RBC, changes the activity of catalase, glutathione peroxidase (GP) and the intensity of peroxide oxidation of lipids (LPO). Analysis of the spectral lines of Raman Spectroscopy shows that the ability of the Hb to bind O<sub>2</sub> I1580/I1548 in a suspension of erythrocytes treated with NaNO<sub>2</sub> is significantly higher than control and this effect directly depends on the concentration of NaNO<sub>2</sub> and significant even at the minimum concentrations of NaNO<sub>2</sub> (0,07 mm), and relative ability of Hb to give ligands I1375/I1580 is also dose dependent but in the opposite direction. Manifestations of symmetrical and asymmetrical vibrations of the pyrrole rings of Hb (I1375/I1172) increase with an increasing nitrite dose by ~ 14 %, which indicates the presence of conformational changes in the pyrrole rings associated with the oxidative modification of Hb. MetHb accumulation also dose-depend and reaches its maximum at 30-40 minutes, this is accompanied by the intensification of processes of LPO and the increasing share of membrane bound Hb. It is characteristic that the development of oxidative process is accompanied by a decrease in catalase activity and the activity of GP changes ambiguously and multiple grows with increased NaNO<sub>2</sub> contents. Noting these facts, we can say that the already relatively small concentrations of nitrite of sodium can affect the conformation of Hb, resulting in a change in his affinity for O<sub>2</sub>. This stimulates oxidative modification of Hb, which is reflected in the increasing accumulation of methHb and loss of activities of catalase and GP, and at high concentrations of nitrite to increase the activity of GP.

**Key words:** erythrocytes, hemoglobin, catalase, glutathionperoxidase, LPO, sodium nitrite.