

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Зарипов Павел Ильдарович

**Механизмы редокс-регуляции
при адаптации эритроцитов к стрессовым воздействиям**

Специальность 1.5.2. Биофизика

Специальность 1.5.5. Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена в лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук и на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

**Научные
руководители**

Петрушанко Ирина Юрьевна, кандидат физико-математических наук

Максимов Георгий Владимирович, доктор биологических наук, профессор

**Официальные
оппоненты**

Гайнуллина Дина Камилевна, доктор биологических наук, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных, ведущий научный сотрудник

Козлова Елена Карловна, доктор физико-математических наук, профессор, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), кафедра медицинской и биологической физики, профессор

Ширинский Владимир Павлович, доктор биологических наук, профессор, «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова, лаборатория клеточной подвижности, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории

Защита диссертации состоится «18» июня 2026 г. в 14 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.015.05 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 24, биологический факультет МГУ, кафедра биофизики, ауд. «Новая».

E-mail: fursova@biophys.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3915>

Автореферат разослан « ____ » мая 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук

П.В. Фурсова

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень её разработанности. Эритроциты – самые многочисленные клетки в организме человека, обеспечивающие снабжение всех органов и тканей кислородом (O_2). Нарушение функциональной активности или снижение числа эритроцитов (анемия) приводят к ухудшению качества жизни, развитию вторичных заболеваний и преждевременной смерти.

В норме время жизни эритроцитов составляет в среднем 115 дней [1] и сокращается до 10-20 при патологиях [2]. Их функциональная активность и продолжительность жизни определяются, как ограниченным из-за отсутствия ядра, аппарата Гольджи и рибосом, запасом белков и липидов [1], так и действием внешних стрессовых факторов. Перемещаясь по кровотоку к тканям организма эритроциты попадают в условия дефицита O_2 – гипоксию, которая усиливается при физической активности и в высокогорье [3]; при снижении уровня глюкозы в крови испытывают метаболический стресс [4], а при изменении осмолярности крови – осмотический [5]; проходя по капиллярам и синусам селезенки подвергаются механическому стрессу [6]. Кроме того, в кровотоке эритроциты – основные переносчики бета-амилоидных пептидов, уровень которых повышается при болезни Альцгеймера (БА) [7]. Эти стрессовые воздействия могут вызывать изменения редокс-статуса клеток – изменения соотношения восстановленных и окисленных форм молекул [8]. Нарушение данного баланса запускает развитие окислительного стресса, который подразумевает накопление активных форм кислорода (АФК), таких как супероксид-анион (O_2^{*-}), перекись водорода (H_2O_2) и гидроксил-радикал (OH^{*-}). Окислительное повреждение ограниченного запаса белков и липидов АФК приводит к снижению функциональной активности и преждевременному старению эритроцитов [9].

Основные источники АФК в эритроцитах – это активность NADPH оксидаз и аутоокисление основного белка эритроцитов гемоглобина (Hb) [10], обеспечивающего транспорт O_2 . Основа системы антиоксидантной защиты эритроцитов – трипептид глутатион (GSH) – основной низкомолекулярный тиол клеток [11]. Способность Hb и других белков ковалентно связывать глутатион через образование дисульфидной связи (глутатионилирование) представляет

собой важное звено антиоксидантной защиты эритроцитов, поскольку предотвращает необратимое окисление тиоловых групп белка [9]. Помимо защитной функции, глутатионилирование модулирует активность ряда белков, в частности, повышает сродство Hb к O₂ [12], что оказывает прямое влияние на функциональную активность эритроцитов.

Как меняется редокс-статус эритроцитов, а значит и выполнение их основной функции – доставки O₂ – под действием стрессов до настоящего момента было изучено крайне слабо. Характеристика редокс-статуса эритроцитов, установление механизмов, лежащих в основе адаптации клеток и роли взаимодействия Hb с глутатионом в этих процессах, позволят глубже понять причины нарушения функциональной активности эритроцитов при стрессах и предложить способы их предотвращения. Полученные результаты могут быть использованы в разработке новых подходов для увеличения продолжительности жизни эритроцитов, времени хранения донорской крови и борьбы с такими патологиями, как серповидно-клеточная анемия и БА.

Цель исследования – выявить механизмы редокс-регуляции эритроцитов в норме и при адаптации к физиологическим стрессовым воздействиям.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать редокс-статус эритроцитов, уровень внутриклеточного Ca²⁺ при гипоксии, под действием метаболического, осмотического и механического стресса, при связывании бета-амилоида (Aβ₄₂) и его патогенной изомеризованной по D7 формы (изоAβ₄₂).

2. Определить изменение внутриклеточного уровня Na⁺ и K⁺ в эритроцитах при гипоксии, под действием метаболического и механического стрессов.

3. Оценить степень глутатионилирования Hb в эритроцитах, адаптирующихся к гипоксии, метаболическому, осмотическому и механическому стрессам, действию Aβ₄₂ и изоAβ₄₂.

4. Установить, как взаимодействие с глутатионом влияет на конформацию и функциональные свойства Hb.

Научная новизна. Впервые показано, что взаимодействие Hb с глутатионом и изменение редокс-условий играет важную роль в адаптации эритроцитов к стрессовым воздействиям. Показана способность Hb

депонировать GSH за счет образования нековалентного комплекса. Дана характеристика комплекса и установлена роль комплекса Hb:GSH и глутатионилирования Hb при адаптации эритроцитов к характерным физиологическим стрессовым воздействиям.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты работы развивают современные представления о механизмах редокс-регуляции эритроцитов при их адаптации к различным стрессовым условиям. Показана важная роль глутатионилирования Hb и образования нековалентного комплекса с GSH в адаптации эритроцитов к стрессовым воздействиям. Выявлена функция Hb как депо GSH. Описан механизм роста уровня GSH в эритроцитах при гипоксии, обусловленный конформационным переходом Hb из оксигенированной в деоксигенированную форму. Обнаруженный эффект имеет важное значение в защите эритроцитов от окислительного стресса в тканях организма, где снижен уровень кислорода. Показано влияние метаболического статуса эритроцитов на степень глутатионилирования Hb и, соответственно, сродство Hb к O₂. Обнаружено, что Aβ₄₂ и изоAβ₄₂ являются регуляторами редокс-статуса и газотранспортной функции эритроцитов. Полученные данные необходимы для эффективной борьбы с такими патологиями, как серповидно-клеточная анемия и БА, и могут быть использованы в разработке новых подходов для увеличения времени хранения донорской крови.

Методология и методы исследования. Объектом и предметом исследования являлись адаптация эритроцитов человека к стрессовым воздействиям и механизмы редокс-регуляции эритроцитов в норме и в присутствии стрессовых факторов. В работе применяли современные биофизические, биохимические и биоинформатические методы исследования.

Положения, выносимые на защиту:

1. Комплексная характеристика, включающая параметры, соответствующие размеру (FSC) и форме (SSC) клеток, концентрацию ионов (Ca²⁺, Na⁺, K⁺), редокс-статус (уровни АФК, NO, GSH) и степень глутатионилирования Hb, позволяет оценить влияние физиологических стрессовых воздействий на состояние и функциональную активность эритроцитов и установить механизмы их адаптации.

2. Важное значение в адаптации эритроцитов к гипоксии, метаболическому, осмотическому и механическому стрессам, а также действию $A\beta_{42}$ имеют взаимодействия Hb с глутатионом за счет образования ковалентных (глутатионилирование) и нековалентных связей (образование комплекса), которые изменяют свойства молекулы белка.

3. Взаимодействие Hb с глутатионом регулируется не только окислительным стрессом, но и другими внутри- и внеклеточными факторами, такими как деоксигенация, снижение уровня АТФ, вызванного депривацией по глюкозе, а также связыванием бета-амилоида с поверхностью эритроцитов.

Степень достоверности и апробация результатов. Выводы диссертационной работы обоснованы, прямо вытекают из результатов, полученных с использованием современных экспериментальных методик, достаточных объёмов выборок и подходящих методов статистического анализа. Выводы содержат решения поставленных задач. Апробация работы проведена на заседании кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Результаты работы представлены в устных докладах на международной научной конференции "VII Съезд биофизиков России" (Краснодар, Россия, 2023) и в рамках 27-й Пущинской школы-конференции "Биология – наука XXI века" (Пущино, Россия, 2024). Работа поддержана грантами РНФ №19-14-00374, №19-14-00374-П и министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2024-530 от 24.04.2024 г.). При проведении исследований использовалось оборудование, приобретенное за счет средств ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН.

Личный вклад автора. Автор выполнял основную экспериментальную работу, анализировал результаты, проводил статистическую обработку, представлял результаты на научных конференциях. В работе [1] соискатель проводил экспериментальную работу с образцами суспензии эритроцитов, а именно, оценивал редокс-параметры клеток, уровень Ca^{2+} и содержание GSH (совместно с к.ф.-м.н. Я.В. Ткачевым); определял термодинамические параметры связывания Hb с GSH (совместно с к.ф.-м.н. И.Ю. Петрушанко и Е.В. Мельниковой). В работе [2] автор изучил изменение уровней ионов Na^{+} и K^{+} в образцах эритроцитов. Соискатель также участвовал во всех этапах

экспериментальной работы и написании статей [3] и [4].

Публикации. Основные положения, результаты и выводы диссертации опубликованы в 4 статьях в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальностям 1.5.2. Биофизика и 1.5.5. Физиология человека и животных (биологические науки).

Структура и объём диссертации. Исследование изложено по стандартному плану. Диссертация включает в себя введение, обзор литературы, описание используемых материалов и методов, изложение полученных результатов и их обсуждение, заключение, выводы, список использованной литературы. Материал изложен на 150 страницах, включает 2 таблицы и 55 рисунков. Список литературы содержит 312 источников.

II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы посвящен описанию жизненного цикла, структуры и функций эритроцитов. Особое внимание уделяется строению мембраны, ионным транспортерам, антиоксидантной системе клетки и Hb. Дана характеристика основных стрессовых воздействий, которым подвергаются эритроциты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы эритроцитов получали из цельной крови здоровых доноров в возрасте 18-50 лет. Эритроциты отмывали и ресуспендировали в буфере, имитирующем плазму крови.

Моделирование стрессовых воздействий. Деоксигенацию проводили в гипоксической станции при 1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂ в течение 3 ч. Метаболический стресс моделировали, инкубируя эритроциты в безглюкозной среде в течение 24 ч. Осмотический стресс инициировали, снижая осмолярность среды с 330 до 250 мОсм/л на 1 мин или 24 ч. Механический стресс моделировали пропуская эритроциты через фильтр с диаметром пор 1.2 мкм при центрифугировании с ускорением 400 или 1500g. Aβ₄₂ или изоAβ₄₂ инкубировали с эритроцитами в

концентрации 0.1 или 1 мкМ в течение 90 мин.

Визуализацию морфологических изменений проводили при помощи автоматического клеточного анализатора JuLI Stage.

Методом проточной цитофлуориметрии оценивали изменение морфологии эритроцитов по параметрам малоуглового (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния; уровень связанных бета-амилоидов при помощи специфических антител к A β ₄₂; состояние гликокаликса по связыванию лектина; а также внутриклеточные уровни АФК, восстановленных тиолов, NO и Ca²⁺ при помощи флуоресцентных красителей DHR-123, mBBr, DAF-FM и Fluo-4, соответственно.

Уровень GSH в эритроцитах определяли при помощи реактива Элмана и методом ядерного магнитного резонанса совместно с к.ф.-м.н. Я.В. Ткачевым.

Методом атомно-абсорбционной спектроскопии измеряли внутриклеточные концентрации Na⁺ и K⁺ совместно с к.б.н. С.В. Сидоренко.

Концентрацию АТФ определяли при помощи набора ATP Assay Kit.

Количество тотального белка в образцах оценивали по поглощению при 562 нм при помощи бицинониновой кислоты.

Методом иммуноблоттинга оценивали глутатионилирование Hb. Белки разделяли по методу Лэммли и проводили электроперенос на поливинилиденфторидную мембрану, блокировали в 5% р-ре обезжиренного молока, после чего обрабатывали антителами. Визуализацию комплексов антиген-антитело проводили с помощью хемилюминесценции.

Значение параметра р50, характеризующего сродство Hb к O₂, измерила проф. А.Ю. Богданова.

Изотермическую калориметрию титрования использовали для определения параметров связывания окси и деоксиформы Hb с GSH совместно с к.ф.-м.н. И.Ю. Петрушанко и Е.В. Мельниковой.

Спектроскопию комбинационного рассеяния (КР) применяли для оценки конформационного состояния гема Hb при глутатионилировании и образовании комплекса Hb:GSH совместно с к.б.н. Е.Ю. Паршиной.

Инфракрасные спектры (ИК) образцов регистрировали для оценки изменения вторичной структуры Hb при глутатионилировании и образовании комплекса Hb:GSH.

Статистический анализ. Нормальность распределения данных определяли по критериям Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Достоверность различий между двумя группами оценивали парным *t*-критерием Стьюдента и *W*-критерием Уилкоксона для зависимых выборок. Достоверности различий между тремя и более группами определяли однофакторным дисперсионным анализом (ANOVA) для зависимых выборок с тестом Тьюки и критерием Фридмана с тестом Данна. Достоверность различий между тремя независимыми группами оценивали с помощью ANOVA и теста Тамхейна T2.

Данные молекулярного моделирования расположения цистеиновых остатков в молекуле окси- и деоксиформ Hb предоставлены Ю.М. Полуэктовым.

Данные молекулярного докинга комплекса Hb:GSH предоставлены к.ф.-м.н. А.А. Анашкиной.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Адаптация эритроцитов к деоксигенации

В артериальной крови содержание O₂ соответствует парциальному давлению (*p*O₂) около 12-15 кПа. В тканях снижается до 3-6 кПа, опускаясь еще ниже при недостатке O₂ в воздухе и патологиях [3]. В качестве модели гипоксии нами выбрано *p*O₂ 1 кПа, что соответствует 1% O₂ при атмосферном давлении.

Через 3 ч. инкубации в гипоксии в эритроцитах на 90%, возрастает уровень Ca²⁺ (рис. 1а). Это может способствовать высвобождению O₂ в тканях организма, поскольку ранее было показано [13], что при увеличении внутриклеточного Ca²⁺ снижается сродство Hb к O₂. Наблюдается рост внутриклеточного NO (рис. 1б), который согласно литературным данным [14] увеличивает деформабельность эритроцитов, что улучшает кровоснабжение тканей, за счет увеличения гемодинамики. Содержание АФК в эритроцитах не меняется (рис. 1в), что указывает на отсутствие окислительного стресса. Наш эксперимент на изолированных эритроцитах показал, что в условиях гипоксии эритроциты не являются источником АФК. Уровень тиолов, представленных, преимущественно, GSH, в клетках увеличивается (рис. 1г). Содержание GSH в эритроцитах, оцененное с помощью реактива Элмана (рис. 1д) и методом ЯМР (рис. 1е) также возрастает. Рост GSH не связан с восстановлением пула GSSG и

синтезом *de novo*, о чем свидетельствуют результаты с использованием ингибитора синтеза GSH. Иммуноблотинг показал, что рост уровня GSH также не связан с деглутатионированием Hb.

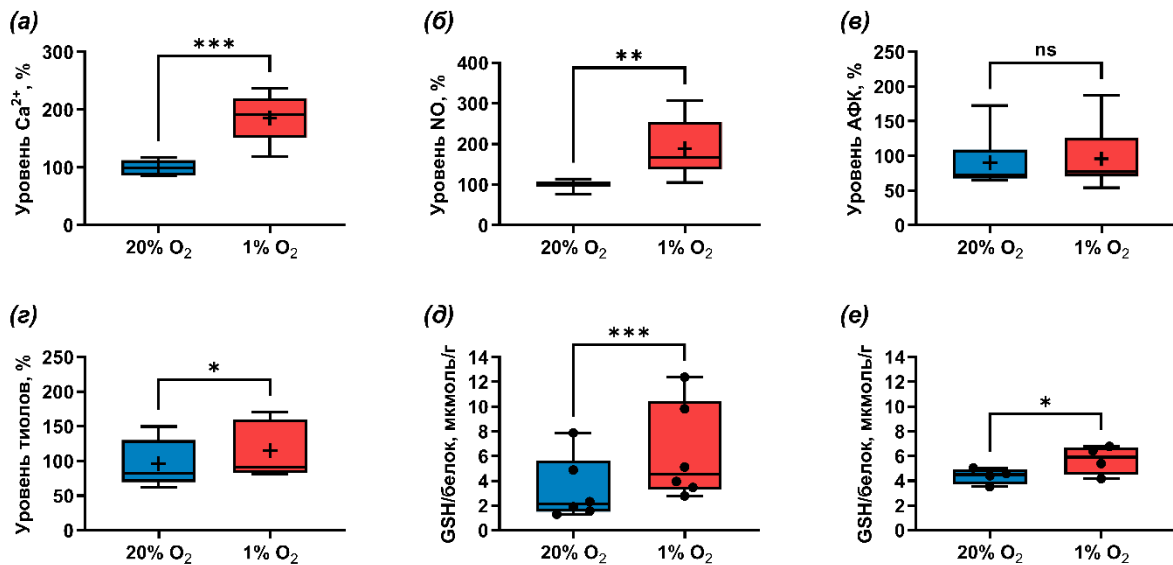


Рисунок – 1. Уровни (а) Ca²⁺, (б) NO, (в) АФК, (г) восстановленных тиолов и уровни GSH измеренные (д) при помощи реактива Элмана и (е) методом ЯМР в эритроцитах через 3 ч. инкубации в условиях нормоксии (20% O₂) и гипоксии (1% O₂). За 100% принято значение исследуемых параметров в нормоксии (20% O₂). Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса в ящике, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, n = 4-6. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Методом изотермической калориметрии титрования показано, что как оксиформа Hb (oxyHb), так и деоксиформа Hb (deoxyHb) способны связывать GSH, однако стехиометрии связывания (N) для двух форм отличаются (табл. 1). Оксигенированная форма Hb способна связывать четыре молекулы GSH, а деоксигенированная форма только две (табл. 1). Использование в эксперименте Hb с восстановленными тиоловыми группами и GSH исключает образование ковалентной S-S связи между Hb и GSH. Сродство deoxyHb к GSH (K_d = 17.0 мкМ) заметно ниже, чем у oxyHb (K_d = 2.1 мкМ). В энергию связывания (табл. 1) основной вклад вносит энтропийная составляющая (-TΔS), что указывает на преобладание гидрофобных взаимодействий между GSH и Hb. При помощи молекулярного докинга показано расположение двух пар сайтов связывания GSH в молекуле oxyHb (рис. 2).

Таблица – 1. Термодинамические параметры связывания GSH с оксиформой Hb и деоксиформой Hb.

	N	K_a , моль/л ⁻¹	K_d , мкмоль/л	ΔH , ккал/моль	$(-T\Delta S)$, ккал/моль	ΔG , ккал/моль
oxyHb	4.1	4.80×10^{-5}	2.1	-0.13	-7.63	-7.76
deoxyHb	2.4	0.59×10^{-5}	17.0	-0.23	-6.28	-6.51

Измерения проведены при 25°C. N – стехиометрия; K_a – константа связывания, стандартное отклонение не превышает $\pm 20\%$; K_d – константа диссоциации, рассчитана как $K_d = 1/K_a$; ΔH – изменение энтальпии, стандартное отклонение не превышает $\pm 10\%$; $-T\Delta S$ – изменение энтропии, стандартное отклонение не превышает $\pm 10\%$; ΔG – энергия Гиббса.

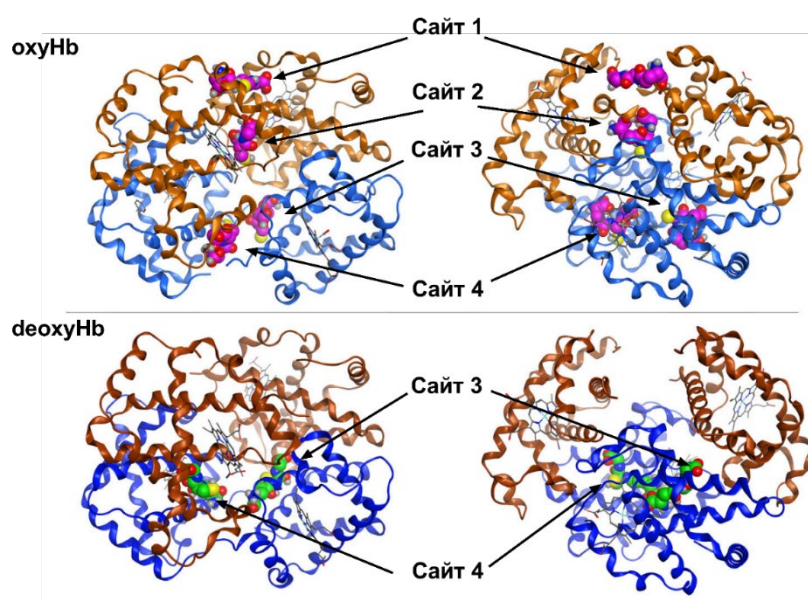


Рисунок – 2. Нековалентный комплекс Hb с GSH. Сверху – оксиформа Hb, вид спереди и сбоку. Снизу – деоксиформа Hb, вид спереди и сбоку. α -субъединицы обозначены синим цветом, β -субъединицы – коричневым цветом. Сайты связывания GSH отмечены стрелочками. Модель докинга получена при помощи Vina autodock docking. Изображение А.А. Анашкиной.

Первая пара расположена на границе между β -глобинами (сайты 1 и 2), вторая – между α -глобинами (сайты 3 и 4). В деоксиформе Hb участки связывания, расположенные между двумя β -глобинами, изменяются, высвобождая две молекулы GSH (рис. 2). Таким образом, рост уровня GSH при гипоксии обусловлен диссоциацией GSH из нековалентного комплекса при конформационном переходе oxyHb в deoxyHb.

При циркуляции эритроциты регулярно попадают в условия недостатка O_2 , перемещаясь по капиллярам, расположенным в тканях. Концентрация Hb в зрелом эритроците приближается к 5.5 мМ, что, в соответствии с обнаруженным механизмом, позволяет при деоксигенации высвободить значительный пул GSH без дополнительных энергетических затрат. Выход GSH из комплекса с deoxyHb может обеспечивать усиленную антиоксидантную защиту эритроцитов от АФК, возникающих в митохондриях гипоксических тканей [3].

2. Адаптация эритроцитов к метаболическому стрессу

Снижение уровня глюкозы в крови ниже 3.9 мМ считается состоянием гипогликемии. Эритроциты не имеют митохондрий и поэтому сильно зависят от уровня глюкозы в среде [4]. Гликолиз – основной источник АТФ для эритроцитов. С помощью депривации по глюкозе мы моделировали метаболический стресс.

Инкубация эритроцитов в безглюкозной среде в течение 24 ч. приводит к существенному снижению уровня АТФ в клетках – на 47% относительно контроля. При этом на 40% увеличивается среднее значение FSC, что указывает на увеличение размера эритроцитов. Это сопровождается возрастанием внутриклеточного Na^+ на 130% (рис. 3а). Na^+/K^+ -АТФаза – единственный транспортер ионов Na^+ против градиента концентрации, представленный в мембране эритроцитов. Таким образом, увеличение размера клеток связано с увеличением содержания Na^+ , что обусловлено снижением активности Na^+/K^+ -АТФазы вследствие недостатка АТФ. Через 24 ч. дефицита глюкозы уровни Ca^{2+} и АФК в эритроцитах не меняются (рис. 3в, д), содержание NO снижается на 20% (рис. 3г), а уровень тиолов (преимущественно GSH) на 42% (рис. 3е). Это обусловлено как недостатком NADPH, необходимого для восстановления GSSG глутатионредуктазой и синтеза NO, так и нарушением синтеза GSH, вызванного дефицитом АТФ.

Снижение GSH и NADPH благоприятно для глутатионилирования клеточных белков, что подтверждают результаты иммуноблот-анализа (рис. 4). 24-часовой метаболический стресс увеличивает степень глутатионилирования Hb на 70% (рис. 4в). Таким образом, метаболический стресс, индуцированный депривацией по глюкозе, приводит к снижению уровня АТФ и GSH, что,

несмотря на отсутствие окислительного стресса, индуцирует глутатионирование Hb.

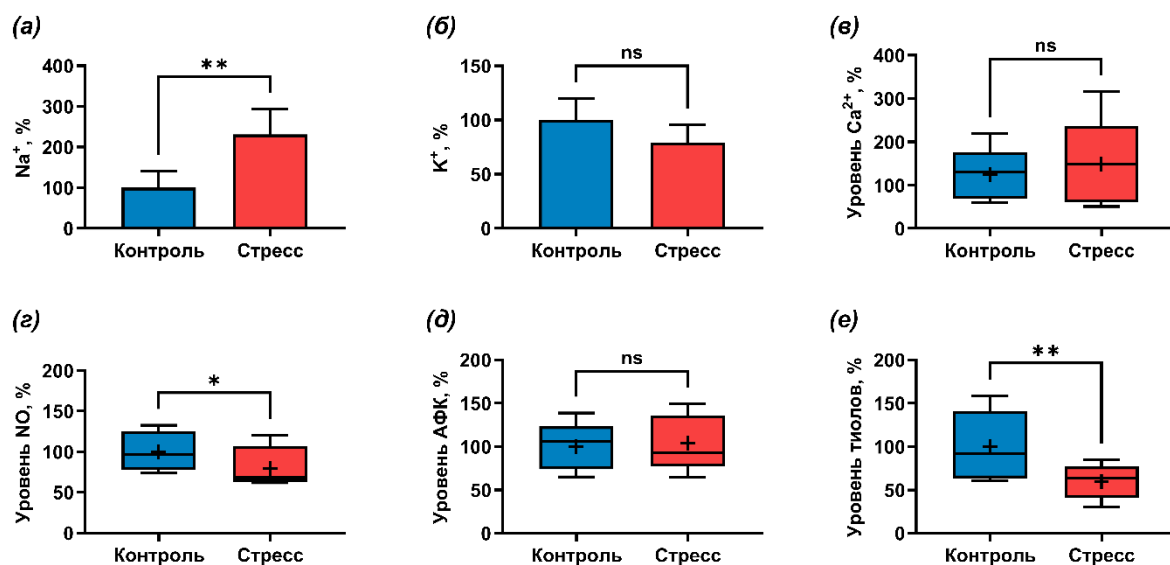


Рисунок – 3. Уровни (а) Na⁺, (б) K⁺, (в) Ca²⁺, (г) NO, (д) АФК, и (е) восстановленных тиолов в эритроцитах через 24 ч. инкубации в среде с глюкозой (контроль) и в безглюкозной среде (стресс). За 100% принято значение исследуемых параметров в контроле. Для (а) и (б) данные представлены как среднее ± SD, *n* = 3. Для (в), (г), (д), (е) данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса в ящике, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, *n* = 3-5. **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

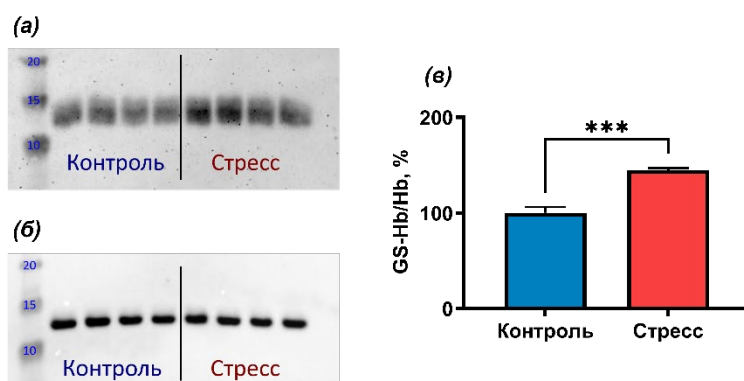


Рисунок – 4. Степень глутатионирования Hb через 24 ч. инкубации эритроцитов в среде с глюкозой (контроль) и в безглюкозной среде (стресс). Иммуноблоттинг с антителами против (а) глутатионированного белка и (б) α-субъединицы Hb. Представлена одна пара характерных мембран из трех. (в) количественный анализ. За 100% принят уровень глутатионирования Hb в эритроцитах, инкубированных в присутствии глюкозы (контроль). Данные представлены как среднее ± SD. ****p* < 0.001.

3. Адаптация эритроцитов к осмотическому стрессу

Тест на осмотическую резистентность эритроцитов используется для оценки их деформабельности и устойчивости к гемолизу. В организме в гипоосмотические условия эритроциты попадают при гипонатриемии [5], поскольку ионы Na^+ обеспечивают около 90% внеклеточной осмолярности.

Снижение осмолярности до 250 мОсм/л в течение 1 мин не влияет на значение параметра FSC (рис. 5а), но снижает параметр SSC (рис. 5б), в среднем на 15%. Через 24 ч. инкубации значение FSC (рис. 5в), по-прежнему, не меняется, а параметр SSC также снижен. (рис. 5г).

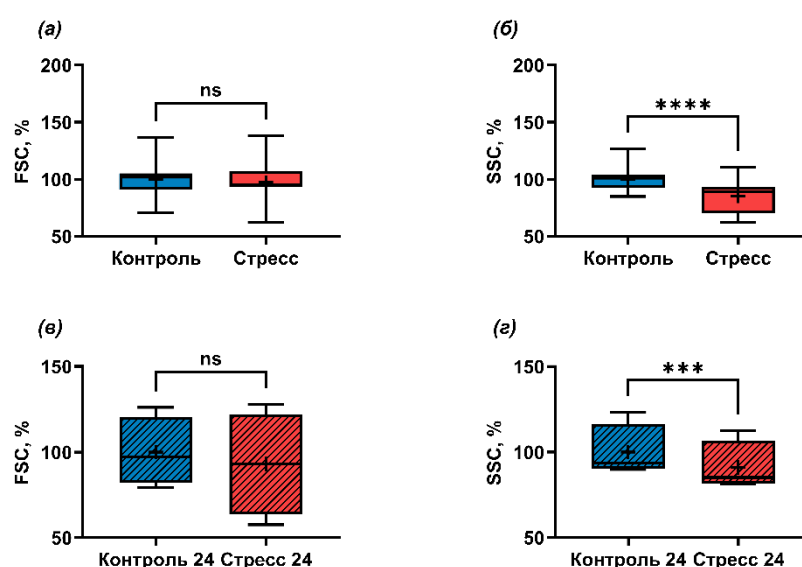


Рисунок – 5. Изменение параметров (а, в) малоуглового (FSC) и (б, г) бокового (SSC) светорассеяния в эритроцитах в покое (контроль) и после (а, б) краткого (1 мин) гипоосмотического воздействия (стресс), и (в, г) через 24 ч. инкубации в покое (контроль 24) и в условиях гипоосмотического воздействия (стресс 24). За 100% принято значение исследуемых параметров в покое. Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса в ящике, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, $n = 20$. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Уменьшение SSC происходит вследствие "сглаживания" рельефа поверхности клеток при переходе из дискоцитов в сфероциты. Эритроциты сильно увеличиваются в объеме уже через 5 с после снижения осмолярности среды, что хорошо видно по отсутствию центрального углубления. В течение первой минуты клетки постепенно адаптируются к новым условиям и, через 60 с, приобретают вид разбухших дискоцитов. Через 24 ч. инкубации большинство

клеток имеет вид сфероцитов. При краткосрочном (1 мин) гипоосмотическом стрессе на 28% увеличивается содержание внутриклеточного Ca^{2+} (рис. 6а). Быстрый вход ионов Ca^{2+} обеспечивает восстановление объема эритроцитов при гипоосмотическом воздействии, что и наблюдается в течение первой минуты после индукции стресса. Через 24 ч. внутриклеточный Ca^{2+} в эритроцитах изотоническом (контроль) и гипотоническом (стресс) буфере не отличается (рис. 6д). Уровни АФК и NO ни при кратком (рис. 6б, в), ни при длительном (рис. 6е, ж) гипоосмотическом стрессе не меняется. Содержание тиолов (преимущественно GSH) возрастает на 26% уже при краткосрочном (1 мин) гипоосмотическом шоке (рис. 6з), и остается повышенным (на 12%) через 24 ч. инкубации (рис. 6з).

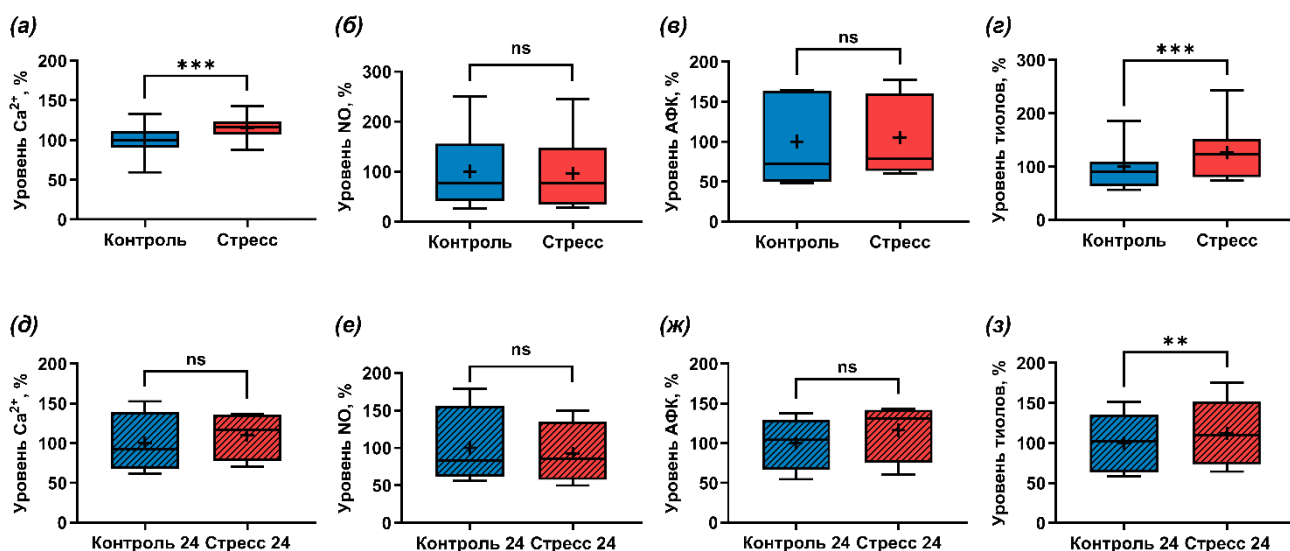


Рисунок – 6. Уровни (а) Ca^{2+} , (б) NO, (в) АФК и (г) восстановленных тиолов в эритроцитах в покое (контроль) и после краткого (1 мин) гипоосмотического воздействия (стресс); и уровни (д) Ca^{2+} , (е) NO, (ж) АФК и (з) восстановленных тиолов через 24 ч. инкубации в покое (контроль 24) и в условиях гипоосмотического воздействия (стресс 24). За 100% принято значение исследуемых параметров в покое. Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса в ящике, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, $n = 5-20$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

При этом острый (1 мин.) гипоосмотический стресс приводит к росту глутатионилирования Hb на 30%, которое возвращается к контрольным значениям через 24 часа инкубации. Следовательно, рост GSH не связан с

деглутатионированием Hb. На основании анализа литературных данных и обнаруженного нами нековалентного комплекса Hb с GSH можно предположить, что гипоосмотическое воздействие, приводя к изменению морфологии эритроцитов индуцирует конформационный переход части молекул Hb, что может приводить к выходу GSH из комплекса с Hb.

Таким образом, быстрый ответ эритроцитов на гипоосмотическое воздействие включает в себя не только возрастание ионов Ca^{2+} , но и одновременный рост уровня GSH с глутатионированием Hb. После длительного периода адаптации данные редокс-параметры приближаются к контрольным значениям, однако морфология клеток остаётся измененной.

4. Адаптация эритроцитов к механическому стрессу

Механическому стрессу эритроциты подвергаются при прохождении через синусы селезенки и капилляры [6]. В модели механического стресса эритроциты проходили через фильтр с диаметром пор 1.2 мкм при центрифугировании с ускорением 400 и 1500 g.

Центрифугирование в отсутствие фильтра приводит к увеличению параметра FSC, и не влияет на уровни Na^+ и K^+ в эритроцитах. Механический стресс приводит к возрастанию параметра SSC, что указывает на изменение формы эритроцитов. Это сопровождается снижением внутриклеточного K^+ . Снижение K^+ хорошо согласуется с ростом Ca^{2+} после механического стресса (рис. 7а, д). Падение K^+ на фоне увеличения внутриклеточного Ca^{2+} указывает на работу каналов Гардоса (KCNN4) [6]. Эти Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы обеспечивают выход K^+ , Cl^- и воды, регулируя объем и морфологию эритроцитов. При центрифугировании рост Ca^{2+} менее выраженный (рис. 7а, д), недостаточный для того, чтобы вызвать снижение уровня K^+ и рост SSC. Увеличение NO при механическом стрессе (рис. 7б, е), вероятно, вызвано ростом Ca^{2+} и также не наблюдается при центрифугировании. Рост уровня GSH наблюдается только после механического стресса (рис. 7г, з), в то время как рост уровня АФК детектируется, как после центрифугирования, так и после механического стресса (рис. 7в, ж). Рост АФК может свидетельствовать о развитии окислительного стресса в клетках. Это способствует росту степени глутатионирования Hb, которое мы наблюдаем во всех исследованных

группах. При центрифугировании мы наблюдаем классическую картину развития окислительного стресса – снижение уровня GSH (рис. 7г, з) вследствие взаимодействия с возросшими АФК (рис. 7в, ж) и окисленными до SOH тиоловыми группами белков, что приводит к глутатионилированию белков.

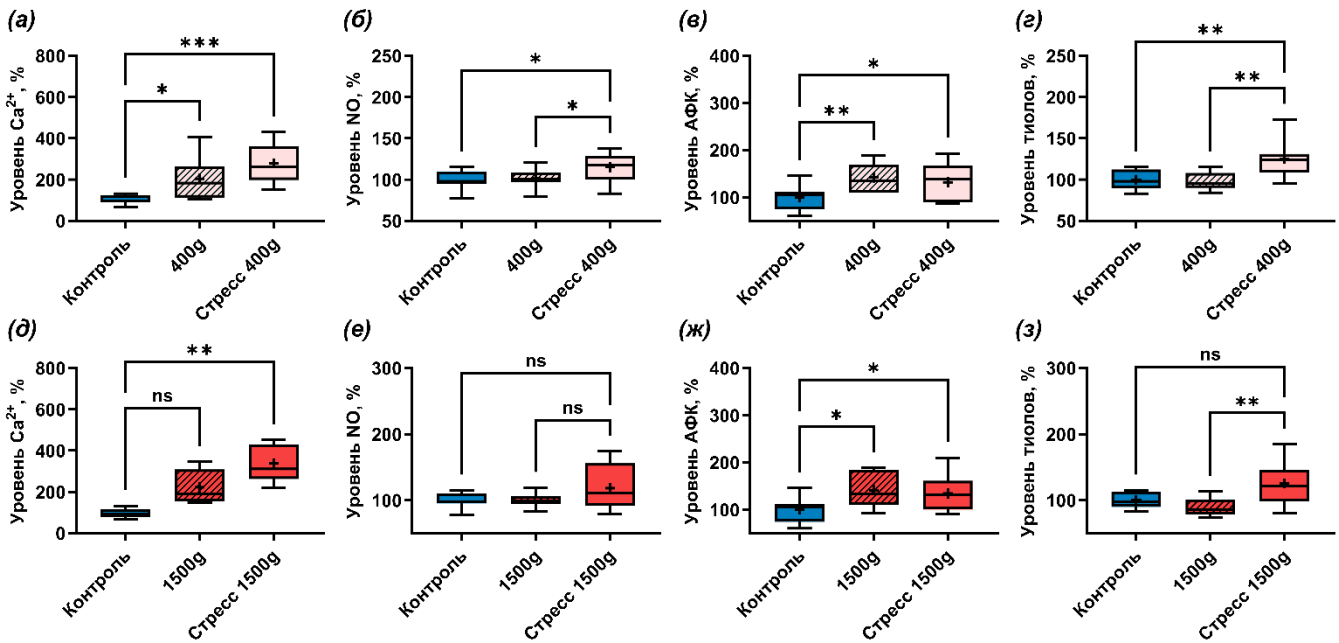


Рисунок – 7. Уровни (а, д) Ca²⁺, (б, е) NO, (в, ж) АФК и (г, з) восстановленных тиолов в эритроцитах в покое (контроль), после центрифугирования и после прохождения через фильтр (стресс) при ускорениях 400 g (а, б, в, г) и 1500 g (д, е, ж, з). За 100% принято значение исследуемых параметров в покое. Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса в ящике, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, $n = 6$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.01$.

В группе после механического стресса, как и в случае краткого гипоосмотического воздействия, процесс глутатионилирования Hb происходит на фоне роста GSH. Оба эффекта имеют важное адаптационное значение. Из литературы известно, что GSH снижает долю метгемоглобина (metHb), а глутатионилирование препятствует прикреплению metHb к ПМ клетки. Это позволяет поддерживать необходимую деформабельность мембраны эритроцитов. Как мы отмечали выше, по-видимому, рост уровня GSH при механическом и кратком гипоосмотическом воздействиях обусловлен его выходом из нековалентного комплекса с Hb. Из данных литературы [15] известно, что сжатие, растяжение, любая локальная механическая деформация

мембраны эритроцитов, способствуют частичному конформационному R→T переходу Hb. Согласно данным наших экспериментов высвобождение GSH происходит при изменении морфологии эритроцитов, что демонстрируют изменения параметра SSC при гипоосмотическом (рис. 5б) и механическом воздействиях на эритроциты. Непосредственный механизм, обеспечивающий изменение конформации Hb при механической деформации мембраны пока не ясен. Это перспективное направление для дальнейших исследований.

Таким образом, как центрифугирование, так и прохождение через фильтр вызывают окислительный стресс и глутатионилирование гемоглобина, однако только в случае деформации эритроцитов при прохождении через фильтр наблюдается возрастание GSH и кальций-зависимый рост K^+ и NO.

5. Адаптация эритроцитов к действию бета-амилоидов

Известно, что эритроциты – основной переносчик бета-амилоидов в кровотоке. Уровень амилоида на эритроцитах растет с возрастом и в случае развития БА [7]. У пациентов с БА и мышей с моделью БА отмечается снижение оксигенации крови, причина которой не ясна.

Установлено, что инкубация с 0.1 и 1 мкМ $A\beta_{42}$ или его патогенной изомеризованной формой $isoA\beta_{42}$ увеличивает содержание $A\beta$ на поверхности эритроцитов (рис. 8а, б) и долю эритроцитов с высоким уровнем $A\beta$ (рис. 8г, д). Истощение гликокаликса за счет удаления сиаловых кислот (рис. 8е) усиливает эти эффекты (рис. 8). Можно предположить, что истощение гликокаликса с возрастом или вследствие различных заболеваний будет влиять на уровень связанного с эритроцитами $A\beta$ и является фактором риска развития БА. Согласно данным иммуноферментного анализа (рис. 8в) $A\beta_{42}$ и $isoA\beta_{42}$ связываются с поверхностью эритроцитов с близким сродством (K_d 0.99 ± 0.22 и 1.01 ± 0.36 мкМ, соответственно). Инкубации эритроцитов с 0.1 и 1 мкМ бета-амилоидов приводит к увеличению количества пептидов на поверхности клеток в несколько раз относительно контрольных значений. Связывание $A\beta_{42}$ и $isoA\beta_{42}$ с эритроцитами не влияет на параметр FSC, но приводит к снижению параметра SSC, что указывает на изменение формы клеток. Это хорошо согласуется с данными об увеличении количества вытянутых эритроцитов у пациентов с БА. При этом мы не обнаружили изменения уровня внутриклеточного Ca^{2+} .

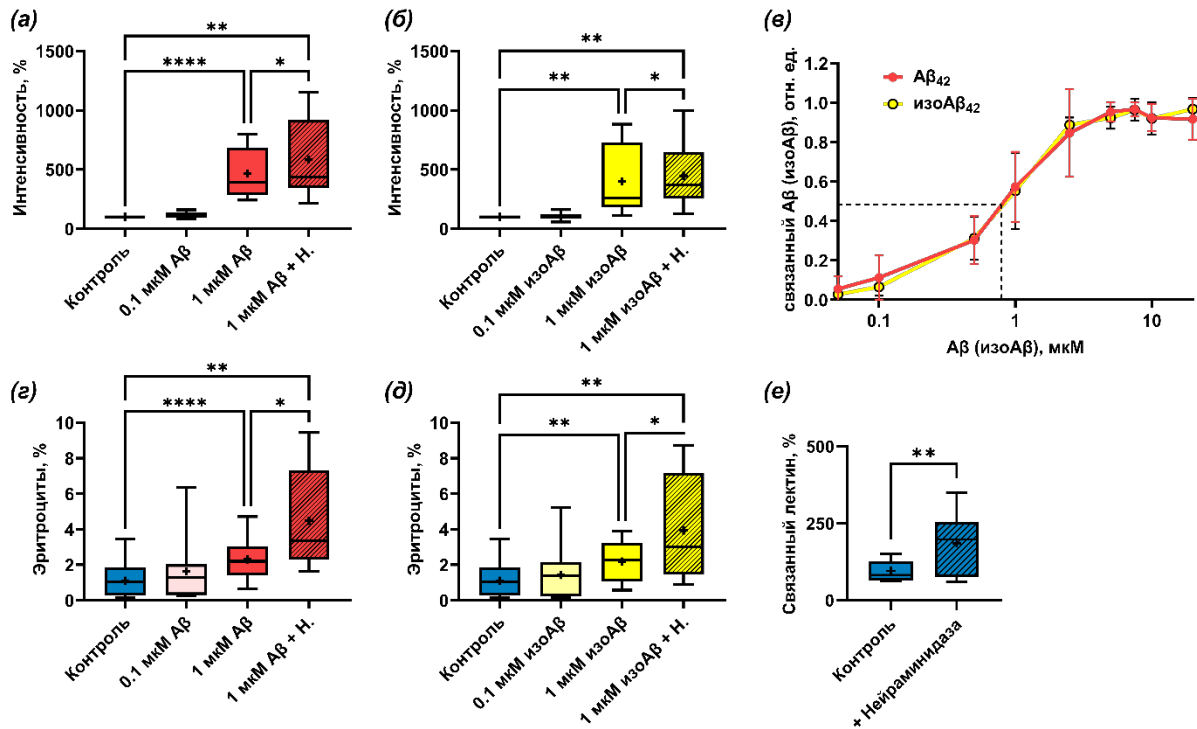


Рисунок – 8. Средняя интенсивность флуоресценции антител к бета-амилоиду (а) после инкубации с 0.1 или 1 мкМ Аβ₄₂ и преинкубации с нейраминидазой (+ N); и (б) после инкубации с 0.1 или 1 мкМ изоАβ₄₂ и преинкубации с нейраминидазой (+ N). (в) дозозависимость связывания Аβ₄₂ (красный) и изоАβ₄₂ (желтый) с поверхностью эритроцитов. Процент эритроцитов с высокой интенсивностью флуоресценции антител к амилоиду (г) после инкубации с 0.1 или 1 мкМ Аβ₄₂ и преинкубации с нейраминидазой (+ N); и (д) после инкубации с 0.1 или 1 мкМ изоАβ₄₂ и преинкубации с нейраминидазой (+ N). (е) оценка состояния гликокаликса после обработки нейраминидазой. Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса в ящике, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, $n = 12$. Для (в) каждый набор данных был нормирован на свое максимальное значение. Данные представлены как среднее \pm SD, $n = 4$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Аβ₄₂ и изоАβ₄₂ влияют на редокс-статус эритроцитов. Уже в концентрации 0.1 мкМ действие Аβ₄₂ и изоАβ₄₂ приводит к существенному снижению уровня АФК (рис. 9а, б). Основные источники АФК в эритроцитах это Нв и NADPH-оксидазы. В присутствии ингибитора NADPH-оксидаз хлорида дифенилениодиния (DPI) уровень АФК в эритроцитах снижается более чем на 25% (рис. 9в). При этом, DPI полностью нивелирует эффекты, вызванные Аβ₄₂ и изоАβ₄₂ (рис. 9г, д). Следовательно, снижение АФК в эритроцитах связано с

подавлением работы мембранных NADPH-оксидаз Аβ. Падение АФК приводит к снижению сродства Hb к O₂, и, таким образом, может быть причиной понижения уровня оксигенации крови при БА. Об этом свидетельствует увеличение параметра p50 Hb (pO₂ необходимого для насыщения 50% Hb O₂) после инкубации с Aβ₄₂ и изоAβ₄₂, отсутствующее при добавлении DPI к контрольным и экспериментальным образцам.

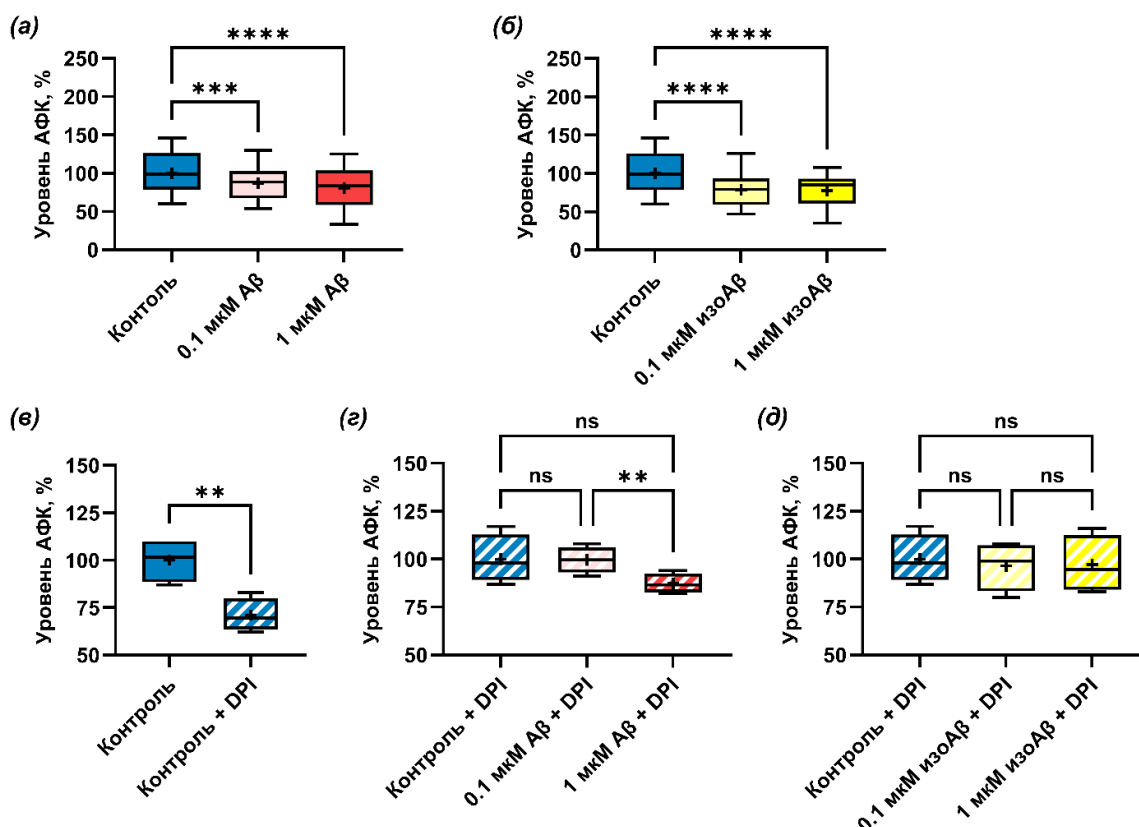


Рисунок – 9. Уровни АФК в эритроцитах в покое (контроль), (а) после инкубации с 0.1 или 1 мкМ Аβ₄₂; (б) после инкубации с 0.1 или 1 мкМ изоАβ₄₂; (в) после преинкубации с DPI; (г) после преинкубации с DPI и инкубации с 0.1 или 1 мкМ Аβ₄₂; (д) после преинкубации с DPI и инкубации с 0.1 или 1 мкМ изоАβ₄₂. За 100% принято значение исследуемых параметров в покое. Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса в ящике, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, $n = 4-12$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Снижение АФК сопровождается ростом GSH при инкубации с Аβ, при этом общий уровень тиолов в клетке не меняется. Рост GSH хорошо согласуется со снижением внутриклеточного содержания АФК и свидетельствует о

снижении уровня окислительного стресса под действием $A\beta$. Действие $isoA\beta_{42}$ также снижает уровень внутриклеточного NO. Накопление $isoA\beta_{42}$ на эритроцитах, вероятно, будет нарушать синтез NO, что снизит их деформабельность и, соответственно, гемодинамику в сосудах.

Снижение степени глутатионилирования Hb происходит под действием $A\beta_{42}$, но не наблюдается при инкубации клеток с $isoA\beta_{42}$. В случае $A\beta_{42}$ снижение глутатионилирования Hb соответствует падению АФК и повышению уровня GSH. Однако $isoA\beta_{42}$, снижая АФК (рис. 9б), никак не влияет на уровень глутатионилирования. Мы полагаем, что этот эффект может быть связан с ингибированием синтеза NO $isoA\beta_{42}$. Поскольку нитрозилирование Hb, способного конкурировать за тиолы с глутатионилированием белка, не происходит, уровень глутатионилирования, несмотря на снижение АФК, в присутствии $isoA\beta_{42}$ не меняется. Глутатионилирование повышает сродство Hb к O_2 более чем в 6 раз [12], поэтому снижение степени глутатионилирования под действием $A\beta$ может быть одной из причин понижения уровня оксигенации тканей при БА.

6. Изменение конформации гемоглобина при ковалентном и нековалентном взаимодействии с глутатионом

В следующей серии экспериментов исследовали изменения конформации гема и глобина. На рис. 10 представлены КР- и ИК-спектры растворов гемоглобина (Hb), глутатионилированного гемоглобина (Hb-SSG) и нековалентного комплекса гемоглобина с глутатионом (Hb:GSH).

В КР спектрах Hb-SSG и Hb:GSH снижается величина соотношения характерных полос I_{1375}/I_{1172} относительно контроля (рис. 10а), что указывает на увеличение подвижности гема. В КР-спектре Hb:GSH снижена интенсивность полосы 1585 см^{-1} , вклад которой обусловлен асимметричным колебаниям метиновых "мостиков", что, вероятно, говорит о снижении способности Hb в комплексе с GSH высвобождать лиганды. Кроме того, так как пик с максимумом в полосе 1563 см^{-1} , характерный для спектра $oxyHb$, выражен только в спектре Hb:GSH (рис. 10а). то, вероятно при образовании нековалентного комплекса увеличивается сродство Hb к O_2 . При использовании другого лазера (возбуждение с $\lambda\ 633\text{ нм}$) в КР-спектре Hb:GSH амплитуда полосы 665 см^{-1} была

меньше, чем в спектрах Hb и Hb-SSG (рис. 10б), вероятно, вследствие разрыхления третичной структуры глобина при образовании комплекса. Кроме того, в спектре Hb:GSH увеличено соотношение I_{975}/I_{998} , что указывает на изменение конформации гема в области боковых радикалов (рис. 10б).

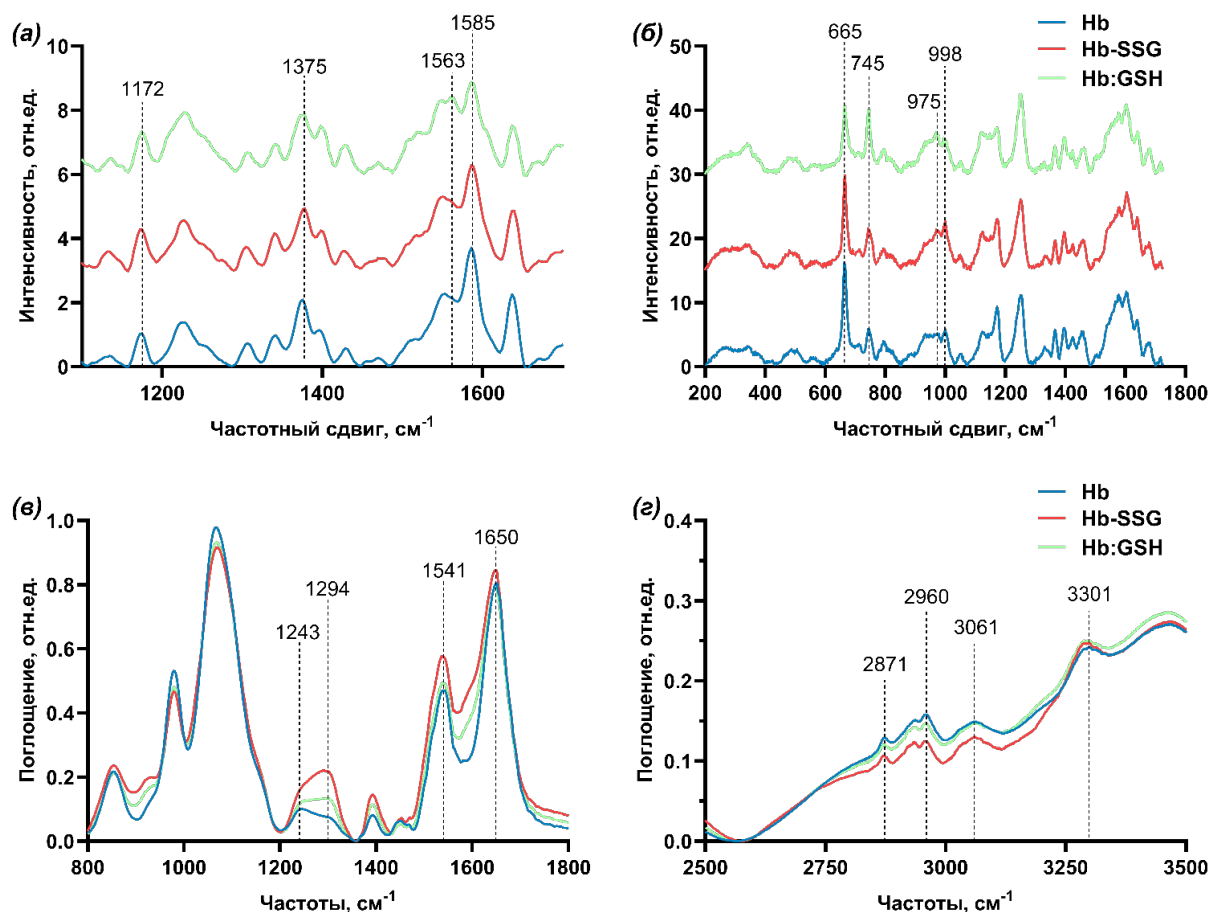


Рисунок – 10. Спектры КР, полученные при возбуждении (а) лазером 532 нм и (б) лазером 633 нм; и участки (а) 800-1800 см и (б) 2500-3500 см⁻¹ усредненных спектров ИК Hb (синий), глутатионилированного Hb (Hb-SSG, красный) и нековалентного комплекса Hb с GSH (Hb:GSH, зеленый). Для наглядности КР спектры Hb-SSG и Hb:GSH подняты по оси ординат, $n = 6-12$.

В ИК-спектре Hb-SSG отношение пиков I_{1650}/I_{1541} снижается (рис. 10в), что свидетельствует о снижении доли α -спиралей во вторичной структуре белка. В спектрах Hb-SSG и Hb:GSH смещается максимум области амид III с 1243 см⁻¹ к 1294 см⁻¹ (рис. 10в). Такое смещение может указывать на увеличение доли β - и неупорядоченных структур, что подтверждает анализ области 2500-3500 см⁻¹ ИК-спектра (рис. 10г). В спектре Hb-SSG из-за снижения амплитуды I_{3061} увеличивается соотношение I_{3301}/I_{3061} (рис. 10г). Вероятно, при

глутатионилировании уменьшается количество внутримолекулярных водородных связей, что способствует увеличению доли неупорядоченной структуры. В случае Hb-SSG выявлено снижение I_{2960}/I_{2871} , характеризующее отношение ассиметричных и симметричных колебаний растяжения C-H связей СН₃ групп, что, вероятно, говорит о снижении доли α -спиралей и увеличении представленности β -структур при глутатионилировании.

Таким образом, глутатионилирование Hb меняет вторичную структуру глобина, снижая долю α -спиралей, но мало влияет на окружение гема. При образовании нековалентного комплекса Hb с GSH вторичная структура остается практически неизменной, а конформация порфиринового макроцикла меняется, что приводит к снижению способности гема Hb в комплексе с GSH выделять лиганды.

III. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя полученные результаты, отметим, что каждое исследованное стрессовое воздействие приводит к изменению редокс-статуса клеток. Впервые описан нековалентный комплекс Hb с GSH, который позволяет эритроцитам повышать уровень GSH при гипоксии. Показано, что степень глутатионилирования Hb меняется при механическом, осмотическом стрессе и действии A β ₄₂ вследствие изменения редокс-статуса клеток и при метаболическом стрессе из-за недостатка GSH вследствие снижения АТФ. Выявлено влияние глутатионилирования и образования нековалентного комплекса с GSH на конформацию гема и вторичную структуру Hb. Мы считаем, что в основе механизма адаптации эритроцитов к исследуемым моделям стресса особую роль выполняют ковалентные и нековалентные взаимодействия Hb с глутатионом, которые обеспечивают, как антиоксидантную защиту клетки, так и модулируют функциональную активность эритроцита, поскольку глутатионилирование и образование комплекса повышают сродство Hb к O₂. Полученные данные могут быть использованы в разработке новых подходов для повышения жизнеспособности эритроцитов при патологических состояниях и увеличения сроков хранения донорской крови.

ВЫВОДЫ

1. В основе адаптации эритроцитов к физиологическим стрессовым воздействиям, метаболическому, осмотическому, механическому стрессам и действию бета-амилоидных пептидов лежит изменение редокс-статуса клеток и взаимодействий Hb с глутатионом.
2. Рост уровня GSH в цитозоле эритроцитов при гипоксии обусловлен выходом из нековалентного комплекса с гемоглобином вследствие конформационного перехода при деоксигенации гемоглобина.
3. Увеличение степени глутатионилирования гемоглобина происходит не только при развитии окислительного стресса, но и при метаболическом стрессе, вызванном недостатком глюкозы.
4. Изменение формы эритроцитов при гипоосмотическом стрессе, индуцированном снижением осмолярности с 330 до 250 мОсм/л и механическом стрессе, вызванном прохождением эритроцитов через фильтр, сопровождается возрастанием содержания GSH в цитозоле, что указывает на важную роль нековалентного комплекса гемоглобина с GSH при адаптации к этим воздействиям.
5. A β ₄₂ и его изомеризованная форма изоA β ₄₂ связываются с поверхностью эритроцитов с близким сродством и снижают уровень АФК, обусловленный работой NADPH оксидаз, приводя к снижению сродства гемоглобина к кислороду, что может быть причиной падения оксигенации крови у пациентов с болезнью Альцгеймера. Снижения сродства гемоглобина при связывании A β ₄₂ обусловлено деглутатионилированием гемоглобина.
6. Методом ИК-спектроскопии по изменению соотношения интенсивности пиков поглощения (I₁₆₅₀/I₁₅₄₁ и I₁₃₇₅/I₁₁₇₂) показано, что глутатионилирование гемоглобина снижает долю альфа-спиралей, и повышает подвижность гема.
7. Методом КР-спектроскопии по изменению соотношения интенсивности пиков КР (I₉₇₅/I₉₉₈ и I₁₅₈₅/I₁₃₇₅) показано, что образование нековалентного комплекса гемоглобина с GSH меняет гемовое окружение и конформацию порфиринового цикла, что способствует увеличению сродства Hb к O₂.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальностям 1.5.2. Биофизика и 1.5.5. Физиология человека и животных (биологические науки):

1. Fenk S., Melnikova E.V., Anashkina A.A., Poluektov Yu.M., **Zaripov P.I.**, Mitkevich V.A., Kaestner L., Minetti G., Mairbäurl H., Goede J.S., Makarov A.A., Petrushanko I.Yu., Bogdanova A.Yu. Hemoglobin is an oxygen-dependent glutathione buffer adapting the intracellular reduced glutathione levels to oxygen availability // *Redox Biology*. – 2022. – Vol. 58. – P. 102535. EDN: [TLFINQ](#). Импакт-фактор 11,9 (JIF); 1,50/0,46 п. л.

2. Слатинская О.В., **Зарипов П.И.**, Браже Н.А., Петрушанко И.Ю., Максимов Г.В. Изменение конформации и распределения гемоглобина в эритроците при ингибировании Na^+/K^+ -атфазы // *Биофизика*. – 2022. – Т. 67. №5. – С. 897-905. EDN: [JIEVCW](#). Импакт-фактор 0,498 (РИНЦ); 1,04/0,34 п. л.

3. Kuleshova Yu.D., **Zaripov P.I.**, Poluektov Yu.M., Anashkina A.A., Kaluzhny D.N., Parshina E.Yu., Maksimov G.V., Mitkevich V.A., Makarov A.A., Petrushanko I.Yu. Changes of the hemoglobin properties in complex with glutathione and after glutathionylation // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. – Vol. 24. №17. – P. 13557. EDN: [UGFEFH](#). Импакт-фактор 4,9 (JIF); 2,08/1,73 п. л.

4. **Зарипов П.И.**, Кулешова Ю.Д., Полуэктов Ю.М., Сидоренко С.В., Кван О.К., Максимов Г.В., Митькевич В.А., Макаров А.А., Петрушанко И.Ю. Метаболический стресс эритроцитов индуцирует глутатионилирование гемоглобина // *Молекулярная биология*. – 2023. – Т. 57. №6. – С. 1188–1198. EDN: [SMPPEE](#). Импакт-фактор 0,755 (РИНЦ); 1,27/1,15 п. л.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Franco R. S. Measurement of Red Cell Lifespan and Aging // *Transfus. Med. Hemotherapy*. 2012. Т. 39, № 5. С. 302–307.
2. Sebastiani P. и др. A network model to predict the risk of death in sickle cell disease // *Blood*. 2007. Т. 110, № 7. С. 2727–2735.
3. Dosek A. и др. High altitude and oxidative stress // *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2007. Т. 158, № 2–3. С. 128–131.
4. Nemkov T. и др. Decoding the metabolic landscape of pathophysiological stress-induced cell death in anucleate red blood cells // *Blood Transfus.* 2020. № Blood Transfusion-2 2020 (March-April). С. 130–142.
5. Stookey J. D. и др. RBC deformability and amino acid concentrations after hypo-osmotic challenge may reflect chronic cell hydration status in healthy young men // *Physiol. Rep.* 2013. Т. 1, № 5.
6. Danielczok J. G. и др. Red Blood Cell Passage of Small Capillaries Is Associated with Transient Ca²⁺-mediated Adaptations // *Front. Physiol.* 2017. Т. 8. С. 979.
7. Kiko T. и др. Amyloid β Levels in Human Red Blood Cells // *PLOS ONE. Public Library of Science*, 2012. Т. 7, № 11. С. e49620.
8. Obeagu E. I., Igwe M. C., Obeagu G. U. Oxidative stress's impact on red blood cells: Unveiling implications for health and disease // *Medicine (Baltimore)*. 2024. Т. 103, № 9. С. e37360.
9. Mohanty J. G., Nagababu E., Rifkind J. M. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging // *Front. Physiol.* 2014. Т. 5.
10. Tsantes A. E. и др. Redox Imbalance, Macrocytosis, and RBC Homeostasis // *Antioxid. Redox Signal.* 2006. Т. 8, № 7–8. С. 1205–1216.
11. Gilbert H. F. *Molecular and Cellular Aspects of Thiol-Disulfide Exchange // Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology / под ред. Meister A.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2006. С. 69–172.
12. Craescu C. T. и др. Covalent Binding of Glutathione to Hemoglobin. II. Functional Consequences and Structural Changes Reflected in NMR Spectra // *The Journal Of Biological Chemistry*. 1986. Т. 261, № 31. С. 14710–14716.
13. Makhro A. и др. *N*-methyl- D -aspartate receptors in human erythroid precursor cells and in circulating red blood cells contribute to the intracellular calcium regulation // *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 2013. Т. 305, № 11. С. C1123–C1138.
14. Zhao Y. и др. Nitric oxide inhibits hypoxia-induced impairment of human RBC deformability through reducing the cross-linking of membrane protein band 3 // *J. Cell. Biochem.* 2019. Т. 120, № 1. С. 305–320.
15. Wojdyla M., Raj S., Petrov D. Absorption spectroscopy of single red blood cells in the presence of mechanical deformations induced by optical traps // *J. Biomed. Opt.* 2012. Т. 17, № 9. С. 0970061.