

ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ
имени В.А. ЭНГЕЛЬГАРДТА РАН

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители:

кандидат физико-математических наук

Петрушанко Ирина Юрьевна

доктор биологических наук, профессор

Максимов Георгий Владимирович

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ	7
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1. Жизненный цикл эритроцитов.....	12
2. Строение плазматической мембраны эритроцитов	16
3. Проницаемость мембраны эритроцитов. Ионный транспорт	21
4. Метаболизм эритроцитов	25
5. Антиоксидантная система эритроцитов. Глутатион.	30
6. Гемоглобин – основной белок эритроцитов.....	34
7. Характерные стрессы.....	38
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	43
1. Материалы.....	43
2. Методы	44
2.1. Подготовка образцов эритроцитов.....	44
2.2. Деоксигенация эритроцитов	46
2.3. Индукция метаболического стресса.....	46
2.4. Индукция осмотического стресса.....	47
2.5. Индукция механического стресса	47
2.6. Приготовление $A\beta_{42}$ и $isoA\beta_{42}$ и инкубация с эритроцитами	48
2.7. Проточная цитофлуориметрия.....	48
2.8. Оценка уровня свободного GSH реактивом Элмана.....	50
2.9. Оценка уровня свободного GSH методом ядерного магнитного резонанса	50
2.10. Атомно-абсорбционная спектрометрия.....	51
2.11. Оценка уровня АТФ.....	51

2.12. Оценка содержания общего белка.....	52
2.13. Иммуноблотинг	52
2.14. Подготовка растворов гемоглобина, нековалентного комплекса гемоглобина с глутатионом и глутатионилированного гемоглобина	53
2.15. Изотермическая калориметрия титрования.....	54
2.16. Спектроскопия комбинационного рассеяния.....	54
2.17. Регистрация инфракрасных спектров	55
2.18. Визуализация морфологических изменений эритроцитов	56
2.19. Статистическая обработка.....	56
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	57
1. Адаптация эритроцитов к деоксигенации	57
1.1. Содержание Na^+ и K^+ при деоксигенации	57
1.2. Содержание Ca^{2+} и редокс-параметры при деоксигенации	58
1.3. Глутатионилирование гемоглобина при деоксигенации и нековалентный комплекс глутатиона с гемоглобином	61
2. Адаптация эритроцитов к метаболическому стрессу.....	67
2.1. Оценка эффективности индукции метаболического стресса	67
2.2. Размер и форма эритроцитов при метаболическом стрессе	68
2.3. Содержание Na^+ и K^+ при метаболическом стрессе	69
2.4. Содержание Ca^{2+} и редокс-параметры при метаболическом стрессе... ..	70
2.5. Глутатионилирование гемоглобина при метаболическом стрессе	73
2.6. Механизм адаптации.....	74
3. Адаптация эритроцитов к осмотическому стрессу.....	76
3.1. Размер и форма эритроцитов при осмотическом стрессе.....	76
3.2. Содержание Ca^{2+} и редокс-параметры при осмотическом стрессе.....	80
3.3. Глутатионилирование гемоглобина при осмотическом стрессе.....	82
3.4. Механизм адаптации.....	83

4. Адаптация эритроцитов к механическому стрессу	87
4.1. Размер и форма эритроцитов при механическом стрессе.....	87
4.2. Содержание Na^+ и K^+ при механическом стрессе.....	89
4.3. Содержание Ca^{2+} и редокс-параметры при механическом стрессе	90
4.4. Глутатионилирование гемоглобина при механическом стрессе.....	95
4.5. Механизм адаптации.....	97
5. Адаптация эритроцитов к действию бета-амилоидов	100
5.1. Связывание бета-амилоидов с поверхностью эритроцитов	100
5.2. Размер, форма и содержание Ca^{2+} в эритроцитах под действием бета-амилоидов	103
5.3. Редокс-параметры и сродство Hb к O_2 под действием бета-амилоидов	104
5.4. Глутатионилирование гемоглобина под действием бета-амилоидов.	107
6. Изменение конформации гемоглобина при ковалентном и нековалентном взаимодействии с глутатионом.....	110
6.1. Оценка эффективности глутатионилирования гемоглобина при инкубации с окисленным глутатионом (GSSG).....	110
6.2 Влияние глутатионилирования и образования комплекса с глутатионом на конформацию гемопорфиринового макроцикла гема.....	112
6.3. Влияние глутатионилирования и образования комплекса с глутатионом на инфракрасный спектр гемоглобина.....	118
6.4. Механизм изменения конформации гемоглобина.....	124
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	128
ВЫВОДЫ	130
БЛАГОДАРНОСТИ	131
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	132

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ААС – атомно-абсорбционная спектрометрия

АК – аминокислота

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

АФК – активные формы кислорода

A β ₄₂ – бета-амилоид A β ₄₂

БА – болезнь Альцгеймера

ДТНБ – 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота), реактив Элмана

Гб – гемоглобин

изоA β ₄₂ – изомеризованная по Asp7 форма бета-амилоида A β ₄₂

ИК – инфракрасный (спектр, спектроскопия)

ККМ – красный костный мозг

КР – спектроскопия комбинационного рассеяния света

ПМ – плазматическая мембрана

СД – сахарный диабет

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

2,3-BPG – 2,3-бисфосфоглицерат

AE1 – белок полосы 3

CaM – кальмодулин

GCL – глутаматцистеинлигаза

deoxyHb – деоксиформа гемоглобина

FC – проточная цитофлуориметрия

FSC – параметр малоуглового светорассеяния

GSH – восстановленная форма глутатиона

GSSG – окисленная форма глутатиона

Hb – гемоглобин

Hb:GSH – нековалентный комплекс гемоглобина с глутатионом

Hb-SSG – глутатионилированный гемоглобин

KCNN4 – канал Гардоса

metHb – метгемоглобин

NMDA – N-метил-D-аспартат

NMDAR – N-метил-D-аспартат рецептор

oxyHb – оксиформа гемоглобина

P_i – неорганический фосфат

PBS – 100 мМ калий-фосфатный буфер

PBST – 100 мМ фосфатный буфер, содержащий 0.1% Твин-20

PMCA – Ca²⁺-АТФаза

SDS – додецилсульфат натрия

SS – дисульфидная связь

SSC – параметр бокового светорассеяния

ВВЕДЕНИЕ

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. По последним данным от анемии страдает около четверти населения Земли, в основном женщины и дети в возрасте до 5 лет [1].

В норме время жизни эритроцитов составляет в среднем 115 дней [2] и сокращается до 10-20 при патологиях [3]. Их функциональная активность и продолжительность жизни определяются, как ограниченным из-за отсутствия ядра, аппарата Гольджи и рибосом, запасом белков и липидов [2,4,5], так и действием внешних стрессовых факторов. Перемещаясь по кровотоку к тканям организма эритроциты попадают в условия дефицита O_2 – гипоксию [6], которая усиливается при физической активности и в высокогорье [7]; при снижении уровня глюкозы в крови испытывают метаболический стресс [8,9], а при изменении осмолярности крови – осмотический [10,11]; проходя по капиллярам [12] и синусам селезенки [13] подвергаются механическому стрессу [14]. Кроме того, в кровотоке эритроциты – основной переносчик бета-амилоидов [15], уровень которых повышается при болезни Альцгеймера (БА) [16]. Эти стрессовые воздействия могут вызывать изменения редокс-статуса клеток – изменения соотношения восстановленных и окисленных форм молекул [17]. Нарушение баланса запускает развитие окислительного стресса, который подразумевает накопление активных форм кислорода (АФК), таких как супероксид-анион (O_2^{*-}), перекись водорода (H_2O_2) и гидроксид-анион (OH^{*-}) [18]. Окислительное повреждение ограниченного запаса белков и липидов АФК приводит к снижению функциональной активности эритроцита и преждевременному старению клетки [19].

Основные источники АФК в эритроцитах – это работа NADPH оксидаз и аутоокисление мажорного белка гемоглобина (Hb) [18], обеспечивающего

транспорт O_2 . Основа системы антиоксидантной защиты эритроцитов – трипептид глутатион (GSH) – преобладающий низкомолекулярный тиол клеток [20]. Способность Hb и других белков ковалентно связывать глутатион через образование дисульфидной связи (глутатионилирование) [21] представляет собой важное звено антиоксидантной защиты эритроцитов, поскольку предотвращает необратимое окисление тиоловых групп белка [19]. Помимо защитной функции, глутатионилирование модулирует активность ряда белков, в частности, повышает сродство Hb к O_2 [22,23], что оказывает прямое влияние на функциональную активность эритроцитов.

Как меняется редокс-статус эритроцитов, а значит и выполнение их основной функции – доставки O_2 – 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 Ca^{2+} при гипоксии, под действием метаболического, осмотического и механического стресса, при связывании бета-амилоида ($A\beta_{42}$) и его патогенной изомеризованной по D7 формы (изо $A\beta_{42}$).
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 $A\beta_{42}$ и $изоA\beta_{42}$.

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 O_2 . Обнаружено, что $A\beta_{42}$ и $изоA\beta_{42}$ 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 (Ca^{2+} , 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 $\text{A}\beta_{42}$ 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" (Пушино, Россия, 2024). Работа поддержана грантами РФФИ №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.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Около 83% клеток в организме человека представлено эритроцитами [24]. Циркулирующие эритроциты обеспечивают снабжение всех органов и тканей O_2 , который переносится основным белком эритроцитов гемоглобином (Hb). Помимо доставки O_2 , эритроциты поглощают H_2O_2 и свободные радикалы, например, активные формы кислорода (АФК), вырабатываемые периферическими тканями в условиях стресса [18].

1. Жизненный цикл эритроцитов

В норме количество зрелых эритроцитов в организме взрослого человека составляет в среднем 2×10^{13} [25]. Эритроциты живут в кровотоке около 110-120 дней [26]. Продолжительность их жизни может сокращаться до 70 или увеличиваться до 140 дней [2] в зависимости от условий созревания и степени испытанного в течение циркуляции стрессового воздействия. А при патологиях продолжительность жизни эритроцитов может уменьшаться очень значительно, например, до 10-20 дней у пациентов с серповидно-клеточной анемией [3].

Ежедневно погибает и созревает около 1.7×10^{11} новых эритроцитов. Они формируются в печени во время внутриутробного развития и в ККМ в постнатальный период в процессе эритропоэза – одной из форм гемопоэза [27,28]. Эритроциты образуются из мультипотентных гемопоэтических стволовых клеток, проходя через многоэтапный процесс созревания. В ККМ эритропоэз проходит в эритробластных островках [29]. Эти островки состоят из макрофагов, окруженных созревающими эритроидными клетками. Макрофаги способствуют пролиферации и дифференцировке и обеспечивают эритробласты железом [28]. По мере созревания проэритробласты перемещаются в контакте с центральным макрофагом к краю эритробластного островка (рис. 1). В процессе трансформации в эритробласт проэритробласт уменьшается в размере, хроматин в нём конденсируется, начинается синтез Hb и других белков [28]. Когда

эритробласт становится достаточно зрелым он вступает в контакт с эндотелиальной клеткой, теряет ядро, проходит через пору в цитоплазме эндотелиальной клетки и попадает в кровоток в виде ретикулоцита [30]. Энуклеация происходит перед выходом из костного мозга, ядро фагоцитируется и разрушается макрофагами костного мозга [31]. Ретикулоцит – непосредственный предшественник эритроцита – дозревает до зрелого эритроцита в течение 1-2 дней [28].

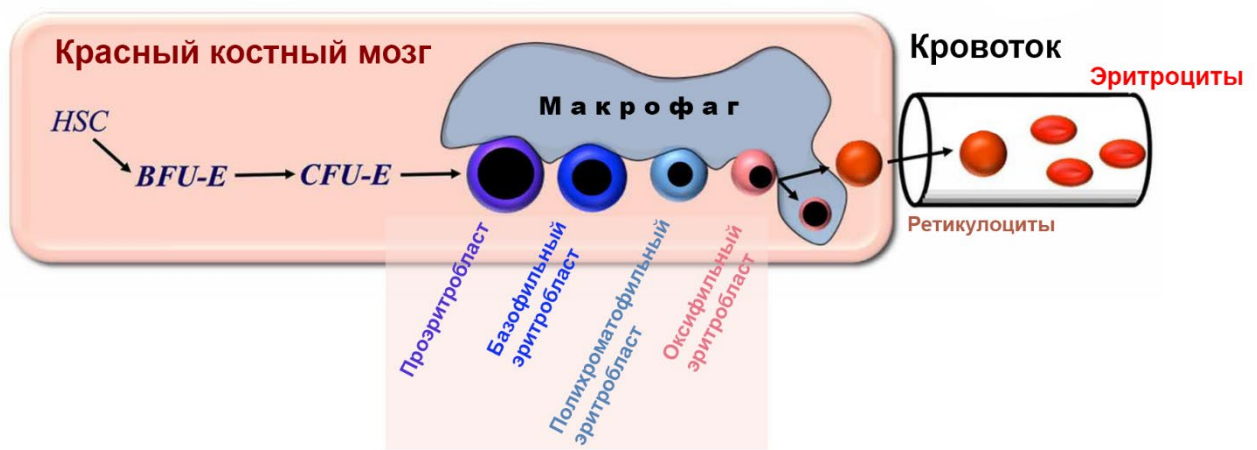


Рис. 1. Эритропоэз в ККМ (слева) и кровотоке (справа). Центральный макрофаг обозначен серым цветом. Указаны клетки-предшественники: гемопоэтические стволовые клетки (HSC) и колонии эритроидных предшественников (BFU-E, CFU-E). Адаптировано из [27].

Циркулируя по кровотоку ретикулоциты продолжают синтезировать Hb, пока не теряют митохондрии и аппарат синтеза белка – комплекс Гольджи, ЭПР, рибосомы [4,5]. Созревание происходит под воздействием внешних факторов, в первую очередь, механического воздействия при прохождении через капилляры и синусы селезенки [5]. Важнейшие перестройки, происходящие в ретикулоците – это регуляция объёма клетки, ремоделирование мембраны и удаление белков (рис. 2). В регуляции объёма принимают участие механочувствительные PIEZO1 каналы, Ca^{2+} -активируемые каналы Гардоса (KCNN4), котранспортеры K^+Cl^- [32]. Активная перестройка мембраны происходит с участием двух связанных через спектриновую сеть белковых комплексов – анкиринового комплекса и комплекса на основе белка 4.1R [33]. Лишние белки выводятся через ESCRT-

опосредованный механизм мультивезикулярных телец (MVB) [5]. Белки (например, TFR1 и аквапорин-1) подвергаются убиквитинированию и направляются в MVB, где формируются экзосомы, высвобождение которых активируется притоком Ca^{2+} (рис. 2). Все три процесса взаимосвязаны на молекулярном уровне и необходимы для окончательного превращения ретикулоцита в зрелый эритроцит [5].

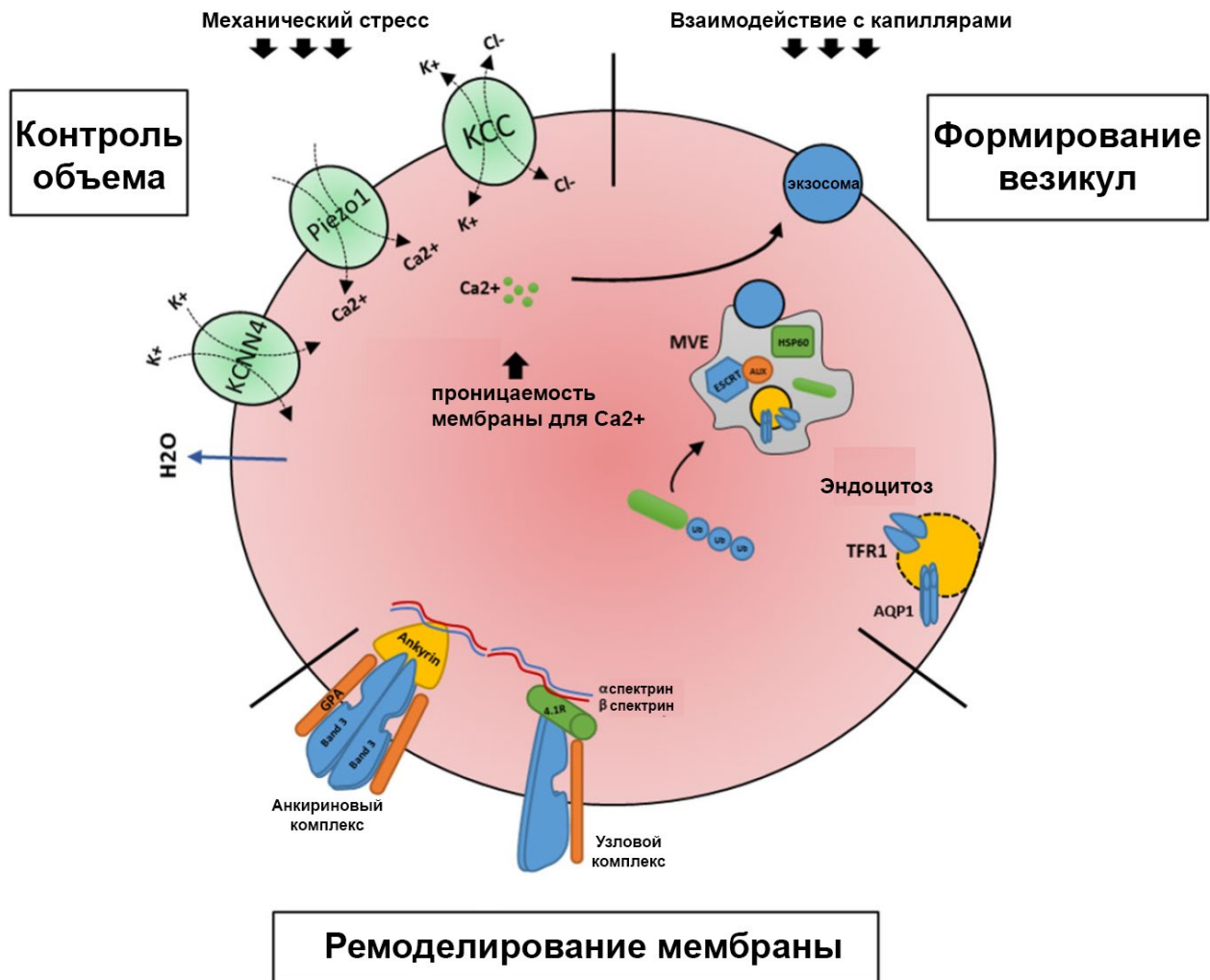


Рис. 2. Основные процессы, происходящие в ретикулоците при циркуляции по кровотоку – контроль объема, формирование везикул и ремоделирование плазматической мембраны. Адаптировано из [5].

К моменту полного созревания снижается содержание целого ряда белков, например, N-метил-D-аспартат рецепторов (NMDAR) [34], белка полосы 3 (AE1) и спектрина [35]. Площадь клеточной поверхности ретикулоцита в процессе созревания уменьшается на 20-30% [30]. В результате, сформировавшийся

эритроцит имеет ограниченный и не восполняемый запас функциональных белков на всю продолжительность своей жизни, окислительное повреждение которых приводит к изменению функционирования и старению эритроцита [19].

После созревания эритроциты приобретает форму двояковогнутого диска [36] с диаметром около 8 мкм и толщиной 2 мкм [26]. В среднем клетки имеют объем около 90 фл и площадь поверхности примерно 140 мкм² [37]. Размер эритроцита немного уменьшается с возрастом за счет сдувания мембраны, поскольку невосполняемый пул мембранных белков и липидов постепенно окисляется [38]. Кроме того, происходит постепенное сдувание мембраны. Потери мембраны и воды приводят к увеличению плотности стареющих клеток [39]. По мере старения в эритроцитах накапливается ряд изменений, которые могут служить сигналами для распознавания макрофагами и последующего удаления эритроцитов. Например, накопление продуктов перекисного окисления липидов, агрегация АЕ1, образование простагландина Е2 с последующей активацией катионных каналов пропускающих Ca²⁺, поступление Ca²⁺ и т.д. [40–44]. Все они приводят к снижению деформабельности клетки. Двояковогнутая форма обеспечивает увеличение площади поверхности эритроцита (на 43%), то есть площади мембраны, что в свою очередь позволяет эритроцитам сильно изменять свою форму – набухать до сферы объемом около 150 фл или деформироваться, чтобы войти в микрокапилляры диаметром 2.8 мкм [26]. Также, обратимой деформации эритроциты подвергаются, проходя через синусы селезенки. Упругость мембраны и способность клетки к деформации во многом обеспечивается мембранным каркасом на основе спектрина [33]. Он представляет собой свернутую (в покое) гексагональную решетку, на которой расположены прочие мембранные белки [33,45]. Кроме того, деформабельность клетки обеспечивается вязкостью цитоплазмы, которая, в первую очередь регулируется концентрацией мажорного белка эритроцитов Нб и, следовательно, зависит от изменения объема клетки [46]. Когда концентрация Нб повышается с 0.05 до 0.15 г/мл (0.77 - 2.2 мМ), вязкость раствора Нб увеличивается в 2 раза. При таких концентрациях вклад вязкости цитоплазмы в деформабельность

эритроцита незначителен. Однако вязкость возрастает экспоненциально при концентрациях Hb выше 0.15 г/мл, увеличиваясь в 7 раз при концентрации Hb 0.3 г/мл (4.65 мМ) [47]. В таком случае вязкость цитоплазмы может стать основной детерминантой клеточной деформабельности [33]. Снижение деформируемости эритроцитов, например, при потере избыточной площади поверхности в ходе старения, приводит к нарушению функции эритроцитов и уменьшению их выживаемости в результате удаления эритроцитов селезенкой [48].

2. Строение плазматической мембраны эритроцитов

Мембрана эритроцитов играет важную роль в функционировании и структуре клетки. Как мы отметили выше, это ключевой фактор, определяющий уникальную двояковогнутую форму эритроцитов [26], а ее состояние во многом обуславливает выживаемость клеток [48]. Мембрана эритроцитов сохраняет нереактивную поверхность, поэтому эритроциты не прилипают к эндотелию, не агрегируют и не закупоривают капилляры. Она обеспечивает барьер с избирательной проницаемостью, который удерживает жизненно важные компоненты внутри клетки и обеспечивает отток метаболических отходов [46]. Для облегчения переноса углекислого газа и поддержания рН через мембрану транспортируются анионы Cl^- и HCO_3^- . Плазматическая мембрана (ПМ) активно контролирует содержание катионов (Ca^{2+} , Na^+ , K^+) и объем воды в эритроцитах [33]. ПМ изолирует от внешней среды восстановители, необходимые для предотвращения окислительного повреждения Hb и других клеточных компонентов, и участвует в регуляции метаболизма путем обратимого связывания и инактивации отдельных гликолитических ферментов [49].

Эритроцитарная мембрана – наиболее изученная ПМ животных клеток, зачастую, она выступает в качестве модельной системы. На рис. 3 представлено схематическое изображение эритроцитарной мембраны, которая представляет собой сложную структуру, состоящую из относительно подвижного

билипидного слоя, стабилизированного нижележащим мембранным каркасом [33]. Липидный слой составляет около 50% от сухой массы мембраны, содержит холестерин и фосфолипиды примерно в равных количествах, небольшую долю составляют гликолипиды и фосфоинозитиды [50]. Зрелые эритроциты сильно зависят от липидного обмена и ограниченной репарации фосфолипидов, поскольку не способны синтезировать жирные кислоты, фосфолипиды и холестерин *de novo*. Холестерин обеспечивает текучесть мембраны и присутствует в обоих слоях мембраны в равных количествах, в то время как фосфолипиды распределены асимметрично [50]. Фосфатидилхолин и сфингомиелин, преимущественно расположенные в наружном слое, принимают участие в липидном обмене и репарации мембранных фосфолипидов [51]. Гликолипиды несут несколько важных антигенов эритроцитов и располагаются только в наружном слое. Фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилинозитол расположены во внутреннем слое [33]. Асимметричное распределение фосфолипидов поддерживается динамическим процессом с участием ферментов флиппазы и флоппазы, которые транспортируют фосфолипиды во внутренние и внешние слои соответственно [52]. Скрамблаза опосредует двунаправленное движение фосфолипидов против градиента их концентрации [53]. Асимметричность мембраны очень важна для выживания эритроцитов. Например, выход фосфатидилсерина на внешнюю поверхность клетки, как это происходит при серповидно-клеточной анемии и β -талассемии, увеличивает адгезию эритроцитов к эндотелию сосудов и приводит к тромбозам через активацию каскада коагуляции [51].

Мембранные белки подразделяют на интегральные, трансмембранные и периферийные в зависимости от их расположения в мембране (рис. 3). Интегральные и трансмембранные белки встраиваются в липидный бислой за счет гидрофобных взаимодействий. Они часто выступают из двойного слоя во внеклеточное пространство плазму и/или в цитозоль. Эти структурные особенности напрямую связаны с их функциями в качестве транспортных белков, рецепторов, сигнальных молекул и носителей антигенов эритроцитов

[33]. Периферийные белки составляют клеточный скелет и прикреплены к цитоплазматической стороне липидного бислоя через ковалентные и нековалентные связи с цитоплазматическими доменами трансмембранных белков. Система этих взаимодействий очень динамична, а аффинность белков друг к другу активно регулируется посттрансляционными модификациями, такими как фосфорилирование, метилирование, гликозилирование и глутатионилирование [54–56].

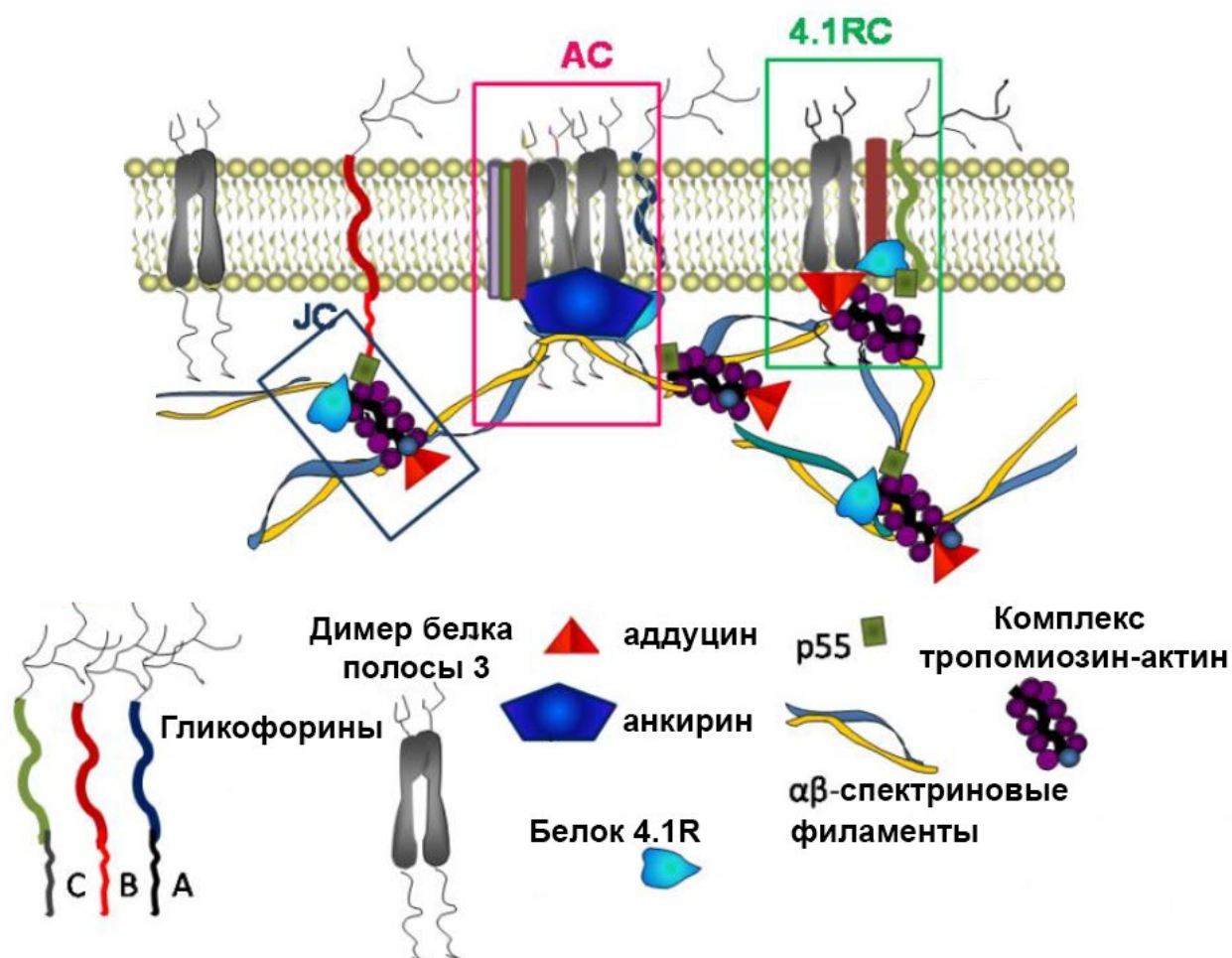


Рис. 3. Строение мембраны эритроцитов человека. Показаны липидный бислой, мажорные белки и основные комплексы. AC – анкириновый комплекс, JC – узловой комплекс, 4.1RC – комплекс на основе белка 4.1R. Адаптировано из [57].

В эритроцитах обнаружено 340 мембранных белков; 105 из них интегральные [58]. Подробно охарактеризовано более 50 трансмембранных белков, представленных в эритроцитах в количествах от нескольких сотен до миллиона копий [33].

Самый многочисленный и важнейший из них это анионный-обменник

(AE1), он же белок полосы 3, осуществляющий транспорт ионов HCO_3^- из клетки и ионов Cl^- в клетку. AE1 состоит из 911 аминокислот (АК) имеет молекулярную массу 95 кДа. Белок включает два функциональных домена: N-концевой цитоплазматический домен (43 кДа) и трансмембранный домен (52 кДа), от которого отходит короткий C-концевой цитоплазматический хвост из 33 АК [59]. Трансмембранный домен включает 13 α -спиральных трансмембранных сегментов, соединенных гидрофильными петлями, и 1 гидрофобную петлю [60]. C-концевой цитоплазматический участок связывает карбоангидразу II в результате чего образуется ферментативный комплекс между трансмембранным доменом AE1 и карбоангидразой II, который обеспечивает обмен анионами HCO_3^- и Cl^- [61]. Транспорт HCO_3^- имеет ключевое значение для эффективного переноса эритроцитами O_2 и CO_2 , поскольку обеспечивает снижение цитозольного pH, что способствует диссоциации O_2 из комплекса с Hb [62]. N-концевой фосфорилированный цитоплазматический домен служит важнейшим центром белок-белковых взаимодействий [63] (рис. 3). Он регулирует метаболические пути, связывая и деактивируя ключевые гликолитические ферменты глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, фосфоглицераткиназу и альдолазу. Фосфорилирование AE1 по Tyr-8 высвобождает ферменты [64].

При взаимодействии с другими трансмембранными белками AE1 образует макромолекулярные комплексы [65], например, комплексы с гликофоринами – белками, препятствующими слипанию эритроцитов друг с другом и адгезии к эндотелию [66]. Особое значение для эритроцитов имеют два примембранных комплекса, связанных с N-концевым доменом AE1 (рис. 3). Оба этих комплекса представлены белками цитоскелета. Клеточный скелет в эритроцитах – это сложная сеть димеров α - и β -спектрина, на которой расположены регуляторные белки [33]. Актин, тропомиозин и тропомодулин, белок 4.1R, аддуцин, дематин важнейшие из них. Совместно со спектриновым каркасом они образуют основу клеточного скелета [45]. Первый комплекс с AE1 (рис. 3) – анкириновый – включающий тетрамер AE1, собственно, анкирин и белок 4.2 [67], служит основным местом крепления ПМ к цитоскелету [68]. Второй – комплекс на

основе белка 4.1R или 4.1R комплекс (рис. 3) – обеспечивает механическую стабильность мембраны, предотвращая фрагментирование ПМ при механическом воздействии [33]. N-концевой участок спектринового димера связывается с актином при участии белка 4.1R. [69]. Те, в свою очередь, взаимодействуют с мембранными белками, напрямую с гликофорином C [70] и, через промежуточное звено в виде аддуцина, с димером AE1 [71]. Составная часть расширенного 4.1R комплекса – узловый комплекс – не закреплен на ПМ (рис. 3). Основная функция комплекса – удержание сети спектриновых димеров [33]. Кроме того, связанный с актином аддуцин, блокирует удлинение актиновых филаментов [72].

Цитоплазматический домен AE1 также обратимо связывается с деоксигенированной формой Hb, в результате чего образуется особая фракция примембранного Hb [73,74]. Взаимодействие deoxyHb и AE1 контролирует сборку комплекса гликолитических ферментов на ПМ за счет конкуренции за сайты связывания, обеспечивая переключение метаболизма глюкозы с пентозофосфатного пути в пользу гликолиза в условиях гипоксии [73]. Кроме того, комплекс Hb с AE1 обеспечивает выброс АТФ из эритроцитов в условиях гипоксии за счет гемолиза части клеток, что необходимо для вазодилатации сосудов [73,75]. Третья функция комплекса – регуляция стабильности ПМ [73]. Связывание AE1 с deoxyHb – вытесняет из комплекса анкирин, что приводит к откреплению ПМ от цитоскелета [49]. Также deoxyHb способен связываться с белком 4.1R, что приводит к разрушению примембранного узлового комплекса с AE1 [76].

Метформа Hb, содержащая Fe (III), связывается с примембранными белками с еще большим сродством, чем деоксигенированная форма Hb, составляя основную часть примембранного Hb [77]. Причем, около трети примембранного Hb прикрепляется к белкам мембраны через прочную дисульфидную связь [78]. Такая связь Hb с ПМ снижает деформабельность клеток [79], приводит к кластеризации AE1 и удалению эритроцитов из кровотока [77,78].

3. Проницаемость мембраны эритроцитов. Ионный транспорт

Мембрана эритроцитов обладает избирательной проницаемостью для катионов и анионов, что необходимо для поддержания высокого (115 мМ) уровня K^+ , низкого (30 мМ) содержания Na^+ [80] и очень низкой (30-60 нМ) концентрации свободного Ca^{2+} в клетке [81]. Избирательная проницаемость мембраны обеспечивается системой активных транспортеров и пассивных трансмембранных каналов [33,57,82]. Трансмембранные белки регулируют проницаемость мембраны для аминокислот [83], H_2O , которая транспортируется аквапорином-1 (AQP1) [84], и глюкозы, которая поглощается переносчиком глюкозы (GLUT-1) [85]. Большую группу составляют переносчики одновалентных катионов и анионов [82,83] (рис. 4). Среди них наиболее изучены анионный обменник AE1 (рис. 4, 7) – о его функциях мы уже писали выше – и Na^+/K^+ аденозинтрифосфатаза (Na^+/K^+ -АТФаза).

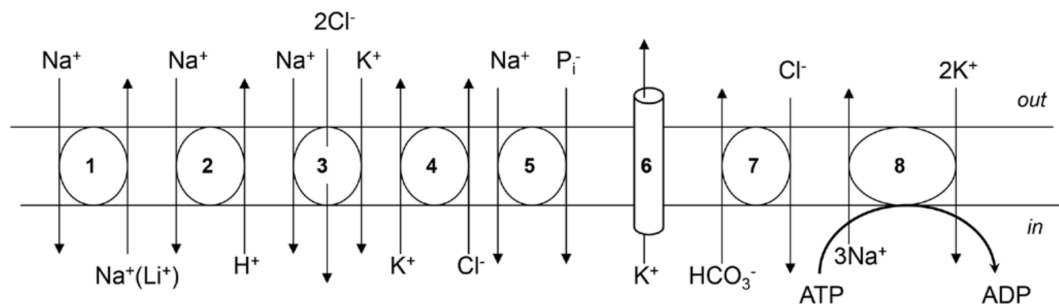


Рис. 4. Основные системы транспорта одновалентных ионов через мембрану эритроцитов: 1 – Na^+/Na^+ (Na^+/Li^+) обменник; 2 – Na^+/H^+ обменник; 3 – $Na^+, K^+, 2Cl^-$ котранспорт; 4 – K^+, Cl^- котранспорт; 5 – котранспорт Na^+ и P_i ; 6 – Ca^{2+} -активируемый K^+ канал; 7 – AE1; 8 – Na^+/K^+ -АТФаза. Цит. по [82].

Na^+/K^+ -АТФаза – активный транспортер – в результате гидролиза одной молекулы АТФ осуществляет транспорт трех ионов Na^+ из клетки и двух ионов K^+ в клетку (рис. 4, 8), создавая трансмембранный градиент концентраций ионов [86]. Таким образом, поддерживается высокое содержание K^+ и низкое содержания Na^+ . Этот градиент необходим для передачи сигналов, обеспечения вторичного транспорта, поддержания клеточного объема и осмотической

активности. Функциональный мономер Na^+/K^+ -АТФазы состоит из полипептидных цепей двух типов, названных α - и β -субъединицами [87]. Субъединица α Na^+/K^+ -АТФазы, содержит участки связывания АТР, Na^+ , K^+ , а также кардиотонических стероидов. Субъединица β непосредственного участия в катализе не принимает, но влияет на транспортные функции фермента, изменяя сродство к транспортируемым катионам [88]. В эритроцитах содержится всего около 200 единиц фермента [82,89], содержащих $\alpha 1$ - и $\alpha 3$ -изоформы каталитической субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы [90]. Снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы, например, при окислительном стрессе значительно уменьшает деформабельность эритроцитов [91]. Этому способствует индуцируемое окислительным стрессом глутатионилирование – присоединение молекулы глутатиона к ферменту, которое приводит к конформационным изменениям в белке и ингибирует его активность [55].

Градиенты Na^+ и K^+ , создаваемые натрий-калиевым насосом, используются несколькими пассивными градиент-зависимыми системами (рис. 4, 1-5). Это Na^+/Li^+ обменник, Na^+/H^+ обменник, $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ котранспортер, K^+Cl^- котранспортер, а также котранспортер Na^+ и неорганического фосфата P_i [83]. Явление Na^+/Li^+ обмена (рис. 4, 1) было впервые обнаружено у больных гипертонической болезнью, для эритроцитов которых показано увеличение скорости Na^+/Li^+ обмена [92]. Известно, что P_i ингибирует Na^+ -зависимый выход Li^+ из клетки, что может указывать на тесную связь в работе Na^+/Li^+ обменника и Na^+ , P_i котранспортера [93] (рис. 4, 5). При этом, вопрос о молекулярной природе Na^+/Li^+ обменника остается открытым [82]. Потенциально Li^+ может транспортироваться Na^+/K^+ -АТФазой и АЕ1, поэтому наличие специализированного фермента не обязательно [93]. Na^+/H^+ обмен (рис. 4, 2) обеспечивает переносчик NHE1 [94]. Известно, что активность Na^+/H^+ обменника возрастает при закислении цитоплазмы и при гиперосмотическом сжатию эритроцитов [82]. Котранспортеры катионов и анионов Cl^- (рис. 4, 3-4) осуществляют перенос ионов ПМ как по электрохимическому градиенту, так и против него. В последнем случае используется энергия градиентов

котранспортируемых катионов, созданных за счет работы Na^+/K^+ -АТФазы [95]. Поток $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспорта, как правило, направлен в клетку, а K^+, Cl^- котранспорта из клетки [82]. $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ котранспортер способствует аккумуляции Cl^- в эритроцитах [95], а K^+, Cl^- котранспортер активно вовлечен в регуляцию объема эритроцитов при осмотическом и механическом воздействиях, поскольку за оттоком ионов K^+ и Cl^- следует отток H_2O [32,96]. Этот эффект K^+, Cl^- котранспортер обеспечивает наряду с Ca^{2+} -активируемым K^+ каналом Гардоса [32] (рис. 4, б). Открытие каналов Гардоса (KCNN4) и выход K^+ происходит в ответ на приток внутриклеточного Ca^{2+} [97], опосредуя, тем самым, Ca^{2+} -зависимую регуляцию объема и реологии эритроцитов (рис. 5) [96].

Приток Ca^{2+} в эритроциты обеспечивает система каналов, каждый из которых имеет свои стимулы активации [44] (рис. 5). Механочувствительный PIEZO1 канал открывается при деформации ПМ эритроцитов, например, при прохождении через просвет микрокапилляров [98]. Он функционирует в тесной связке с упомянутым выше KCNN4 [96]. Изменение потенциала ПМ активирует неселективный катионный канал ($\text{Ca}_v2.1$) [99] и потенциал-зависимый катионный канал (VDAC) [100]. Последний меняет свою селективность в зависимости от конформации [44]. Работа N-метил-D-аспаратат (NMDA) рецепторов (NMDAR) регулируется уровнем глутамата и глицина в плазме [101], например, повышается после выброса глутамата в кровь при выполнении физических упражнений [102]. Активация NMDAR приводит к накоплению Ca^{2+} , сокращению клеток и снижению внутриклеточного pH [34].

В покое внутриклеточный уровень свободного Ca^{2+} составляет от 30 до 60 нМ [81], а в плазме крови содержится около 1.8 мМ Ca^{2+} [44]. Этот огромный 40 000-кратный градиент обеспечивает активируемая кальмодулином (CaM) Ca^{2+} -АТФаза (PMCA) [57] (рис. 5). В эритроцитах человека экспрессируется изоформы PMCA1 [58] и PMCA4 [44]. Они состоят из 1200-1220 АК, образующих 10 трансмембранных доменов, 2 ориентированных в цитозоль петли, содержащих сайты связывания и фосфорилирования АТФ, и обращенные внутрь N- и C-концы. Последний содержит Ca^{2+} -CaM-связывающий домен,

сайты фосфорилирования и PDZ-связывающий домен, взаимодействующий с рядом белков [103].

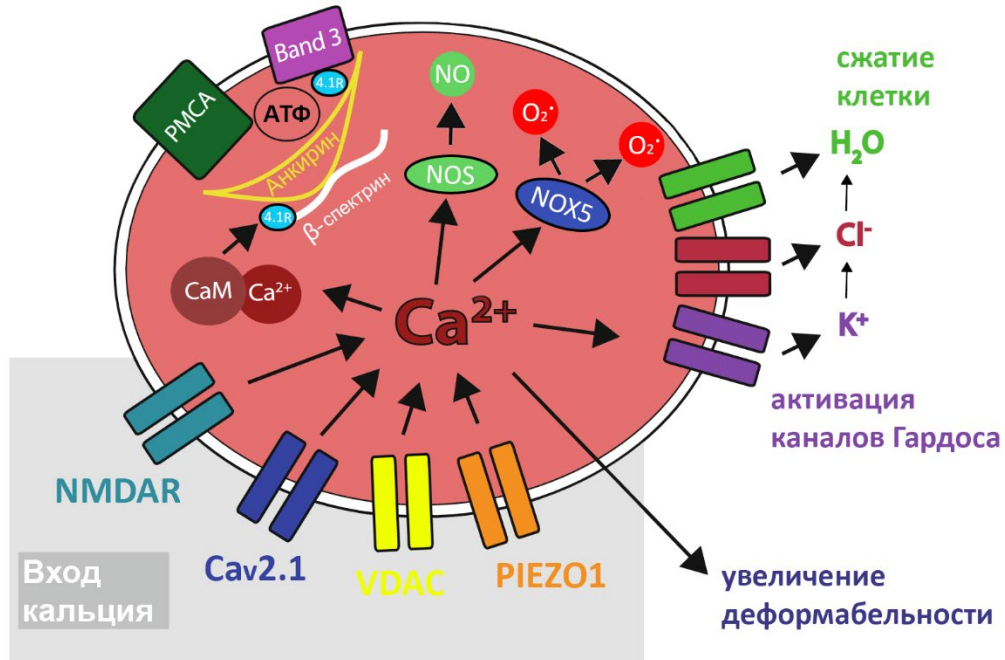


Рис. 5. Основные транспортеры Ca^{2+} и Ca^{2+} -опосредуемые процессы в эритроцитах. PMCA – Ca^{2+} -АТФаза; Band 3 – белок полосы 3; NOS – NO синтаза; NOX5 – NADPH оксидаза; NMDAR – N-метил-D-аспартат рецепторы; Cav2.1 – неселективный катионный канал; VDAC – потенциал-зависимый катионный канал; PIEZO1 – механочувствительный канал. Адаптировано из [104].

Как и в других клетках, в эритроцитах Ca^{2+} выполняет роль сигнальной молекулы; градиент Ca^{2+} позволяет эритроцитам своевременно регулировать метаболизм, менять форму и объем [44]. Поддержание кальциевого гомеостаза обеспечивает функционирование целого ряда процессов. Известно, что вход ионов Ca^{2+} обеспечивает увеличение деформабельности эритроцитов, что особенно важно при изменении осмолярности [105] и прохождении через капилляры и синусы селезенки [96]. Молекулярный механизм адаптации включает отток ионов K^+ через Ca^{2+} -активируемые каналы Гардоса (KCNN4) [57], что ведет к выходу из клетки Cl^- и воды и снижению объема (рис. 5) [97,106]; а также активацию кальций-кальмодулинового комплекса (Ca-CaM) (рис. 5) [107]. Этот комплекс определяет стабильность цитоскелета [57]. Связывание с

Ca-SaM снижает сродство белка 4.1R, который входит в узловую и анкириновый примембранные комплексы [70,71], ко всем белкам партнерам, в результате чего структура цитоскелета теряет стабильность и разрыхляется [108]. Показано, что увеличение внутриклеточного уровня Ca^{2+} приводит к запуску Ca^{2+} -зависимых NO-синтаз (рис. 5) [109]. Последующий выход NO из клетки способствует вазодилатации, что упрощает прохождение эритроцитов через просвет капилляров [110]. Кроме того, увеличение внутриклеточного Ca^{2+} может влиять на сродство Hb к O_2 [34].

Во всех описанных процессах, повышение уровня свободного Ca^{2+} в цитоплазме имеет временный характер и выполняет сигнальную функцию [96]. Длительное, не контролируемое увеличение внутриклеточного Ca^{2+} приводит к удалению эритроцитов в селезенке, способствует агрегации эритроцитов и образованию тромбов [42,43,57]. Это обусловлено активацией Ca^{2+} -зависимой NADPH-оксидазы (NOX5), которая способна активироваться при непосредственном связывании кальция [111]. Гиперактивированная NOX5 синтезирует O_2^{*-} , который преобразуется в H_2O_2 , проникающую в клетку, что приводит к развитию окислительного стресса в эритроцитах (рис. 5) [112], повреждению ключевых белков и гибели клеток. Дерегуляция кальциевого гомеостаза возникает при нарушении работы PMCA – единственного транспортера Ca^{2+} против градиента концентрации. Основным фактором, ограничивающим скорость работы PMCA в эритроцитах это доступность АТФ. В условиях постоянного притока Ca^{2+} активация PMCA приводит к быстрому истощению внутриклеточного пула АТФ [113]. Снижение скорости экструзии Ca^{2+} кальциевым насосом – один из признаков старения эритроцитов [114].

4. Метаболизм эритроцитов

Метаболизм эритроцитов имеет ряд важных особенностей. Из-за отсутствия митохондрий им недоступен аэробный путь получения АТФ с помощью дыхания; зрелые эритроцитах получают АТФ исключительно из

анаэробного преобразования глюкозы по пути Эмбдена-Мейергофа (гликолиз) для получения АТФ [115]. Хотя на подготовительных этапах гликолиза по 1 молекуле АТФ используют гексокиназа и фосфофруктокиназа, чистый прирост составляет 2 молекулы АТФ на каждую молекулу глюкозы, поскольку на заключительных этапах в общей сложности 4 АТФ генерируют фосфоглицераткиназа и пируваткиназа (рис. 6). Кроме того, на этапе, катализируемом глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой, образуется восстановленный никотинамид-аденин-динуклеотид (NADH). NADH может использоваться ферментом цитохром-b5-редуктазой для восстановления нефункционального метгемоглобина, содержащего Fe^{3+} , до нормального Hb с Fe^{2+} . Если эта реакция не происходит, NADH используется для восстановления пирувата до лактата лактатдегидрогеназой на последнем этапе гликолиза [116]. Реакция гликолиза (рис. 6) в суммарном виде выглядит следующим образом:



Другая важная особенность метаболизма эритроцитов – шунт Рапопорта-Люберинг – уникальный побочный гликолитический путь синтеза 2,3-бисфосфоглицерата (2,3-BPG) [116]. Шунт Рапопорта-Люберинг состоит из 2 реакций, осуществляемых в обход этапа гликолиза, катализируемого фосфоглицераткиназой (рис. 6) [117]. 2,3-BPG регулирует аффинность Hb к O_2 [118], а также выполняет функцию дополнительного энергетического буфера, поскольку представляет собой основной промежуточный продукт гликолиза в эритроцитах – его концентрация примерно равна сумме концентраций других промежуточных продуктов гликолиза [116]. В зависимости от значения pH в цитозоле фермент бисфосфоглицератмутаза может действовать, как изомераза, катализируя образование 2,3-BPG из 1,3-BPG, или как фосфатаза, катализируя гидролиз 2,3-BPG до 3- или 2-фосфоглицерата и P_i [118].

Гексозомонофосфатный шунт или пентозофосфатный путь – еще один метаболический путь в эритроцитах, ответвляющийся от гликолиза (рис. 6). В ходе окислительного этапа этого пути образуется рибулозо-5-фосфат и 2

молекулы восстановленного никотинамид-аденин-динуклеотидфосфата (NADPH) [119].

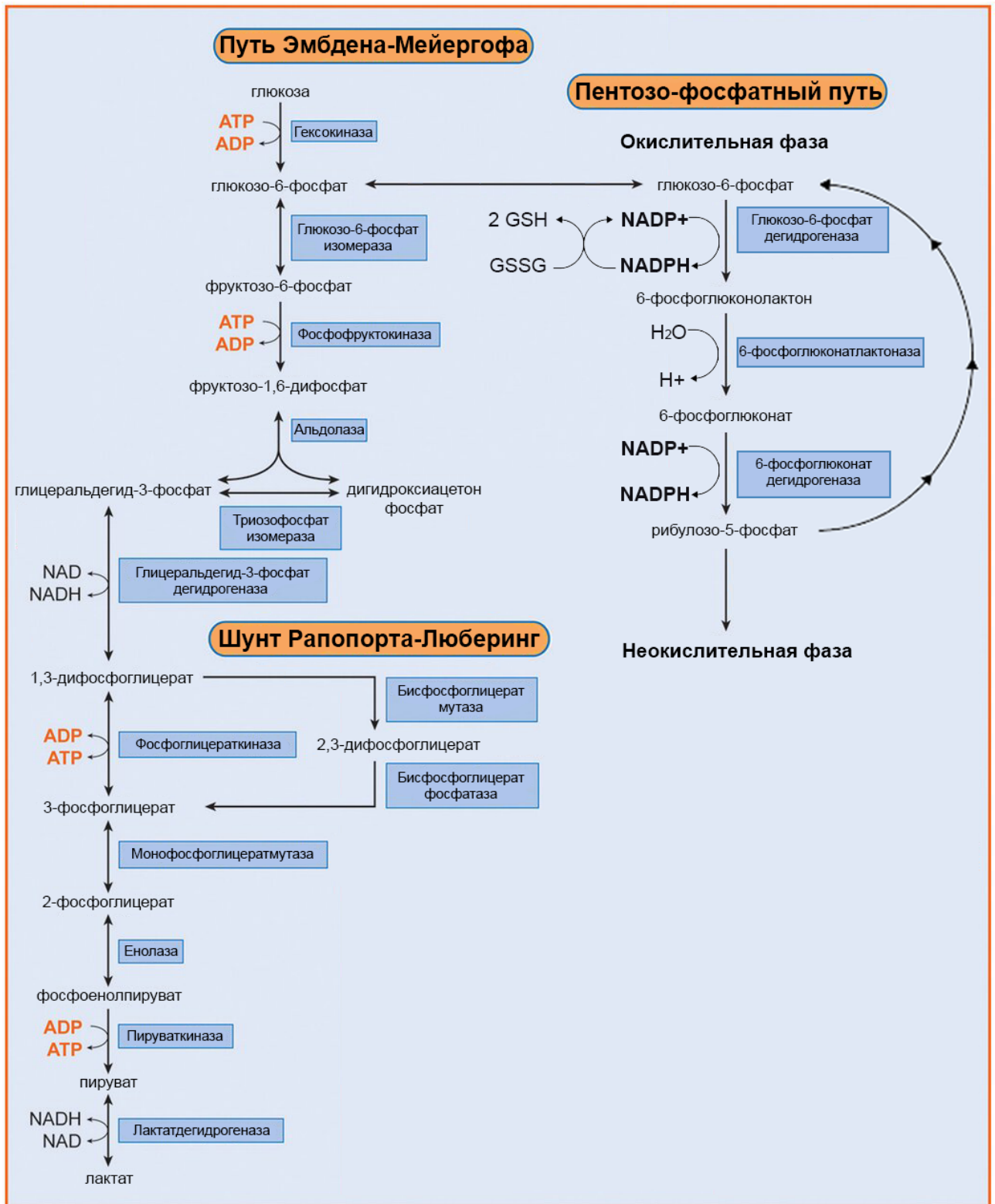


Рис. 6. Путь Эмбдена-Мейергофа (гликолиз) и шунт Рапопорта-Люберинг. Адаптировано из [116].

NADPH необходим для работы многочисленных антиоксидантных систем клетки [120]. Основная часть NADPH в эритроцитах используется для восстановления GSSG до GSH (рис. 6) [17]. Лимитирующий фермент пентозофосфатного пути глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа [115]. Она активируется при увеличении концентрации $NADP^+$ в цитозоле в результате активного расходования NADPH [116]. Суммарное уравнение окислительного этапа пентозофосфатного пути:



АТФ необходима для всех ключевых процессов в эритроцитах, включая, работу АТФаз, регуляцию активности белков и метаболизма, поддержание целостности мембраны, обеспечение деформабельности и удаление поврежденных белков [115]. В норме на синтез АТФ посредством гликолиза затрачивается около 90% поступающей в эритроциты глюкозы, а оставшиеся 10% направляются по пентозофосфатному пути [119]. Быстрое переключение между двумя метаболическими путями позволяет эритроцитам своевременно адаптироваться к меняющимся условиям [115]. Ингибирование одного пути метаболизма глюкозы активирует второй. Скорость гликолиза регулируется главным образом 3 лимитирующими ферментами: гексокиназой и фосфофруктокиназой, зависимыми от доступности АТФ, и пируваткиназой, зависящей от доступности NADH [116]. O_2 -зависимая регуляция метаболизма глюкозы осуществляется через N-концевой домен АЕ1 [73,115]. При насыщении клетки O_2 АЕ1 связывает и ингибирует глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, фосфоглицераткиназу и альдолазу, что перенаправляет метаболизм глюкозы по пентозофосфатному пути. Напротив, при низком уровне O_2 deoxyHb вытесняет гликолитические ферменты из комплекса с АЕ1, стимулируя гликолиз и обеспечивая синтез АТФ и 2,3-BPG в условиях гипоксии [64,73]. В случае развития окислительного стресса АФК окисляют тиоловые группы глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [121] и пируваткиназы [122], ингибируя активность ферментов. Это ограничивает метаболический поток по пути

Эмбдена-Мейергофа и направляет окисление глюкозы по пентозофосфатному пути для получения восстановительных эквивалентов NADPH, необходимых для антиоксидантной защиты клетки [115].

К прочим важнейшим метаболитам относятся предшественники глутатиона, ряд АК, таких как метионин и аргинин, сфингозин-1-фосфат, жирные кислоты [115]. Эритроциты содержат аргиназу-1, которая преобразует аргинин в орнитин, предшественник полиаминов [123], и изоформу эндотелиальной NO-синтазы, использующую аргинин в качестве субстрата для синтеза NO [106]. Как мы уже отмечали ранее, выход NO из эритроцитов способствует вазодилатации [110]. Сфинголипид сфингозин 1-фосфат участвует в адаптации клетки к гипоксии [124]. В условиях высокогорья он связывается с деоксигенированным Hb после его стабилизации 2,3-BPG [125]. Поддержание Hb в T-форме обеспечивает максимальное высвобождение O₂ в гипоксических тканях и способствует активации гликолиза за счет высвобождения гликолитических ферментов из комплекса с AE1 в цитозоль [73,124]. Десатуразы жирных кислот (особенно FADS2) в эритроцитах способствуют гомеостазу NADH путем рециркуляции восстановительных эквивалентов обратно в их окисленное состояние [126], что необходимо для этапа гликолиза катализируемого глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой.

Центральную роль в регуляции метаболизма эритроцитов имеет окислительный стресс [115]. Развитие окислительного стресса влияет на основные метаболические пути – гликолиз [119], гексозомонофосфатный шунт [121,122], метаболизм АК [9]; модулирует активность ферментов Na⁺/K⁺-АТФазы [91], десатураз [126] и др. Ряд метаболических процессов в эритроцитах, например, метаболизм метионина, напрямую обусловлены окислительным стрессом [120]. Процессы формирования АФК в эритроцитах до конца не изучены, однако, известно, что аутоокисление Hb приводит к продукции (O₂^{*-}) и других АФК, в основном перекиси водорода (H₂O₂) и гидроксид-аниона (OH^{*-}) [18]. Гиперактивированные Ca²⁺-зависимые NOX5 синтезируют O₂^{*-} [112]. Кроме того, эритроциты поглощают АФК, вырабатываемые окружающими

тканями [18]. При нормальной концентрации АФК действуют как важный посредник в клеточной передаче сигналов [127]. Однако, их избыточное образование характерно для патофизиологии ряда заболеваний, например, серповидно-клеточной анемии [112].

5. Антиоксидантная система эритроцитов. Глутатион.

По мере старения эритроцитов снижается их способность нейтрализовать окислители [128]. Дисбаланс между продукцией АФК и возможностями антиоксидантной системы приводит к развитию окислительного стресса в клетках, что в свою очередь индуцирует перекисное окисление липидов и окислительное повреждению белков [40]. Это основная причина постепенного снижения функциональной активности, старения и гибели эритроцитов [19]. Эритроциты чрезвычайно уязвимы к окислительному стрессу, поскольку лишены способности к синтезу белков *de novo*, при этом, они постоянно подвергаются действию АФК, ведь их основная функция – транспорт O_2 [120]. Тем не менее, эритроциты обладают развитой, многоуровневой антиоксидантной системой защиты, которая позволяет им в течение всего времени жизни (около 120 дней [26]) нейтрализовывать АФК.

Антиоксидантную защиту эритроцитов обеспечивает ряд ферментов, таких как супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, пероксиредоксин 2, глутаредоксин, глутатионпероксидаза 4 (GPX4), восстановительные эквиваленты NADPH и пул глутатиона [19] – основного низкомолекулярного тиола клеток млекопитающих [20]. Их совокупное действие можно подразделить на четыре этапа (рис. 7). Это снижение степени окислительного стресса за счет нейтрализации молекул АФК (рис. 7, 1), восстановление поврежденных белков, липидов и других метаболитов (рис. 7, 2), разрушение необратимо окисленных белков протеасомами (рис. 7, 3) и образование везикул с поврежденными молекулами и частями липидного бислоя (рис. 7, 4) [120]. Особое значение имеет своевременная активация лимитирующего фермента пентозофосфатного пути

глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, поскольку NADPH, восстанавливаемый только в реакциях пентозофосфатного пути необходим для работы большинства антиоксидантных систем [120].

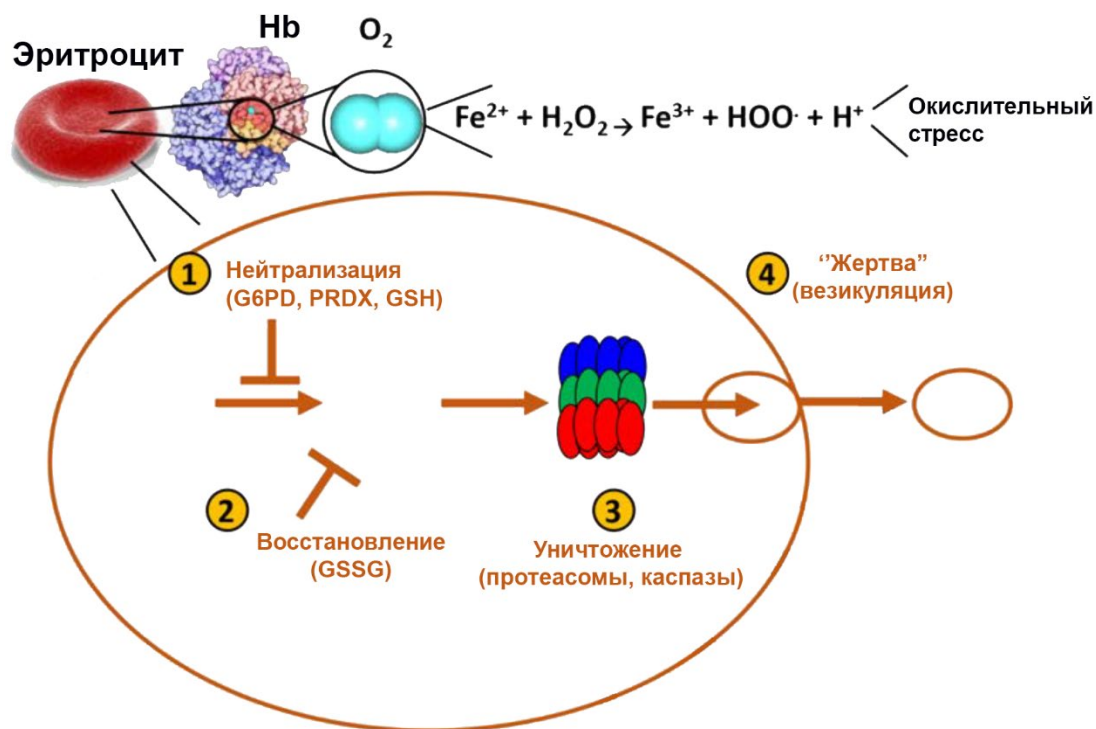
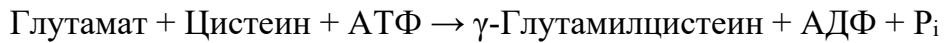


Рис. 7. Окислительный стресс и действие антиоксидантной системы в эритроцитах. Адаптировано из [120].

Значительная часть антиоксидантной системы работает "на опережение", нейтрализуя АФК до того, как они повредят клеточные белки и липиды. Фермент супероксиддисмутаза катализирует превращение $O_2^{\bullet -}$ в H_2O_2 и O_2 , а каталаза и пероксиредоксины катализируют разложение H_2O_2 в H_2O и O_2 [17]. L-изоаспарагиновая метилтрансфераза катализирует реакцию метилирования деамидированных остатков, что позволяет в 15-30% случаев спасти поврежденную белковую молекулу [115]. Пероксиредоксин 6 и глутатионпероксидаза 4 катализируют восстановление окисленных H_2O_2 фосфолипидов [120]. Глутатионпероксидаза 4 – часть тиол-зависимой антиоксидантной системы эритроцитов [127]. Ключевое звено этой системы – глутатион – трипептид, состоящий из остатков глутаминовой кислоты, цистеина и глицина [129]. Биосинтез глутатиона происходит в два АТФ-зависимых этапа:



Первый этап катализируется глутаматцистеинлигазой (γ -глутамилцистеинсинтетазой) [129]. Ингибирование глутаматцистеинлигазы молекулами GSH обычно считается главным регуляторным этапом гомеостаза глутатиона [130]. Второй этап синтеза GSH необратим и опосредован глутатионсинтетазой [129]. Восстановленная форма глутатиона (GSH) (рис. 8а) окисляясь образует молекулу окисленного глутатиона (GSSG), которая состоит из двух трипептидов, связанных дисульфидным мостиком (рис. 8б). В состоянии покоя в эритроцитах преобладает GSH – его концентрация составляет 5-10 мМ, что примерно в 100 раз выше содержания GSSG [131]. При развитии окислительного стресса соотношение GSH/GSSG снижается до единицы.

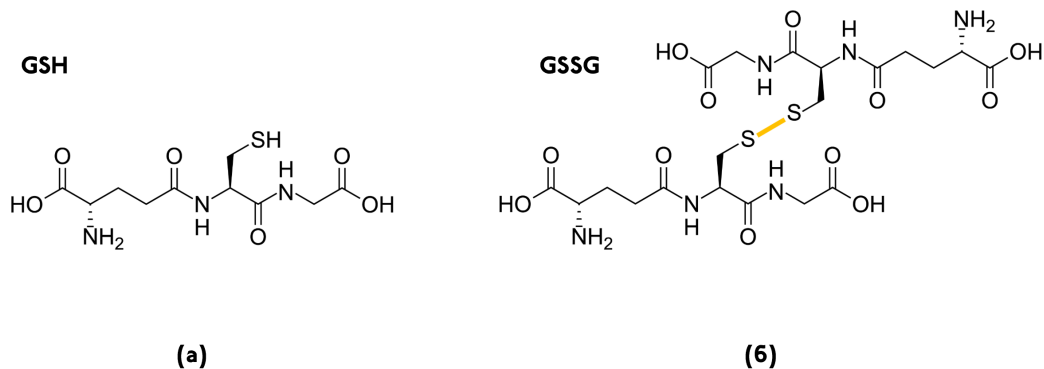


Рис. 8. Молекулярная структура восстановленной (а) и окисленной (б) формы глутатиона.

Редокс-потенциал пары GSH/GSSG определяет редокс-потенциал клетки [132]. Именно пул GSH позволяет эритроцитам удалять H_2O_2 , образующийся в окружающих клетках [18]. Реакцию восстановления H_2O_2 до H_2O и, соответственно, окисления GSH до GSSG катализирует фермент глутатионпероксидаза 1 [133]. В свою очередь GSSG восстанавливается до GSH посредством глутатионредуктазы [129], которая использует NADPH в качестве донора электронов. При развитии окислительного стресса GSH взаимодействует с АФК и окисленными до SOH тиоловыми группами белков, в результате чего

снижается отношение восстановленного глутатиона к окисленному глутатиону (GSH/GSSG), что инициирует запуск глутатионилирования тиоловых групп белков [134]. Глутатионилированием называют образование S-S мостика между молекулой глутатиона и тиоловой группой (-SH) цистеинового остатка белка. Глутатионилирование белков может реализовываться через ряд механизмов (рис. 9). Самый простой из них – прямой тиол-дисульфидный обмен между тиоловыми группами протеина и GSSG (рис. 9, 1) [135].

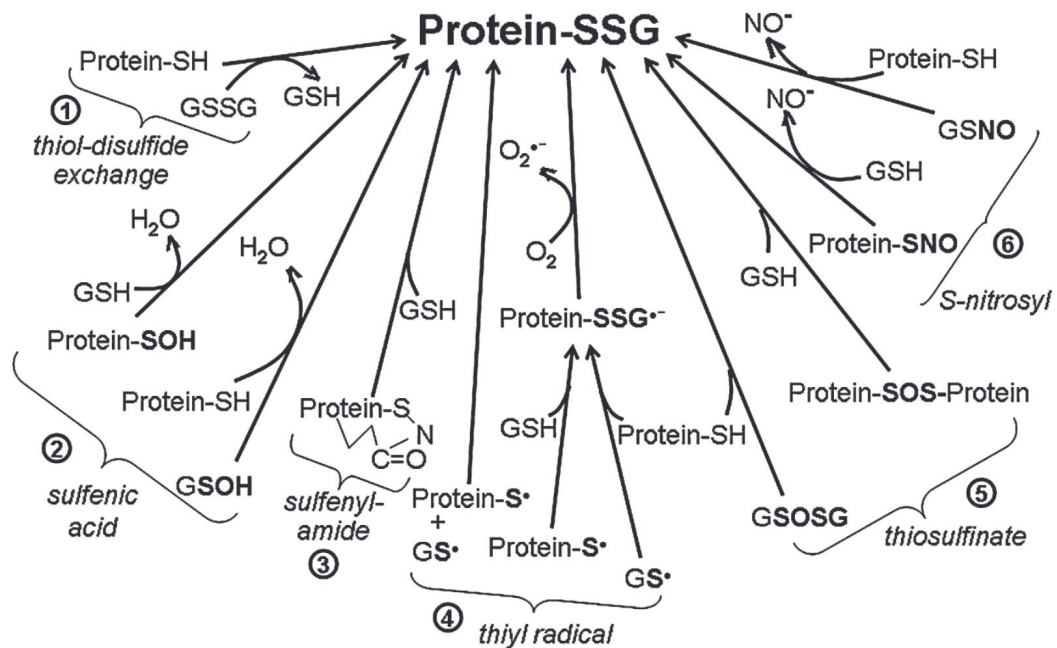
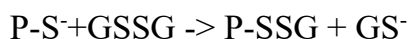


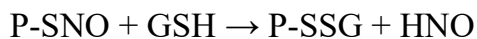
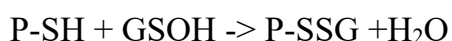
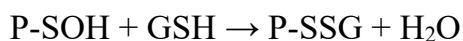
Рис. 9. Возможные механизмы S-глутатионилирования белков. (1) посредством тиол-дисульфидного обмена; (2) через промежуточные соединения сульфеновой кислоты; (3) через промежуточные сульфенамиды; (4) через промежуточные тиильные радикалы; (5) через тиосульфидные промежуточные соединения; (6) через S-нитрозильные интермедиаты. Цит. по [135].

Реакция тиол-дисульфидного обмена, не требует катализатора. Её можно записать в виде:



Глутатионилирование обеспечивает защиту цистеиновых остатков белков, предотвращая их окисление молекулами АФК [129]. Кроме того,

восстановленный глутатион способен взаимодействовать с уже модифицированными тиоловыми остатками [20]. Примеры таких реакций:



Глутатионилирование Hb принято считать маркером окислительного стресса эритроцитов [136]. Процесс может катализироваться ферментами, в частности, глутаредоксином 1 [127]. При нормализации редокс-статуса, а именно восстановлении нормального уровня NADPH, глутаредоксины катализируют деглутатионилирование SH-групп белков [134]. Помимо физиологических ответов на окислительный стресс, глутатионилирование белков наблюдается при различных патологических состояниях, сопровождающихся нарушением редокс-статуса клеток, таких как сахарный диабет (СД), хроническая почечная недостаточность, железодефицитная анемия, гиперлипидемия, атаксия Фридрейха и атеросклероз [137–139]. Глутатионилирование тиоловых групп не только предотвращает их необратимое окисление, но и в ряде случаев изменяет функциональную активность белка [55,135]. В частности, глутатионилирование определенных цистеиновых остатков каталитической субъединицы Na⁺/K⁺-АТФазы ингибирует активность фермента [55]. Глутатионилирование ключевых мембранных белков, а также белков цитоскелета спектрина и анкирина сказывается на реологических свойствах эритроцитов [140]. Также глутатионилированию подвергается основной белок эритроцитов Hb [140].

6. Гемоглобин – основной белок эритроцитов

Hb обеспечивает транспорт O₂ к тканям организма. Это мажорный белок эритроцитов, его концентрация в клетке приближается к пределу растворимости (5.5 мМ) [141], а массовая доля в сухом веществе клетки составляет 96% [142]. В эритроцитах человека на разных этапах онтогенеза присутствует несколько форм Hb, каждая из которых представляет собой тетрамер, состоящий из 4

субъединиц, 2 из которых всегда представлены α -субъединицами (рис. 10, а). В эмбриональный период синтезируется HbF, имеющий 2 α и 2 γ субъединицы. У взрослого человека около 2% Hb представлено формой HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$), 6% – формой HbA_{1c} ($\alpha_2\beta_2$), в которой β субъединицы имеют дополнительную глюкозу, и около 92% составляет форма HbA₁ ($\alpha_2\beta_2$) [143].

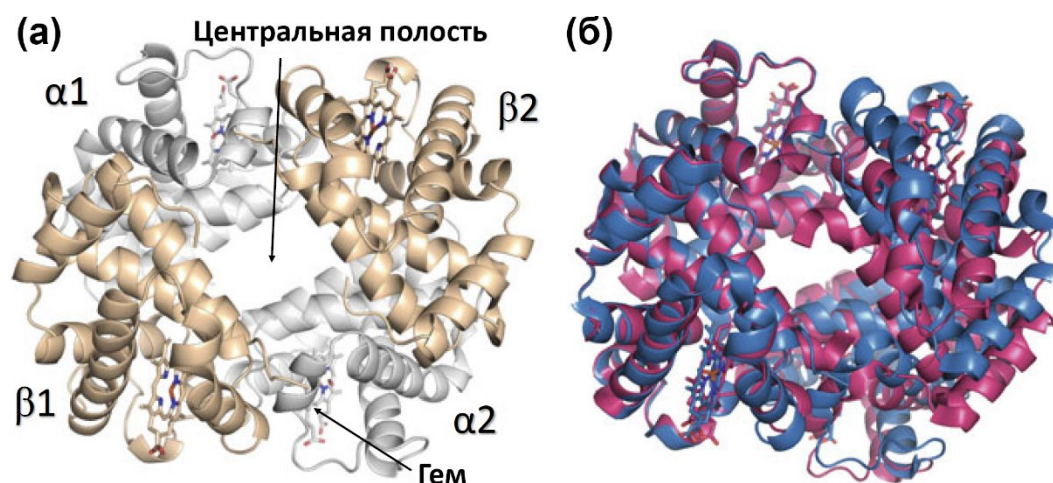


Рис. 10. Кристаллическая структура Hb. (а) общий вид тетрамера Hb, 2 α субъединицы обозначены серым цветом, 2 β субъединицы – бежевым. (б) структуры оксигенированного (R-форма) Hb (пурпурный) и деоксигенированного (T-форма) Hb (синий). Адаптировано из [144].

HbA₁ имеет молекулярную массу 64 458 кДа. Субъединицы α_1 , α_2 , β_1 и β_2 образуют 2 $\alpha\beta$ -димера расположенных симметрично относительно друг друга [144]. Между субъединицами образуется центральная полость (рис. 10, а). Основной вклад во взаимодействие субъединиц вносят гидрофобные взаимодействия [145]. Субъединицы состоят из 7-8 α -спиралей, соединенных неспиральными элементами, которые называют углами [144]. Каждая из субъединиц содержит гем, связывающий одну молекулу O₂. Гем, представляет собой порфириновое ядро (рис. 11), содержащее ион железа, удерживаемый при помощи координационных связей 4 атомами N пиррольных колец и атомом N остатка His-93 полипептидной цепи. Молекула лиганда, например O₂, координируется к Fe²⁺ и оказывается заключённой между атомом Fe и атомом N остатка His-64 полипептидной цепи [146].

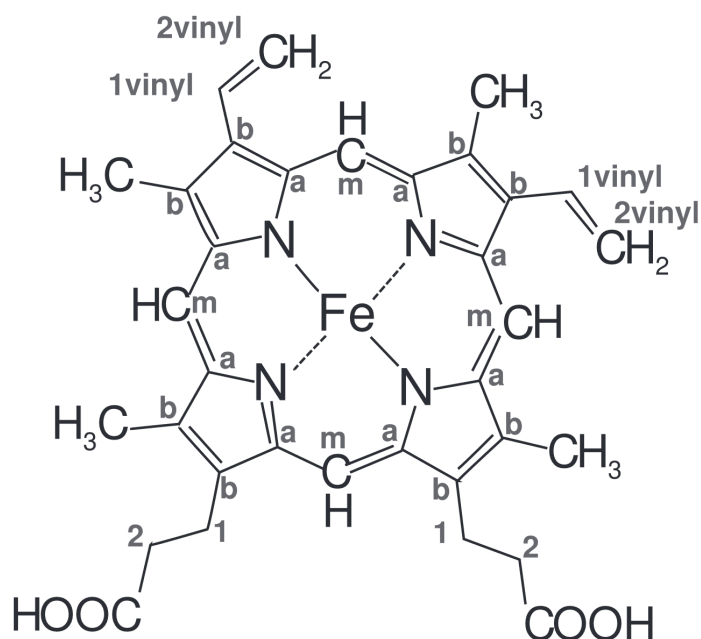


Рис. 11. Структура гема с проиндексированными атомами С. Цит. по [147].

Таким образом, молекула Hb может одновременно связывать до 4 молекул O₂. Связывание O₂ с четырьмя сайтами на одной молекуле имеет кооперативную природу – каждая присоединенная молекула лиганда облегчает связывание с последующей. В процессе связывания O₂ происходит конформационный переход молекулы Hb из напряженной (tense) формы (T), характеризующейся низким сродством к O₂, в расслабленную (relax) форму (R), характеризующуюся высоким сродством к O₂ [146]. Конформационный сдвиг в R-форму включает разрыв солевых мостиков βHis146-βAsp94 в димерах Hb [148], и приводит к уменьшению размера центральной полости в R-форме (рис. 10, б). Различные факторы, такие как низкий pH, высокий уровень CO₂, взаимодействие с 2,3-BPG и сфингозин-1-фосфатом, сдвигают равновесие в сторону T-формы, что позволяет эритроцитам эффективно выделять O₂ в тканях. И наоборот, высокий pH, низкий CO₂ или удаление 2,3-BPG способствуют переходу в R-форму, обладающую более высоким сродством к O₂ [125,144].

В норме гем содержит Fe в степени окисления (II). Только с такой степенью окисления гемового железа Hb способен связывать O₂. Однако, степень окисления гемового Fe может повышаться, при этом меняются и свойства молекулы Hb [149], что хорошо видно по характерным спектрам поглощения

разных форм белка (рис. 12). Гемовое железо в окисленной форме (Fe^{3+}) содержит метгемоглобин (metHb), не способный связывать O_2 . Дальнейшее окисление Fe до Fe^{4+} приводит к образованию высокореактивного феррилгемоглобина, активно вовлеченного в перекисное окисление липидов [150].

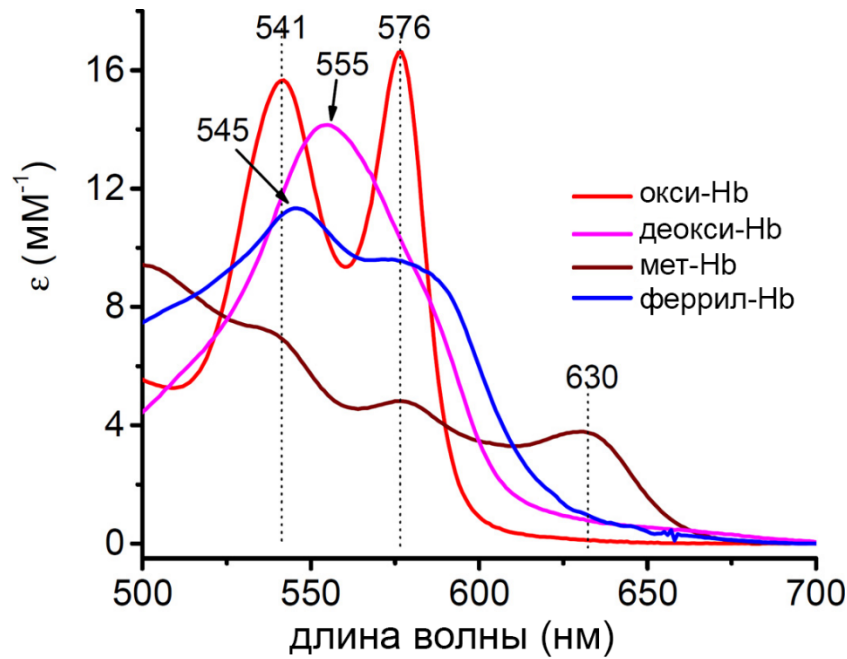


Рис. 12. Характерные спектры основных окислительно-восстановительных форм гемоглобина. Красным – оксиформа Hb (ferrous); коричневым – метформа Hb (ferric); розовым – деоксиформа Hb; синим – ferryl Hb. Адаптировано из [149].

Окислять гемовое железо могут АФК. Кроме того, Hb в оксиформе связывает NO, восстанавливая его до нитрата (NO_3^-), сам Hb при этом переходит в форму метгемоглобина (metHb) [151]. Деоксиформа Hb реагирует с азотистой кислотой с образованием NO и metHb [152]. При этом S-нитрозилированный по остатку Cys-93 β-глобиновой цепи Hb может вести себя как донор NO [151]. В последние десятилетия стало понятно, что нитрит реагирует со многими конформационными состояниями тетрамера Hb [152]. Свободный GSH препятствует окислению гемового Fe и, соответственно, образованию metHb [153]. Кроме того, GSH способен восстанавливать гемовое Fe^{3+} метформы белка до Fe^{2+} [154].

Как мы уже упоминали ранее, Hb также может подвергаться глутатионилированию [140]. Тетрамер Hb содержит 6 остатков цистеина – по 1

на каждой α -субъединице (Cys104) и по 2 на каждой β -субъединице (Cys93, Cys112) [21]. В литературе показано глутатионилирование по остаткам β Cys93 [155] и β Cys112 [156]. Данные о возможности присоединения глутатиона к остатку α Cys104 противоречивы [6,157]. Известно, что блокирование наиболее реактивного остатка β Cys93 с помощью N-этилмалеимида снижает долю примембранного metHb [78]. Глутатионилирование выполняет не только протекторную, но и регуляторную функцию, а именно в 6 раз повышает сродство Hb к O₂ [22,23]. Глутатионилирование блокирует образование солевых мостиков β His146- β Asp94 и разрушает водородную связь β 2Asp99- α 1Tyr42 на границе раздела между $\alpha\beta$ -димерами, которые присутствуют в deoxyHb. Аналогичные изменения происходят при переходе из T-формы в R-форму Hb [146]. То есть, глутатионилирование индуцирует конформационный сдвиг T-формы в оксиподобную конформацию [23]. В глутатионилированном участке Hb увеличивается конформационная гибкость и происходит разрыхление этого региона [158]. Однако, как при этом меняется вторичная структура белка пока не установлено.

7. Характерные стрессы

Как мы видим, редокс-зависимые модификации Hb влияют на функциональные свойства эритроцита и, в свою очередь, тесно связаны с его редокс-статусом. Развитие окислительного стресса в клетках может быть обусловлено другими первичными стрессовыми воздействиями. Перемещаясь по кровотоку, эритроциты сталкиваются с гипоксией (дефицитом O₂) [7], испытывают метаболический [8], осмотический [11] и механический [12] стрессы.

Деоксигенация возникает при прохождении через капилляры в периферических тканях; возрастает в высокогорье, при недостаточной работе легких, различных анемиях [3,6,7,159]. Эритроциты реагируют на гипоксию посредством так называемой O₂-зависимой метаболической регуляции, которая

включает конкурентное связывание deoxyHb и гликолитических ферментов с N-концевым цитозольным доменом AE1 [64,73]. Этот механизм способствует накоплению 2,3-BPG, стабилизируя деоксигенированное состояние Hb и подкисление цитозоля, что приводит к высвобождению O₂ за счет эффекта Бора [160]. При острой гипоксии (0% O₂ в течение 30 минут) из эритроцитов высвобождается АТФ [161], в клетках нарушается гликолиз и происходит переключение метаболизма глюкозы по пентозофосфатному пути [75]. Нарушается гомеостаз глутатиона, метаболизм аргинина/NO и метаболизм серы/H₂S [159]. Снижение доступности O₂ приводит к системными изменениям редокс-статуса клеток организма. В ответ на гипоксический стресс в большинстве клеток запускается сигнальный каскад, включающий продукцию АФК в митохондриях [162]. Длительное непрерывное или периодическое воздействие гипоксии на человека приводит к системному некомпенсированному окислительному стрессу, регистрируемому по снижению уровня антиоксидантов в крови [163]. Быстрое дозозависимое повышение уровня GSH в эритроцитах в ответ на деоксигенацию было показано в эритроцитах человека [164]. Помимо прочего, при деоксигенации возрастает доля мембрано-связанного Hb, который вытесняет анкирин из комплекса с AE1, открепляя ПМ от цитоскелета [49], что влияет на деформабельность эритроцитов.

Метаболический стресс – недостаток глюкозы в плазме крови – во многом обусловлен прохождением клеток через органы и ткани с различным содержанием O₂ и доступностью питательных веществ, что в свою очередь влияет на редокс-статус эритроцитов и их способность восполнять уровни АТФ и NADPH [8,9]. Выраженность стресса определяется функциональным состоянием организма. Так, при СД типа I и II происходят сверхфизиологические колебания уровня глюкозы, а заболевания дыхательной системы (например, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), астма, фиброз легких) приводят к формированию дыхательной недостаточности, метаболического ацидоза и хронической гипоксии [165,166]. Пожилые люди с СД имеют более высокий риск гипогликемии из-за возрастного нарушения целого ряда

адаптивных физиологических реакций [167]. Частота возникновения гипогликемических эпизодов коррелирует с длительностью заболевания СД и продолжительностью лечения инсулином [168]. При дефиците АТФ снижается активность трансмембранных ионных насосов (Na^+/K^+ -АТФазы, Ca^{2+} -АТФазы), обеспечивающих поддержание ионного градиента, нарушается синтез глутатиона, метаболизм пуринов и пиримидинов, асимметрия мембранных фосфолипидов. Недостаток NADPH нарушает работу большинства антиоксидантных систем, что ведет к окислению гемового Fe^{2+} , окислительному повреждению клеточных белков и липидов [116,169]. Неспособность эритроцитов обеспечить свои энергетические потребности при гипогликемии приводит к ускорению процессов старения и преждевременному гемолизу [170]. Отметим, что имеющиеся в литературе данные о влиянии депривации глюкозы на состояние эритроцитов в организме [171,172] и изолированных эритроцитах [9,173] несколько противоречивы, поэтому вопрос о влиянии глюкозного голодания на редокс-статус изолированных эритроцитов и редокс-зависимые модификации Hb остается открытым.

Адаптация эритроцитов осмотическому и механическому воздействиям тесно связана с деформабельностью ПМ [33,48], способностью клеток к поддержанию объема [46], и кальциевым гомеостазом [44,57,96,97]. Кратковременный вход Ca^{2+} в клетки влияет на множество параметров эритроцитов, включая образование свободных радикалов [57]. Кроме того, заметную роль при адаптации к механическому стрессу имеет NO, регулирующий тонус сосудов путем модулирования активности гладкомышечных клеток [174,175]. Кроме того, NO обеспечивает поддержание высокой деформабельности эритроцитов в условиях гипоксии поскольку препятствует кластеризации AE1, предположительно, активируя фосфатазу SHP-2 и ингибируя Syk-киназу [110]. Активность NO-синтаз регулируется, преимущественно, внутриклеточной концентрацией Ca^{2+} и фосфорилированием по регуляторным остаткам [174]. Показана активация NO-синтаз в ответ на приток Ca^{2+} в цитозоль, обусловленный открытием механочувствительные

PIEZO1 каналов при механическом воздействии [12]. Несмотря на общую разработанность темы и множество проведенных исследований [13,14,70,96,105,107,176], тиоловый статус эритроцитов и состояние Hb при осмотическом и механическом стрессах пока не известны.

Циркуляция патогенных форм бета-амилоида (A β) в крови создает множество факторов риска и вносит существенный вклад в развитие болезни Альцгеймера (БА) [15,177]. БА сопровождается нарушением сосудисто-гемодинамических процессов [178], у пациентов с БА отмечается снижение уровня O₂ в церебральных венах, которое прогрессирует с развитием заболевания и ухудшает когнитивный статус [179,180]. Образуются отложения A β в кровеносных сосудах, провоцирующие дегенерацию сосудистой стенки [181–183]. Снижение сатурации крови в мышцах с моделью БА наблюдается уже на ранней стадии заболевания [184]. Гипербарическая кислородная терапия позволяет замедлить снижение когнитивных функций у пациентов с БА [185,186], а также развитие заболевания в мышцах с моделью БА [187]. Таким образом, снижение уровня оксигенации крови играет важную роль в патогенезе БА, однако его причина не ясна. Ключевым фактором может являться нарушение функций эритроцитов.

Эритроциты – это основной переносчик A β в крови. Количество бета-амилоида, переносимое эритроцитами, составляет от 2.1 пкмоль/г Hb у молодых людей до 3.8 пкмоль/г Hb у пожилых, что на порядок больше, чем его содержание в плазме [16]. В периферической крови пациентов с БА было обнаружено больше эритроцитов, несущих на своей поверхности бета-амилоид и его фибриллы, чем у здоровых людей [188]. На мышцах линии APP/PS1, моделирующих БА, было показано, что уровень A β , связанного с эритроцитами, возрастает уже в 3 месяца, задолго до появления бляшек в мозгу животных и тогда же отмечается снижение степени оксигенации крови [184]. Повышение уровня бета-амилоида на эритроцитах, индуцированное его добавлением *in vitro* или введением в кровь мышцей, приводит к развитию перекисного окисления липидов эритроцитов [189]. При БА возрастает доля вытянутых эритроцитов

[188,190], что отмечается также *in vitro* под действием фибрилл Аβ [190], и может ухудшать прохождение эритроцитов по сосудам. Кроме того, под действием Аβ повышается сродство эритроцитов к эндотелию сосудов [191]. На мышинной модели БА, наряду со снижением оксигенации крови, показано общее снижение количества эритроцитов [184]. Однако мишени Аβ на эритроцитах и причины снижения их газотранспортной функции неизвестны. Кроме того, роль в данном процессе патогенной, ускоряющей олигомеризацию формы Аβ с изомеризованным остатком Asp7 (изоАβ), составляющей более 50% от всех пептидов бета-амилоида в мозгу пациентов с БА [192], ранее не рассматривалась.

Поскольку циркуляция патогенных форм Аβ в крови создает множество факторов риска и вносит существенный вклад в развитие БА [15,177], вопрос о том, каким образом эритроциты переносят бета-амилоид и его патогенную изомеризованную форму стоит особенно остро. Кроме того, возникает не менее важный вопрос о действии этих изоформ на состояние эритроцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Материалы

Реактивы для исследования куплены у следующих фирм: Россия – "Лабтех": бромфеноловый синий, C_2H_6O , CH_3COOH ; "Диаэм": глицин, аланин, бычий сывороточный альбумин; "Реахим": HCl , $NaOH$, Na_2CO_3 ; "Хеликон": глюкоза, KCl , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $NaCl$, дезоксихолат натрия; США – "Bio-Rad": бисакриламид, персульфат аммония $[(NH_4)_2S_2O_8]$, кумасси-G250; "Novex": 2x Tris-Glycine SDS sample-buffer; "Cayman Chemical Group": тиорфан; "Fluka analytical": $ZnCl_2$, $MgCl_2$; "MP-Biomedicals": Ponceau S; "Panreac": глутамин, $Na_2S_2O_4$; "Sigma-Aldrich": метгемоглобин, нейраминидаза, лектин, гексафторизопропанол, HEPES, глутамат, аргинин, убаин, 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота), H_3PO_4 , формальдегид $[CH_2O]$, молибдат аммония $[(NH_4)_6Mo_7O_{24}]$, $SnCl_2$, $CaCl_2$, $MgSO_4$, TEMED; "Thermo Fisher Scientific": PMSF, красители для проточной цитофлуориметрии – монобромбиман (mBBr), дигидрородамин 123 (DHR123), DAF-FM диацетат, Fluor-4; Германия – "Roche": трис(гидроксиметил)аминометан; "AppliChem": GSH, GSSG, твин-20 (полисорбат-20); Индия – "CDH Fine Chemical": $NaHCO_3$; Китай – "Servicebio": додецилсульфат натрия (SDS), обезжиренное молоко, белки-маркеры для вестерн-блота PageRuler (G26619); "LifeTein": $A\beta_{42}$, $isoA\beta_{42}$.

Антитела для исследования куплены у следующих фирм: Россия – "Хайтест": против N-конца $A\beta_{42}$, конъюгированные с FITC (BAMcc7), к иммуноглобулинам мыши, конъюгированным с пероксидазой хрена (#GAM). Великобритания – "Abscam": против α -Hb (ab92492), β -Hb (ab214049); "Millipore": против глутатионилирования белков P-SSG (MAB5310); США – "Thermo Fisher Scientific" к иммуноглобулинам кролика, конъюгированным с пероксидазой хрена (#A16035);

В работе использовали кровь, полученную из локтевой вены доноров. Эксперименты с кровью людей проводили в соответствии с принципами биомедицинской этики, сформулированными в последней редакции

Хельсинкской декларации (2013 г.). Эксперименты одобрены локальным биоэтическим комитетом. От всех пациентов получено информированное согласие на проведение медицинского обследования, в том числе на взятие образцов крови.

2. Методы

2.1. Подготовка образцов эритроцитов

Образцы крови отбирали в пробирку с гепарином из контейнера Бактивам (Масо Pharma, Франция) с цельной донорской кровью через адаптер для вакуумных пробирок Вакувам (Improvacuter, Россия) чтобы избежать попадания воздуха. Отсутствие воздуха предотвращает активацию клеток, гепарин необходим для антикоагуляции. Для отделения эритроцитов цельную кровь центрифугировали с ускорением 1500 g при +23°C в течение 10 мин, отбирали супернатант и ресуспендировали осажденные эритроциты в буфере, имитирующем плазму крови. Дважды повторяли процедуру. Отмытые эритроциты ресуспендировали в буфере, имитирующем плазму крови (в объемном соотношении 1:2) и подвергали стрессовым воздействиям, типичным для эритроцитов, циркулирующих в кровотоке.

Состав буфера, имитирующего плазму крови (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 0.75 mM MgSO₄, 0.015 mM ZnCl₂, 0.1 mM аргинина, 0.2 mM глутамата, 0.2 mM глицина, 0.2 mM аланина, 0.6 mM глутамина, 10 mM глюкозы, 20 mM HEPES, 9 mM NaOH, pH 7.4 при +23°C) [39], несколько изменяли в зависимости от решаемой задачи. В экспериментах, посвященных адаптации эритроцитов к *механическому* и *краткому осмотическому* воздействию использовали буфер описанного выше состава. В то же время, в экспериментах по адаптации эритроцитов к *деоксигенации*, к *длительному осмотическому* и *метаболическому* стрессу клетки инкубировали в среде с 5% содержанием CO₂, соответственно, применяли буфер, содержащий 115 mM NaCl и 25 mM NaHCO₃. Также, при *метаболическом* воздействии 10 mM глюкозы добавляли только в

2.2. Деоксигенация эритроцитов

Эритроциты в буфере, имитирующем плазму крови, аликвотировали по 100 мкл и инкубировали в условиях недостатка кислорода (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂) в гипоксической станции Whitley H45 HEPA (Don Whitley Scientific Ltd, Великобритания). Контрольную группу инкубировали в клеточном CO₂-инкубаторе в условиях нормоксии (20% O₂, 5% CO₂, 75% N₂) [193] в течение 3 ч. при +37°C. Время инкубации рассчитывали так, чтобы эритроциты в условиях гипоксии перешли в деоксигенированное состояние. Эффективность деоксигенации подтверждали по характеру спектра поглощения гемоглобина в диапазоне 500 – 700 нм [149], измеренного на спектрофотометре V-550 (Jasco, Япония). Измерение проводили в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см. Спектры регистрировали со скоростью сканирования 100 нм/мин.

По окончании инкубации оценивали редокс-статус эритроцитов и содержание внутриклеточного Ca²⁺ методом проточной цитофлуориметрии (FC). Отбирали аликвоты для оценки уровня внутриклеточного Na⁺ и K⁺ методом атомно-абсорбционной спектрометрии (ААС). Остальные аликвоты замораживали в жидком азоте и помещали на -80°C для последующей оценки уровня свободного GSH реактивом Элмана (ДТНБ), постановки вестерн-блота и других тестов.

2.3. Индукция метаболического стресса

Отмытые от плазмы эритроциты ресуспендировали и инкубировали в безглюкозной среде (стресс) и в буфере, содержащем 10 мМ глюкозы (контроль) в клеточном CO₂-инкубаторе в течение 24 ч. при +37°C. По окончании инкубации оценивали редокс-статус эритроцитов и содержание внутриклеточного Ca²⁺ методом FC. Отбирали образцы для оценки уровня внутриклеточного Na⁺ и K⁺ методом ААС. Часть образцов замораживали в жидком азоте и помещали на -80°C для последующей оценки содержания внутриклеточного АТФ и степени глутатионилирования Hb методом вестерн-блоттинга, как описано далее.

2.4. Индукция осмотического стресса

К суспензии эритроцитов в буфере, имитирующем плазму крови, добавляли дистиллированную воду так, что вода составляла 1/3 объема конечной пробы. Это приводит к снижению осмолярности с 330 до 250 мОсм/л [194]. Состояние клеток оценивали в двух временных точках, соответствующих *краткому* и *хроническому* осмотическому стрессу – через 1 мин и через 24 ч. инкубации в гипоосмотической среде. По окончании инкубации оценивали редокс-статус эритроцитов и содержание внутриклеточного Ca^{2+} методом FC. Часть образцов замораживали в жидком азоте и помещали на -80°C для последующей оценки степени глутатионилирования Hb методом вестерн-блоттинга, как описано далее.

2.5. Индукция механического стресса

Круговые фильтры с диаметром пор 1.2 мкм (GE HealthCare, США) смачивали в буфере, имитирующем плазму крови, и вместе со специальной вставкой, имеющей сетчатое дно для удержания фильтра, помещали в пробирки типа фалькон так, чтобы фильтр полностью закрывал просвет пробирки. Исходную суспензию эритроцитов в буфере, имитирующем плазму крови, разводили в 10 раз. 1 мл полученной суспензии наслаивали на фильтр и центрифугировали при ускорениях 400 или 1500 g и температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 30 сек. Для оценки вклада центробежных сил в паре с каждым подопытным образцом центрифугировали 1 мл суспензии эритроцитов в пробирке без фильтра. Контрольную группу держали при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ и не подвергали манипуляциям.

Через 3 мин после прохождения эритроцитов через фильтр регистрировали редокс-параметры эритроцитов, а также содержание внутриклеточного Ca^{2+} методом FC. Собранные фракции эритроцитов разделяли по 100 мкл; отбирали образцы для оценки уровня внутриклеточного Na^{+} и K^{+} методом ААС; часть образцов замораживали в жидком азоте и помещали на -80°C для последующего

анализа степени глутатионилирования Hb методом вестерн-блоттинга, как описано далее.

2.6. Приготовление $A\beta_{42}$ и $изоA\beta_{42}$ и инкубация с эритроцитами

Синтетический пептид $A\beta_{42}$ и его изомеризованную по Asp7 форму ($изоA\beta_{42}$) приобрели у LifeTein (США). Подготовку р-ор $A\beta_{42}$ и $изоA\beta_{42}$ в DMSO проводили по стандартной методике [195]. Ледяной гексафторизопропанол добавили к сухому $A\beta_{42}$ или $изоA\beta_{42}$ до конечной концентрации 1 мМ и инкубировали в течение часа при +23°C. По окончании инкубации р-ор поместили на лед на 10 мин и аликвотировали из расчета 0.56 мг пептида на аликвоту. Пептиды высушили в вакуумной сушилке (Eppendorf, США) и хранили при -80°C.

2.5 мМ стоковые р-ры бета-амилоидов готовили непосредственно перед экспериментами, добавляя к сухим пептидам 20 мкл безводного ДМСО и инкубируя в течение часа при +23°C. Стоковые р-ры бета-амилоидов разбавляли фосфатно-солевым буфером и добавляли к суспензии эритроцитов в буфере, имитирующем плазму крови, в конечной концентрации 0.1 или 1 мкМ. Образцы инкубировали в течение 90 мин при +37°C. Часть проб предварительно преинкубировали с нейраминидазой (15 мг/л) в течение часа при +37°C. Ингибитор NADPH-оксидаз хлорид дифенилениодиния (DPI) добавляли в конечной концентрации 50 мкМ за 30 мин до добавления бета-амилоидов. Во все экспериментальные и контрольные образцы добавляли равное количество ДМСО.

2.7. Проточная цитофлуориметрия

Методом проточной цитофлуориметрии проводили анализ внутриклеточного редокс-статуса клеток по уровню GSH, АФК и NO, а также определяли содержание внутриклеточного Ca^{2+} . Для инкубации с флуоресцентными красителями 1 мкл суспензии эритроцитов ресуспендировали в 100 мкл буфера, имитирующего плазму крови. В случае механического

воздействия – 20 мкл в 2 мл буфера. Содержание низкомолекулярных тиолов оценивали с использованием флуоресцентного красителя mBBr ($E_x/E_m = 392/490$ нм), который добавляли до конечной концентрации 20 мкМ [39]. Уровень АФК и уровень NO определяли с помощью окрашивания 5 мкМ DHR123 ($E_x/E_m = 507/525$ нм) [196] и 5 мкМ DAF-FM диацетата ($E_x/E_m = 495/515$ нм) [197] соответственно. Внутриклеточный уровень Ca^{2+} определяли, окрашивая клетки 2.5 мкМ Fluo-4 ($E_x/E_m = 495/516$ нм), как описано ранее [198]. После окрашивания клетки инкубировали в темноте в течение 30 мин при $+37^\circ\text{C}$. В случае длительного воздействия (деоксигенация, метаболический, длительный осмотический стресс) эритроциты окрашивали за 30 мин до конца индукции соответствующего воздействия. Для краткосрочных стрессов (механический, краткий осмотический в течении 1 мин) окрашивание клеток проводили заблаговременно, до непосредственного воздействия.

Также оценивали средние значения параметров малоуглового (FSC) и бокового светорассеяния (SSC), характеризующих площадь поперечного сечения и форму эритроцитов [176,199]. Анализ эритроцитов проводили на проточном цитофлуориметре BD LSRFortessa™ (Becton Dickinson, США).

Связывание $A\beta_{42}$ и $isoA\beta_{42}$ с поверхностью эритроцитов оценивали при помощи антител на N-конец $A\beta_{42}$, конъюгированных с FITC. После завершения инкубации с амилоидными пептидами в образцы вносили по 1 мл буфера, имитирующего плазму крови (PLB), и центрифугировали с ускорением $1500 g$ в течение 5 мин при $+23^\circ\text{C}$. Процедуру отмывки повторяли два раза, после чего ресуспендировали клетки в 100 мкл буфера. В каждую пробу вносили по 1 мкл антител и инкубировали в темноте в течение часа при $+37^\circ\text{C}$. Затем эритроциты дважды отмывали в 1 мл буфера и ресуспендировали клетки в 300 мкл буфера. Регистрировали интенсивность флуоресценции и процент эритроцитов с высокой флуоресценцией. Эффективность действия нейраминидазы оценивали по связыванию лектина с поверхностью эритроцитов после инкубации с нейраминидазой. Окрашивание лектином проводили сразу после отмывки в течение 30 мин при $+37^\circ\text{C}$.

2.8. Оценка уровня свободного GSH реактивом Элмана

Замороженные пробы (по 100 мкл), полученные после различных стрессовых воздействий, помещали на лёд и добавляли 400 мкл 5%-ой трихлоруксусной кислоты. После разморозки и выпадения белкового осадка пробы центрифугировали с ускорением 16100 g при +4°C в течение 10 мин. Осадок растворяли в 1.5 мл 0.1 М NaOH и использовали для оценки содержания белка в пробах как описано далее. Депротеинизированный [200] супернатант отбирали и вносили в 100 мМ калий-фосфатный буфер (PBS), содержащий 5 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), в соотношении 1:10 [201,202]. Непосредственно перед измерением готовили 10 мМ раствор 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) (ДТНБ). Добавляли в образцы до конечной концентрации 0.1 мМ. Измерения проводили в 1-см кварцевых кюветах на спектрофотометре V-550 (Jasco, Япония).

Уровень внутриклеточного GSH оценивали по разнице поглощения при длине волны 412 нм до добавления ДТНБ и после 3 мин инкубации с 0.1 мМ ДТНБ [202]. Полученные значения пересчитывали по калибровочной кривой и нормировали на содержание белка. Калибровку выполняли по раствору GSH, содержащему 5% ТХУ.

2.9. Оценка уровня свободного GSH методом ядерного магнитного резонанса

Замороженные пробы (по 100 мкл), полученные после различных стрессовых воздействий, помещали на лёд и добавляли 400 мкл 5%-ой трихлоруксусной кислоты на D₂O. После разморозки и выпадения белкового осадка пробы центрифугировали с ускорением 16100 g при +4°C в течение 10 мин. Осадок растворяли в 1.5 мл 0.1 М NaOH и использовали для оценки содержания белка в пробах как описано далее. Депротеинизированный [200] супернатант отбирали и помещали на лёд. 410 мкл супернатанта переносили в стандартную 5 мм пробирку для ЯМР. Непосредственно перед каждым экспериментом готовили стандартный р-ор – 0.5 мкг/мл GSH на D₂O. Спектры

^1H ЯМР регистрировали на спектрометре 300 МГц Avance 3 (Bruker, США) при температуре 303 К, используя импульсную последовательность Watergate W5 [203] для подавления сигнала воды. Каждый спектр накапливался из 192 сканов. Серии спектров записывали параллельно с последовательным добавлением аликвот стандартного р-ра GSH в ЯМР-пробирку при помощи стеклянного капилляра. Объем каждой аликвоты определяли гравиметрически. После коррекции фазы для каждой серии спектров вычитали базовую линию. Сигнал β -протонов цистеина (при 2.9 м.д.), характерный для GSH, интегрировали. Содержание GSH в образцах определяли по интегральным интенсивностям методом линейной регрессии.

2.10. Атомно-абсорбционная спектрометрия

Методом атомно-абсорбционной спектрометрии оценивали содержание ионов Na^+ и K^+ в эритроцитах. Аликвоты (по 100 мкл) эритроцитов в буфере, имитирующем плазму крови, помещали на лед и добавляли 1 мл ледяного 0.1 М MgCl_2 . Образцы центрифугировали с ускорением 1500 g в течение 10 мин при $+4^\circ\text{C}$. Супернатант отбирали, клетки ресуспендировали в 1 мл 0.1 М MgCl_2 . Повторяли процедуру трижды. После последнего центрифугирования осажденные клетки ресуспендировали в 5%-ой трихлоруксусной кислоте и инкубировали в течение ночи при $+4^\circ\text{C}$ для осаждения белков [194]. После инкубации образцы центрифугировали с ускорением 16100 g в течение 10 мин. Депротенинизированный [200] супернатант отбирали и определяли концентрации ионов Na^+ и K^+ на приборе Квант-2М (КОРТЭК, Россия) [204]. Осадок растворяли в 0.1 М NaOH и использовали для определения содержания белка, как описано далее. Полученные значения концентраций Na^+ и K^+ в пробах нормировали на содержание белка.

2.11. Оценка уровня АТФ

Содержание АТФ в клетках определяли по уровню флуоресценции на микропланшетном ридере Spark (Tecan, Австрия) при помощи набора ATP Assay

Kit (Sigma-Aldrich, США) [197]. Полученные значения нормировали на содержание белка.

2.12. Оценка содержания общего белка

Содержание белка в пробах измеряли при помощи набора на основе бицинониновой кислоты BCA Assay Kit (ThermoFisher Scientific, США). Концентрацию белка определяли по поглощению при 562 нм на микропланшетном ридере Spark (Tecan, Австрия) [205].

2.13. Иммуоблотинг

Степень глутатионилирования Hb оценивали методом иммуоблотинга. Замороженные ранее эритроциты лизировали путем трехкратного цикла разморозки–заморозки и добавляли содержащий SDS двукратный трис-глициновый буфер для образцов без меркаптоэтанола. Инкубировали в термостате в течение 30 мин при +37°C. Электрофорез проводили в 14%-ном разделяющем и 5%-ом концентрирующем полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по методу Laemmli [206] на установке Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, США). Электроперенос белков на PVDF мембрану проводили при силе тока 0.8-1.2 А в течение 7 мин в камере Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, США), используя транс-буфер для полусухого переноса (25 мМ трис-НСl, 192 мМ глицин, 20% этанол). Мембраны инкубировали в блокирующем буфере – 5%-ном обезжиренном молоке на трис-солевом буфере, содержащем 0.1% детергента (TBST) – в течение 1 ч. при +23°C с постоянным перемешиванием. Инкубацию с первичными антителами проводили в TBST в течение ночи при +4°C с постоянным перемешиванием. Затем отмывали мембраны в TBST три раза по 15 мин и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена в TBST в течение 30 мин при +23°C и постоянном перемешивании. Мембраны отмывали от вторичных антител в TBST 3 раза по 10 мин и проявляли при помощи набора SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific,

США) на приборе ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, США).

Уровень глутатионилирования гемоглобина оценивали с использованием первичных мышинных антител на глутатион в составе белков в разведении 1:1000 и вторичных антител к иммуноглобулинам мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена в разведении 1:10000. Полученный сигнал нормировали на содержание α - и β -субъединиц гемоглобина, которое оценивали с использованием первичных кроличьих антител в разведении 1:1000 и вторичных антител к иммуноглобулинам кролика, конъюгированных с пероксидазой хрена в разведении 1:5000. Обработку данных проводили в программе Image Lab 6.0.1.

2.14. Подготовка растворов гемоглобина, нековалентного комплекса гемоглобина с глутатионом и глутатионилированного гемоглобина

Образцы Hb для оценки конформационных изменений белка готовили с использованием очищенного метгемоглобина человека. Навеску метгемоглобина разводили в ледяном 50 мМ К-фосфатном буфере (34.8 мМ K_2HPO_4 , 15.2 мМ KH_2PO_4 , 2 мМ $MgCl_2$, pH 7.4), содержащем 50 мМ KCl до конечной концентрации 100 или 200 мкМ. Метгемоглобин инкубировали на льду с 5 мМ дитионитом натрия ($Na_2S_2O_4$) в течение 30 мин. Инкубация с $Na_2S_2O_4$ приводит к восстановлению железа в геме metHb ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$) и тиоловых групп белка ($-S-S- \rightarrow -S-H$). Для очистки от $Na_2S_2O_4$ восстановленный Hb пропускали через колонку для гель-фильтрации PD MiniTrap G-25 (Cytiva, США). Элюирование проводили с использованием 50 мМ К-фосфатного буфера. Образец разделяли на аликвоты по 80-100 мкл.

Параллельно, по мере необходимости, готовили р-ры 4 мМ GSSG и GSH на 50 мМ К-фосфатном буфере, содержащем 50 мМ KCl (pH 7.4). В опытах с применением изотермической калориметрии титрования (часть 2.13) аликвоты 4 мМ GSH добавляли к р-ру Hb непосредственно во время эксперимента. Перед снятием спектров комбинационного рассеяния (часть 2.14) и инфракрасных спектров (часть 2.15) р-ор белка инкубировали в течение 1 ч. при +23°C с 4 мМ GSSG для получения *глутатионилированного гемоглобина (Hb-SSG)* и с 4 мМ

GSH для образования *нековалентного комплекса гемоглобина с глутатионом (Hb:GSH)*.

2.15. Изотермическая калориметрия титрования

Методом изотермической калориметрии титрования оценивали взаимодействие окси и деоксиформы Hb с GSH. Эксперименты с оксиформой Hb проводили в нормальной атмосфере (20% O₂) при +23°C. Пробоподготовку проводили, как описано в части 2.12 текущей главы. Пробоподготовку и эксперименты с deoxyHb проводили аналогично, но в условиях низкого содержания кислорода (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂) в гипоксической станции Whitley H45 HEPA (Don Whitley Scientific Ltd, Великобритания) при +23°C. 50 мМ К-фосфатный буфер для приготовления р-ов и элюции предварительно уравнивали в гипоксической атмосфере.

Аликвоты лиганда (4 мМ GSH) по 2.0 мкл вносили в ячейку, содержащую 70-100 мкМ Hb, для получения полной изотермы связывания. Чтобы определить эффективную теплоту связывания, теплоту разбавления вычитали из теплоты реакции. Термодинамические параметры связывания GSH с Hb исследовали на приборах MicroCal iTC200 и MicroCal PEAQ-ITC (Malvern Panalytical, Великобритания). Полученные кривые титрования анализировали в программе MicroCal Origin и в программном обеспечении Malvern в приближении одного типа сайтов связывания лиганда. Определяли значение равновесной константы ассоциации (K_a, 1/K_d), изменение энтальпии (ΔH) и стехиометрию связывания (N). Изменения энергии Гиббса (ΔG) и энтропии (ΔS) рассчитывали из уравнения:

$$\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T\Delta S,$$

где R – газовая постоянная (≈8,314 Дж/(моль*К))

2.16. Спектроскопия комбинационного рассеяния

Спектры комбинационного рассеяния (КР) образцов Hb получали на комбинированном конфокальном микроскопе-спектрометре Интегра-Спектра

(НТ-МДТ, Россия) используя два разных лазера.

Параметры регистрации #1: лазер 532 нм [207,208], мощность на образце составляла 1-2 мВт, время предварительной экспозиции для уменьшения флуоресценции 20 сек., время регистрации спектра 15-30 сек. Образцы набирали в гематокритные капилляры (АгатМед, Россия), которые запаивали для герметичности [209]. Фильтрацию полученных спектров от шумов проводили методом Савицкого-Голея [210] (интервал 10, полиномиальный порядок 3).

Параметры регистрации #2: лазер 633 нм [211], мощность на образце составляла 1-2 мВт, время предварительной экспозиции для уменьшения флуоресценции 20 сек., время регистрации спектра 10 или 20 сек. Образцы высушивали в виде капли на зеркальном стекле, регистрацию спектров проводили с края капли.

Полученные спектры обрабатывали в программах OriginPro 2018 и Spectragryph 1.2. Спектры представляли в виде зависимости интенсивности от частотного сдвига. Вычитали базовую линию по встроенному алгоритму, нормировали спектры на общую площадь под кривой, определяли интенсивности характерных полос.

2.17. Регистрация инфракрасных спектров

Инфракрасные спектры (ИК) образцов регистрировали на FTIR-спектрометре Spectrum Two FT-IR (Perkin Elmer, США) с приставкой неполного внутреннего отражения (ATR-FTIR). Каплю образцов в буфере высушивали на предметном стекле и прижимали к окну из селенида цинка. Регистрацию сигнала проводили в диапазоне $550 - 4000 \text{ см}^{-1}$ с шагом сканирования 4 см^{-1} . Полученные спектры обрабатывали в программе Spectragryph 1.2. Спектры представляли в виде зависимости поглощения от частоты. Вычитали базовую линию по встроенному алгоритму, нормировали спектры на общую площадь под кривой, определяли интенсивности характеристических полос.

2.18. Визуализация морфологических изменений эритроцитов

Фотографии эритроцитов после стрессовых воздействий получали при помощи автоматического клеточного анализатора JuLI Stage (NanoEn Tek, Республика Корея). При съемке использовали встроенный объектив с увеличением 20х.

2.19. Статистическая обработка

Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 10. Нормальность распределения данных определяли по критериям Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Для оценки достоверности различий между двумя группами эритроцитов с нормальным распределением данных использовали парный *t*-критерий Стьюдента для двух зависимых (парных) выборок. Для групп с не нормальным распределением данных использовали непараметрический *W*-критерий Уилкоксона для двух зависимых (парных) выборок. Для оценки достоверности различий между тремя и более группами эритроцитов применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) для зависимых выборок с тестом Тьюки для множественных сравнений в случае нормально распределенных данных и непараметрический критерий Фридмана с тестом Данна для случаев не нормального распределения. Достоверность различий между тремя независимыми группами данных (спектры очищенного Hb) оценивали при помощи ANOVA и теста Тамхейна T2 для множественных сравнений.

При значении $p < 0.05$ различия между группами считали достоверными. На рисунках приведены разбросы данных, медианы, средние значения, значения p и величина стандартного отклонения, рассчитанные на основании 3-20 независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Адаптация эритроцитов к деоксигенации

В артериальной крови содержание O_2 составляет около 12-15 кПа, в то время как в тканях оно снижается до 3-6 кПа [212] и может быть еще меньше при недостатке O_2 и различных патологиях. Таким образом, при циркуляции в кровотоке эритроциты постоянно адаптируются к различному уровню O_2 . В качестве условий гипоксии нами было выбрано парциальное давление O_2 в 1 кПа, что соответствует 1% O_2 при атмосферном давлении. Для эритроцитов это условия гипоксии.

1.1. Содержание Na^+ и K^+ при деоксигенации

После 3 ч. инкубации в условиях нормоксии (20% O_2) и гипоксии (1% O_2) мы оценили внутриклеточные уровни ионов Na^+ и K^+ . Показано, что выбранные условия деоксигенации не влияют на содержание в клетке как Na^+ (рис. 13а), так и K^+ (рис. 13б).

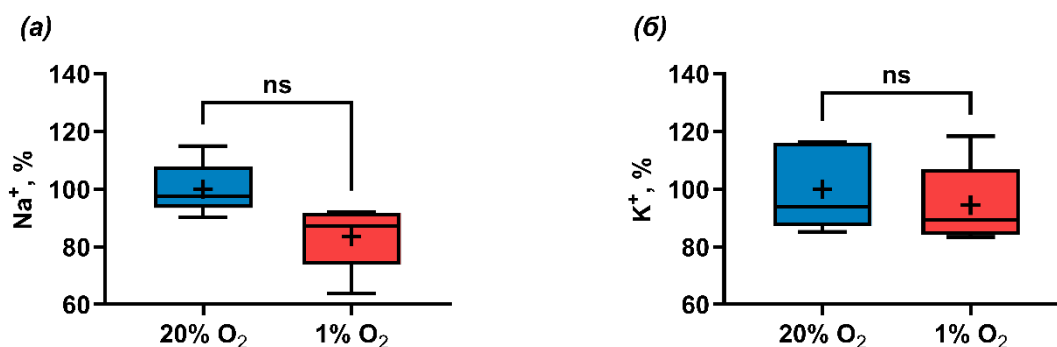


Рис. 13. Содержание внутриклеточного Na^+ (а) и K^+ (б) в эритроцитах через 3 ч. инкубации в условиях нормоксии (20% O_2) и гипоксии (1% O_2). За 100% принято значение исследуемых параметров в нормоксии (20% O_2). Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, $n = 5$.

1.2. Содержание Ca^{2+} и редокс-параметры при деоксигенации

Внутриклеточный Ca^{2+} играет важную роль во внутриклеточном сигналинге [44,213,214]. Поскольку O_2 вовлечен в окислительно-восстановительные реакции, снижение его содержания может менять редокс-статус клеток. Влияние деоксигенации на уровень внутриклеточного Ca^{2+} и параметры редокс-статуса (уровень GSH, АФК и NO) оценивали с использованием флуоресцентных красителей методом проточной цитометрии.

Через 3 ч. инкубации в условиях гипоксии в эритроцитах на 90%, возрастает ($p < 0.001$) уровень Ca^{2+} (рис. 14а). Ранее было показано, что при увеличении внутриклеточного Ca^{2+} с 20 до 200 нМ снижается сродство Hb к O_2 (P_{50} возрастает с 2.28 ± 0.01 до 4.1 ± 0.27 кПа) [34]. Хотя молекулярный механизм этого явления еще не установлен [34], очевидно, что этот эффект способствует высвобождению O_2 в условиях гипоксии – в тканях организма – и, таким образом, улучшает их снабжение O_2 . На фоне повышенного содержания Ca^{2+} наблюдается такой же (на 90%) рост ($p < 0.01$) уровня NO (рис. 14б). Мы полагаем, что рост Ca^{2+} приводит к запуску Ca^{2+} -зависимых NO-синтаз [109]. Известно, что *de novo* синтез NO эритроцитами и его последующий выход из клетки способствуют вазодилатации и улучшению кровоснабжения тканей, упрощая прохождение эритроцитов через просвет капилляров [110]. Тем не менее, также необходимо учитывать процесс неферментативного образования NO из NO_2^- , катализируемый деоксиформой Hb [152]. При деоксигенации количество синтезируемого NO по неферментативному пути образования постепенно возрастает, в то время как ферментативная генерация NO Ca^{2+} -зависимыми NO-синтазами, напротив, подавляется, поскольку O_2 используется этими ферментами в качестве субстрата [109]. Таким образом, вопрос о точном механизме роста уровня NO в эритроцитах при деоксигенации пока остается открытым.

Содержание АФК в эритроцитах через 3 ч. инкубации в условиях гипоксии не меняется (рис. 14з). То есть, в условиях недостатка O_2 развития окислительного стресса мы не регистрируем. Известно, что длительные периоды

системной гипоксии способствуют развитию состояния некомпенсированного окислительного стресса в тканях [7]. При этом, основной источник образующихся при окислительном стрессе АФК – это митохондрии [215] – органеллы, отсутствующие у зрелых эритроцитов. Перемещаясь по кровотоку эритроциты поглощают АФК, образующиеся в периферических тканях в условиях стресса, в том числе при дефиците O_2 [18].

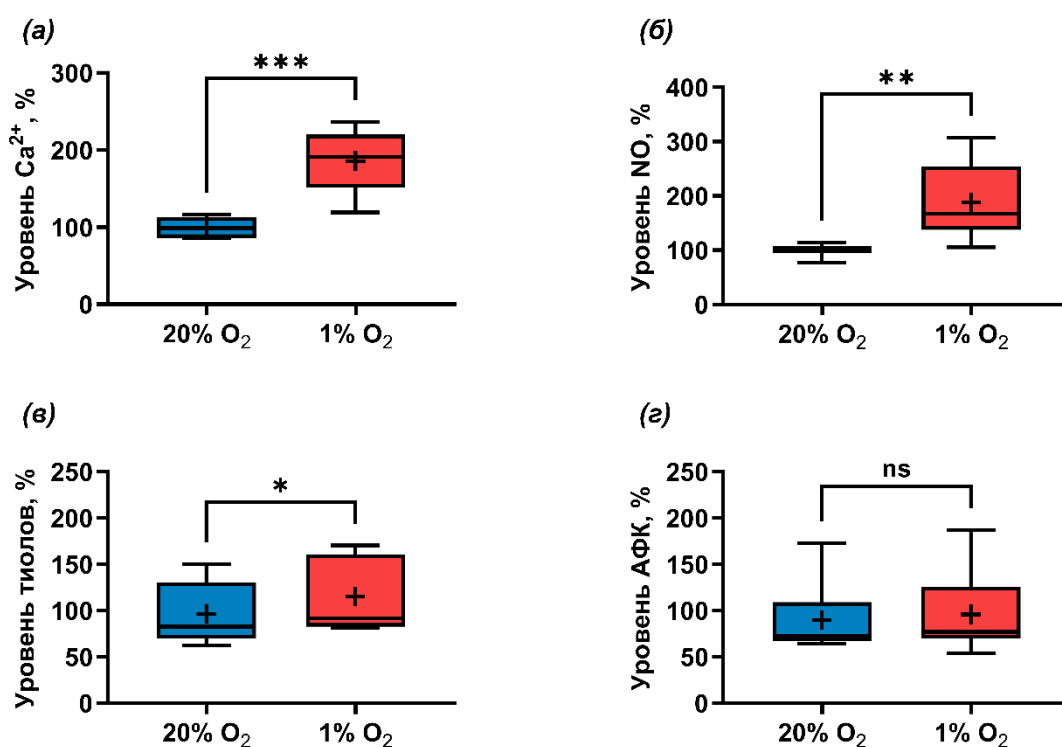


Рис. 14. Уровни Ca^{2+} (а), NO (б), восстановленных тиолов (в), АФК (г) в эритроцитах через 3 ч. инкубации в условиях нормоксии (20% O_2) и гипоксии (1% O_2). За 100% принято значение исследуемых параметров в нормоксии (20% O_2). Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, $n = 6$. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Таким образом, наш эксперимент на изолированных клетках показал, что в условиях гипоксии сами по себе эритроциты не продуцируют АФК. Более того, в этих условиях методом проточной цитометрии мы обнаружили значительное ($p < 0.01$) – на 30% – увеличение содержания тиолов (преимущественно GSH

[216]) в клетках (рис. 14*в*). То есть, в эритроцитах при гипоксии не только не развивается окислительный стресс, но напротив, наблюдается рост основного низкомолекулярного тиола клеток GSH. Уровень GSH в эритроцитах мы оценили также спектрофотометрически (рис. 15*а*) при помощи реактива Элмана после предварительного осаждения белков. Показано, что в условиях гипоксии уровень GSH возрастает ($p < 0.001$) в 2-3 раза. Значимость различий подтвердили парным t -критерием (ratio paired t -test) для двух зависимых (парных) выборок.

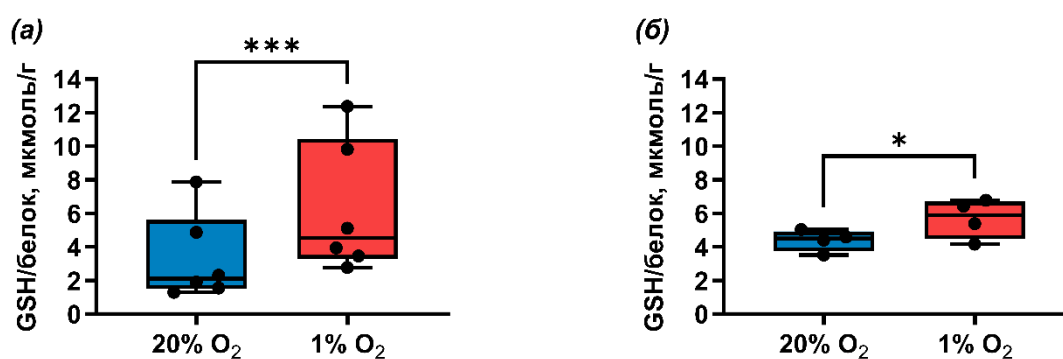


Рис. 15. Уровень свободного GSH в эритроцитах через 3 ч. инкубации в условиях нормоксии (20% O₂) и гипоксии (1% O₂) измеренный (*а*) при помощи реактива Элмана и (*б*) методом протонного магнитного резонанса. Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса, первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов. Точками представлены абсолютные значения для каждого донора, $n = 4-6$. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

Необходимо отметить, что у спектрофотометрического метода с использованием реактива Элмана есть свои ограничения. При измерении GSH реактив также связывается с любыми низкомолекулярными тиолами, например, цистеином, хотя в клетках млекопитающих GSH безусловно количественно (~98% от всех небелковых тиолов) преобладает над другими источниками сигнала [216]. Поэтому мы также провели анализ методом ЯМР, результаты которого подтвердили рост содержания GSH в эритроцитах при деоксигенации среды (рис. 15*б*). Отметим также, что согласно данным наших коллег [6] рост уровня GSH при гипоксии наблюдается даже при ингибировании синтеза глутатиона

путем блокады глутатион-синтазы 1мМ бутионин сульфоксимином. То есть, возрастание GSH не обусловлено усилением синтеза. Кроме того, с использованием реактива Элмана показано, что увеличение GSH также не связано с восстановлением GSSG [6].

1.3. Глутатионилирование гемоглобина при деоксигенации и нековалентный комплекс глутатиона с гемоглобином

Рост уровня свободного GSH в эритроцитах при деоксигенации мог быть обусловлен процессом деглутатионилирования (открепления молекул глутатиона от цистеиновых остатков за счет восстановления S-S связей) Hb – мажорного белка эритроцитов. Тетрамер Hb содержит 6 остатков цистеина (рис. 16) – по одному на каждой α -субъединице (Cys104) и по два на каждой β -субъединице (Cys93, Cys112) [21].

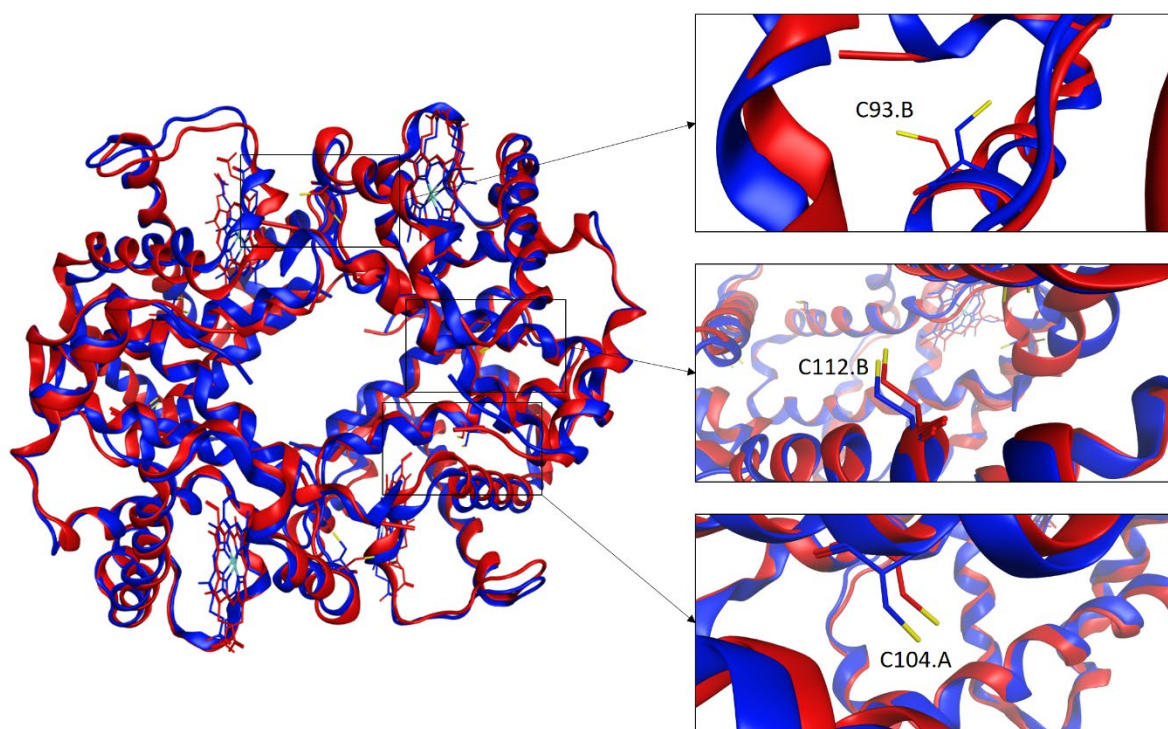


Рис. 16. Моделирование доступности остатков цистеина (α Cys104, β Cys93 и β Cys112) для S-глутатионилирования в структуре оксигенированного (синий) и деоксигенированного (красный) Hb. Области, в которых локализованы Cys, показаны с увеличением. Изображение Ю.М. Полуэктова.

В настоящее время доказано глутатионилирование по остаткам β Cys93

[155] и β Cys112 [156], а имеющиеся данные о глутатионилировании α Cys104 противоречивы [6,157]. Анализ существующих структур Hb, выполненный в нашей лаборатории (рис. 16) продемонстрировал, что α Cys104 недоступен для растворителя ни в окси-, ни в деоксиформе Hb; доступность β Cys93 для глутатионилирования значительно выше в деоксиформе, в то время как β Cys112 доступен для глутатионилирования как в оксигенированной, так и в деоксигенированной форме белка [6]. Таким образом, к росту GSH могло бы привести деглутатионилирование β Cys93, который становится доступен растворителю при деоксигенации.

Методом вестерн-блоттинга мы оценили уровень глутатионилирования Hb в эритроцитах после 3 ч. инкубации в нормоксии (20% O₂) и гипоксии (1% O₂) и не обнаружили изменений (рис. 17). Это означает, что деглутатионилирование Hb не может быть источником свободного GSH при деоксигенации.

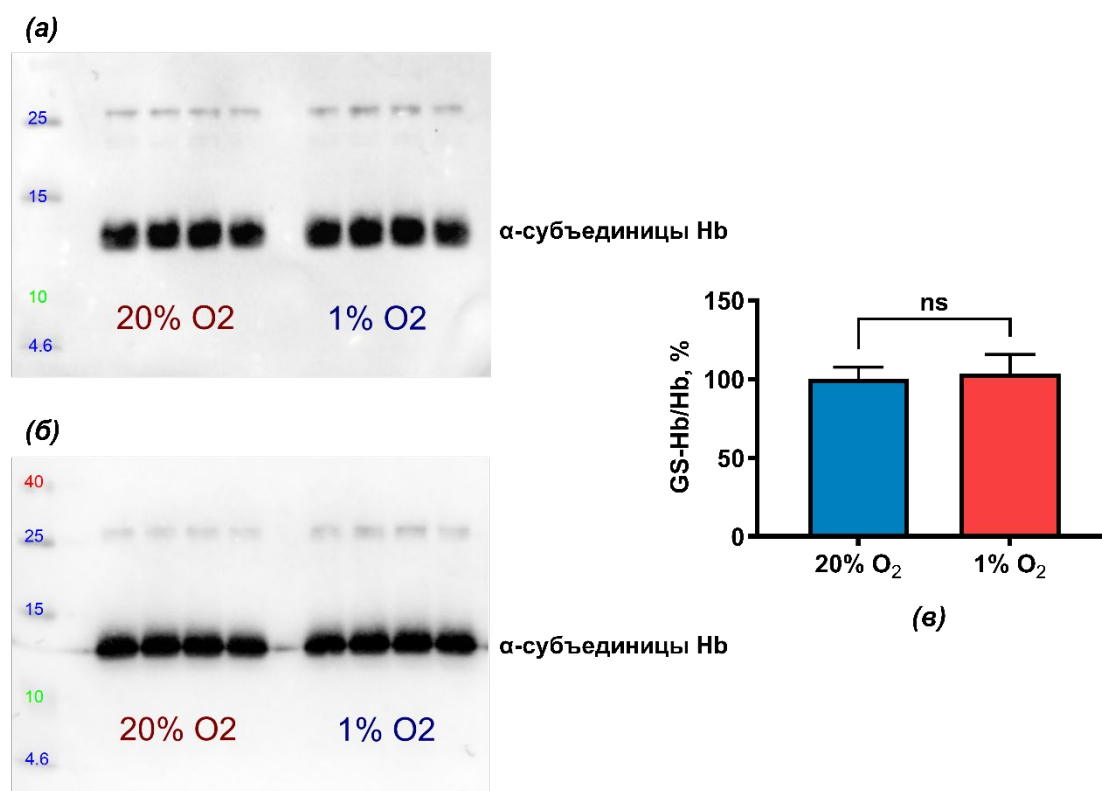


Рис. 17. Степень глутатионилирования Hb через 3 ч. инкубации в условиях нормоксии (20% O₂) и гипоксии (1% O₂). Иммуноблоттинг с антителами против глутатионилированного белка (GS-Hb) (а) и α -субъединицы гемоглобина (α -Hb) (б). Представлена одна пара характерных мембран из трех. (в) – результаты количественного анализа. За 100% принят уровень глутатионилирования Hb в

эритроцитах в условиях нормоксии (20% O₂). Данные представлены как среднее \pm SD.

Чтобы выяснить, происходит ли нековалентное связывание GSH с Hb был использован метод изотермической калориметрии титрования. Кривые титрования и изотермы связывания GSH с охуHb (рис. 18а) и деохуHb (рис. 18б) представлены ниже. Из представленных данных видно, что как охуHb, так и деохуHb способны связывать GSH, однако стехиометрии связывания для данных формы различны (рис. 18).

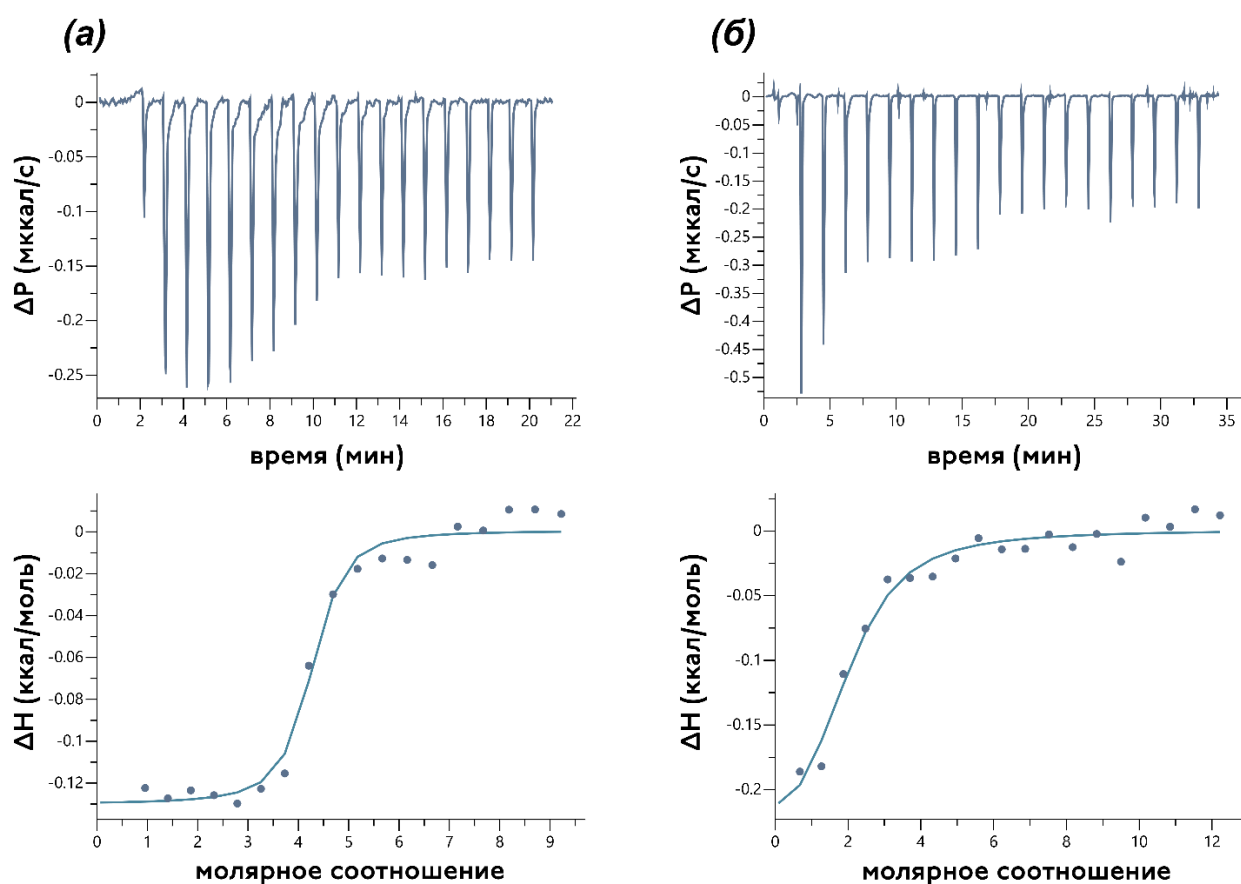


Рис. 18. Образование нековалентного комплекса GSH с охуHb и деохуHb. Кривые титрования (сверху) и изотермы связывания (снизу) взаимодействия GSH с (а) оксиформой Hb (при 20% O₂) и с (б) деоксиформой Hb (при 1% O₂) при T=25°C.

Использование в эксперименте Hb с восстановленными тиоловыми группами и восстановленного глутатиона (GSH) исключает образование ковалентной S-S связи между Hb и глутатионом, поскольку реакция S-

глутатионилирования данных тиоловых групп белка протекает только с участием GSSG, но не GSH [135].

В результате анализа изотерм связывания были получены термодинамические параметры образования комплекса – стехиометрия реакции, константа связывания, изменение энтальпии, изменение свободной энергии Гиббса и изменение энтропийного вклада в свободную энергию (табл. 2). Полученная стехиометрия связывания (N) свидетельствует о том, что оксигенированная форма Hb способна связывать четыре молекулы GSH, а деоксигенированная форма только две (табл. 2). Сродство deoxyHb к GSH ($K_d = 17.0$ мкМ) заметно ниже, чем у oxyHb ($K_d = 2.1$ мкМ). В энергию связывания (табл. 2) основной вклад вносит энтропийная составляющая ($-T\Delta S$), что указывает на преобладание гидрофобных взаимодействий между GSH и Hb.

Табл. 2. 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 три-четыре раза 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.

Молекулярный докинг [6] позволил определить вероятное расположение сайтов связывания GSH в молекуле Hb. Показано, что oxyHb связывает восстановленный глутатион в двух парах "карманов"; каждый из "карманов" связывает одну молекулу GSH (рис. 19). Первая пара сайтов связывания расположена на границе между двумя β -глобинами (сайты 1 и 2). Вторая пара сайтов с чуть более низким сродством расположена между двумя α -глобинами

(сайты 3 и 4). В деоксиформе Нб "карманы" между двумя цепями β -глобина (сайты 1 и 2) открываются, высвобождая две молекулы GSH (рис. 19). Таким образом, при переходе молекулы гемоглобина из окси в деоксиформу количество сайтов связывания GSH снижается с четырех до двух, а рост уровня свободного GSH в гипоксии обусловлен диссоциацией из нековалентного комплекса с Нб.

Как мы уже отмечали, основные источники GSH в животной клетке – это синтез ферментами γ -глутамилцистеинсинтетазой и глутатионсинтазой и восстановление окисленной формы глутатиона (GSSG) [9]. Для синтеза 1 молекулы GSH необходимы 2 молекулы АТФ, в то время как для восстановления GSSG до GSH требуется NADPH [119].

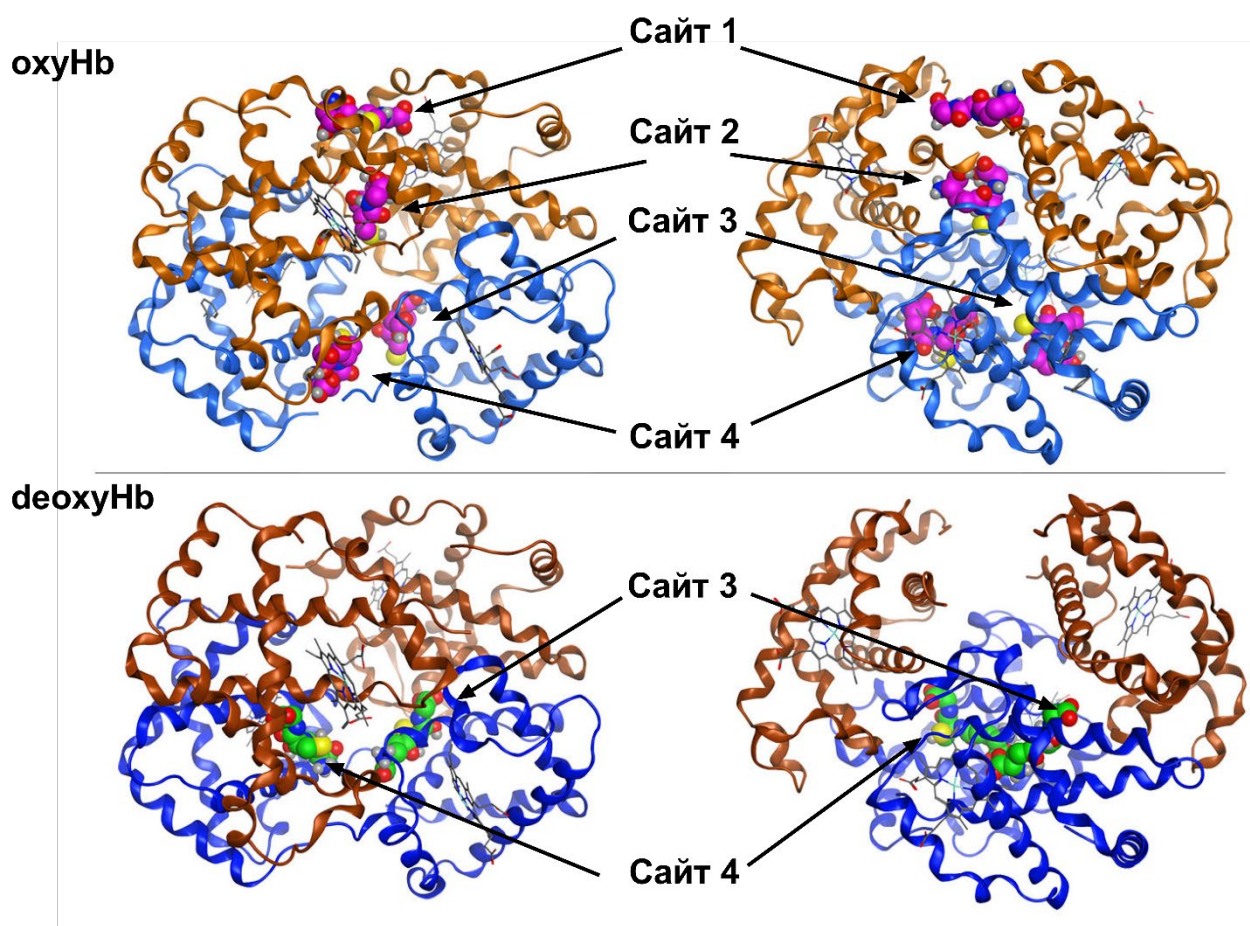


Рис. 19. Нековалентный комплекс Нб с GSH. Сверху – оксиформа Нб, вид спереди и сбоку. Снизу – деоксиформа Нб, вид спереди и сбоку. α -субъединицы обозначены синим цветом, β -субъединицы – коричневым цветом. Сайты связывания GSH отмечены стрелочками. Модель докинга получена при помощи Vина autodock docking.

В течение жизни эритроциты регулярно попадают в условия недостатка O_2 , перемещаясь по капиллярам, расположенным в периферийных тканях. Концентрация Hb в зрелом эритроците приближается к 5.5 мМ [141], что, в соответствии с обнаруженным механизмом, позволяет при деоксигенации быстро высвобождать огромный пул молекул GSH без дополнительных энергетических затрат. Выход GSH из комплекса с deoxyHb может обеспечивать усиленную антиоксидантную защиту эритроцита от свободных радикалов [6], возникающих в митохондриях гипоксических тканей [215].

Гемоглобиновый буфер глутатиона в эритроцитах – это великолепный адаптационный механизм, функционирующий в течение всего жизненного пути клетки и позволяющий эритроцитам снижать потребление глюкозы, что особенно важно в условиях, когда организм сталкивается с острой нехваткой O_2 , поскольку анаэробный гликолиз в этом случае оказывается единственным источником АТФ и NADPH. В конечном счете, именно этот механизм может способствовать выживанию в периоды острой гипоксии [217]. Важно отметить, что в центральной полости Hb также находится сайт связывания регулятора 2,3-BPG, расположенный в β - β -глобиновом интерфейсе. Нашим коллективом показано, что конкуренция между GSH и 2,3-BPG отсутствует, поскольку при деоксигенации два сайта связывания GSH в центральной полости разрушаются, а на их месте формируется сайт связывания 2,3-BPG с Hb [6].

2. Адаптация эритроцитов к метаболическому стрессу

В организме человека физиологической нормой считается суточная гликемическая вариабельность, подразумевающая поочередную смену пониженного и повышенного уровня глюкозы [218], который варьирует в пределах 3.9–6.1 мМ. Снижение уровня глюкозы ниже 3.9 мМ уже считается состоянием гипогликемии, хотя первые симптомы начинают проявляться только при снижении содержания глюкозы до 3.0 мМ [167,219]. Эритроциты зависят от уровня глюкозы в среде поскольку не имеют митохондрий [116]. Гликолиз – основной источник АТФ для эритроцитов [119]. С помощью депривации по глюкозе мы инициировали метаболический стресс.

2.1. Оценка эффективности индукции метаболического стресса

Чтобы оценить влияние депривации по глюкозе на энергетический баланс эритроцитов мы определяли уровень АТФ в цитозоле. Инкубация эритроцитов в безглюкозной среде в течение 24 ч. приводит к существенному снижению ($p < 0.05$) уровня АТФ в клетках – на 47% относительно контроля (рис. 20).

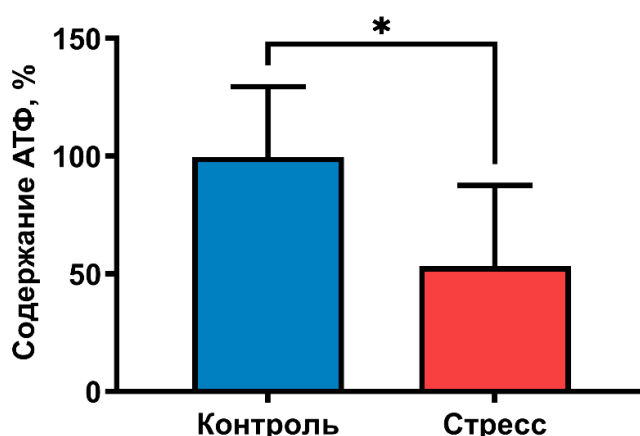


Рис. 20. Содержание АТФ в эритроцитах через 24 ч. инкубации в среде с глюкозой (контроль) и в безглюкозной среде (стресс). За 100% принято значение исследуемых параметров в контроле. Данные представлены как среднее \pm SD, $n = 3$. $*p < 0.05$.

Известно, что падение уровня АТФ в эритроцитах ниже 25% от

нормального значения приводит к разрушению цитоскелета с последующим гемолизом [220]. В нашем эксперименте столь критического падения внутриклеточного АТФ не происходит. Таким образом, мы успешно индуцировали метаболический стресса в эритроцитах, о чем свидетельствует значимое, но не летальное для клеток снижение содержания АТФ. Ранее в литературе описывали и более существенное (на 80% от начального значения) снижение АТФ при отсутствии глюкозы в среде [173]. Однако, в упомянутой работе [173] использовали буфер для эритроцитов не содержащий не только глюкозы, но и аминокислот. В тоже время нами использована среда, имитирующая плазму крови, в состав которой входит ряд необходимых для жизнедеятельности эритроцитов аминокислот.

2.2. Размер и форма эритроцитов при метаболическом стрессе

Как следует из результатов, полученных методом проточной цитометрии, 24-часовая инкубация в безглюкозной среде приводит к росту ($p < 0.05$) среднего значения малоуглового рассеяния эритроцитов (FSC), характеризующего, преимущественно, поперечное сечение клеток [176,221], на 40% (рис. 21а); при этом параметр бокового рассеяния клеток (SSC), характеризующий морфологию эритроцитов [199,221], лишь незначительно снижается (рис. 21б).

Согласно данным литературы [176,199] увеличение FSC и снижение SSC указывают на то, что эритроциты увеличиваются в размере и приобретают более сферическую форму. Наблюдаемые изменения морфологии оценили с помощью микроскопической съемки (рис. 22). При депривации по глюкозе эритроциты увеличиваются в размере и приобретают более сферическую форму, что видно по отсутствию центрального углубления. Однако, также отмечается явно ассиметричная форма большинства клеток в безглюкозной среде. Появление в группе эритроцитов с ассиметричной формой повышает параметр SSC популяции клеток, что противоположно эффекту от разбухания эритроцитов [222]. Это объясняет отсутствие значимого снижения параметра SSC в популяции, подвергнутой метаболическому стрессу.

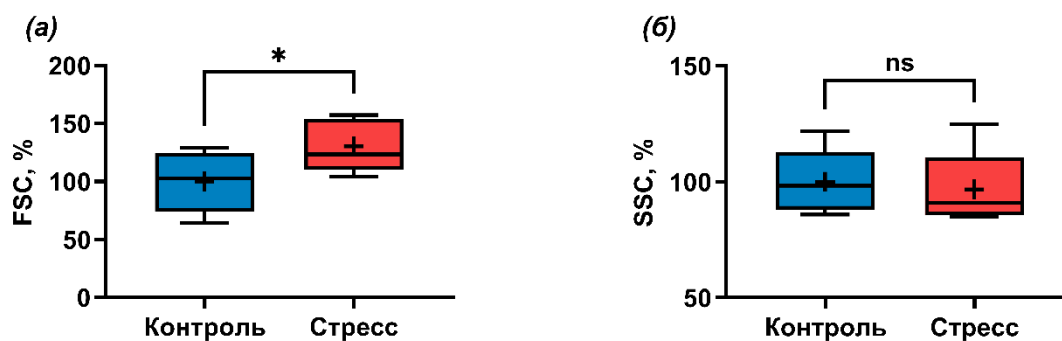


Рис. 21. Изменение параметров малоуглового (FSC) (а) и бокового (SSC) (б) светорассеяния эритроцитов через 24 ч. инкубации в среде с глюкозой (контроль) и в безглюкозной среде (стресс). За 100% принято значение исследуемых параметров в контроле. Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, $n = 5$. $*p < 0.05$.

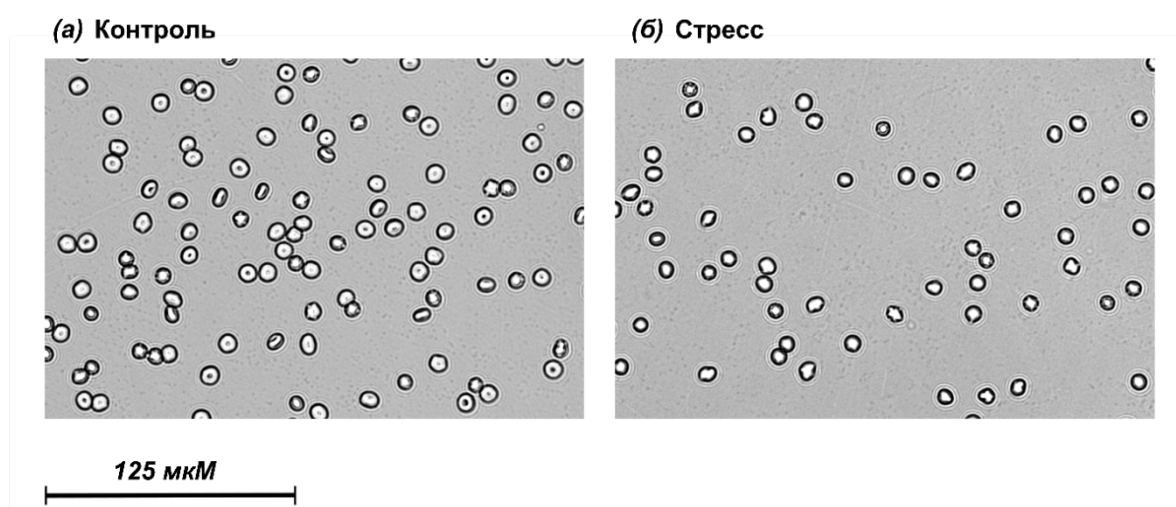


Рис. 22. Изменение морфологии эритроцитов через 24 ч. инкубации в среде с глюкозой (а) и в безглюкозной среде (б). Увеличение $\times 20$, масштабный отрезок (125 мкм) приведен на рисунке.

2.3. Содержание Na^+ и K^+ при метаболическом стрессе

Для того, чтобы выяснить, с чем связано изменение объема клеток, мы оценили внутриклеточные уровни ионов Na^+ и K^+ . При метаболическом стрессе на 130% возрастает ($p < 0.01$) содержание внутриклеточного Na^+ (рис. 23а).

Концентрация K^+ достоверно не меняется, хотя и наблюдается тенденция к ее снижению (рис. 23б). Такой же эффект (рис. 23в,г) мы обнаружили после инкубации эритроцитов в присутствии 1 мМ уабаина – специфического ингибитора Na^+/K^+ -АТФазы [87]. Na^+/K^+ -АТФаза – единственный транспортер ионов Na^+ против градиента концентрации, представленный в мембране эритроцитов [82]. Таким образом, увеличение размера клеток связано с нарушением градиента Na^+ и K^+ , что, по-видимому, обусловлено снижением активности Na^+/K^+ -АТФазы вследствие недостатка АТФ.

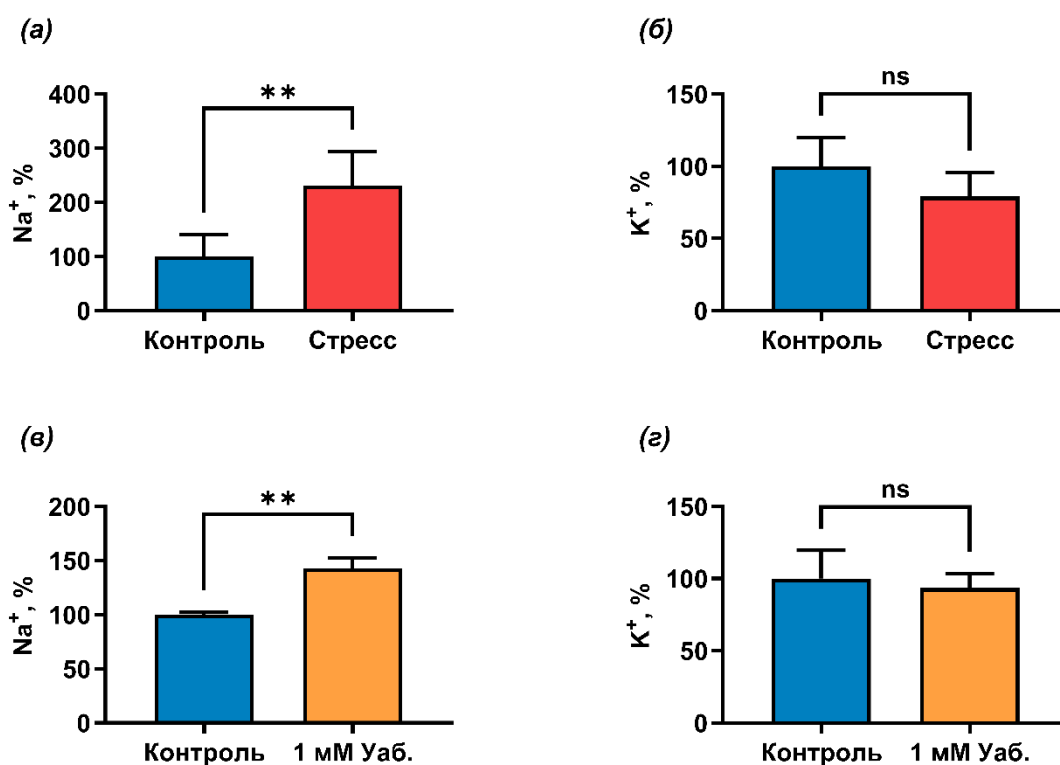


Рис. 23. Содержание внутриклеточного Na^+ (а) и K^+ (б) в эритроцитах через 24 ч. инкубации в среде с глюкозой (контроль) и в безглюкозной среде (стресс). Содержание внутриклеточного Na^+ (в) и K^+ (г) в эритроцитах через 3 ч. инкубации без ингибиторов (контроль) и в присутствии 1 мМ уабаина (1 мМ Уаб). За 100% принято значение исследуемых параметров в контроле. Данные представлены как среднее \pm SD, $n = 3-4$. ** $p < 0.01$.

2.4. Содержание Ca^{2+} и редокс-параметры при метаболическом стрессе

Мы не обнаружили значимых изменений в содержании внутриклеточного Ca^{2+} через 24 ч. инкубации эритроцитов в безглюкозной среде (рис. 24а).

Влияние метаболического стресса на редокс-статус эритроцитов мы оценили по уровню АФК, GSH и NO. Через 24 ч. глюкозного голодания содержание АФК в эритроцитах не меняется (рис. 24г), что свидетельствует об отсутствии окислительного стресса в клетках. Несмотря на это, наблюдается значительное, на 42%, снижение ($p < 0.001$) уровня тиолов (преимущественно GSH [216]) (рис. 24в). Кроме того, на 20% падает ($p < 0.05$) содержание NO в эритроцитах (рис. 24б).

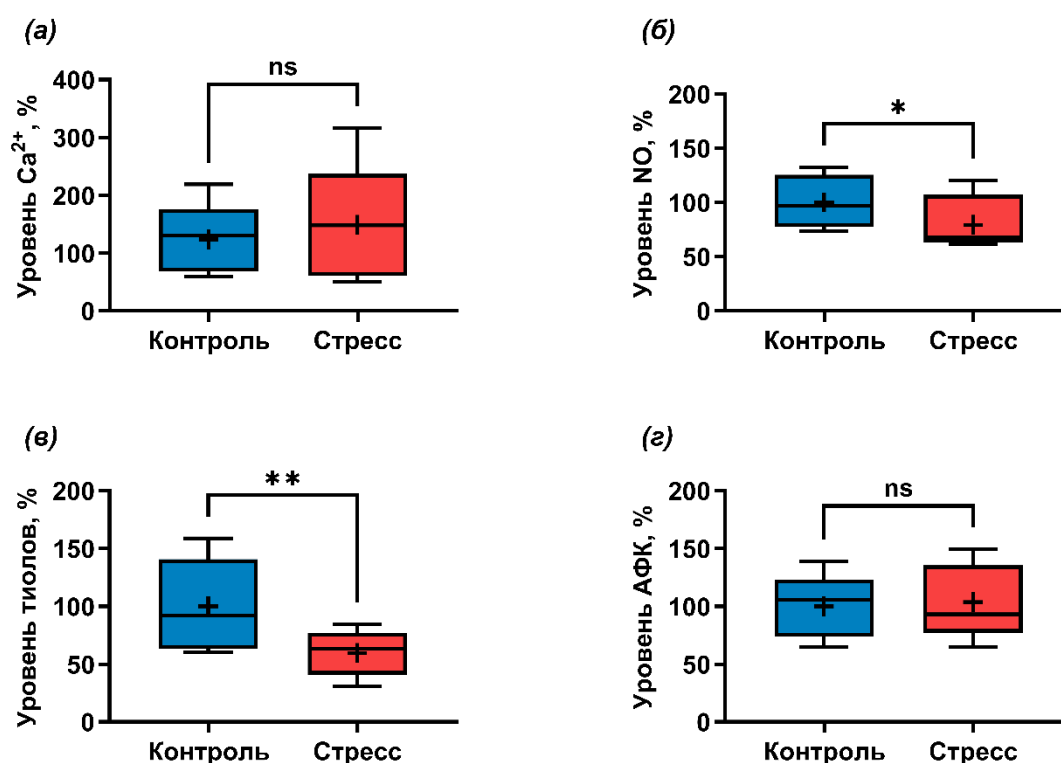


Рис. 24. Уровни Ca^{2+} (а), NO (б), восстановленных тиолов (в), АФК (г) в эритроцитах через 24 ч. инкубации в среде с глюкозой (контроль) и в безглюкозной среде (стресс). За 100% принято значение исследуемых параметров в контроле. Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальные значения – концы усов, $n = 5$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

При некоторых заболеваниях, таких как СД I и II типа [223,224], поражениях гипофиза [225], патологических состояниях (сепсис [226]), в том числе обусловленных хирургическим вмешательством (бариатрическая хирургия [227]) и несвоевременной коррекцией гипогликемической терапии

[228], может развиваться хроническая гипогликемия, которая влечет за собой развитие окислительного стресса, вызывающего сосудистые осложнения, риск тромбозов и эндотелиальную дисфункцию [229]. Гипогликемия, индуцированная введением инсулина здоровым волонтерам, также приводила к быстрому росту АФК как в эндотелиальных клетках [229], так и в эритроцитах [172]. Такой же эффект вызывала физическая активность пациентов с СД II типа [171], при этом падал уровень тиолов и снижалась активность СОД [172]. Согласно полученным нами данным, инкубация эритроцитов в отсутствие глюкозы в течение 24 ч. не приводит к росту АФК (рис. 24б). Наблюдаемый при гипогликемии рост АФК в эритроцитах [172], вероятно, обусловлен поглощением оксидантов, вырабатываемых другими тканями, поскольку наши данные указывают на то, что в системе *in vitro* при недостатке глюкозы АФК в эритроцитах не вырабатываются. Способность эритроцитов поглощать оксиданты была ранее показана для случая гипоксии в периферических тканях [18].

Несмотря на отсутствие окислительного стресса в изолированных эритроцитах, недостаток глюкозы приводит к значительному снижению уровня GSH (рис. 24в). Это обусловлено как недостатком NADPH, необходимого для восстановления GSSG глутатионредуктазой, так и нарушением синтеза GSH ферментами γ -глутамилцистеинсинтетазой и глутатионсинтазой, вызванного дефицитом АТФ [9]. Известно, что нарушение метаболизма глюкозы через пентозофосфатный путь в эритроцитах быстро приводит к снижению содержания NADPH и GSH [230]. В отсутствие глюкозы в среде происходит ингибирование глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PD) – основного фермента пентозофосфатного пути, в ходе которого NADP^+ восстанавливается до NADPH. Снижение активности G6PD вследствие мутаций или при добавлении ингибитора ведет к повышению чувствительности эритроцитов к окислительному стрессу и, как следствие, к усиленному гемолизу [231]. Это один из механизмов патогенеза гемолитической анемии. В клетках с дефицитом G6PD GSSG не восстанавливается до GSH; в результате при окислительном стрессе в

клетке не происходит восстановления дисульфидных связей в мембранных белках, которое индуцируется молекулами GSH [231]. Ранее, при анализе метаболомного состава эритроцитов, испытывающих недостаток глюкозы в течение 48 ч, наблюдали снижение общего пула глутатиона, которое происходило на фоне роста внутриклеточных концентраций непосредственных его предшественников – глутамата и цистеина [9]. Эти данные свидетельствуют о том, что вследствие недостатка АТФ снижается активность двух АТФ-зависимых ферментов, участвующих в синтезе глутатиона: γ -глутамилцистеинсинтетазы и глутатионсинтазы. Также наблюдается снижение метаболитов гликолиза и увеличение отношения пирувата к лактату, что свидетельствует о нарушении гомеостаза восстановительных эквивалентов [9].

2.5. Глутатионилирование гемоглобина при метаболическом стрессе

Снижение уровней GSH и NADPH благоприятно для глутатионилирования внутриклеточных белков [135]. Как видно по результатам иммуноблот-анализа, 24-часовой метаболический стресс эритроцитов приводит к увеличению ($p < 0.001$) степени глутатионилирования гемоглобина на 70% (рис. 25). Это может иметь важное физиологическое значение, поскольку ранее было показано, что глутатионилирование Hb приводит к увеличению его сродства к O_2 [23,156]. Глутатионилирование, которое защищает тиоловые группы белков от необратимого окисления и, в ряде случаев, меняет их функционирование [135], как правило, инициируется при развитии окислительного стресса [140]. Однако, мы показали, что метаболический стресс в отсутствие роста АФК также может быть индуктором глутатионилирования (рис. 25).

Как мы уже упоминали, повышение уровня внутриклеточного Na^+ (рис. 23a), наряду с увеличением среднего размера клеток (рис. 21a), свидетельствует о снижении активности Na^+/K^+ -АТФазы [91] вследствие падения уровня АТФ (рис. 20). На основании зарегистрированного нами повышения степени глутатионилирования Hb (рис. 25) можно предположить, что в снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы также вносит вклад глутатионилирование, которое

ингибирует активность фермента [55]. Известно, что мембранные белки более восприимчивы к S-глутатионированию, чем Hb [140].

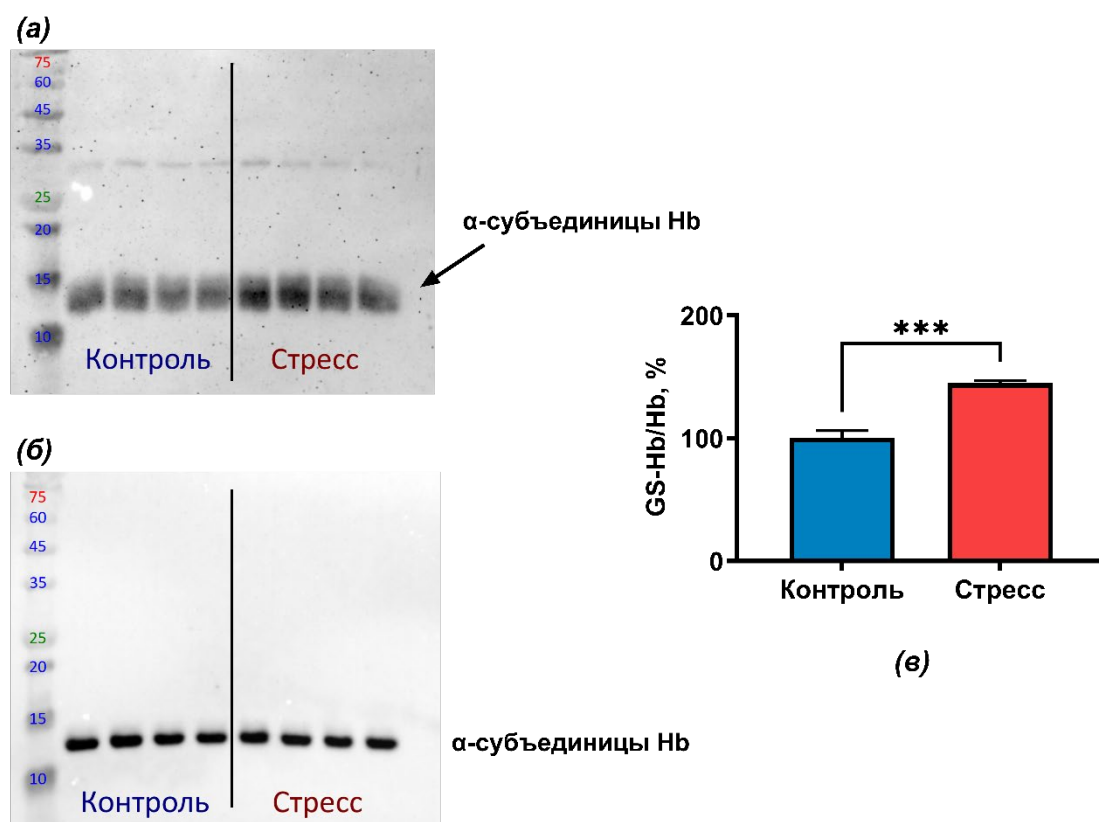


Рис. 25. Степень глутатионирования Hb через 24 ч. инкубации эритроцитов в среде с глюкозой (контроль) и в безглюкозной среде (стресс). Иммуноблоттинг с антителами против глутатионированного белка (GS-Hb) (а) и α-субъединицы гемоглобина (α-Hb) (б). Представлена одна пара характерных мембран из трех. (в) – результаты количественного анализа. За 100% принят уровень глутатионирования Hb в эритроцитах, инкубированных в присутствии глюкозы (контроль). Данные представлены как среднее ± SD. *** $p < 0.001$.

2.6. Механизм адаптации

Таким образом, метаболический стресс, вызванный недостатком глюкозы, приводит к снижению уровня АТФ и GSH, что, несмотря на отсутствие окислительного стресса, индуцирует глутатионирование Hb. Это может быть связано с дефицитом NADPH, необходимым для работы глутатион-редуктазы. Снижение активности данного фермента способствует накоплению GSSG, что инициирует глутатионирование тиоловых групп белков. Поскольку

глутатионилирование Hb повышает его сродство к O₂ [23,156], этот процесс может существенно влиять на функциональную активность эритроцитов. Необходимо также отметить, что снижение уровня GSH при метаболическом стрессе, вероятно, понижает долю Hb, находящегося в комплексе с GSH, что может снижать способность Hb высвобождать молекулы GSH из нековалентного комплекса при деоксигенации. Поэтому, можно утверждать, что метаболический стресс снижает адаптационную способность эритроцитов к гипоксии. Вследствие снижения уровня АТФ при метаболическом стрессе нарушается работа ионных транспортеров, в том числе Na⁺/K⁺-АТФазы, что приводит к росту внутриклеточной концентрации Na⁺ и увеличению объема эритроцитов. Возрастающий уровень глутатионилирования Hb позволяет предположить, что глутатионилирование Na⁺/K⁺-АТФазы также может вносить свой вклад в ингибирование работы фермента [55].

3. Адаптация эритроцитов к осмотическому стрессу

Тест на осмотическую резистентность эритроцитов используется для измерения их деформабельности и устойчивости к гемолизу [176,194]. В организме с гипоосмотическими условиями эритроциты, как правило, сталкиваются при гипонатриемии, поскольку ионы Na^+ обеспечивают около 90% внеклеточной осмолярности [232]. Подавляющее большинство случаев гипонатриемии связано с повышенной активностью антидиуретического гормона, который регулирует баланс воды в организме [233]. Гипонатриемия наблюдается также при панкреатите и периферических отеках [234].

3.1. Размер и форма эритроцитов при осмотическом стрессе

Осмотический стресс осуществляли, снижая осмолярность среды с 330 до 250 мОсм/л. Такое снижение осмолярности в течение 1 мин не влияет на значение параметра FSC эритроцитов (рис. 26а). При этом, снижается ($p < 0.0001$) параметр SSC (рис. 26б), в среднем на 15%. Это указывает на значительное изменение морфологии клеток после гипоосмотического воздействия. Через 24 ч. инкубации в гипоосмотической среде значение FSC, по-прежнему, не меняется (рис. 27а), а параметр SSC эритроцитов становится существенно ниже ($p < 0.0001$), чем в контрольной группе (рис. 27б). Уменьшение SSC происходит вследствие "сглаживания" рельефа поверхности эритроцитов [199], например, при переходе из дискоцитов в сфероциты. Регистрация с помощью автоматического клеточного анализатора JuLI Stage наглядно показывает, что эритроциты округляются и разбухают уже через 5 сек. после снижения осмолярности среды, что хорошо видно по отсутствию центрального углубления (рис. 28б). В течение первой минуты эритроциты постепенно адаптируются к новым условиям и, через 60 сек., приобретают вид разбухших дискоцитов – клетки все еще округлены, но меньшего размера, и мы вновь видим центральное углубление (рис. 28в). Через 24 ч. инкубации в гипоосмолярной среде большинство клеток имеет вид сфероцитов (рис. 29б).

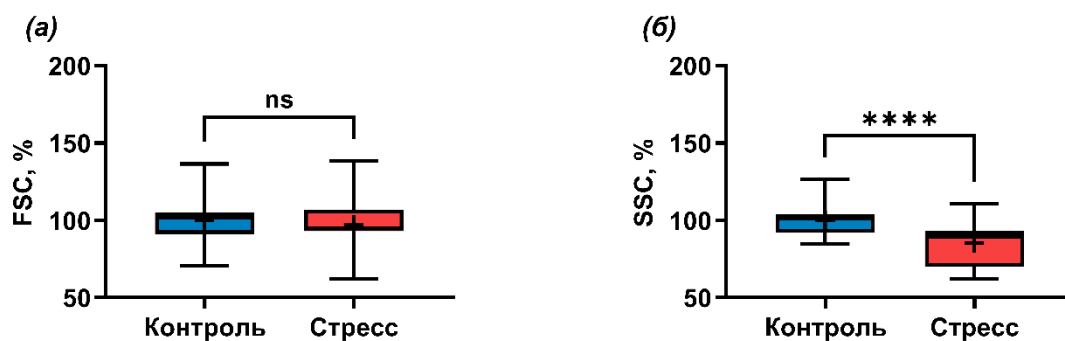


Рис. 26. Изменение параметров малоуглового (FSC) (а) и бокового (SSC) (б) светорассеяния в эритроцитах в покое (контроль) и после краткого (1 мин) гипоосмотического воздействия (стресс). За 100% принято значение исследуемых параметров в покое. Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, $n = 20$. $*p < 0.0001$.

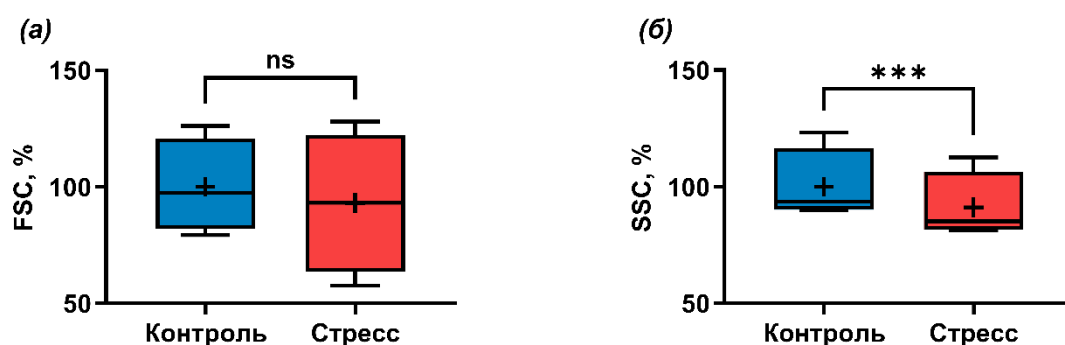


Рис. 27. Изменение параметров малоуглового (FSC) (а) и бокового (SSC) (б) светорассеяния в эритроцитах через 24 ч. инкубации в покое (контроль) и в условиях гипоосмотического воздействия (стресс). За 100% принято значение исследуемых параметров в покое. Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, $n = 5$. $***p < 0.001$.

Ранее методом количественной микроскопии фазовых изображений (QPM) был реконструирован профиль эритроцитов при осмолярности 242 мОсм/л [235]. Клетки имеют утолщенный профиль за счет увеличения объема по сравнению с

эритроцитами в нормальных условиях (осмолярность 290 мОсм/л). При этом, диаметр клеток при значениях осмолярности 242 и 290 мОсм/л не отличается [235]. В условиях, близких к иницированным в нашей работе (осмолярность 200 мОсм/л), показаны снижение параметра SSC эритроцитов [221,236] и набухание эритроцитов [236,237], что хорошо согласуется с нашими результатами.

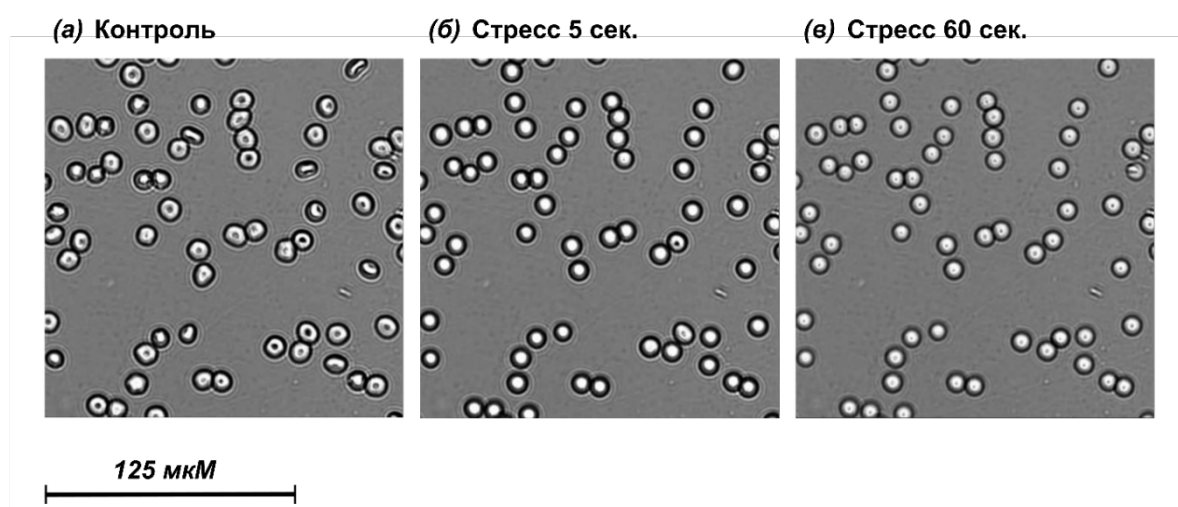


Рис. 28. Морфология эритроцитов в покое (контроль) и после краткого (1 мин) гипоосмотического воздействия (стресс). Увеличение $\times 20$, масштабный отрезок (125 мкМ) приведен на рисунке.

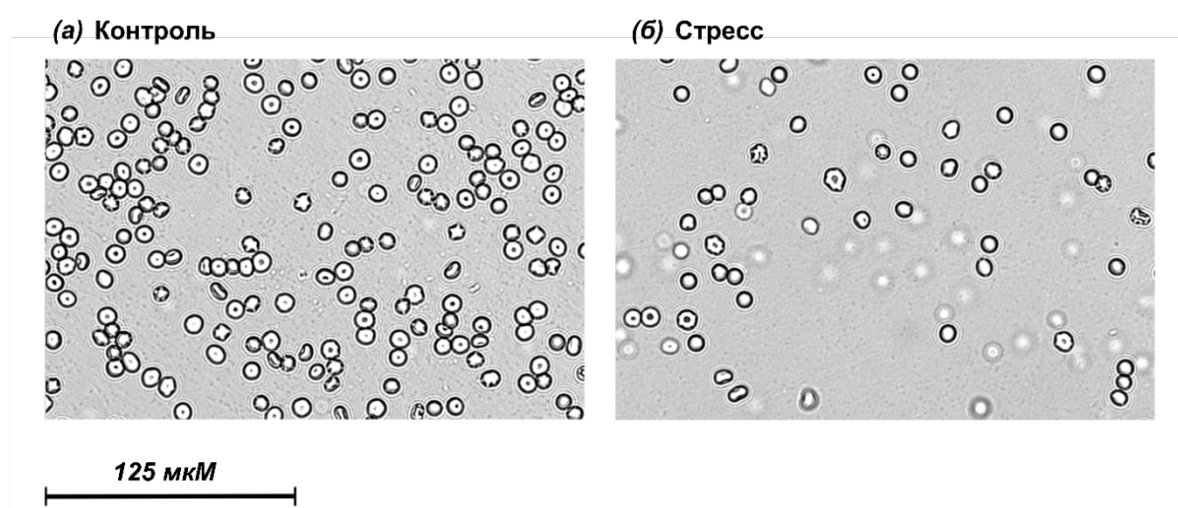


Рис. 29. Морфология эритроцитов через 24 ч. инкубации в покое (контроль) и в условиях гипоосмотического воздействия (стресс). Увеличение $\times 20$, масштабный отрезок (125 мкМ) приведен на рисунке.

Литературные данные об изменении параметра FSC эритроцитов при гипоосмотическом воздействии противоречивы. В ряде работ [176,221] описано увеличение среднего значения FSC в гипоосмотической среде. Есть и противоположные данные – снижение параметра FSC разбухших стоматоцитов по сравнению с FSC нормальных дискоцитов [199]. Из-за двояковогнутой удлиненной в потоке формы эритроцитов значение FSC сильно зависит от ориентации клеток [237,238] и от степени растяжения под действием гидродинамических сил при цитометрическом измерении [238]. Известно, что деформабельность и морфология эритроцитов заметно меняются в зависимости от состава буфера [221]. Особенно сильно эти изменения отражаются на значениях параметра FSC. Показано, что распределение FSC имеет огромную межиндивидуальную вариабельность и различается в изотонических буферах разного состава [221]. Значения SSC имеют меньшую межиндивидуальную вариабельность и в меньшей степени зависят от состава среды, кроме того, изменения SSC стабильнее при инкубации в разных гипотонических буферах [221]. Это подтверждают и наши данные – индивидуальная вариабельность параметра SSC заметно ниже вариабельности FSC (рис. 26, рис. 27). Отметим, что применяемый нами буфер намного ближе к составу плазмы крови, чем используемые в ранних исследованиях PBS [176], р-ор NaCl и р-ор Рингера [221]. Кроме того, в работе Yamamoto с соавторами, в которой описано возрастание FSC при осмотическом стрессе [176], эритроциты подвергали значительно более острому воздействию – снижению осмолярности в 2 раза, до 140 мОсм/л против 250 мОсм/л в нашем эксперименте. В работе Drvenica с соавторами, где также наблюдали возрастание FSC [221], клетки инкубировали в растворах с осмолярностью от 150 мОсм/л до 90 мОсм/л. Мы считаем подобранные нами условия экспериментов более физиологичными, как в отношении состава буфера, так и в отношении силы гипоосмотического воздействия.

Таким образом, эритроциты моментально реагируют на снижение осмолярности, адаптируются к новым условиям среды, что отражается на изменении морфологии клеток. Такое состояние может поддерживаться

длительное время, как минимум, на протяжении суток. Рассмотрим изменение редокс-статуса эритроцитов на фоне осмотического стресса.

3.2. Содержание Ca^{2+} и редокс-параметры при осмотическом стрессе

При краткосрочном (1 мин) гипоосмотическом стрессе на 28% увеличивается ($p < 0.001$) содержание внутриклеточного Ca^{2+} (рис. 30а). Действительно, для животных клеток, адаптирующихся к осмотическому стрессу, показано увеличение концентрации Ca^{2+} [105]. Быстрый вход ионов Ca^{2+} обеспечивает восстановление объема эритроцитов при гипоосмотическом воздействии [105] за счет оттока ионов K^+ через Ca^{2+} -активируемые каналы Гардоса (KCNN4) [57] и активации кальций-кальмодулинового комплекса (Ca-CaM) [107]. Именно этот эффект мы наблюдаем в течении первой минуты после индукции стресса (рис. 28).

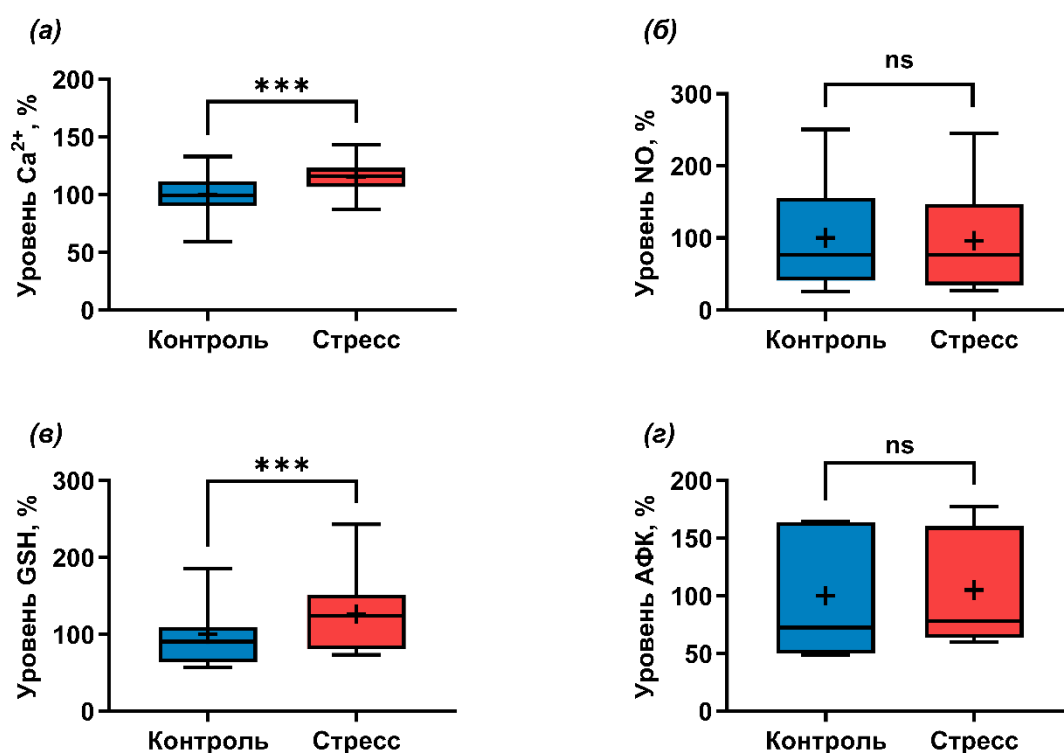


Рис. 30. Уровни Ca^{2+} (а), NO (б), восстановленных тиолов (в), АФК (г) в эритроцитах в покое (контроль) и после краткого (1 мин) гипоосмотического воздействия (стресс). За 100% принято значение исследуемых параметров в покое. Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная

полоса, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, $n = 6-20$. $*p < 0.001$.

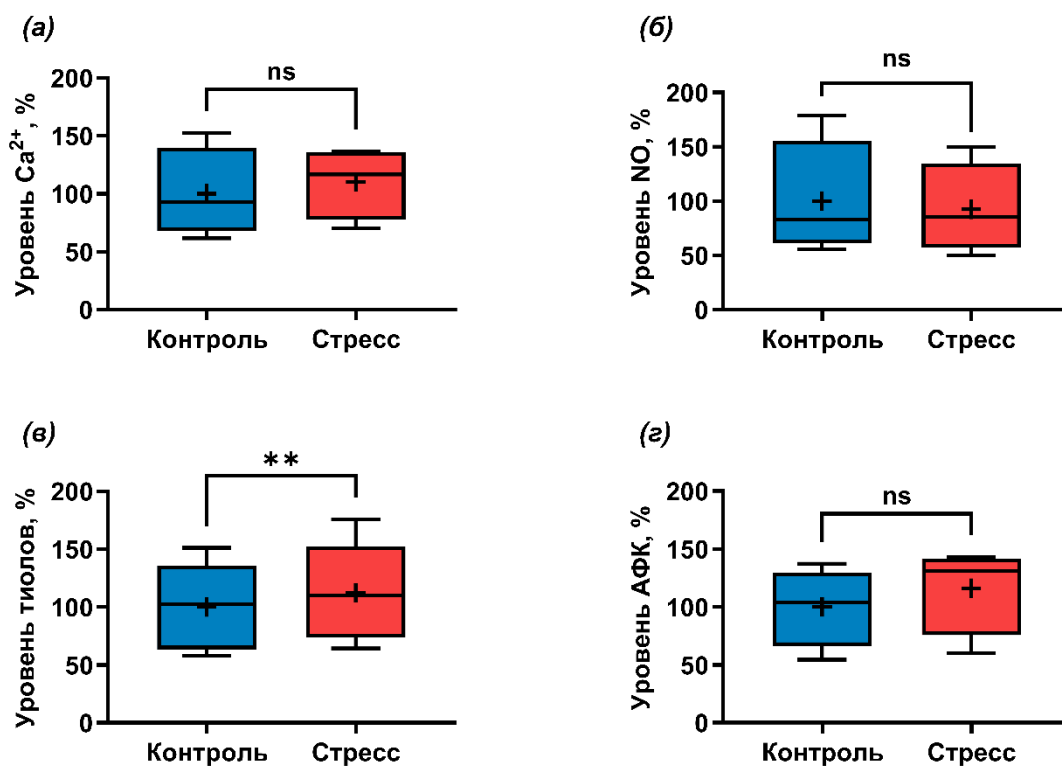


Рис. 31. Уровни Ca^{2+} (а), NO (б), восстановленных тиолов (в), АФК (г) в эритроцитах через 24 ч. инкубации в покое (контроль) и в условиях гипоосмотического воздействия (стресс). За 100% принято значение исследуемых параметров в покое. Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, $n = 5$. $**p < 0.01$.

Комплекс Са-СаМ имеет ключевую роль в регуляции стабильности цитоскелета [57]. Са-СаМ воздействует на белок 4.1R – ключевое звено примембранного белкового суперкомплекса, включающего белки цитоскелета (спектрин, актин, белок 4.2), трансмембранные белки (АЕ1, гликофорины), гемоглобин и др. [70,71]. При взаимодействии с Са-СаМ сродство белка 4.1R ко всем белкам партнерам снижается, а структура цитоскелета теряет стабильность и разрыхляется [108]. Повышение уровня Ca^{2+} имеет временный характер и выполняет сигнальную функцию. Через 24 ч. инкубации внутриклеточный

уровень Ca^{2+} в изотоническом (контроль) и гипотоническом (стресс) буферах не отличается (рис. 31а).

Содержание АФК и NO в эритроцитах значительно не меняется, как при кратком гипоосмотическом воздействии (рис. 30б, г), так и при длительной инкубации в течение 24 ч. (рис. 31б, г). То есть, в клетках не происходит развития окислительного стресса. При этом, концентрация тиолов (преимущественно GSH [216]) значительно возрастает ($p < 0.001$) при краткосрочном (1 мин) гипоосмотическом шоке, в среднем на 26% (рис. 30в), и через 24 ч. инкубации остается повышенной ($p < 0.01$), в среднем на 12% (рис. 31в).

Это наблюдение представляет особый интерес. Как мы уже отмечали в части 1.2 текущей главы, существует несколько путей увеличения уровня внутриклеточного GSH – синтез *de novo* [129]; восстановление окисленной формы глутатиона [9]; деглутатионилирование белков (Hb в случае эритроцитов, как мажорного белка) [155]; и выход из нековалентного комплекса с Hb. Рассмотрим все эти варианты. Максимальная скорость синтеза GSH *de novo* составляет 1.06 ± 0.07 мкмоль/(л эритроцитов) в мин при 37°C и гематокрите 10% [239] или 0.03 ± 0.002 мкмоль/(г Hb). Содержание GSH в эритроцитах в норме составляет в среднем 3.4 мкмоль/(г Hb) [6]. С учетом поправки на гематокрит за 1 мин, прошедшую с момента инициации гипоосмотического стресса до измерения уровня свободного GSH синтез *de novo* мог бы обеспечить прирост внутриклеточного глутатиона на 0.89%. Однако, мы наблюдаем увеличение содержания GSH в среднем на 26%. Аналогично, значительный прирост GSH значительно превышает количества, которые могут быть восстановлены из пула GSSG, концентрация которого в цитозоле меньше концентрации GSH примерно в 100 раз [131,140].

3.3. Глутатионилирование гемоглобина при осмотическом стрессе

Путь повышения свободного GSH через деглутатионилирование Hb также не подтверждается, напротив, при кратком (1 мин) осмотическом воздействии (рис. 32) мы наблюдаем увеличение ($p < 0.01$) степени глутатионилирования Hb

на 30%. При инкубации эритроцитов в условиях гипоосмолярности в течение 24 ч. уровень глутатионилирования Hb снижается и в результате не отличается от степени глутатионилирования в контрольной группе (рис. 33).

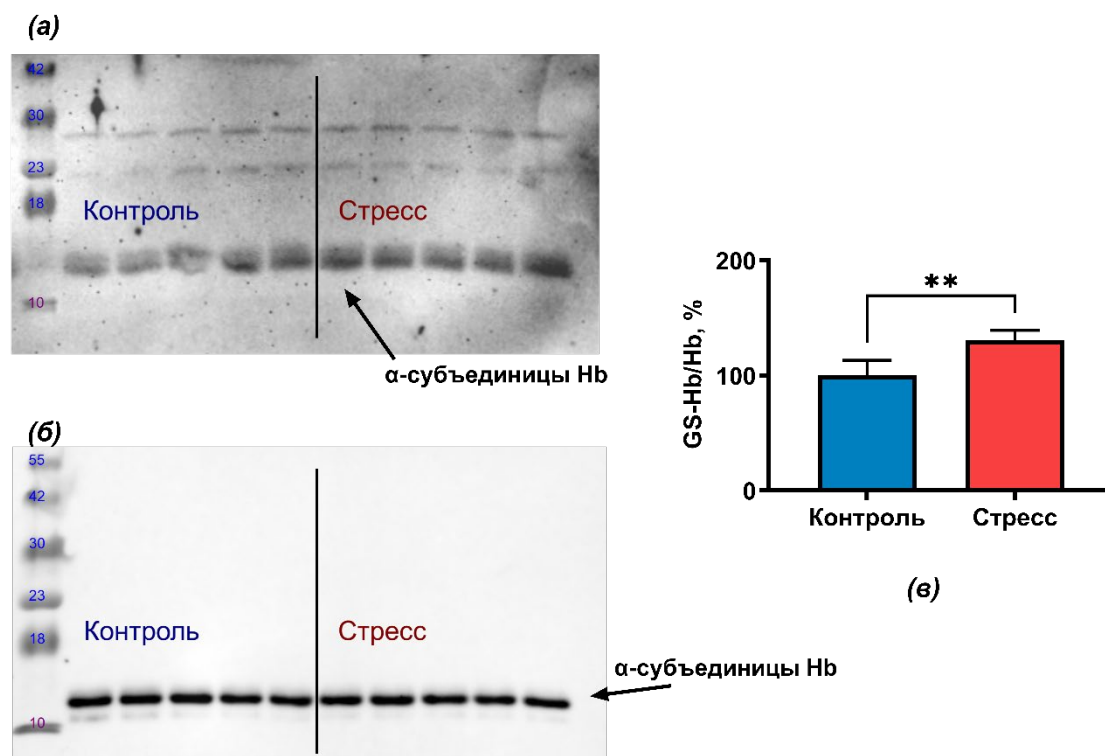


Рис. 32. Степень глутатионилирования Hb в эритроцитах в покое (контроль) и после краткого (1 мин) гипоосмотического воздействия (стресс). Иммуноблотинг с антителами против глутатионилированного белка (GS-Hb) (а) и α -субъединицы гемоглобина (α -Hb) (б). Представлена одна пара характерных мембран из четырех. (в) – результаты количественного анализа. За 100% принят уровень глутатионилирования Hb в эритроцитах в покое (контроль). Данные представлены как среднее \pm SD. $**p < 0.01$.

3.4. Механизм адаптации

Таким образом, клеточный ответ эритроцитов на гипоосмотическое воздействие происходит в течение первой минуты после инициации стресса. Он включает вход ионов Ca^{2+} , последующее разбухание клеток, рост уровня свободного GSH и глутатионилирование Hb. После адаптации к гипоосмотическим условиям эритроциты сохраняют видоизмененную морфологию; уровень внутриклеточного Ca^{2+} восстанавливается, происходит

деглутатионилирование молекул Hb до уровня контроля. Это должно быть связано с нормализацией редокс-статуса, которая, как известно, приводит к тому, что глутаредоксин катализирует деглутатионилирование белков [127].

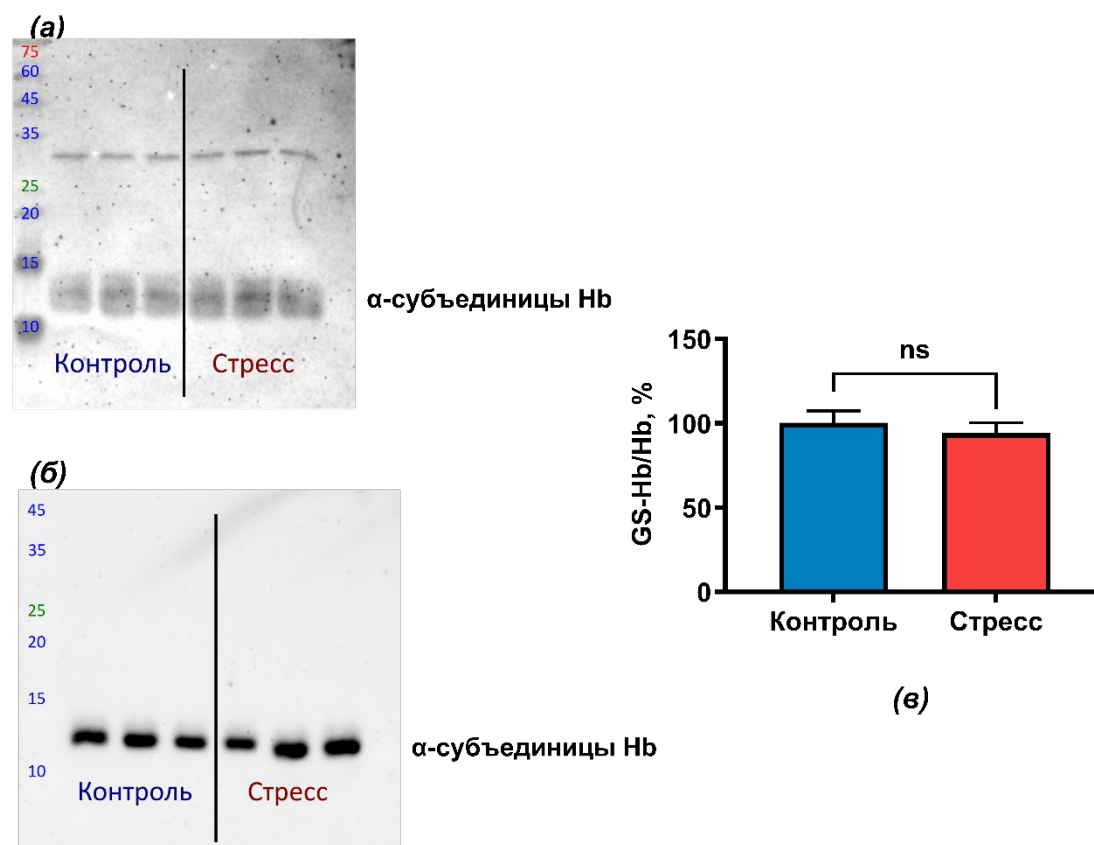


Рис. 33. Степень глутатионилирования Hb в эритроцитах после 24 ч. инкубации в покое (контроль) и в условиях гипоосмотического воздействия (стресс). Иммуноблотинг с антителами против глутатионилированного белка (GS-Hb) (а) и α -субъединицы гемоглобина (α -Hb) (б). Представлена одна пара характерных мембран из трех. (в) – результаты количественного анализа. За 100% принят уровень глутатионилирования Hb в эритроцитах в покое (контроль). Данные представлены как среднее \pm SD.

Подобное снижение степени глутатионилирования Hb по мере адаптации клеток к стрессовым условиям ранее было показано при инкубации эритроцитов с индуцирующим окислительный стресс 1.5 мМ трет-бутилгидропероксидом [21]. Обычно рост глутатионилирования Hb наблюдается при окислительном стрессе [136]. При этом, уровень GSH резко снижается в течении первых 10 мин после индукции стресса и восстанавливается до исходных значений через 80 мин

[21,155]. В нашем эксперименте мы наблюдаем одновременный рост, как степени глутатионилирования Hb, так и уровня GSH. Такой эффект ранее наблюдали при добавлении в среду способного проникать через клеточную мембрану этилового эфира глутатиона (et-GSH) к кардиомиоцитам крысы [134] и клеточной линии SC1 (эмбриональные стволовые клетки мыши) [240]. Отметим, что полностью исключить развитие окислительного стресса нельзя, поскольку отсутствие роста АФК (рис. 31а) может быть связано с нейтрализацией АФК молекулами GSH, содержание которых возрастает очень значительно (рис. 31б).

Последний, из известных нам, источник свободного GSH – это комплекс с Hb. В разделе об адаптации эритроцитов к условиям недостатка O₂ мы показали, что при деоксигенации молекулы Hb (переход R-формы в T-форму Hb [241]) из нековалентного комплекса в цитозоль высвобождаются две молекулы GSH. В спектрах поглощения эритроцитов в условиях гиперосмотического стресса (> 400 мОсм/л) наблюдается смещение максимума полосы Soret в длинноволновую область, что указывает на частичную деоксигенацию Hb [236]. Ранее такое же смещение пика полосы Soret обнаружили при локальном механическом воздействии на эритроциты оптическим пинцетом [242], причем, степень деоксигенации возрастала при увеличении силы воздействия [242,243]. Анализ спектров КР эритроцитов также подтверждает переход охуHb (R-форма) в деохуHb (T-форма) [244]. При этом, растяжение эритроцитов парой оптических пинцетов также приводит к смещению максимума полосы Soret, но уже в коротковолновую область [242].

Отметим, что сходные эффекты наблюдаются при разнонаправленном действии на эритроциты – растяжении [242], близком к гипоосмотическому воздействию и при гиперосмотическом стрессе [236] – а также при локальном механическом действии на мембрану клетки [243]. Wojdyła с соавторами предполагают [242], что непосредственное механическое воздействие оптическим пинцетом деформирует компоненты клетки, включая ПМ и цитоскелет, влияя, таким образом, на взаимодействия Hb-Hb, Hb-мембрана и Hb-

цитоскелет. Это, в свою очередь, приводит к конформационным изменениям в молекуле Hb [242]. Авторы также отмечают, что потенциально любое изменение морфологии эритроцитов может влиять на конформацию Hb, поскольку молекулы Hb в клетке связываются как с мембранным белком AE1 [245], так и с белками цитоскелета [70,246]. Таким образом, можно предположить, что гипоосмотическое воздействие, приводя к изменению морфологии эритроцитов индуцирует конформационный переход части Hb, что может приводить к выходу GSH из комплекса с Hb. Чтобы проверить гипотезу о том, что изменение формы эритроцитов может влиять на уровень GSH, мы подвергли эритроциты прямому механическому воздействию.

4. Адаптация эритроцитов к механическому стрессу

Механическое воздействие на эритроциты обычно рассматривают, как близкое по своему воздействию на клетку к осмотическому [96]. При этом, адаптация эритроцитов к механическому стрессу значительно менее изучена по сравнению с адаптацией к осмотическому воздействию. С механическим стрессом эритроциты сталкиваются при прохождении через капилляры и синусы селезенки [13,96]. Физическая нагрузка увеличивает выраженность этого стресса [215]. Мы инициировали механический стресс пропуская эритроциты через фильтр с диаметром пор 1.2 мкм с ускорением 400 и 1500 g. Выбранные ускорения достаточны для прохождения клеток через фильтр и входят в диапазон (300-2000 g), используемый при центрифугировании эритроцитов в клинических [247] и научных исследованиях [248,249].

4.1. Размер и форма эритроцитов при механическом стрессе

Методом проточной цитометрии мы оценили изменение параметра FSC, характеризующего поперечное сечение клеток [176,238], и параметра SSC, характеризующего морфологию эритроцитов [199,221]. Интересно, что среднее значение FSC заметно увеличивается ($p < 0.05$) только в группе эритроцитов, подвернутой центрифугированию, но не в группе, прошедшей через фильтр как при ускорении 400 g (рис. 34а), так и при 1500 g (рис. 34в). Необходимо учитывать, что значение параметра FSC сильно зависит от ориентации эритроцитов в потоке при цитометрическом измерении [238], поскольку эритроциты имеют дисковидную форму. Поэтому это изменение может указывать на увеличение диаметра, а не размера клеток, например, при "сплющивании" эритроцитов.

В то же время, параметр SSC значительно возрастает ($p < 0.05$) только после механического стресса при каждом выбранном ускорении (рис. 34б, г). Увеличение параметра SSC указывает на нарушение формы эритроцитов [236] после пропускания через фильтр, что хорошо согласуется с актуальной

литературой [222,250]. Так, в недавней статье показано, что подвергнутые механическому давлению в 30 Па эритроциты в присутствии оксидантов приобретают вытянутую и/или складчатую морфологию [250]. Отметим, что искусственная индукция сильного окислительного стресса 0.6 мМ трет-бутилгидропероксидом в упомянутой работе [250] могла повлиять на морфологию клеток.

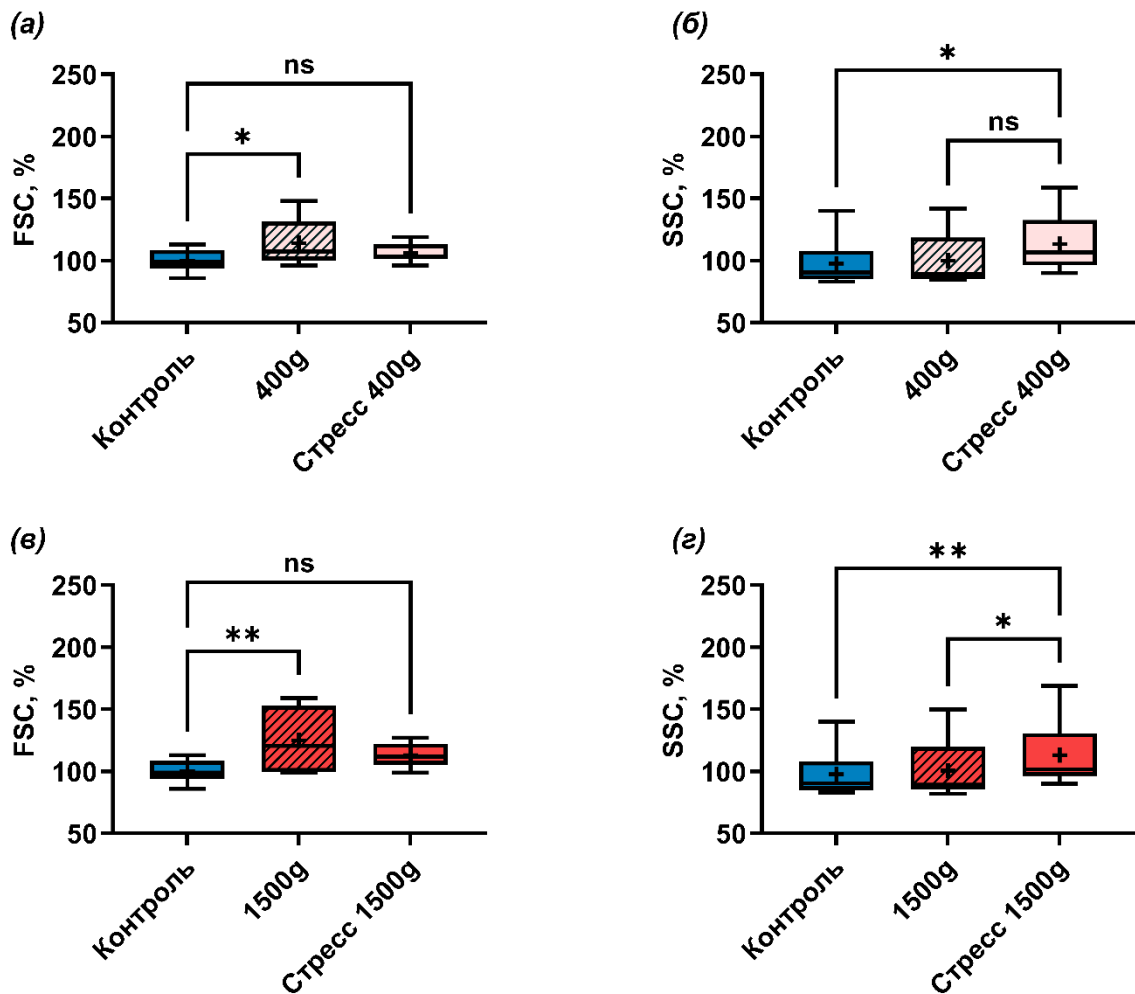


Рис. 34. Изменение параметров малоуглового (FSC) (а, в) и бокового (SSC) (б, г) светорассеяния в эритроцитах в покое (контроль), после центрифугирования и после прохождения через фильтр (стресс) при ускорениях 400 g (а, б) и 1500 g (в, г). За 100% принято значение исследуемых параметров в покое. Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, n = 6. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

В другой работе [222] обнаружили, что эритроциты, движущиеся в потоке под действием давления 60 Па в течение 100 сек., приобретают асимметричную форму. При прохождении через капилляры эритроциты уменьшаются в объеме и приобретают продолговатую форму [96]. Наглядно изменения морфологии видны на рис. 35. – клетки через 3 мин после центрифугирования имеют несколько увеличенный диаметр (рис. 35б, в), а эритроциты, прошедшие через фильтр, приобрели ассиметричную форму (рис. 35г, д). Эти трансформации количественно характеризуют параметры FSC и SSC.

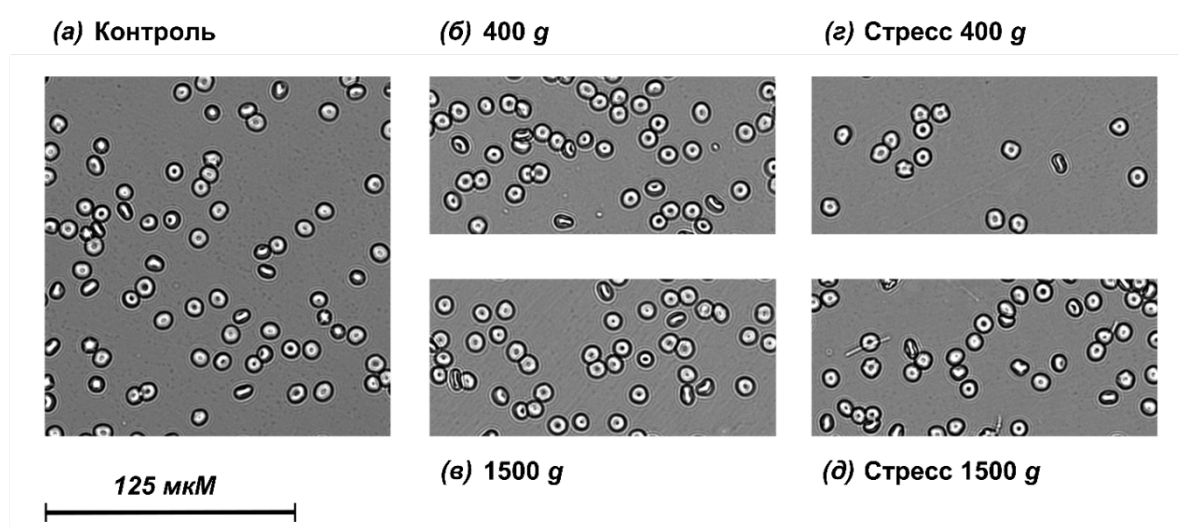


Рис. 35. Морфология эритроцитов в покое (контроль), через 3 мин после центрифугирования и после прохождения через фильтр (стресс) при ускорениях 400 g и 1500 g. Увеличение $\times 20$, масштабный отрезок (125 мкм) приведен на рисунке.

4.2. Содержание Na^+ и K^+ при механическом стрессе

Чтобы установить механизм, обуславливающий изменение диаметра и формы клеток, мы оценили внутриклеточные уровни ионов Na^+ и K^+ . Из-за ограниченной чувствительности метода, нам удалось оценить содержание ионов только с применением ускорения 1500 g, так как при ускорении 400 g значительно меньше клеток проходит через фильтр. При механическом стрессе уровень внутриклеточного Na^+ (рис. 36a) не меняется, а концентрация K^+ снижается ($p < 0.05$), как относительно контрольной группы, так и относительно

группы после центрифугирования (рис. 36б). Центрифугирование не влияет на содержание Na^+ и K^+ в эритроцитах.

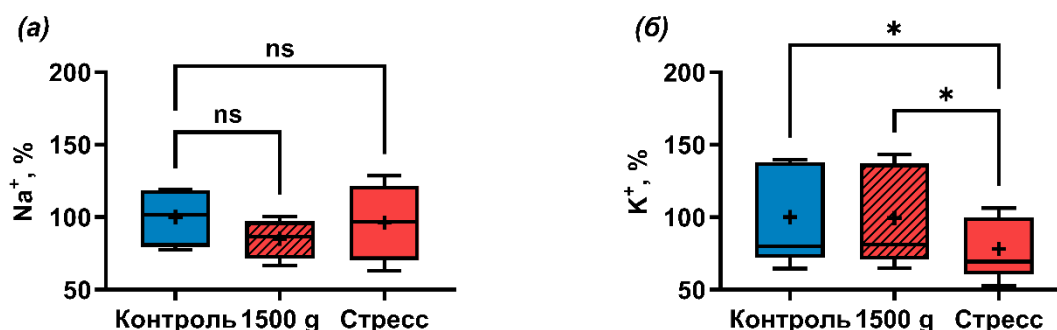


Рис. 36. Содержание внутриклеточного Na^+ (а) и K^+ (б) в эритроцитах в покое (контроль), после центрифугирования и после прохождения через фильтр (стресс) при ускорении 1500 g. За 100% принято значение исследуемых параметров в покое. Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, $n = 5$. * $p < 0.05$.

4.3. Содержание Ca^{2+} и редокс-параметры при механическом стрессе

С данными об уменьшении внутриклеточной концентрации K^+ хорошо согласуется рост ($p < 0.01$) уровня внутриклеточного Ca^{2+} в эритроцитах после механического стресса (рис. 37а, в). Видно, что при увеличении ускорения до 1500 g повышение Ca^{2+} намного более выражено, чем в случае ускорения 400 g – рост в среднем на 290% против 178%. Падение K^+ на фоне увеличения внутриклеточного Ca^{2+} указывает на активную работу каналов Гардоса (KCNN4) [251]. Эти кальций-активируемые калиевые каналы обеспечивают выход K^+ , Cl^- и воды в ответ на рост уровня Ca^{2+} [97,106]. Их основная функция – регуляция объема эритроцитов [252]. Продолжительная активация каналов Гардоса приводит к изменению объема клеток и в конечном счете влияет на реологические свойства эритроцитов [44]. В недавней работе [96] было показано, что рост уровня Ca^{2+} при механическом воздействии обеспечивает активация механо-чувствительных Ca^{2+} каналов PIEZO1, а снижение объема клетки

происходит после запуска каналов Гардоса. Помимо запуска кальций-зависимых калиевых каналов, ионы Ca^{2+} в комплексе с CaM обеспечивают увеличение деформабельности эритроцитов за счет открепления спектринового каркаса от интегральных белков мембраны [57]. Результат этого мы, вероятно, наблюдаем в виде увеличения параметра SSC при механическом воздействии (рис. 34б, г).

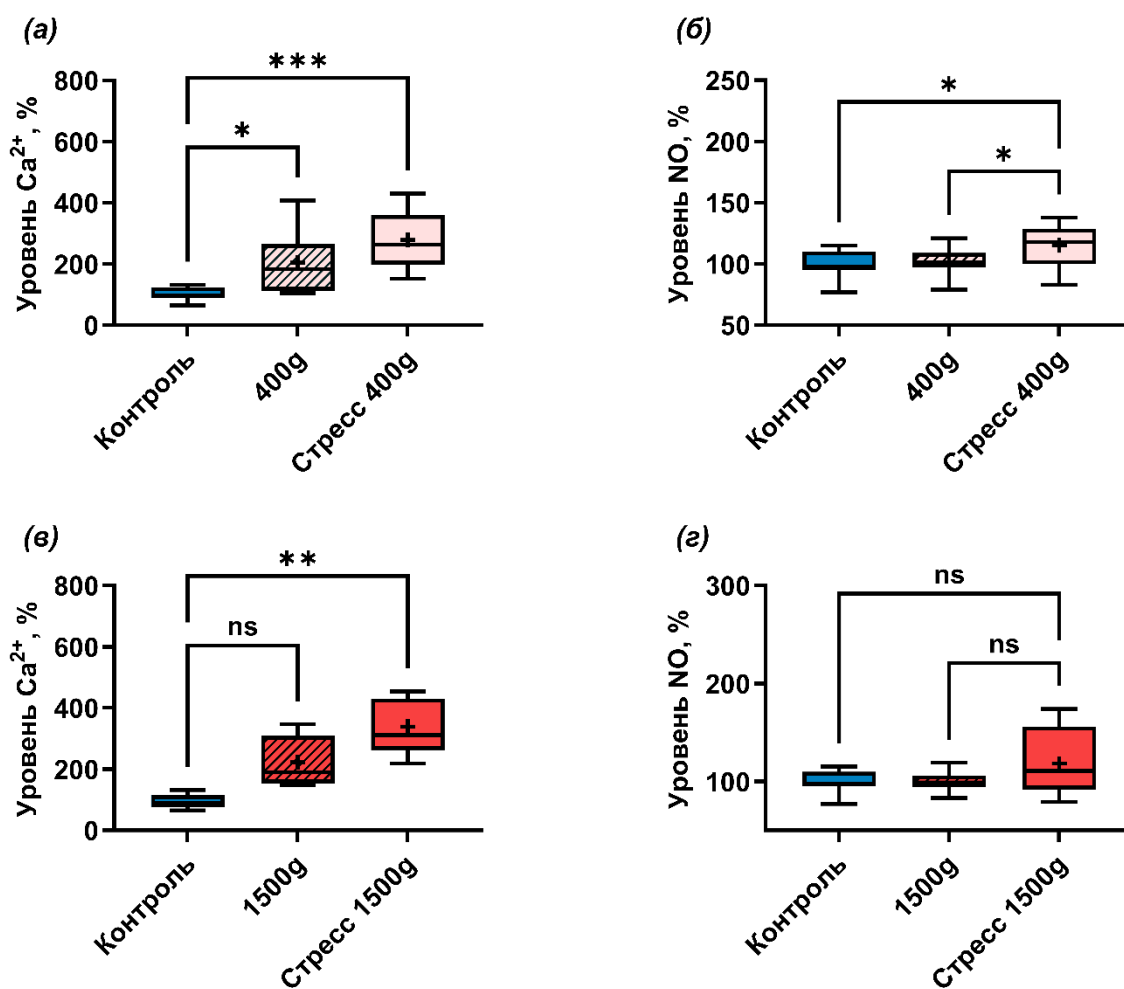


Рис. 37. Уровни Ca^{2+} (а, в) и NO (б, г) в эритроцитах в покое (контроль), после центрифугирования и после прохождения через фильтр (стресс) при ускорениях 400 g (а, б) и 1500 g (в, г). За 100% принято значение исследуемых параметров в покое. Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, $n = 6$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Интересно, что при центрифугировании с ускорением 400 g также наблюдается рост ($p < 0.05$) уровня внутриклеточного Ca^{2+} , в среднем на 105%

(рис. 37а). При ускорении 1500 g мы видим тенденцию к увеличению Ca^{2+} , в среднем на 122% (рис. 37в). Эти значения заметно ниже, чем при механическом стрессе. Мы полагаем, что эта разница, в частности, обуславливает наблюдаемые отличия в клеточном ответе эритроцитов на центрифугирование и пропускание через фильтр. В эритроцитах после центрифугирования мы не обнаружили снижения уровня K^+ (рис. 36б) и видим лишь тенденцию к росту параметра SSC (рис. 35з, д). Считается, что внутриклеточная концентрация свободного Ca^{2+} в эритроцитах в покое устанавливается в пределах 30-60 нмоль/л [57], а для активации каналов Гардоса необходимо увеличение Ca^{2+} до примерно 200 нмоль/л [253], то есть в 3-6 раз в зависимости от исходной концентрации в клетке. Для активации комплекса Са-СаМ также необходим значительный рост $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ – до 100 нмоль/л [57]. Важно отметить, что для активации описанных путей достаточно локального повышения уровня Ca^{2+} , а не общей его концентрации в цитозоле. По-видимому, центрифугирование, оказывает на эритроциты воздействие сходное с прямым механическим стрессом, но увеличение Ca^{2+} заметно ниже, чем при прохождении эритроцитов через фильтры. Из-за этого после краткого центрифугирования в течение 30 с в клетках не активируются Ca^{2+} -зависимые механизмы регуляции.

В пользу этой гипотезы свидетельствуют и различия в содержании NO в эритроцитах после центрифугирования и механического стресса. Как мы уже упоминали в разделе об адаптации эритроцитов к гипоксии, рост внутриклеточного Ca^{2+} способствует повышению уровня NO в эритроцитах за счет активации NO-синтаз [174], в том числе при механическом стрессе [12]. Действительно, мы наблюдаем увеличение ($p < 0.05$) уровня NO в эритроцитах после механического воздействия при ускорении 400 g на 28% (рис. 37б). В группе после центрифугирования концентрация NO не меняется. При ускорении 1500 g (рис. 37г) наблюдается ярко выраженная тенденция к росту NO при механическом стрессе – в среднем на 46%. В эритроцитах после центрифугирования содержание NO по-прежнему не меняется. Таким образом, возрастание Ca^{2+} при центрифугировании недостаточно для активации NO-

синтаз. В организме синтез NO эритроцитами и клетками эндотелия *de novo* способствует вазодилатации [175] и поддерживает деформабельность эритроцитов [110], что особенно важно при циркуляции эритроцитов через просветы капилляров и синусы селезенки – то есть в условиях механического стресса.

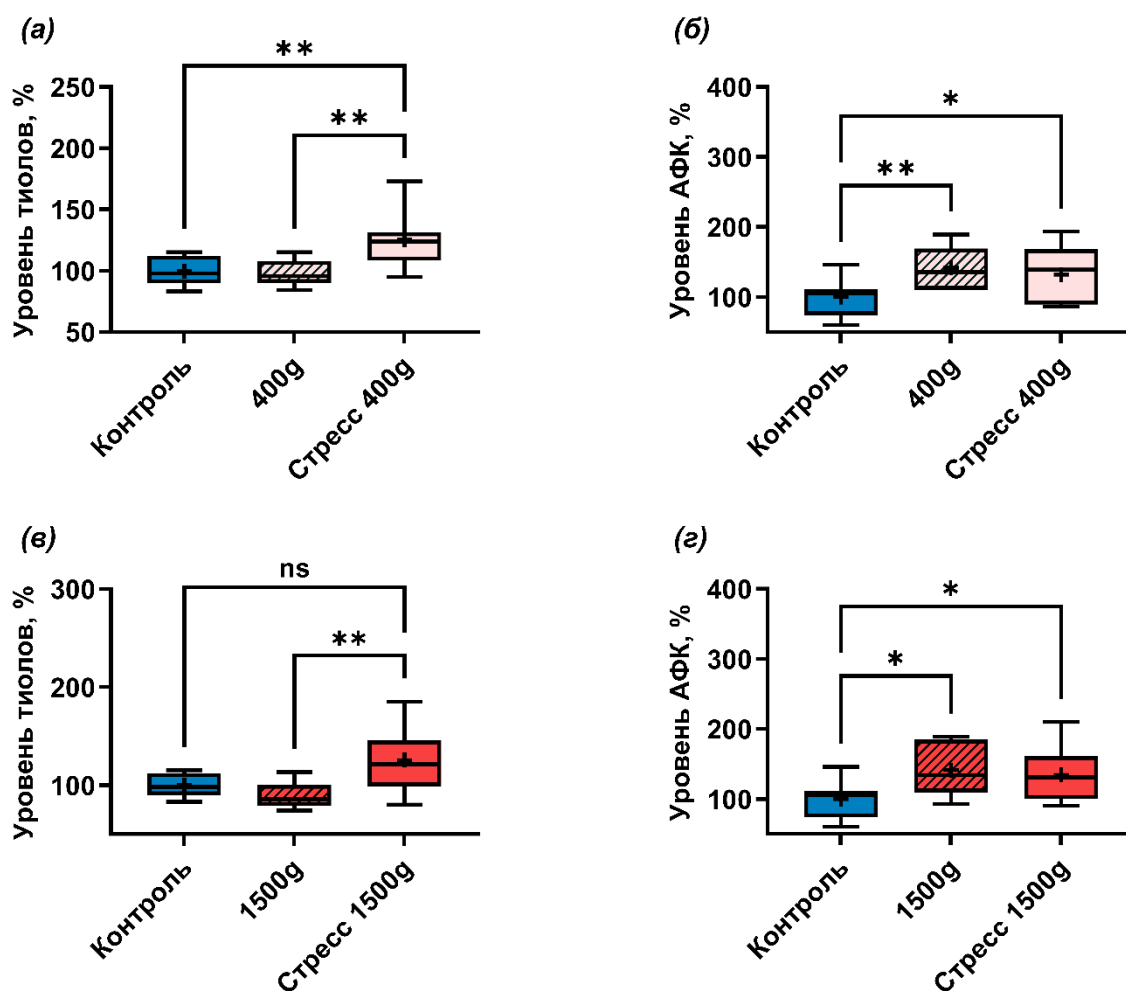


Рис. 38. Уровни восстановленных тиолов (а, в) и АФК (б, г) в эритроцитах в покое (контроль), после центрифугирования и после прохождения через фильтр (стресс) при ускорениях 400 g (а, б) и 1500 g (в, г). За 100% принято значение исследуемых параметров в покое. Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, $n = 6$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

При ускорении 400 g в прошедших через фильтр эритроцитах мы

наблюдаем значительный рост ($p < 0.01$) внутриклеточного GSH на 25%, как относительно эритроцитов в покое (контроль), так и эритроцитов после центрифугирования (рис. 38а). При этом, увеличение ($p < 0.01$) уровня АФК наблюдается, как после центрифугирования, так и после механического стресса, и составляет 41% и 32%, соответственно (рис. 38б). При ускорении 1500 g изменения редокс-параметров практически такие же. Мы видим рост ($p < 0.01$) АФК в обеих группах, на 41% и 34% (рис. 38г), и тенденцию к увеличению тиолов (преимущественно GSH [216]) после механического стресса, в среднем на 26% (рис. 38е). Отметим, что достоверность различий в целом снижается при переходе от ускорения 400 g к ускорению 1500 g (рис. 37, рис. 38). Мы полагаем, это обусловлено большей дисперсией клеточного ответа эритроцитов разных доноров на сильное механическое воздействие, что хорошо видно по минимальному и максимальному значениям для каждой группы.

Рост АФК указывает на развитие окислительного стресса в клетках [254]. В литературе описан [57] возможный путь развития окислительного стресса для случаев механического воздействия на эритроциты. Предполагается, что ключевое значение имеют вызванная ионами Ca^{2+} активация NO-синтазы и выработка NO. При истощении аргинина в цитозоле или плазме NO-синтазы начинают производить супероксид анионы ($\text{O}_2^{\bullet-}$) [255]. Образующийся NO окисляет oxyHb до metHb , а также реагирует с $\text{O}_2^{\bullet-}$, образуя мощный окислитель пероксинитрит (ONOO^-) [256]. Однако, в нашем эксперименте в группе после центрифугирования рост АФК (рис. 38б, г) происходит без роста уровня NO в клетках (рис. 37б, г). Таким образом, наши результаты доказывают, что развитие окислительного стресса при механическом воздействии происходит не по NO-зависимому пути. Мы полагаем, что наиболее вероятный источник АФК в эритроцитах – это Ca^{2+} -зависимая NADPH-оксидаза (NOX5) [112]. Вход в клетку Ca^{2+} активирует работу NOX5, как напрямую, так и через фосфорилирование протеинкиназой С [111]. Активированные NOX5 синтезируют $\text{O}_2^{\bullet-}$, что приводит к развитию окислительного стресса в эритроцитах [112].

4.4. Глутатионилирование гемоглобина при механическом стрессе

Защита от окислительного стресса особенно важна при механическом стрессе, поскольку индукция острого окислительного стресса приводит к разбуханию эритроцитов и увеличению их жесткости, в результате чего клетки не могут протиснуться в микрокапилляры [257]. Развитие окислительного стресса, обычно, сопровождается глутатионилированием белков, это один из защитных механизмов клетки [137]. Действительно, во всех исследованных группах, как при центрифугировании, так и при механическом стрессе мы видим значительный – в среднем в 2 раза – рост ($p < 0.0001$) уровня глутатионилирования Hb (рис. 39). Кроме того, степень глутатионилирования не зависит от прохождения через фильтр (механического воздействия) или ускорения. Это подтверждается статистически – между группами после центрифугирования и стресса нет достоверных отличий.

При центрифугировании мы наблюдаем классическую картину развития окислительного стресса – снижение уровня GSH (рис. 38а, в) вследствие взаимодействия с возросшими АФК (рис. 38б, г) и окисленными до SOH тиоловыми группами белков, что приводит к существенному снижению отношения восстановленного глутатиона к окисленному глутатиону (GSH/GSSG) и инициирует запуск глутатионилирования тиоловых групп белков [134].

В группе же после механического стресса, как и в случае краткого гипоосмотического воздействия, процесс глутатионилирования Hb происходит на фоне роста уровня свободного GSH. Как рост уровня GSH, так и глутатионилирование Hb могут иметь важное физиологическое значение при механическом стрессе. Известно, что связывание Hb с мембраной эритроцитов снижает деформабельность клеток [79], приводит к кластеризации AE1 и удалению эритроцитов из кровотока [77,78]. Фракция примембранного Hb представлена главным образом метформой белка, содержащей Fe^{3+} [77]. Свободный GSH препятствует окислению гемового железа и, соответственно, образованию metHb [153]. Кроме того, GSH способен восстанавливать гемовое

Fe³⁺ метформы белка до Fe²⁺ [154].

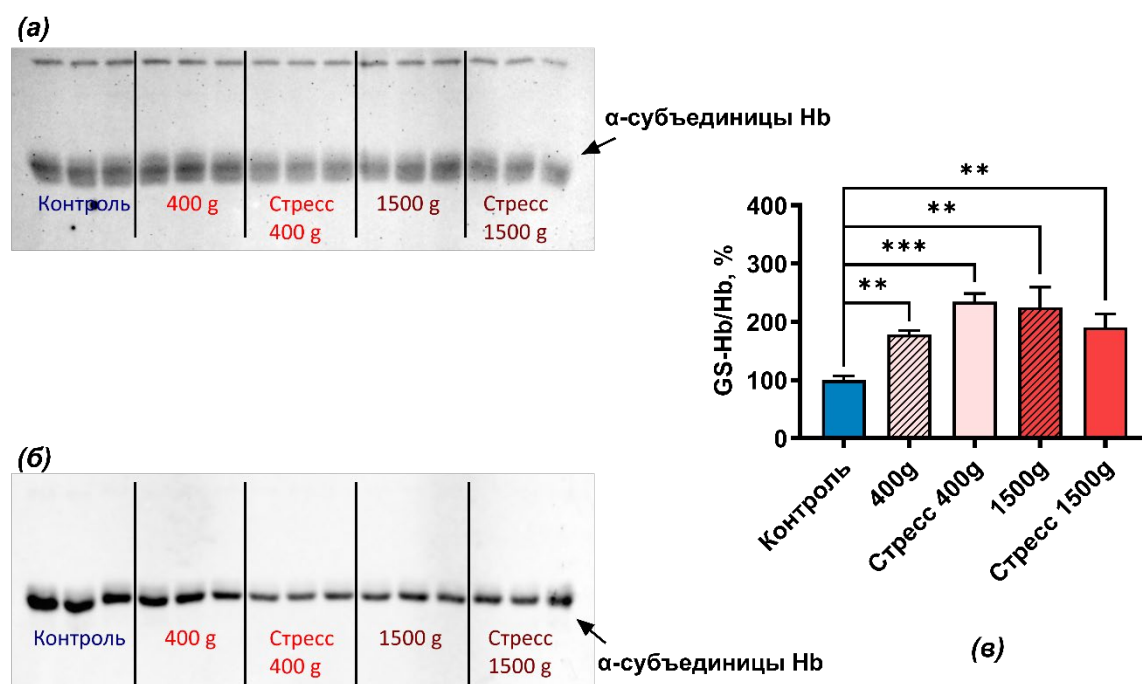


Рис. 39. Степень глутатионилирования Hb в эритроцитах в покое (контроль), после центрифугирования и после прохождения через фильтр (стресс) при ускорениях 400 g и 1500 g. Иммуноблотинг с антителами против глутатионилированного белка (GS-Hb) (a) и α -субъединицы гемоглобина (α -Hb) (б). Представлена одна пара характерных мембран из трех. (в) – результаты количественного анализа. За 100% принят уровень глутатионилирования Hb в эритроцитах в покое (контроль). Данные представлены как среднее \pm SD. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Около трети примембранного Hb присоединяется к мембране через дисульфидную связь с молекулярным комплексом, содержащим спектрин, анкирин и AE1 [78]. Блокирование наиболее реактивного цистеинового остатка β Cys93 с помощью N-этилмалеимида снижало связывание metHb с ПМ на $34 \pm 4\%$ [78]. Естественно, глутатионилирование по этому остатку также препятствует образованию примембранной фракции Hb. Таким образом, совместное действие высокой концентрации GSH и глутатионилирования Hb способно обеспечивать поддержание необходимой для прохождения через просвет капилляров деформабельности ПМ эритроцитов. Свободный GSH может снижать долю metHb, а глутатионилирование препятствовать

прикреплению metHb к ПМ клетки.

4.5. Механизм адаптации

Как мы уже писали в главе, посвященной осмотическому стрессу, по-видимому, рост уровня GSH при механическом и кратком гипоосмотическом воздействиях обусловлен его выходом из нековалентного комплекса с Hb. Сжатие [236], растяжение [244], любая локальная механическая деформация [242,243] мембраны эритроцитов, способствуют частичному R→T переходу конформации Hb. Согласно данным наших экспериментов высвобождение GSH происходит при изменении морфологии эритроцитов, что демонстрируют изменения параметра SSC при гипоосмотическом (рис. 26б) и механическом (рис. 34б, з) воздействиях на эритроциты. Отметим, что SSC значительно не меняется после центрифугирования (рис. 34б, з), при этом также не происходит роста свободного GSH (рис. 38а, в). Мы полагаем, что наши данные свидетельствуют в пользу высказанной ранее гипотезы [242] о том, что любое изменение морфологии эритроцитов влияет на конформацию части Hb в клетке. Физиологический смысл этого явления хорошо понятен – *in vivo* эритроциты подвергаются механической деформации при прохождении через микрокапилляры, расположенные в гипоксических тканях. Механически индуцированный конформационный R→T переход – это дополнительная стимуляция отдачи O₂ наряду с эффектом Вериго – Бора, что обеспечивает оптимальное выполнение эритроцитами своей главной функции. Имеет место и обратная связь – показано, что в условиях гипоксии значительно возрастает механическая деформабельность эритроцитов [70], что в свою очередь облегчает продвижение клеток через капилляры.

Непосредственный механизм, обеспечивающий изменение конформации Hb при механической деформации мембраны пока не ясен. Из данных литературы мы знаем о существовании белкового суперкомплекса на основе спектринового каркаса и мембранного белка AE1 [65]. N-концевой цитоплазматический домен AE1 представляет собой основное место крепления

цитоскелета к мембране [68]. В комплексе с гликофорином А АЕ1 связывается с анкирином [70], который в свою очередь прикрепляется к спектрину [68]. В комплексе с гликофорином С АЕ1 образует сложный белковый комплекс с аддуцином [258], белком 4.1R [71], актином, тропомиозином и тропомодулином [70], который также связан со спектриновым каркасом [71]. Как мы уже писали в прошлом разделе, при входе в клетку Ca^{2+} активируется комплекс Са-СаМ, который воздействует на белок 4.1R, в результате чего структура цитоскелета теряет стабильность и разрыхляется [108]. Это позволяет эритроцитам легко менять свою морфологию.

С цитоплазматическим доменом АЕ1 взаимодействует и Hb [245], связываясь с ним в деоксигенированной форме. Также Hb способен связываться с белком 4.1R [70] и спектрином [246]. Причем, около трети примембранного Hb прикрепляется к мембранным белкам через дисульфидную связь [78]. Взаимодействия Hb с АЕ1 и белком 4.1R O_2 -зависимы – деоxуHb (преимущественно Т-форма [78]) имеет значительно более высокое сродство к белкам-мишеням, чем оxуHb [70,245]. Поэтому, в условиях гипоксии Hb разрывает связи АЕ1 с анкирином [73] и белка 4.1R с гликофорином С [76]. Потенциально, это может обеспечивать увеличение деформабельности мембраны, наблюдаемое в гипоксии [70]. Однако, в недавней статье, напротив, было показано снижение деформабельности мембраны при прикреплении Hb [79]. Возможно, нековалентно связываемый деоxуHb и ковалентно связываемый metHb по-разному влияют на деформабельность ПМ. Это может объяснить противоречия в литературе [70,73,79]. Как мы видим, Hb тесно связан с примембранным белковым суперкомплексом, зависит от перестроек этого комплекса, и сам оказывает влияние на белки-партнеры. Однако, информация о механизмах этого взаимодействия и, что еще важнее о конформационных перестройках самой молекулы Hb очень скудна.

В процесс конформационных перестроек примембранного Hb может быть вовлечен Ca^{2+} . Известно, что доля мембранно-связанного Hb зависит от концентрации этого иона. Как удаление Ca^{2+} из внеклеточной среды, так и

увеличение внутриклеточного уровня Ca^{2+} приводят к высвобождению примембранного Hb в цитозоль [74,259]. При этом, происходит изменение конформации Hb – уменьшается упорядоченность СН-групп АК остатков, увеличивается плотность упаковки молекулы Hb и полярность окружения молекулы [74]. Вход Ca^{2+} в эритроциты при физических нагрузках значительно снижает сродство Hb к O_2 [102]. Показано влияние концентрации Ca^{2+} на вязкость р-ра Hb за счет частичного высвобождения связанной с Hb воды [260]. Изменение морфологии эритроцитов обычно происходит на фоне колебаний внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , об этом свидетельствуют, как данные литературы [12,57,74,96,105,107,257,259], так и проведенные нами эксперименты. Потенциально Ca^{2+} может действовать на Hb, как напрямую через нековалентное взаимодействие, так и опосредованно, через влияние на примембранный белковый суперкомплекс. Выявление механизма влияния Ca^{2+} на Hb требует отдельного исследования.

Отметим, что большой интерес представляют и наши данные о влиянии центрифугирования на эритроциты, поскольку это очень широко распространенная методика пробоподготовки. Долгое время считалось, что даже длительное центрифугирование при ускорениях 200-1500 g не оказывает значительного влияния на эритроциты [261]. Однако, в недавних работах [248,249] было показано, что центрифугирование в пределах распространенных диапазонов времени (1-10 мин) и ускорения (90-16000 g) приводит к гемолизу и высвобождению во внеклеточную среду значительного количества АТФ [249] и Hb [248]. Наши эксперименты также свидетельствуют о наличии не выявленных ранее эффектов от центрифугирования на исследуемые клетки, а именно об изменении размеров и формы эритроцитов и о развитии окислительного стресса в эритроцитах, подвергнутых даже кратковременному центрифугированию.

5. Адаптация эритроцитов к действию бета-амилоидов

Известно, что эритроциты – основной переносчик бета-амилоидов в кровотоке [16]. Уровень амилоидов в крови значительно повышается в случае развития БА [16]. При БА меняется форма эритроцитов [188,190], развивается перекисное окисление липидов [189]. У пациентов с БА отмечено снижение уровня O_2 в церебральных венах, что приводит к снижению когнитивных функций [179,180]. У модельных мышей линии APP/PS1 обнаружено снижение сатурации крови [184]. Насыщение крови O_2 при гипероксигенации позволяет замедлить снижение когнитивных функций у пациентов с БА [185,186], а также развитие заболевания в мышцах с моделью БА [187].

Причиной нарушения газотранспортной функции эритроцитов может быть связывание избыточного количества бета-амилоидов с их поверхностью. Мы охарактеризовали влияние патогенных бета-амилоидов ($A\beta_{42}$ и $isoA\beta_{42}$) на эритроциты и попробовали установить механизмы их адаптации.

5.1. Связывание бета-амилоидов с поверхностью эритроцитов

Чтобы оценить связывание бета-амилоидных пептидов с поверхностью эритроцитов проводили окрашивание клеток флуоресцирующими антителами на N-конец бета-амилоида до и после инкубации с 0.1 и 1 мкМ $A\beta_{42}$ и $isoA\beta_{42}$. Затем проводили детекцию средней флуоресценции клеток и процента интенсивно-флуоресцирующих клеток методом проточной цитометрии (рис. 40). Инкубация с 1 мкМ бета-амилоидов приводит к увеличению средней интенсивности флуоресценции клеток (рис. 40а, б) и значительному росту процента эритроцитов с высоким содержанием пептидов на поверхности эритроцитов (рис. 40в, г).

Важную роль в связывании лигандов с поверхностью клеток выполняет гликокаликс, в частности, сиаловые кислоты, которые обеспечивают отрицательный заряд мембраны [262]. Чтобы оценить вклад гликокаликса в связывание $A\beta_{42}$ и $isoA\beta_{42}$, мы “срезали” остатки сиаловых кислот с эритроцитов

нейраминидазой. Эффективность ее действия на гликокаликс эритроцитов была подтверждена нами с помощью лектина, меченного FITC. Лектин связывается с остатками галактозы, которые становятся доступными после “срезания” сиаловых кислот [263,264]. Удаление сиаловых кислот (Рис. 40д) приводит к повышению уровня связанных с эритроцитами $A\beta_{42}$ и $изоA\beta_{42}$ (Рис. 40а, б) и доли эритроцитов с высоким содержанием бета-амилоидных пептидов (Рис. 40в з).

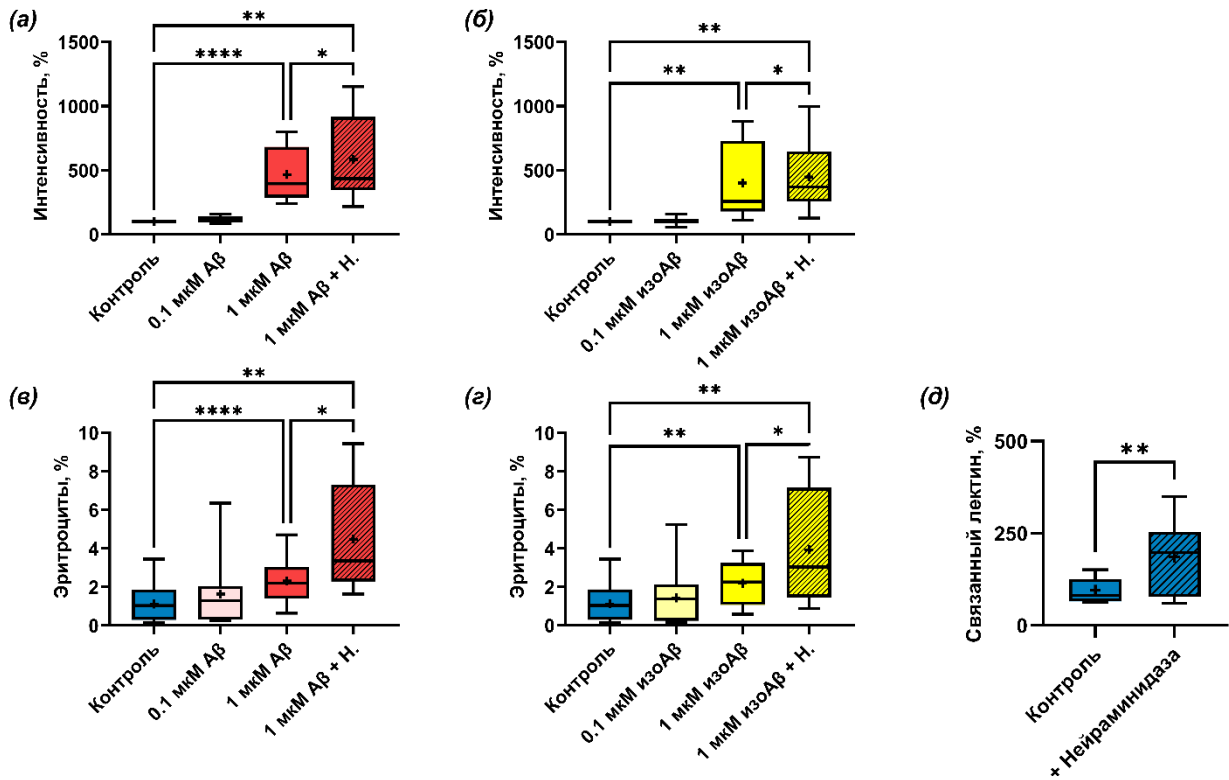


Рис. 40. Связывание $A\beta_{42}$ и $изоA\beta_{42}$ с поверхностью эритроцитов. Средняя интенсивность флуоресценции антител к амилоиду (а) после инкубации с 0.1 или 1 мкМ $A\beta_{42}$ и преинкубации с нейраминидазой (+ N); и (б) после инкубации с 0.1 или 1 мкМ $изоA\beta_{42}$ и преинкубации с нейраминидазой (+ N). Процент эритроцитов с высокой интенсивностью флуоресценции антител к амилоиду (в) после инкубации с 0.1 или 1 мкМ $A\beta_{42}$ и преинкубации с нейраминидазой (+ N); и (з) после инкубации с 0.1 или 1 мкМ $изоA\beta_{42}$ и преинкубации с нейраминидазой (+ N). (д) оценка состояния гликокаликса по уровню связанного лектина после обработки нейраминидазой. Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, $n = 12$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Таким образом, можно предположить, что бета-амилоидные пептиды

связываются не с гликокаликсом, а с белками мембраны эритроцитов, доступ к которым после действия нейраминидазы увеличивается. Важно отметить, что снижение количества сиаловых кислот на поверхности характерно для стареющих эритроцитов [265]. Кроме того, толщина гликокаликса, в частности, гликокаликса эндотелия, снижается с возрастом человека [266]. Полученные данные позволяют заключить, что истощение гликокаликса с возрастом или вследствие различных заболеваний должно приводить к увеличению связанного с эритроцитами бета-амилоида, что будет являться фактором риска развития БА. Также на основании этих данных можно высказать предположение, что изменение уровня амилазы в крови будет влиять на эффективность сорбции бета-амилоида эритроцитами.

Константы связывания (K_d) бета-амилоидов с поверхностью эритроцитов были оценены методом иммуноферментного анализа (рис. 41).

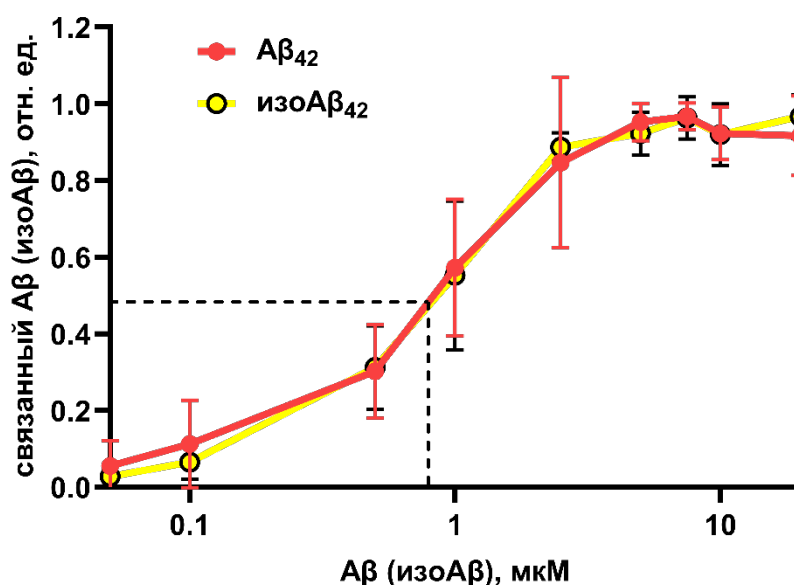


Рис. 41. Дозозависимость связывания Aβ₄₂ (красный) и изоAβ₄₂ (желтый) с поверхностью эритроцитов. Каждый набор данных был нормирован на свое максимальное значение. Данные представлены как среднее ± SD, n = 4.

После инкубации эритроцитов с возрастающими концентрациями пептидов, образцы отмыли в буфере с 0.1% альбумина. Это позволило исключить неспецифическое связывание, поскольку альбумин это основной

транспортер бета-амилоидов в плазме [267]. Средние значения K_d для связывания $A\beta_{42}$ и $изоA\beta_{42}$ с эритроцитами составили 0.99 ± 0.22 и 1.01 ± 0.36 мкМ, соответственно. Согласно данным иммуноферментного анализа, при инкубации эритроцитов с 0.1 и 1 мкМ бета-амилоидов количество пептидов на поверхности клеток возрастает примерно в 2 и 10 раз относительно средних физиологических значений, опубликованных ранее [16].

5.2. Размер, форма и содержание Ca^{2+} в эритроцитах под действием бета-амилоидов

Связывание $A\beta_{42}$ и $изоA\beta_{42}$ в концентрации 0.1 и 1 мкМ с эритроцитами не влияет на значение параметра FSC (рис. 42а, з), но приводит к снижению параметра SSC, что указывает на изменение формы клеток (рис. 42б, д).

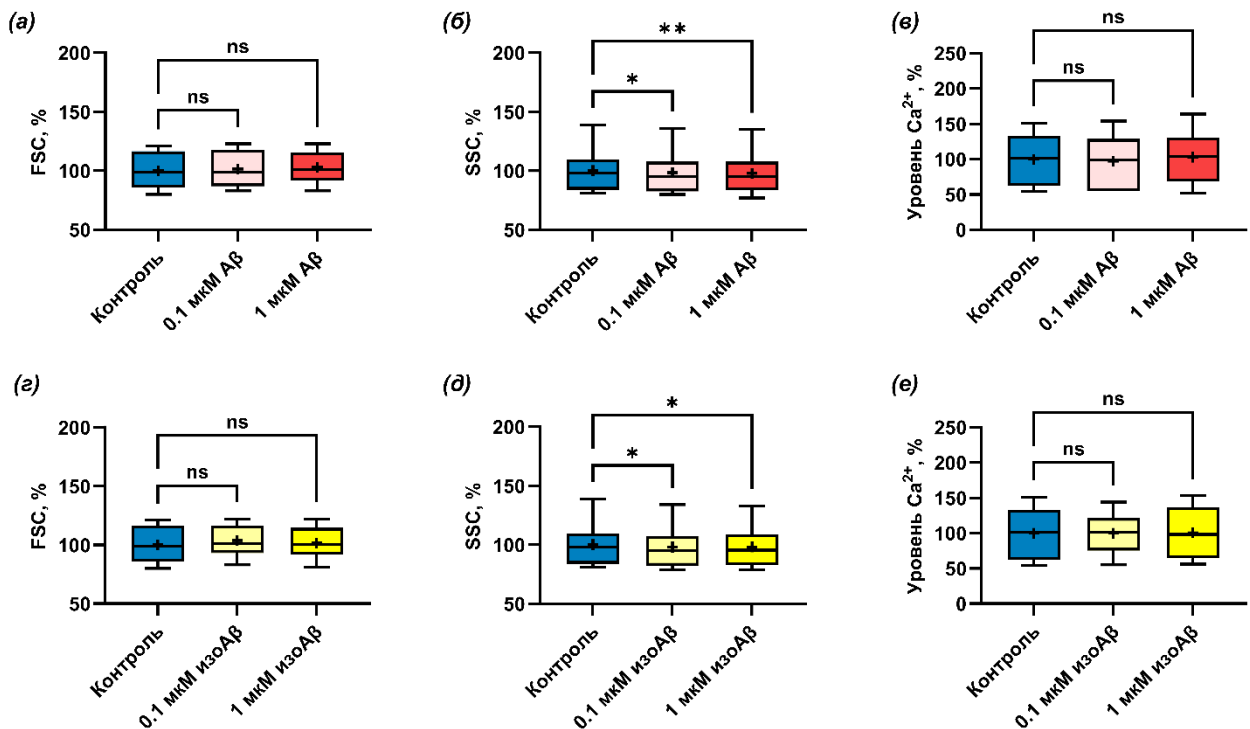


Рис. 42. Изменение параметров малоуглового (FSC) (а, б), бокового (SSC) (в, з) светорассеяния и уровни Ca^{2+} (д, е) в эритроцитах в покое (контроль), после инкубации (а, в, д) с 0.1 или 1 мкМ $A\beta_{42}$ (Aβ), и (б, з, е) с 0.1 или 1 мкМ $изоA\beta_{42}$ (изоAβ). За 100% принято значение исследуемых параметров в покое. Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса, среднее

– символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, $n = 6-12$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Это хорошо согласуется с данными об увеличении количества вытянутых эритроцитов у пациентов с БА [188,190]. При этом мы не обнаружили изменения уровня внутриклеточного Ca^{2+} (рис. 42в, е), который, как правило, вовлечен в изменение размера и формы эритроцитов [96]. В недавней работе [268] было показано, что бета-амилоид способен усиливать вход Ca^{2+} при активации механочувствительных PIEZO1 каналов при помощи Yoda1, что приводит к большему изменению параметров FSC и SSC эритроцитов пациентов с БА по сравнению со здоровыми добровольцами. В наших условиях в отсутствии механического стресса, приводящего к активации PIEZO1, ни роста внутриклеточного Ca^{2+} , ни изменения размера клеток не наблюдается.

5.3. Редокс-параметры и сродство Hb к O₂ под действием бета-амилоидов

Бета-амилоиды влияют на редокс-статус эритроцитов. Мы обнаружили, что инкубация уже с 0.1 мкМ $A\beta_{42}$, или $isoA\beta_{42}$ приводит к существенному снижению уровня АФК (рис. 43а, б). При увеличении концентрации бета-амилоидов до 1 мкМ эффект усиливается (рис. 43а, б).

Как мы уже отмечали ранее, основными источниками АФК в эритроцитах это Hb [18] и NADPH-оксидазы [112]. В присутствии ингибитора NADPH-оксидаз (DPI) уровень АФК в эритроцитах снижается более чем на 25% (рис. 43в). При этом, полностью предотвращается эффект снижения АФК, вызванный $A\beta_{42}$ и $isoA\beta_{42}$ (рис. 43г, д). Следовательно, снижение АФК в эритроцитах связано с подавлением работы мембранных NADPH-оксидаз бета-амилоидными пептидами. В эритроцитах NADPH-оксидаз представлены изоформами NOX1 и Ca^{2+} -зависимой NOX5 [112,269]. Поскольку снижение активности NADPH-оксидаз не связано с изменением уровня внутриклеточного Ca^{2+} (рис. 42д, е), можно заключить, что бета-амилоиды ингибируют работу NOX1.

Падение АФК приводит к снижению сродства Hb к O₂, и, таким образом,

может быть причиной одной из причин понижения уровня оксигенации крови при БА. Согласно данным, предоставленным проф. А.Ю. Богдановой, инкубация эритроцитов с 0.1 мкМ $A\beta_{42}$ и $изоA\beta_{42}$ приводит к возрастанию (рис. 44а) величины парциального давления O_2 , насыщающего Hb на 50% (p50), что свидетельствует о снижении сродства Hb к O_2 . Инкубация в присутствии ингибитора NADPH оксидаз полностью предотвращает действие $A\beta_{42}$ и $изоA\beta_{42}$ на сродство Hb к O_2 (рис. 44б, в).

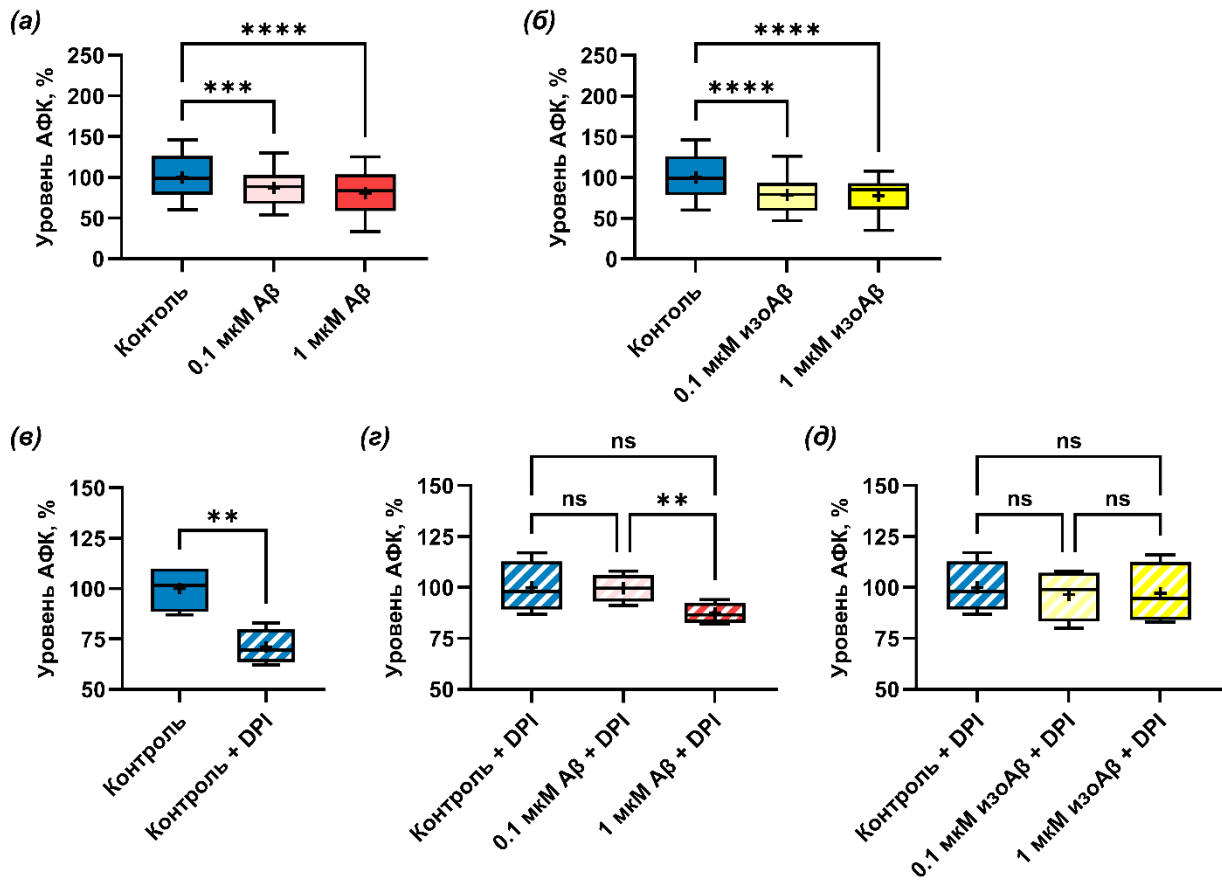


Рис. 43. Уровни АФК в эритроцитах в покое (контроль), (а) после инкубации с 0.1 или 1 мкМ $A\beta_{42}$ ($A\beta$); (б) после инкубации с 0.1 или 1 мкМ $изоA\beta_{42}$ ($изоA\beta$); (в) после преинкубации с DPI; (г) после преинкубации с DPI и инкубации с 0.1 или 1 мкМ $A\beta_{42}$ ($A\beta + DPI$); (д) после преинкубации с DPI и инкубации с 0.1 или 1 мкМ $изоA\beta_{42}$ ($изоA\beta + DPI$). За 100% принято значение исследуемых параметров в покое. Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, $n = 4-12$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

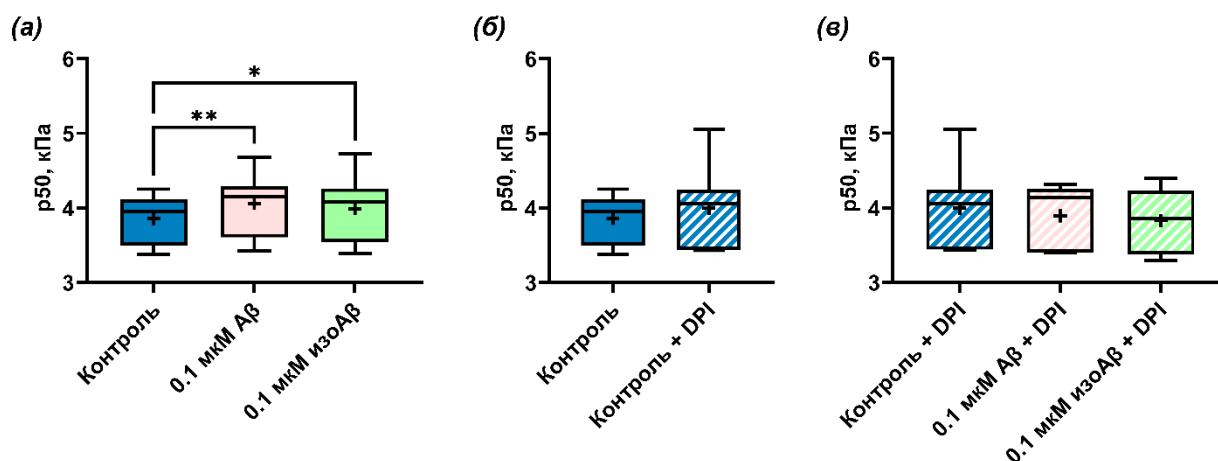


Рис. 44. Значение параметра $p50$ Hb в эритроцитах в покое (контроль), (а) после инкубации с 0.1 мкМ $A\beta_{42}$ ($A\beta$) или $isoA\beta_{42}$ (изо $A\beta$), (б) после преинкубации с DPI; (в) после преинкубации с DPI и инкубации с 0.1 мкМ $A\beta_{42}$ ($A\beta + DPI$) или $isoA\beta_{42}$ (изо $A\beta + DPI$). За 100% принято значение исследуемых параметров в покое. Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, $n = 5-9$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$,

Снижение внутриклеточных АФК сопровождается ростом внутриклеточного GSH при инкубации с бета-амилоидами (рис. 45а, б), при этом общий уровень тиолов в клетке значительно не меняется, как под действием $A\beta_{42}$ (рис. 45в), так и после инкубации с $isoA\beta_{42}$ (рис. 45г). Рост GSH хорошо согласуется со снижением внутриклеточного содержания АФК (рис. 43а, б) и свидетельствует о снижении уровня окислительного стресса под действием бета-амилоидов.

На уровень внутриклеточного NO влияет только $isoA\beta_{42}$, снижая его уже в концентрации 0.1 мкМ (рис. 45е). Поскольку основной источник NO в изолированных эритроцитах – это NO синтазы [174], можно заключить, что $isoA\beta_{42}$ блокирует работу этих ферментов. Производство NO важно для регуляции деформабельности эритроцитов и вазодилатации сосудов [110], что помогает при прохождении через просветы капилляров [270,271]. Ингибиторы NO-синтаз уменьшают скорость потока эритроцитов за счет понижения их деформабельности [272]. Ранее снижение уровня NO под действием $isoA\beta_{42}$

было показано на клетках нейробластомы человека, в которых оно коррелировало с цитотоксическим действием изоАβ₄₂ [273]. Таким образом, накопление изоАβ₄₂ на эритроцитах будет нарушать производство NO, что, вероятно, снизит их деформабельность и скорость прохождения по сосудам.

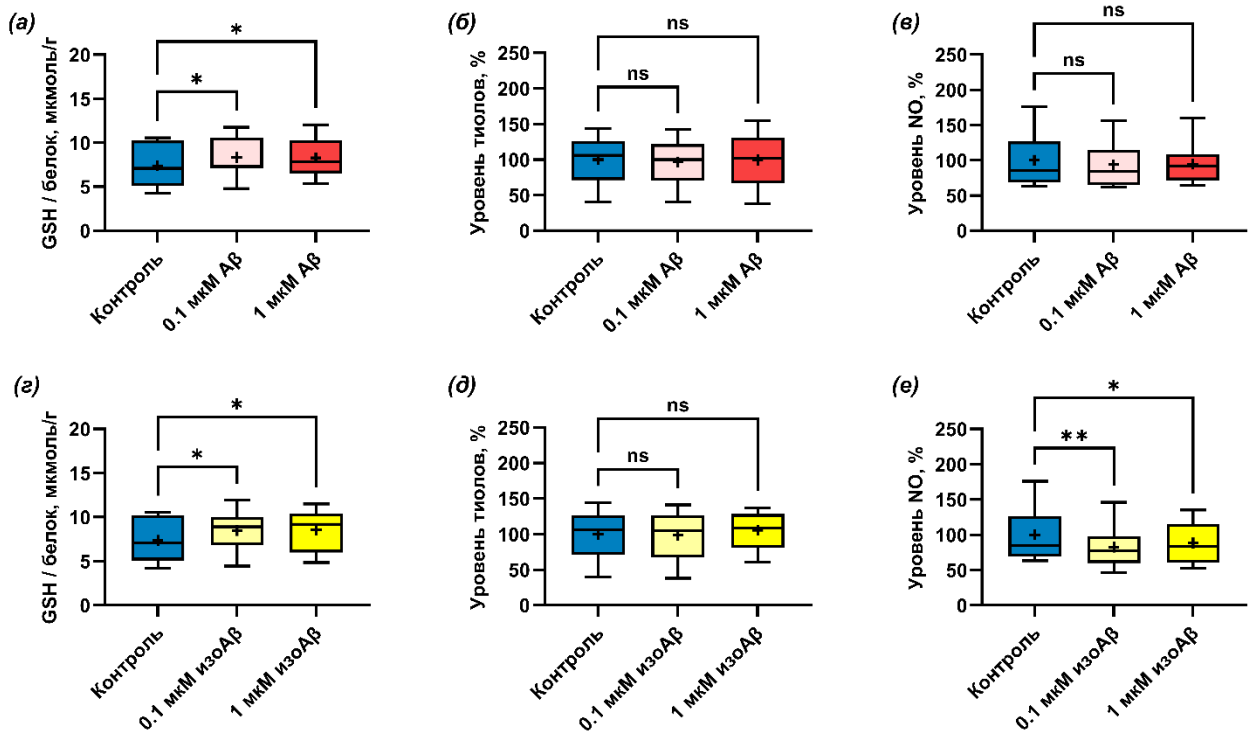


Рис. 45. Уровни GSH (а, б), восстановленных тиолов (в, г) и NO (д, е) в эритроцитах в покое (контроль), после инкубации (а, в, д) с 0.1 или 1 мкМ Аβ₄₂ (Аβ), и (б, г, е) с 0.1 или 1 мкМ изоАβ₄₂ (изоАβ). За 100% принято значение исследуемых параметров в покое. Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, $n = 6-12$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

5.4. Глутатионилирование гемоглобина под действием бета-амилоидов

Под действием Аβ₄₂ происходит снижение степени глутатионилирования Нв (рис. 46). В случае изомеризованной формы бета-амилоида изменения степени глутатионилирования Нв мы не обнаружили (рис. 47).

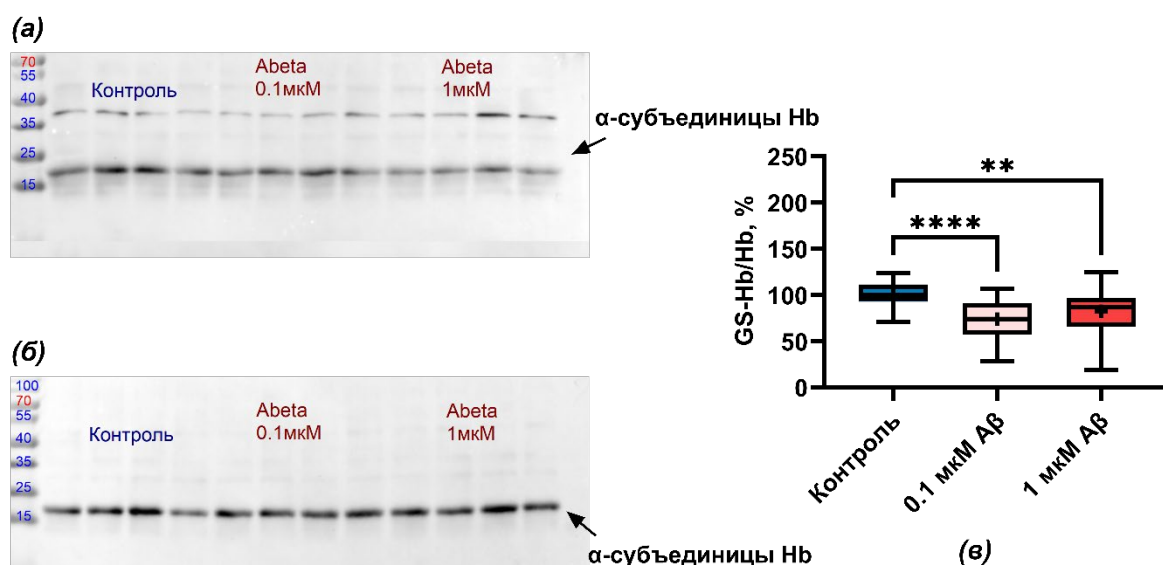


Рис. 46. Степень глутатионилирования Hb в эритроцитах в покое (контроль) и после инкубации 0.1 или 1 мкМ $A\beta_{42}$ ($A\beta$). Иммуноблотинг с антителами против глутатионилированного белка (GS-Hb) (a) и α -субъединицы гемоглобина (α -Hb) (б). Представлена одна пара характерных мембран из восьми. (в) – результаты количественного анализа. За 100% принят уровень глутатионилирования Hb в эритроцитах в покое (контроль). Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, $n = 8$. $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

В случае $A\beta_{42}$ снижение глутатионилирования Hb, которое является маркером окислительного стресса, соответствует падению АФК и повышению уровня свободного GSH. Однако изо $A\beta_{42}$, снижая АФК (рис. 43б), никак не влияет на уровень глутатионилирования. Мы полагаем, что этот эффект может быть связан с ингибированием синтеза NO изо $A\beta_{42}$. Известно, что нитрозилирование является конкурирующей с глутатионилированием модификацией [274]. Изо $A\beta_{42}$ снижает уровень NO, вследствие чего, нитрозилирования Hb, способное предотвратить глутатионилирование белка, не происходит, а уровень глутатионилирования, несмотря на снижение АФК, в присутствии изо $A\beta_{42}$ не меняется. Поскольку глутатионилирование повышает сродство Hb к O_2 более чем в 6 раз [22,23], снижение степени глутатионилирования под действием $A\beta$ может быть одной из причин понижения уровня оксигенации крови при БА.

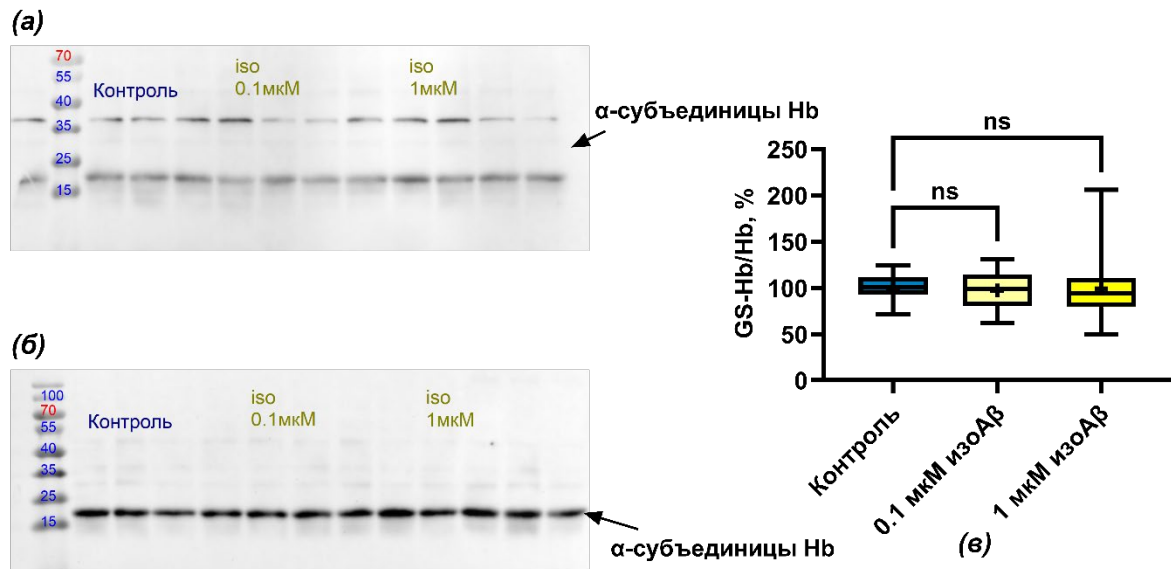


Рис. 47. Степень глутатионилирования Hb в эритроцитах в покое (контроль) и после инкубации 0.1 или 1 мкМ изоАβ₄₂ (изоАβ). Иммуноблоттинг с антителами против глутатионилированного белка (GS-Hb) (а) и α-субъединицы гемоглобина (α-Hb) (б). Представлена одна пара характерных мембран из восьми. (в) – результаты количественного анализа. За 100% принят уровень глутатионилирования Hb в эритроцитах в покое (контроль). Данные представлены в виде разброса значений. Медиана – поперечная полоса, среднее – символ "+", первый и третий квартили – границы ящика, минимальное и максимальное значения – концы усов, $n = 8$.

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

После изучения механизмов адаптации эритроцитов к характерным стрессовым воздействиям, мы сконцентрировались на изменениях, происходящих в молекуле Hb при взаимодействии с GSSG и GSH. Исследование конформационных изменений мы провели на образцах очищенного белка с помощью методов КР- и ИК-спектроскопии. Сочетание двух методов широко применяется в биофизике [209,275,276], поскольку позволяет одновременно оценить вторичную [277] и третичную [278] структуры белка, а в случае гемоглобина и конформационное состояние гема [279].

6.1. Оценка эффективности глутатионилирования гемоглобина при инкубации с окисленным глутатионом (GSSG)

Насыщение Hb кислородом (SaO_2) приближается к 100% при $p\text{O}_2$ выше 17 кПа (128 мм рт. ст.) [193]. Поэтому в обычных атмосферных условиях, при которых $p\text{O}_2$ составляет около 21 кПа (158 мм рт. ст., при атмосферном давлении 760 мм рт. ст.), практически весь очищенный Hb находится в оксиформе [193]. Спектры поглощения наших образцов (рис. 48) имеют два выраженных пика (541 нм и 576 нм), что характерно для oxyHb [149].

Эффективность глутатионилирования оксигемоглобина окисленным глутатионом (GSSG) мы определяли при помощи иммуноблотинга. Результаты показали, что инкубация с GSSG приводит к значительному (более чем в пять раз) увеличению глутатионилирования Hb (рис. 49). При этом инкубация Hb с восстановленным глутатионом (GSH) не меняет степень глутатионилирования белка (рис. 49). Значит, все остатки цистеина доступные для глутатионилирования находятся в восстановленной форме. Результаты иммуноблотинга подтверждают полученные нами ранее данные (раздел об адаптации эритроцитов к гипоксии) о том, что в случае взаимодействия Hb с GSH, реализуется только образование нековалентного комплекса [6].

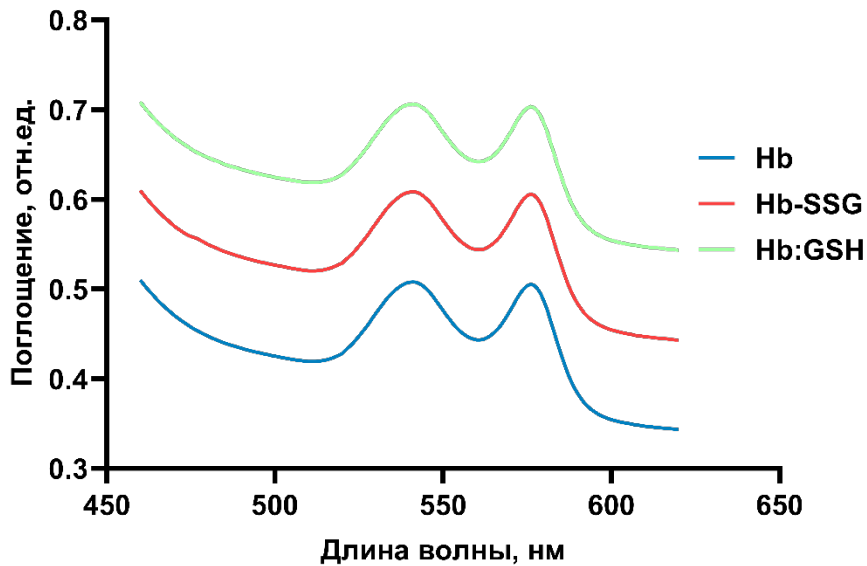


Рис. 48. Спектры поглощения Hb (синий), глутатионилированного Hb (красный) и нековалентного комплекса Hb с GSH (зеленый). Для наглядности спектры Hb-SSG и Hb:GSH подняты на 0.1 и 0.2 отн. ед. соответственно.

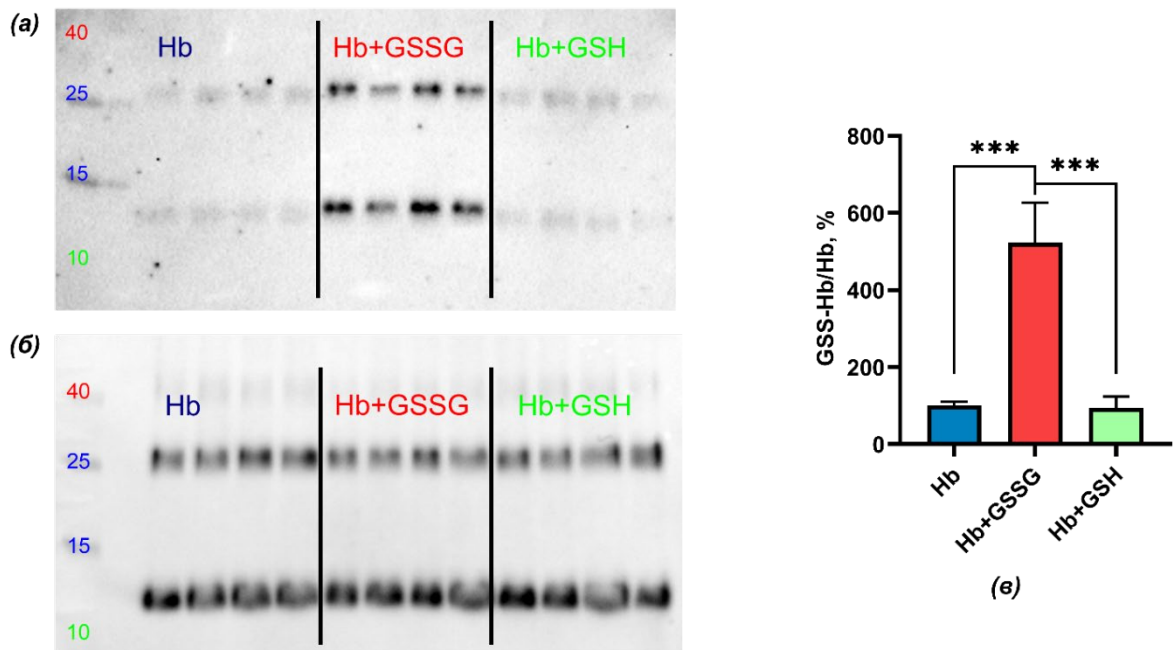


Рис. 49. Степень глутатионилирования Hb в образцах чистого белка (Hb), при добавлении окисленного глутатиона (Hb + GSSG) и при добавлении восстановленного глутатиона (Hb + GSH). (a) иммуноблотинг с антителами против глутатионилированного белка (GS-Hb), (б) иммуноблотинг с антителами против α -субъединицы гемоглобина (α -Hb), (в) результаты количественного анализа. Данные представлены как среднее \pm SD. *** $p < 0.001$.

6.2 Влияние глутатионилирования и образования комплекса с глутатионом на конформацию гемопорфиринового макроцикла гема

Чтобы оценить влияние глутатионилирования и образования нековалентного комплекса с GSH на состояние гема, мы использовали спектроскопию КР. На рис. 50а представлены, полученные с применением зелёного лазера (длина волны 532 нм), усредненные КР спектры растворов гемоглобина (Hb), глутатионилированного гемоглобина (Hb-SSG) и нековалентного комплекса гемоглобина с глутатионом (Hb:GSH) в 50 мМ К-фосфатном буфере (pH 7.4), содержащем 50 мМ KCl. Первые значимые различия мы обнаружили в соотношении интенсивностей характеристических полос I_{1375}/I_{1172} (рис. 50б). Как глутатионилирование ($p < 0.05$), так и образование нековалентного комплекса ($p < 0.05$) снижают это отношение в спектре гемоглобина. Полоса 1375 см^{-1} соответствует интенсивности симметричных, а полоса 1172 см^{-1} асимметричных колебаний пиррольных полуколец гемопорфирина [147,279]. В спектрах Hb-SSG и Hb:GSH возросла интенсивность асимметричных колебаний (I_{1172}). Снижение величины соотношения I_{1375}/I_{1172} указывает на увеличение подвижности гема [209].

В спектре нековалентного комплекса (Hb:GSH) соотношение I_{1585}/I_{1375} (рис. 50в) также снизилось ($p < 0.05$) за счет уменьшения I_{1585} . Полоса 1585 см^{-1} самая выраженная в спектре Hb (рис. 50а). I_{1585} соответствует асимметричным колебаниям метиновых "мостиков" между пирролами в гемопорфирине (C_aC_m , C_aC_mH на рис. 11), выраженных при деформации макроцикла [280]. При деформации меняется диаметр порфиринового цикла [147] и, соответственно, положение железа (Fe^{2+}). Отношение асимметричных колебаний метиновых "мостиков" к симметричным колебаниям пиррольных полуколец (I_{1585}/I_{1375}) характеризует способность Hb высвободить лиганды [207,209].

Этот результат особенно интересен в свете наших данных об адаптации эритроцитов к деоксигенации (часть 1.3 главы Результаты и обсуждения). Как уже отмечалось выше, эритроциты попадают в условия гипоксии перемещаясь по капиллярам, расположенным в периферийных тканях организма [7].

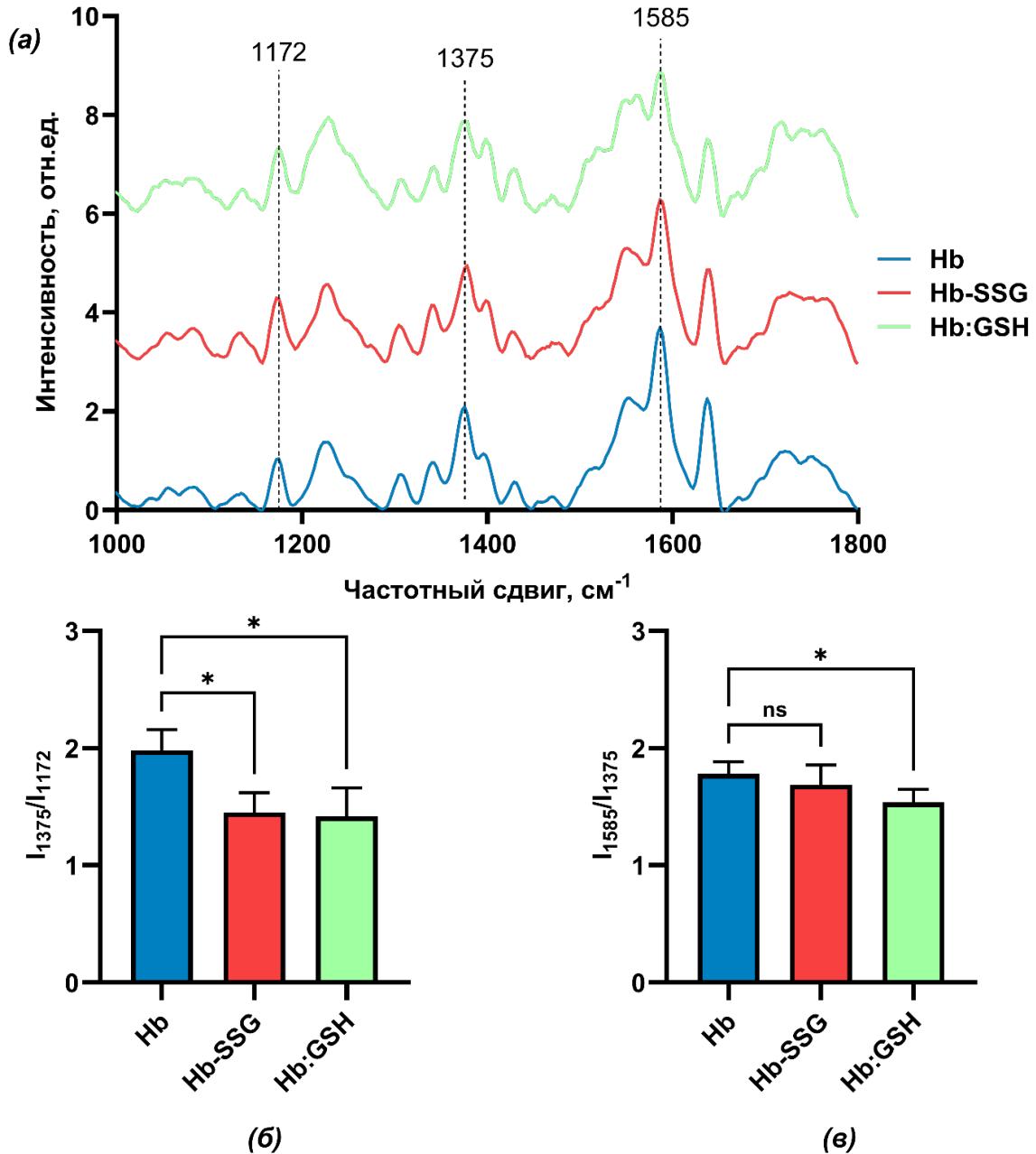


Рис. 50. Анализ изменений характерных полос КР-спектров Hb (синий), глутатионилированного Hb (Hb-SSG, красный) и нековалентного комплекса Hb с GSH (Hb:GSH, зеленый), полученных при возбуждении лазером 532 нм. (а) участок 1000-1800 см⁻¹ усредненных спектров КР. Фильтрация шумов методом Савицкого-Голея. Для наглядности спектры Hb-SSG и Hb:GSH подняты на 3 и 6 отн. ед. соответственно. Соотношения интенсивностей полос (б) 1375/1172 см⁻¹ и (в) 1585/1375 см⁻¹ спектров КР. Данные представлены как среднее ± SD, n = 6. **p* < 0.05.

Пока эритроциты находятся в условиях достаточного pO_2 , охуHb в комплексе с GSH имеет сниженную способность отдавать O₂. Это обеспечивает

лучшую доставку O_2 к тканям, испытывающим гипоксию, то есть выполнение главной функции эритроцитов в организме. Непосредственно в условиях недостатка O_2 комплекс Hb с GSH разрушается при переходе белка в деоксигенированную форму [6], что может дополнительно, наряду с влиянием 2,3-BPG и эффектом Вериги – Бора [159,160], стимулировать выделение O_2 молекулами Hb за счет увеличения способности белка выделять лиганды.

Другие заметные изменения спектров произошли в области $1500-1600\text{ см}^{-1}$ (рис. 51а). Снижение интенсивности полосы 1585 см^{-1} в спектре Hb:GSH привело также к падению ($p < 0.05$) соотношения I_{1585}/I_{1550} относительно контрольного Hb (рис. 51б). Похожая тенденция наблюдается для глутатионилированного Hb, однако, это изменение статистически недостоверно. Наиболее разительное отличие КР спектра нековалентного комплекса Hb:GSH связано с появлением дополнительного выраженного пика с максимумом в полосе 1563 см^{-1} (рис. 51а). Отношение I_{1563}/I_{1550} в спектре Hb:GSH значительно выше ($p < 0.01$), чем в контрольном спектре. Интенсивность полосы 1563 см^{-1} определяется колебаниями связей бокового радикала (C_bC_1 на рис. 11) и "внешних" атомов углерода пирролов (C_bC_b на рис. 11) [147,279]. К соотнесению полосы 1550 см^{-1} с групповыми колебаниями в геме следует подходить с осторожностью. В литературе мы обнаружили ряд разночтений. Часть исследователей указывает, что, как и I_{1585} , I_{1550} соответствует ассиметричным колебаниям метиновых "мостиков" между пирролами (C_aC_m , C_aC_mH на рис. 11) [147,208,281]. Другие авторы привязывают I_{1550} к колебаниям "внешних" атомов углерода пирролов (C_bC_b на рис. 11) наряду с I_{1563} [139,279,282].

Известно, что все три рассматриваемых полосы (1585 , 1563 , 1550 см^{-1}) чувствительны к изменению спинового состояния железа и диаметру порфиринового цикла [147,279]. При переходе Hb из оксигенированного в деоксигенированное состояние резко меняется отношение I_{1585}/I_{1550} , поскольку в спектре охуHb значительно выше интенсивность полосы 1585 см^{-1} , а в случае деоксиформы, наоборот, преобладает полоса 1550 см^{-1} [280]. Пик в районе 1563 см^{-1} присутствует только в спектре оксигенированного Hb [147,279].

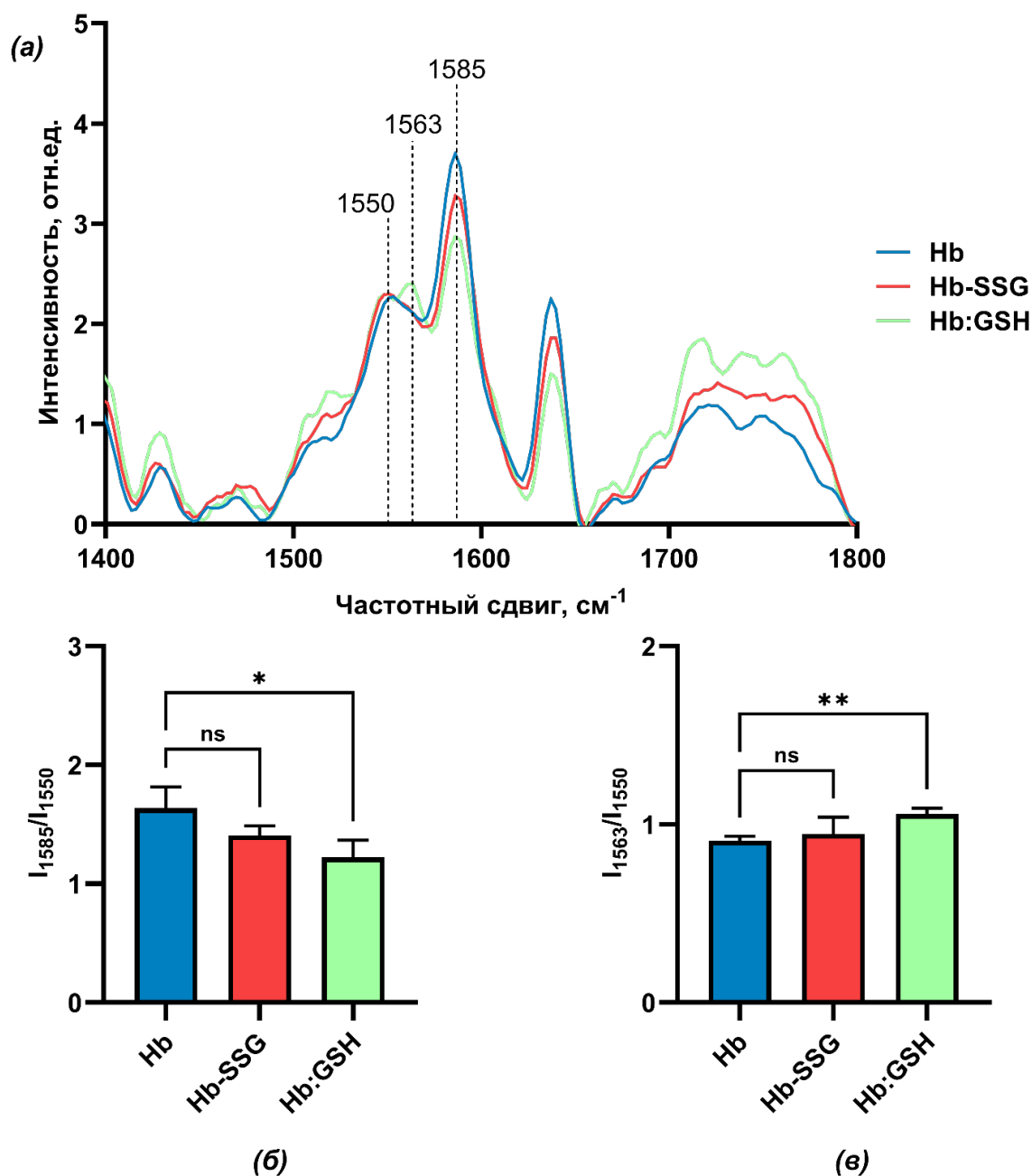


Рис. 51. Анализ изменений характерных полос КР-спектров Hb (синий), глутатионилированного Hb (Hb-SSG, красный) и нековалентного комплекса Hb с GSH (Hb:GSH, зеленый), полученных при возбуждении лазером 532 нм. (а) участок 1400-1800 см⁻¹ усредненных спектров КР. Фильтрация шумов методом Савицкого-Голея. Соотношения интенсивностей полос (б) 1585/1550 см⁻¹ и (в) 1563/1550 см⁻¹ спектров КР. Данные представлены как среднее ± SD, n = 6. **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

В совокупности наши данные об изменениях КР на участке 1500-1600 см⁻¹ указывают на снижение интенсивности колебаний в районе "мостиков" между

пирролами и усиление вибраций в латеральной части гемопорфирина при образовании нековалентного комплекса Hb с GSH. В спектре глутатионилированного Hb мы видим похожие тенденции, однако, они слабо выражены.

Результаты, полученные на растворах Hb при помощи зеленого лазера (532 нм), мы дополнили, используя красный лазер (длина волны 633 нм). На рис. 52а представлены усредненные КР спектры высушенных образцов Hb, Hb-SSG и нековалентного комплекса Hb:GSH. Спектры КР высушенных образцов не соответствуют спектру Hb в растворе, но характерны для Hb в кристаллической форме [278]. При возбуждении лазером 633 нм в кристаллическом Hb наблюдается резонансное усиление ряда полос, что оказывает существенное влияние на форму спектра [279,283]. В этой серии экспериментов мы также обнаружили существенные изменения конформации порфиринового макроцикла в случае нековалентного комплекса Hb с глутатионом. Соотношение полос 665 и 745 см^{-1} (рис. 52б) в КР спектре Hb:GSH значительно меньше, чем в контроле ($p < 0.001$) и образцах глутатионилированного гемоглобина – Hb-SSG ($p < 0.0001$). I_{665} соответствует симметричным деформационным колебаниям пиррольных колец, а I_{745} – "дыхательным" колебаниям (симметричным колебаниям растяжения) пиррольных колец [283]. В образцах Hb с нековалентно связанным глутатионом резонансное усиление полосы 665 см^{-1} меньше, чем в контрольной и глутатионилированной группах. Вероятно, это говорит о разрыхлении кристаллической упаковки белка при образовании комплекса, так как резонансное усиление характерно только для плотной упаковки молекул в кристаллическом образце [279,283].

Кроме того, отличия наблюдаются в соотношении полос 975 и 998 см^{-1} (рис. 52в). Обе эти полосы имеют резонансное усиление при возбуждении кристаллического гемоглобина светом длиной волны 633 нм [279,283]. Полоса 975 см^{-1} соответствует асимметричным деформационным колебаниям пиррольных колец, а интенсивность полосы 998 см^{-1} соответствует асимметричным колебаниям растяжения бокового радикала (C_βC_1 на рис. 11)

[211,283]. Увеличение I_{975}/I_{998} в комплексе Hb:GSH относительно Hb ($p < 0.0001$) и Hb-SSG ($p < 0.0001$), по-видимому, указывает на структурные изменения в области боковых радикалов гемопорфирина.

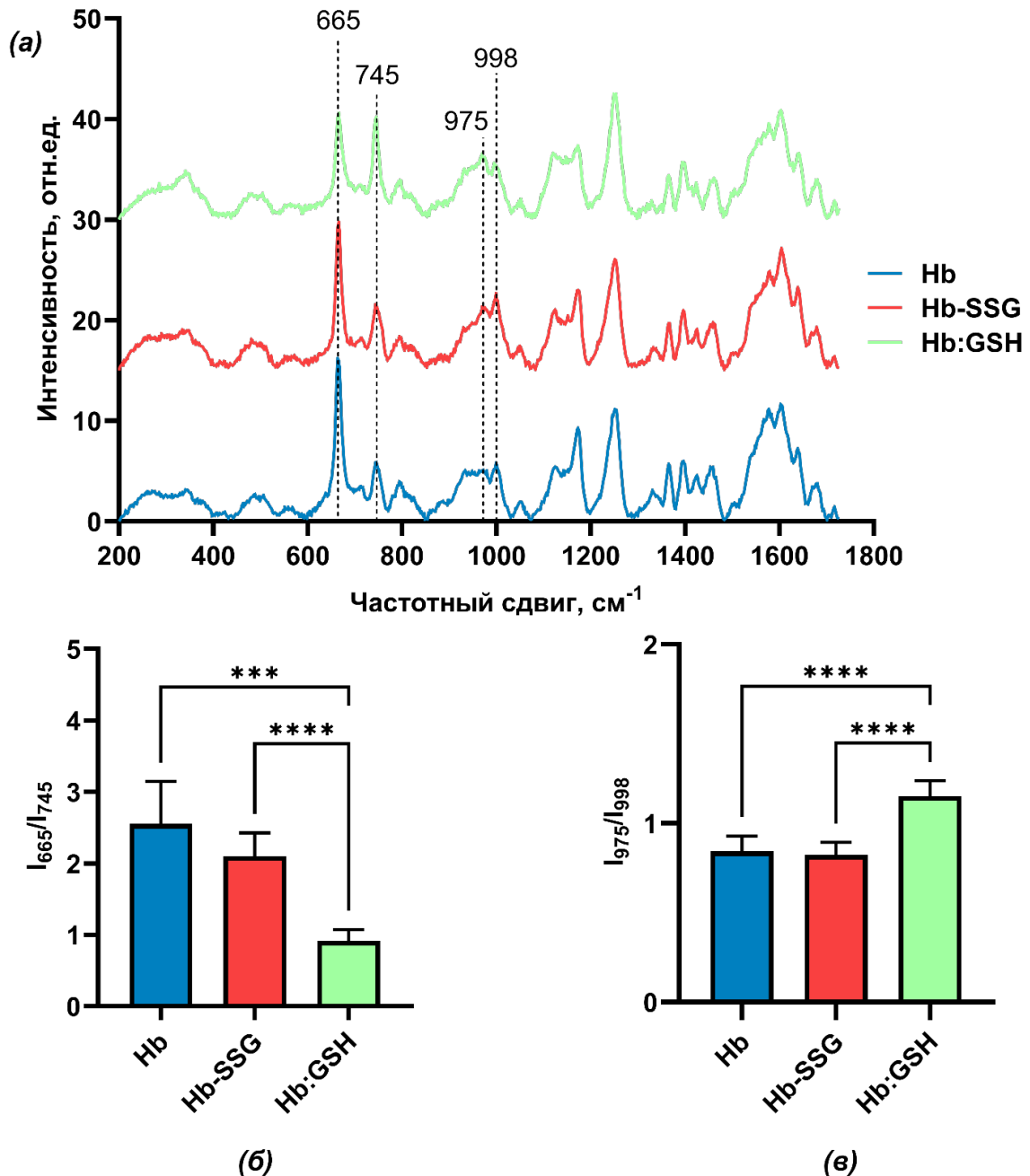


Рис. 52. Анализ изменений характерных полос КР-спектров Hb (синий), глутатионилированного Hb (Hb-SSG, красный) и нековалентного комплекса Hb с GSH (Hb:GSH, зеленый), полученных при возбуждении лазером 633 нм. (a) усредненные спектры КР. Для наглядности спектры Hb-SSG и Hb: GSH подняты на 15 и 30 отн. ед. соответственно. Соотношения интенсивностей полос

(б) 665/745 cm^{-1} и (в) 975/998 cm^{-1} спектров КР. Данные представлены как среднее \pm SD, n = 8. *** $p < 0.001$.

Этот результат хорошо согласуется с нашими данными, полученными при помощи лазера 532 нм (рис. 51), и дополняет общую картину изменения конформации гема при образовании нековалентного комплекса. Таким образом, анализ КР спектров очищенного Нб, глутатионилированной формы белка и нековалентного комплекса Нб с GSH указывает на значительные изменения гемового окружения и конформации гемопорфирина при образовании комплекса с GSH.

6.3. Влияние глутатионилирования и образования комплекса с глутатионом на инфракрасный спектр гемоглобина

Для оценки изменений вторичной структуры глобина мы регистрировали ИК спектры очищенного Нб, глутатионилированного Нб и Нб в комплексе с восстановленным глутатионом (рис. 53). На участке 1000-3500 cm^{-1} представлены полосы ИК спектра, характеризующие групповые колебания пептидных (амидных) связей в молекуле белка (группы частот амид I, II, III, A, B), а также группа полос (2874 cm^{-1} – 2961 cm^{-1}), соответствующая колебаниям связей боковых метильных групп (CH_3) аминокислот [284,285]. Амидные полосы характеризуют пять внутривибрационных (растяжение $\text{C}=\text{O}$, растяжение $\text{C}-\text{N}$, растяжение $\text{N}-\text{H}$, изгибания $\text{O}=\text{C}-\text{N}$ и $\text{C}-\text{N}-\text{H}$) и три внеплоскостных (кручение $\text{C}-\text{N}$, изгибания $\text{C}=\text{O}$ и $\text{N}-\text{H}$) типа колебаний [286,287]. Поскольку перечисленные группы частот чувствительны к изменениям вторичной структуры, их характеристика лежит в основе анализа белковых ИК спектров.

Группа частот (область) амид I наиболее выраженная из характеризующих пептидные связи полос. Обычно для белковой молекулы форма амид I определяется суперпозицией полос всех входящих в состав белка элементов вторичной структуры [277,287]. Известно, что положение максимума амид I зависит от преобладающей вторичной структуры [288]. Основной вклад (80%) в амплитуду амид I вносят колебания растяжения $\text{C}=\text{O}$ связей. В значительном

меньшей степени (по 10%) выражены колебания растяжения C-N и колебания изгиба N-H [285,289]. Амид II соответствует только групповым деформационным колебаниям (изгибания) N-H (60%) и валентным колебаниям (растяжения) C-N (40%) [289]. Меньшая по интенсивности область амид III (рис. 53) наиболее комплексная. Как и амид II, область амид III обусловлена главным образом деформационными колебаниями N-H и валентными колебаниями C-N [285,288], но вклад в ее структуру вносят также внеплоскостные деформационные колебания C=O и колебания растяжения C-C боковых групп АК [290]. Амид III редко используется для определения вторичной структуры, отчасти, из-за вклада боковых цепей АК [290], отчасти, из-за своей малой интенсивности на фоне значительных помех от вклада буферных молекул в этой спектральной области [291]. Поэтому результаты анализа амид III мы трактовали в свете других, более достоверных показателей (амид I, II, A, B).

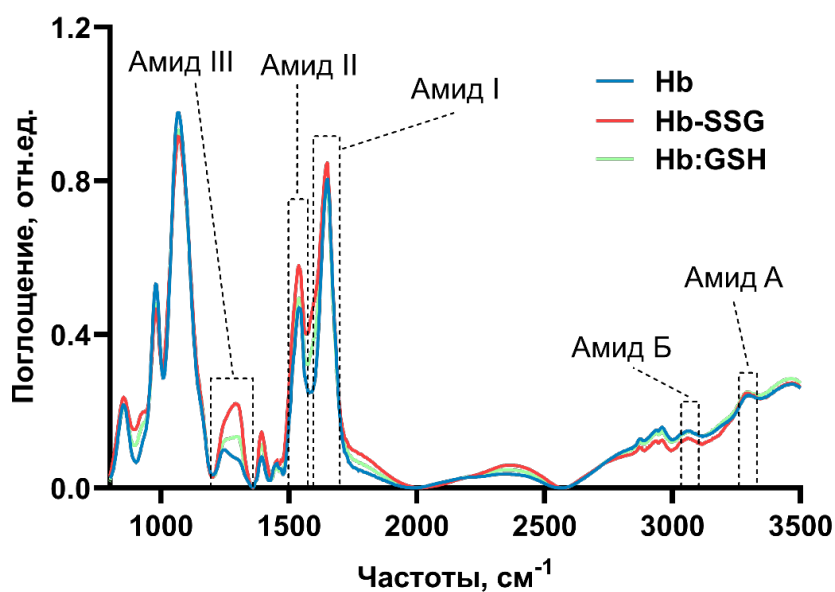


Рис. 53. Усредненные ИК спектры гемоглобина – Hb (синий), глутатионилированного гемоглобина – Hb-SSG (красный) и нековалентного комплекса гемоглобина с глутатионом – Hb:GSH (зеленый).

Hb – глобулярный белок, и в его вторичной структуре преобладают α -спирали. Положение амид I с максимумом в полосе 1650 см^{-1} (рис. 54a) характерно для α -спиральной структуры [277,288]. Уменьшение относительной амплитуды амид I по сравнению с амплитудой амид II, которая в значительно

меньшей степени зависит от вторичной структуры белка, может свидетельствовать об уменьшении относительного содержания α -спиралей за счет увеличения доли других типов вторичной структуры (β -слоев, неупорядоченной структуры).

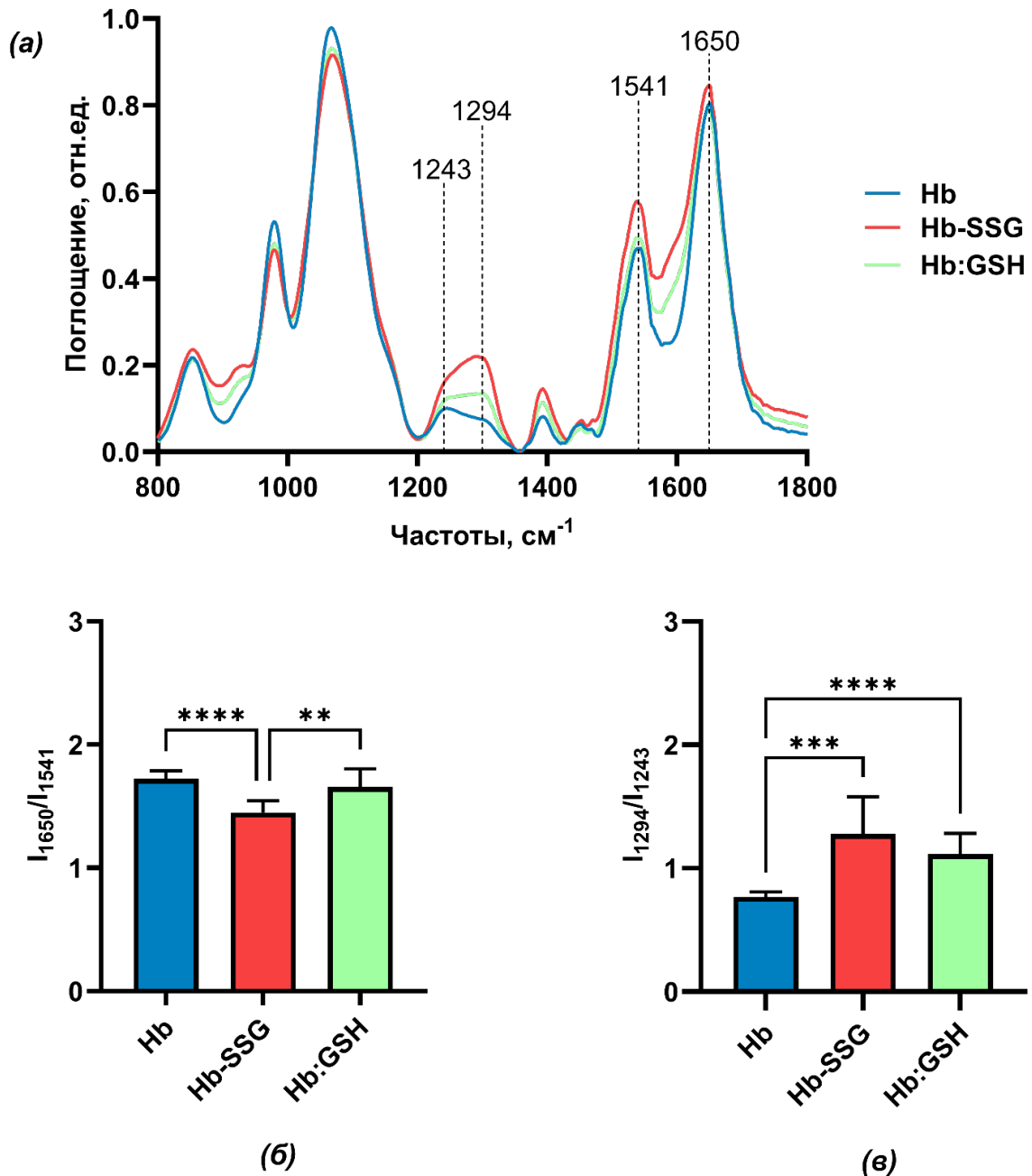


Рис. 54. Анализ ИК спектров Hb (синий), глутатионилированного Hb (Hb-SSG, красный) и нековалентного комплекса Hb с GSH (Hb:GSH, зеленый). (a) участок 800-1800 cm^{-1} усредненных ИК спектров. Соотношения интенсивностей полос (б) 1650/1541 cm^{-1} и (в) 1294/1243 cm^{-1} ИК спектров. Данные представлены как среднее \pm SD, $n = 12$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Отношение максимумов амид II/амид I использовали в недавней работе [292] для оценки доли β -структур в составе белка. В данной работе мы выбрали отношение максимумов амид I/амид II (I_{1650}/I_{1541}) как показатель доли α -спиралей в молекуле Hb. При глутатионилировании (Hb-SSG) отношение I_{1650}/I_{1541} снижается (рис. 54б) относительно контрольного Hb ($p < 0.0001$) и нековалентного комплекса Hb:GSH ($p < 0.01$), что указывает на уменьшение доли α -спиралей в молекуле Hb при глутатионилировании.

В области амид III видно явное смещение максимума с 1243 см^{-1} в контроле (Hb) к 1294 см^{-1} в образцах Hb-SSG и Hb:GSH (рис. 54а). Соответственно, значительно возрастает и отношение I_{1294}/I_{1243} (рис. 54в) в спектрах Hb-SSG ($p < 0.0001$) и комплекса Hb:GSH ($p < 0.001$). Такое смещение говорит об изменении соотношения вторичных структур в молекуле после глутатионилирования и образования нековалентного комплекса [293]. Хорошо известно, что разные диапазоны частот внутри амид III соответствуют различным типам вторичной структуры белка [293–296]. Мы наблюдаем заметное увеличение интенсивности на участке от 1243 см^{-1} до 1300 см^{-1} с максимумом в полосе 1294 см^{-1} , что ближе всего к диапазонам, характерным для β -структур и неупорядоченной структуры [293,294]. Увеличение интенсивности может указывать на рост содержания этих структур при глутатионилировании Hb и образовании комплекса с GSH.

Группы частот амид А и амид Б (рис. 55а) расположены в дальней области спектра ($3000 - 3300 \text{ см}^{-1}$). Амид А и амид Б значительно меньше изучены, чем полосы амид I, II и III, поскольку в растворах в этой области спектра поглощает H_2O . Зарегистрировать поглощение на этих частотах можно только при работе с высушенными образцами [289]. Тем не менее, участки амид А и Б интересны своей эксклюзивностью – они характеризуют только одну функциональную группу. Амид А обычно описывают как групповые валентные колебания N-H. Представляя собой колебания растяжения N-H, поглощение в области амид А очень чувствительно к образованию водородных связей и к полярности растворителя [289,290]. Полоса амид А – первый компонент дублета резонанса

Ферми [290], возникающего в протеиновых структурах, поскольку частота валентных колебаний N-H близка к удвоенной частоте амида II [297]. Второй компонент – амид Б – в литературе связывают как с деформационными колебаниями N-H [285], так и с колебаниями растяжения N-H [290]. Последняя версия имеет убедительную экспериментальную поддержку [298]. Предполагается, что в отличие от участка амид А, интенсивность которого определяется растяжением "свободных" N-H групп [289], основной вклад в группу частот амид Б дают колебания N-H с атомом Н в составе внутримолекулярных водородных связей [298]. Поскольку α -спирали и β -структуры содержат значительно больше внутримолекулярных водородных связей, чем неупорядоченная структура [299], соотношение амид А/амид Б косвенно характеризует представленность вторичных структур в молекуле белка.

В спектре Hb-SSG мы обнаружили увеличение отношения I_{3301}/I_{3061} – максимумов амид А к амид Б (рис. 55б) – по сравнению со спектрами Hb ($p < 0.01$) и Hb:GSH ($p < 0.05$). Это происходит из-за снижения амплитуды амид Б (I_{3061}) при глутатионилировании. То есть, в молекулах Hb-SSG уменьшается количество внутримолекулярных водородных связей. Мы полагаем, что глутатионилирование Hb способствует увеличению доли неупорядоченной структуры. Этот результат хорошо согласуется с данными, полученными в нашей лаборатории с использованием метода кругового дихроизма [300].

Помимо прочего, при глутатионилировании (Hb-SSG) мы регистрируем снижение I_{2960}/I_{2871} на 9% (рис. 55в) относительно контрольного Hb ($p < 0.05$) и нековалентного комплекса с глутатионом (Hb:GSH) ($p < 0.05$). I_{2960}/I_{2871} характеризует отношение ассиметричных колебаний растяжения к симметричным колебаниям растяжения C-H связей CH_3 групп [285]. Снижение этого соотношения ранее обнаружили в ИК спектре эритроцитов у больных СД II типа [301]. Такие эритроциты имеют повышенное (более 9%) содержание гликированного гемоглобина (HbA1c) [302]. Для HbA1c показано снижение доли α -спиралей и рост представленности β -структур относительно контрольного Hb

[285,301]. Таким образом, анализ ИК спектров очищенного Hb, глутатионилированной формы белка и нековалентного комплекса Hb с GSH указывает на значительные изменения во вторичной структуре при глутатионилировании.

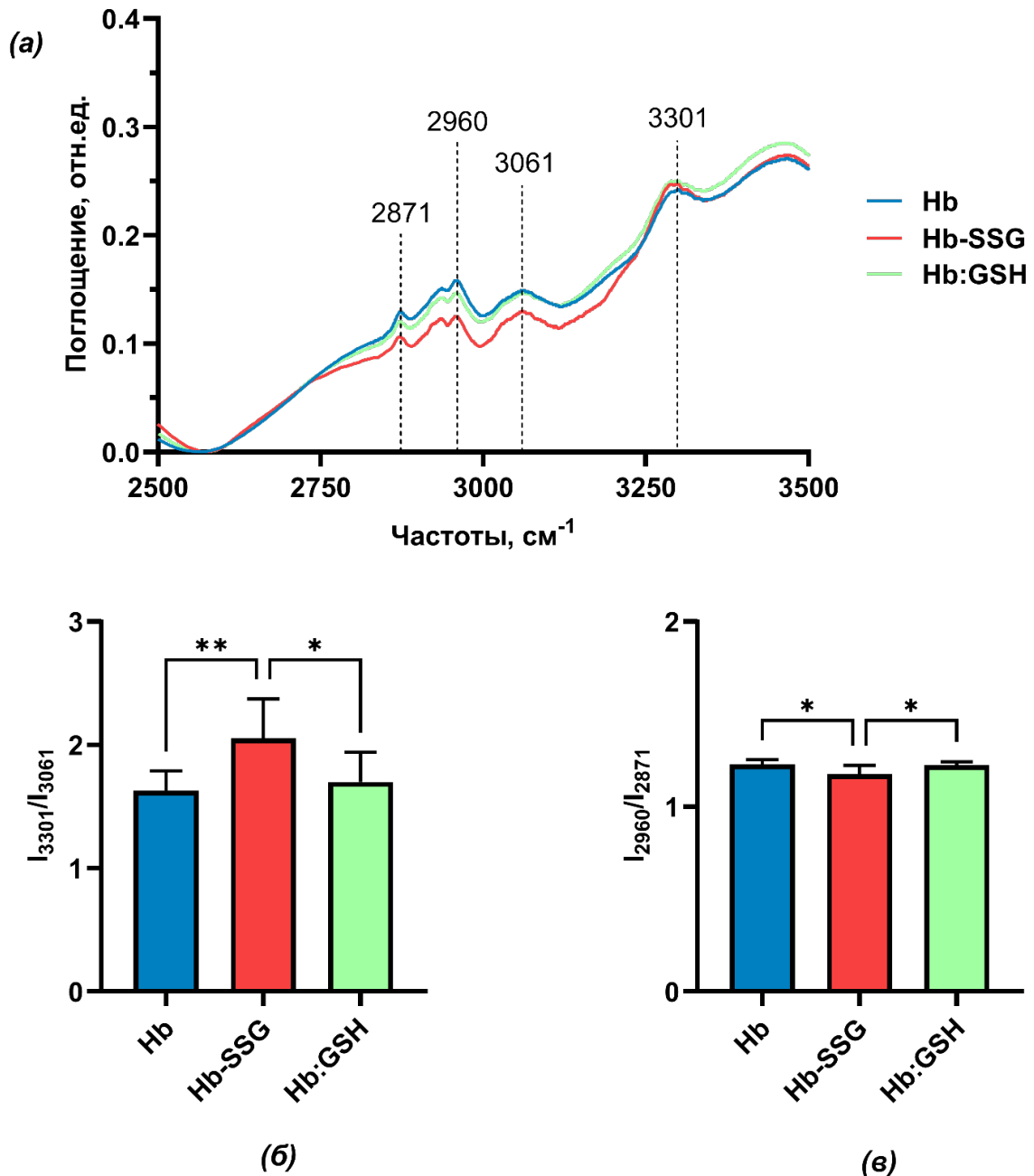


Рис. 55. Анализ ИК спектров Hb (синий), глутатионилированного Hb (Hb-SSG, красный) и нековалентного комплекса Hb с GSH (Hb:GSH, зеленый). (a) участок 2500-3500 cm^{-1} усредненных ИК спектров. Соотношения интенсивностей полос (б) 3301/3061 cm^{-1} и (в) 2960/2871 cm^{-1} ИК спектров. Данные представлены как среднее \pm SD, $n = 12$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

6.4. Механизм изменения конформации гемоглобина

Глутатионилирование – ковалентное связывание Hb с окисленным глутатионом – возрастает при окислительном стрессе [137], депривации по глюкозе, при механическом и кратком осмотическом воздействиях. Показано увеличение степени глутатионилирования Hb при целом ряде патологий [137] и курении [157]. В норме процент глутатионилированных белков в эритроцитах составляет около 4%, а максимальное повышение зарегистрировано при сахарном диабете с микроангиопатией и составляет около 69% [303]. Помимо защитных функций, глутатионилирование приводит к увеличению сродства Hb к O₂ [22,23]. Образование нековалентного комплекса Hb с восстановленным глутатионом может происходить в нормальных условиях. Оно позволяет эритроцитам высвобождать глутатион при гипоксии, повышая антиоксидантные способности клеток [6]. Образование нековалентного комплекса также повышает сродство Hb к O₂, но это повышение гораздо менее выражено, чем при глутатионилировании белка [6]. Увеличение сродства Hb к O₂ может быть обусловлено изменением конформации и положения гема или гемового окружения, так как именно железо (Fe²⁺) в составе гема осуществляет непосредственное координирование O₂ при связывании [141,146]. Отметим, что Hb в наших образцах находился в оксигенированном состоянии и соотношение форм гемоглобина (oxyHb, deoxyHb, metHb) не менялось во время проведения экспериментов. Это подтверждает анализ спектров поглощения в длинноволновой области в диапазоне 500-700 нм (рис. 48) – сопоставление характерных для разных форм гемоглобина пиков [304]. Соответственно, обнаруженные нами эффекты не были вызваны изменением соотношения различных форм гемоглобина.

Данные КР свидетельствуют о значительном преобразовании конформации порфиринового макроцикла, особенно при образовании нековалентного комплекса. Увеличение подвижности гема показано, как для глутатионилированного Hb, так и для нековалентного комплекса с GSH. В случае последнего мы также обнаружили увеличение интенсивности колебаний в

латеральной области порфиринового цикла и области боковых радикалов гемопорфирина. Эти изменения приводят, в том числе, к снижению способности Hb в комплексе с GSH выделять лиганды.

Особый интерес представляет снижение I_{665} относительно контрольного Hb, которое для нековалентного комплекса мы наблюдаем при возбуждении лазером 633 нм. Высокая интенсивность полосы 665 см^{-1} наблюдается только в эритроцитах [305], содержащих Hb в концентрации близкой к пределу растворимости (5.5 мМ) [141], и в кристаллических образцах [283], но не в растворе Hb. Предполагают, что усиление I_{665} – это результат дальнедействующих экситонных взаимодействий, генерируемых при суперпозиции экситонных переходов при высокой концентрации гемов [279,283]. Необходимо отметить, что в этом смысле кристаллический образец наиболее близок по КР-характеристике к концентрированному клеточному Hb. Снижение плотности упаковки молекул Hb при образовании нековалентного комплекса может происходить в результате конформационного перехода или вследствие частичного нарушения взаимодействия между частями молекулы белка, что ведет к некоторому "разрыхлению" структуры. Эта гипотеза подтверждается данными нашей лаборатории о снижении температуры плавления Hb в комплексе с GSH, что свидетельствует о меньшей термостабильности третичной и четвертичной структур белка [300]. В этой же работе показано увеличение триптофановой флуоресценции при образовании нековалентного комплекса [300]. Согласно результатам молекулярного докинга [6] третий и четвертый сайты нековалентного связывания глутатиона в охуHb включают Trp37 β -субъединиц. β Trp37 находятся на границе раздела между $\alpha\beta$ димерами, поэтому их флуоресценция чувствительна к конформационным изменениями молекулы Hb [306].

Помимо прочего, известно, что замена β Trp37 на Ala или Gly увеличивает сродство к O_2 [307], что указывает на существенную роль остатка β Trp37 в формировании сайта связывания O_2 [308]. Еще больше аффинность к O_2 повышается при замене α Tyr140 на Gly [309] и при удалении остатка β His146

[310]. И тот и другой АК остатки входят в группу, образующую нековалентные сайты связывания глутатиона. α_2 Tyr140 располагается в третьем и четвертом, а His146 обеих β -субъединиц в первом и втором сайтах связывания, которые разрушаются при переходе Hb в деоксигенированное состояние [6]. Показано, что остатки β His146 образуют солевые мостики с β Asp94 в T-конформации Hb [148], внося значительный вклад в эффект Бора [311]. При нековалентном связывании GSH окружение и положение остатков β Trp37, α Tyr140 и β His146 меняется, что может быть причиной перестроек в третичной и четвертичной структуре Hb и конформационных преобразований гемопорфирина, которые мы обнаружили методом КР спектроскопии.

Анализ ИК спектров показал, что при глутатионилировании значительно меняется вторичная структура Hb – снижается содержание α -спиралей и увеличивается доля неупорядоченных структур. Наблюдается также тенденция к повышению содержания β -структур. Эти результаты были подтверждены в нашей лаборатории методом кругового дихроизма в ультрафиолетовой области [300]. В интерпретации полученных результатов важную роль играет то, какой остаток цистеина глутатионируется в охуHb. Напомним, гемоглобин содержит шесть остатков цистеина, по одному в α -субъединицах (Cys104), и по два в β -субъединицах (Cys93, Cys112) [21]. Доказано глутатионилирование по остаткам β Cys93 [312] и β Cys112 [156], а данные о глутатионилировании α Cys104 противоречивы [6,157]. Участок гемоглобина, содержащий β Cys93, исследовали ранее [158] методом водород/дейтериевого обмена. Показано, что S-глутатионилирование приводит к небольшому увеличению гибкости конформации пептида, содержащего β Cys93. Повышенная гибкость глутатионилированного участка может быть обусловлена исчезновением ряда нековалентных взаимодействий на границе $\alpha\beta$ димеров, в том числе солевых мостиков β His146- β Asp94 и водородных связей β His146- α Lys40 [23], что в конечном итоге проявляется в снижении кооперативности белка [158]. Однако в отличие от β Cys112, который всегда доступен для глутатионилирования, остаток β Cys93 доступен растворителю в деоксиформе Hb[6]. Поэтому, мы полагаем, что

в охуНб глутатионируется в основном β Cys112. Это хорошо объясняет отсутствие выраженного влияния глутатионирования на гемовое окружение (для Нб-SSG мы обнаружили лишь увеличение подвижности гема) на фоне значительного изменения вторичной структуры, поскольку β Cys93 находится рядом с гемом, а β Cys112 в α -спирали β -субъединицы вдали от гема [6].

Таким образом, мы показали, что глутатионирование оксиформы Нб меняет вторичную структуру белка, снижая долю α -спиралей, но слабо влияет на гемовое окружение. При образовании нековалентного комплекса Нб с GSH вторичная структура остается практически неизменной, однако значительно деформируется порфириновый цикл. При глутатионировании, несмотря на изменение вторичной структуры, не наблюдается выраженных перестроек третичной и четвертичной структур охуНб. Напротив, образование нековалентного комплекса меняет эти структуры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нам удалось значительно продвинуться в понимании механизмов адаптации эритроцитов к стрессовым воздействиям. Мы охарактеризовали редокс-статус эритроцитов под действием $A\beta_{42}$ и $isoA\beta_{42}$, при гипоксии, метаболическом, осмотическом и механическом стрессе. Оценили изменения морфологии клеток и содержание одновалентных катионов. Обнаружили, что в ответ на недостаток O_2 в эритроцитах повышается уровень свободного GSH, растут внутриклеточные концентрации Ca^{2+} и NO, но не наблюдается роста АФК. Показали, что глутатион способен образовывать нековалентный комплекс с Hb. Доказали, что рост уровня GSH при гипоксии не связан с деглутатионированием, а обусловлен диссоциацией молекул GSH из нековалентного комплекса с Hb. Описали термодинамические параметры образования, обнаруженного нековалентного комплекса GSH с оксигенированной и деоксигенированной формами Hb. Таким образом, обнаружено, что Hb выполняет роль своеобразного глутатионового буфера, обеспечивающего изменение уровня свободного глутатиона в клетке в зависимости от содержания O_2 . Мы предположили, что этот же механизм может быть вовлечен в адаптацию эритроцитов к гипоосмотическому и механическому стрессам. Нам удалось подробно охарактеризовать реакцию эритроцитов на эти близкие друг другу воздействия. При кратком гипоосмотическом и механическом стрессах в эритроцитах одновременно с запуском глутатионирования увеличивается содержание свободного GSH. Рост GSH, предположительно, обусловлен деформацией мембраны, вызывающей, согласно данным литературы, изменение конформации Hb. Окислительный стресс в эритроцитах развивается, как при механическом воздействии, так и при кратком центрифугировании. В условиях метаболического стресса, инициированного депривацией по глюкозе, в эритроцитах окислительный стресс не развивается, однако степень глутатионирования Hb возрастает вследствие недостатка АТФ и NADPH, что приводит к ингибированию синтеза GSH и снижению

восстановления GSSG. Бета-амилоиды $A\beta_{42}$ и $isoA\beta_{42}$, связываются с мембранными белками эритроцитов, вызывая изменение редокс-статуса в клетках. $A\beta_{42}$ и $isoA\beta_{42}$ ингибируют NADPH оксидазы, что приводит к снижению уровня АФК и увеличению содержания GSH. В ответ на действие $A\beta_{42}$ снижается степень глутатионилирования Hb, что, вероятно, является ключевой причиной падения оксигенации крови у пациентов с БА. Действие $isoA\beta_{42}$ нарушает синтез NO в эритроцитах.

Мы подробно охарактеризовали свойства глутатионилированного Hb и Hb в комплексе с GSH. Глутатионилирование значительно меняет вторичную структуру Hb – снижается содержание α -спиралей и увеличивается доля неупорядоченной структуры. При этом повышается подвижность гема. Образование нековалентного комплекса приводит к изменению гемового окружения белка, разрыхлению молекулы Hb и снижению способности белка в комплексе с GSH выделять лиганды. Высвобождение GSH из нековалентного комплекса при деоксигенации способствует защите эритроцитов от окислительного стресса при прохождении через ткани в условиях гипоксии. Доля глутатионилированного Hb возрастает при целом ряде патологий, сопровождающихся окислительным стрессом.

Суммируя полученные результаты, отметим, что каждое исследованное стрессовое воздействие приводит к изменению редокс-статуса клеток. Система адаптации эритроцитов строится вокруг этих изменений и особую роль в ней имеют ковалентное и нековалентное взаимодействия Hb с глутатионом. Эти взаимодействия обеспечивают антиоксидантную защиту в случае развития окислительного стресса и модулирует функциональную активность эритроцита. 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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарю моих научных руководителей Ирину Юрьевну Петрушанко – за полученные знания, уделенное время, внимание, наставления и помощь при написании диссертационной работы; и Георгия Владимировича Максимова – за огромное терпение, ценные советы и переданный опыт.

Искренне благодарю Полину Александровну Петрову, Евгению Юрьевну Паршину, Ольгу Вадимовну Слатинскую, Ярослава Владимировича Ткачева, Елизавету Витальевну Мельникову, Юлию Дмитриевну Кулешову и Федорова Дмитрия Андреевича за помощь в освоении новых методов, проведении экспериментов и обработке полученных результатов. Благодарю Юрия Михайловича Полуэктова и Анастасию Андреевну Анашкину за предоставленные данные *in silico* моделирования и молекулярного докинга.

Особо благодарю Светлану Вадимовну Сидоренко.

Выражаю искреннюю признательность Ольге Дмитриевне Лопиной и Елизавете Андреевне Климановой за обсуждение полученных результатов, неоценимое участие и оказанную поддержку.

Огромное спасибо коллективу лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН и сотрудникам биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Отдельно хочу поблагодарить за все мою супругу и мою семью.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gardner W. M. и др. Prevalence, years lived with disability, and trends in anaemia burden by severity and cause, 1990–2021: findings from the Global Burden of Disease Study 2021 // *Lancet Haematol.* 2023. Т. 10, № 9. С. e713–e734.
2. Franco R. S. Measurement of Red Cell Lifespan and Aging // *Transfus. Med. Hemotherapy.* 2012. Т. 39, № 5. С. 302–307.
3. 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.
4. Moura P. L. и др. Non-muscle myosin II drives vesicle loss during human reticulocyte maturation // *Haematologica.* 2018. Т. 103, № 12. С. 1997–2007.
5. Ovchynnikova E. и др. The Shape Shifting Story of Reticulocyte Maturation // *Front. Physiol.* 2018. Т. 9. С. 829.
6. Fenk S. и др. Hemoglobin is an oxygen-dependent glutathione buffer adapting the intracellular reduced glutathione levels to oxygen availability // *Redox Biol.* 2022. Т. 58. С. 102535.
7. Dosek A. и др. High altitude and oxidative stress // *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2007. Т. 158, № 2–3. С. 128–131.
8. Tang H. и др. Inability to Maintain GSH Pool in G6PD-Deficient Red Cells Causes Futile AMPK Activation and Irreversible Metabolic Disturbance // *Antioxid. Redox Signal.* 2015. Т. 22, № 9. С. 744–759.
9. 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.
10. Parker J. C. Hemolytic action of potassium salts on dog red blood cells // *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 1983. Т. 244, № 5. С. C313–C317.
11. 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.
12. Ulker P. и др. Shear stress activation of nitric oxide synthase and increased nitric oxide levels in human red blood cells // *Nitric Oxide.* 2011. Т. 24, № 4. С. 184–191.
13. Moreau A. и др. Physical mechanisms of red blood cell splenic filtration. 2023. Т. 120, № 44.
14. Kameneva M. V. и др. Decrease in Red Blood Cell Deformability Caused by Hypothermia, Hemodilution, and Mechanical Stress. *ASAIO Journal* // *ASAIO Journal.* 1999. Т. 45, № 4. С. 307–310.
15. Bu X.-L. и др. Blood-derived amyloid- β protein induces Alzheimer's disease pathologies // *Mol. Psychiatry.* 2018. Т. 23, № 9. С. 1948–1956.
16. Kiko T. и др. Amyloid β Levels in Human Red Blood Cells // *PLOS ONE.* Public Library of Science, 2012. Т. 7, № 11. С. e49620.
17. 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.

18. Tsantes A. E. и др. Redox Imbalance, Macrocytosis, and RBC Homeostasis // *Antioxid. Redox Signal.* 2006. Т. 8, № 7–8. С. 1205–1216.
19. 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.
20. 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.
21. Colombo G. и др. Cellular redox potential and hemoglobin S-glutathionylation in human and rat erythrocytes: A comparative study // *Blood Cells. Mol. Dis.* 2010. Т. 44, № 3. С. 133–139.
22. Garel M.-C. и др. Covalent Binding of Glutathione to Hemoglobin. I. Inhibition of Hemoglobin S Polymerization // *The Journal Of Biological Chemistry.* 1986. Т. 261, № 31. С. 14704–14709.
23. 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.
24. Nemkov T. и др. Red blood cells as an organ? How deep omics characterization of the most abundant cell in the human body highlights other systemic metabolic functions beyond oxygen transport // *Expert Rev. Proteomics.* Informa UK Limited, 2018. Т. 15, № 11. С. 855–864.
25. Bogdanova A., Kaestner L. Early Career Scientists' Guide to the Red Blood Cell – Don't Panic! // *Front. Physiol.* 2020. Т. 11. С. 588.
26. Klinken P. S. Red blood cells // *IJBCB.* 2002. Т. 34. С. 1513–1518.
27. Palis J. Primitive and definitive erythropoiesis in mammals // *Front. Physiol.* 2014. Т. 5.
28. Moras M., Lefevre S. D., Ostuni M. A. From Erythroblasts to Mature Red Blood Cells: Organelle Clearance in Mammals // *Front. Physiol.* 2017. Т. 8. С. 1076.
29. Chasis J. A., Mohandas N. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis // *Blood.* 2008. Т. 112, № 3. С. 470–478.
30. Waugh R. Reticulocyte rigidity and passage through endothelial-like pores // *Blood.* 1991. Т. 78, № 11. С. 3037–3042.
31. Yoshida H. и др. Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells // *Nature.* 2005. Т. 437, № 7059. С. 754–758.
32. Fermo E. и др. 'Gardos Channelopathy': a variant of hereditary Stomatocytosis with complex molecular regulation // *Sci. Rep.* 2017. Т. 7, № 1. С. 1744.
33. Mohandas N., Gallagher P. G. Red cell membrane: past, present, and future // *Blood.* 2008. Т. 112, № 10. С. 3939–3948.
34. 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.
35. Minetti G. и др. Membrane Rearrangements in the Maturation of Circulating Human Reticulocytes // *Front. Physiol.* 2020. Т. 11. С. 215.

36. Huisjes R. и др. Squeezing for Life – Properties of Red Blood Cell Deformability // *Front. Physiol.* 2018. Т. 9. С. 656.
37. McLaren C. E., Brittenham G. M., Hasselblad V. Statistical and graphical evaluation of erythrocyte volume distributions // *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 1987. Т. 252, № 4. С. H857–H866.
38. Ciana A., Achilli C., Minetti G. Spectrin and Other Membrane-Skeletal Components in Human Red Blood Cells of Different Age // *Cell. Physiol. Biochem.* 2017. Т. 42, № 3. С. 1139–1152.
39. Van Cromvoirt A. M. и др. Donor Age and Red Cell Age Contribute to the Variance in Lorrca Indices in Healthy Donors for Next Generation Ektacytometry: A Pilot Study // *Front. Physiol.* 2021. Т. 12. С. 639722.
40. Lang F. и др. Oxidative Stress and Suicidal Erythrocyte Death // *Antioxid. Redox Signal.* 2014. Т. 21, № 1. С. 138–153.
41. Lutz H. U., Bogdanova A. Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans // *Front. Physiol.* 2013. Т. 4.
42. Kaestner L. и др. Prostaglandin E2 activates channel-mediated calcium entry in human erythrocytes: an indication for a blood clot formation supporting process // *Thromb. Haemost.* 2004. Т. 92, № 12. С. 1269–1272.
43. Kaestner L., Minetti G. The potential of erythrocytes as cellular aging models // *Cell Death Differ.* 2017. Т. 24, № 9. С. 1475–1477.
44. Kaestner L., Bogdanova A., Egee S. Calcium Channels and Calcium-Regulated Channels in Human Red Blood Cells // *Calcium Signaling* / под ред. Islam Md. S. Cham: Springer International Publishing, 2020. Т. 1131. С. 625–648.
45. Liu S. C., Derick L. H., Palek J. Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton. // *J. Cell Biol.* 1987. Т. 104, № 3. С. 527–536.
46. Chasis J. A., Mohandas N. Erythrocyte membrane deformability and stability: two distinct membrane properties that are independently regulated by skeletal protein associations. // *J. Cell Biol.* 1986. Т. 103, № 2. С. 343–350.
47. Cokelet G. R., Meiselman H. J. Rheological Comparison of Hemoglobin Solutions and Erythrocyte Suspensions // *Science.* 1968. Т. 162, № 3850. С. 275–277.
48. Safeukui I. и др. Quantitative assessment of sensing and sequestration of spherocytic erythrocytes by the human spleen // *Blood.* 2012. Т. 120, № 2. С. 424–430.
49. Stefanovic M. и др. Oxygen regulates the band 3–ankyrin bridge in the human erythrocyte membrane // *Biochem. J.* 2013. Т. 449, № 1. С. 143–150.
50. Jakobik V., Burus I., Decsi T. Fatty acid composition of erythrocyte membrane lipids in healthy subjects from birth to young adulthood // *Eur. J. Pediatr.* 2009. Т. 168, № 2. С. 141–147.
51. Daleke D. L. Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane: // *Curr. Opin. Hematol.* 2008. Т. 15, № 3. С. 191–195.
52. Devaux P. F. и др. How lipid flippases can modulate membrane structure // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 2008. Т. 1778, № 7–8. С. 1591–1600.
53. Sahu S. K. и др. Phospholipid scramblases: An overview // *Arch. Biochem. Biophys.* 2007. Т. 462, № 1. С. 103–114.

54. Pantaleo A. и др. Current knowledge about the functional roles of phosphorylative changes of membrane proteins in normal and diseased red cells // *J. Proteomics*. 2010. Т. 73, № 3. С. 445–455.
55. Petrushanko I. Yu. и др. S-Glutathionylation of the Na,K-ATPase Catalytic α Subunit Is a Determinant of the Enzyme Redox Sensitivity // *J. Biol. Chem.* 2012. Т. 287, № 38. С. 32195–32205.
56. Strader M. B. и др. Post-translational modification as a response to cellular stress induced by hemoglobin oxidation in sickle cell disease // *Sci. Rep.* 2020. Т. 10, № 1. С. 14218.
57. Bogdanova A. и др. Calcium in Red Blood Cells—A Perilous Balance // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Т. 14, № 5. С. 9848–9872.
58. Pasini E. M. и др. In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells // *Blood*. 2006. Т. 108, № 3. С. 791–801.
59. Van Den Akker E. и др. Band 3 multiprotein complexes in the red cell membrane; of mice and men // *Blood Cells. Mol. Dis.* 2010. Т. 45, № 1. С. 1–8.
60. Fujinaga J., Tang X.-B., Casey J. R. Topology of the Membrane Domain of Human Erythrocyte Anion Exchange Protein, AE1 // *J. Biol. Chem.* 1999. Т. 274, № 10. С. 6626–6633.
61. Sterling D., Reithmeier R. A. F., Casey J. R. A Transport Metabolon // *J. Biol. Chem.* 2001. Т. 276, № 51. С. 47886–47894.
62. Jennings M. L. Cell Physiology and Molecular Mechanism of Anion Transport by Erythrocyte Band 3/AE1 // *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 2021. С. ajpcell.00275.2021.
63. Zhang D. и др. Crystallographic structure and functional interpretation of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3 // *Blood*. 2000. Т. 96, № 9. С. 2925–2933.
64. Chu H., Low P. S. Mapping of glycolytic enzyme-binding sites on human erythrocyte band 3 // *Biochem. J.* 2006. Т. 400, № 1. С. 143–151.
65. Bruce L. J. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane // *Blood*. 2003. Т. 101, № 10. С. 4180–4188.
66. Williamson R. C., Toyе A. M. Glycophorin A: Band 3 aid // *Blood Cells. Mol. Dis.* 2008. Т. 41, № 1. С. 35–43.
67. Rybicki A. C., Musto S., Schwartz R. S. Identification of a band-3 binding site near the N-terminus of erythrocyte membrane protein 4.2 // *Biochem. J.* 1995. Т. 309, № 2. С. 677–681.
68. Kim S. и др. Determination of Structural Models of the Complex between the Cytoplasmic Domain of Erythrocyte Band 3 and Ankyrin-R Repeats 13–24 // *J. Biol. Chem.* 2011. Т. 286, № 23. С. 20746–20757.
69. An X. и др. Identification and Functional Characterization of Protein 4.1R and Actin-Binding Sites in Erythrocyte β Spectrin: Regulation of the Interactions by Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate // *Biochemistry*. 2005. Т. 44, № 31. С. 10681–10688.
70. Ugurel E. и др. From Experiments to Simulation: Shear-Induced Responses of Red Blood Cells to Different Oxygen Saturation Levels // *Front. Physiol.* 2020. Т. 10. С. 1559.

71. Salomao M. и др. Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: New insights into the structural organization of the red blood cell membrane // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008. Т. 105, № 23. С. 8026–8031.
72. Kuhlman P. A. и др. A New Function for Adducin // *J. Biol. Chem.* 1996. Т. 271, № 14. С. 7986–7991.
73. Chu H. и др. Reversible binding of hemoglobin to band 3 constitutes the molecular switch that mediates O₂ regulation of erythrocyte properties // *Blood.* 2016. Т. 128, № 23. С. 2708–2716.
74. Slatinskaya O. V. и др. The Role of Extracellular Ca²⁺ in Regulating the Distribution and Conformation of Hemoglobin in Erythrocytes // *Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology.* 2021. Т. 15, № 3. С. 230–238.
75. Grygorczyk R., Orlov S. N. Effects of Hypoxia on Erythrocyte Membrane Properties—Implications for Intravascular Hemolysis and Purinergic Control of Blood Flow // *Front. Physiol.* 2017. Т. 8. С. 1110.
76. Chang S. H., Low P. S. Regulation of the Glycophorin C-Protein 4.1 Membrane-to-Skeleton Bridge and Evaluation of Its Contribution to Erythrocyte Membrane Stability // *J. Biol. Chem.* 2001. Т. 276, № 25. С. 22223–22230.
77. Arashiki N. и др. Membrane Peroxidation and Methemoglobin Formation Are Both Necessary for Band 3 Clustering: Mechanistic Insights into Human Erythrocyte Senescence // *Biochemistry.* 2013. Т. 52, № 34. С. 5760–5769.
78. Welbourn E. M. и др. The mechanism of formation, structure and physiological relevance of covalent hemoglobin attachment to the erythrocyte membrane // *Free Radic. Biol. Med.* 2017. Т. 103. С. 95–106.
79. Barshtein G. и др. Hemoglobin Binding to the Red Blood Cell (RBC) Membrane Is Associated with Decreased Cell Deformability // *Int. J. Mol. Sci. MDPI AG,* 2024. Т. 25, № 11. С. 5814.
80. Mauritz J. M. A. и др. X-Ray Microanalysis Investigation of the Changes in Na, K, and Hemoglobin Concentration in Plasmodium falciparum-Infected Red Blood Cells // *Biophys. J.* 2011. Т. 100, № 6. С. 1438–1445.
81. Tiffert T., Lew V. L. Cytoplasmic calcium buffers in intact human red cells. // *J. Physiol.* 1997. Т. 500, № 1. С. 139–154.
82. Orlov S. N. Membrane theory of the pathogenesis of arterial hypertension: What do we know about this, half a century later? // *Bull. Sib. Med.* 2019. Т. 18, № 2. С. 234–247.
83. Brugnara C. Erythrocyte membrane transport physiology // *Curr Opin Hematol.* 1997. Т. 2. С. 122–127.
84. Crisp R. L. и др. Red blood cell aquaporin-1 expression is decreased in hereditary spherocytosis // *Ann. Hematol.* 2016. Т. 95, № 10. С. 1595–1601.
85. Guizouarn H., Allegrini B. Erythroid glucose transport in health and disease // *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 2020. Т. 472, № 9. С. 1371–1383.
86. Skou J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves // *Biochimica et Biophysica Acta.* 1957. Т. 23. С. 394–401.
87. Orlov S. N. и др. Na,K-ATPase as a target for endogenous cardiotonic steroids: What's the evidence? // *Genes Dis.* 2020. С. S2352304220300167.

88. Mironova G. D. и др. Ion-transporting properties and ATPase activity of (Na⁺ + K⁺)-ATPase large subunit incorporated into bilayer lipid membranes // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1986. Т. 861. С. 224–236.
89. Skou J. C., Esmann M. The Na,K-ATPase // *J Bioenerg Biomembr.* 1992. Т. 24, № 3. С. 249–261.
90. Balzan S. и др. Erythrocyte sodium pump stimulation by ouabain and an endogenous ouabain-like factor // *Cell Biochem. Funct.* 2007. Т. 25, № 3. С. 297–303.
91. Radosinska J., Vrbjar N. Erythrocyte Deformability and Na,K-ATPase Activity in Various Pathophysiological Situations and Their Protection by Selected Nutritional Antioxidants in Humans // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Т. 22, № 21. С. 11924.
92. Canessa M. и др. Increased Sodium-Lithium Countertransport in Red Cells of Patients with Essential Hypertension // *N Engl J Med.* 1980. Т. 302, № 14. С. 772–776.
93. Elmariah S., Gunn R. B. Kinetic evidence that the Na-PO₄ cotransporter is the molecular mechanism for Na/Li exchange in human red blood cells // *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 2003. Т. 285, № 2. С. C446–C456.
94. Wooden J. M. и др. Comparative proteomics reveals deficiency of SLC9A1 (sodium/hydrogen exchanger NHE1) in β-adducin null red cells // *Br. J. Haematol.* 2011. Т. 154, № 4. С. 492–501.
95. Orlov S. N., Hamet P. Intracellular Monovalent Ions as Second Messengers // *J. Membr. Biol.* 2006. Т. 210, № 3. С. 161–172.
96. 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.
97. Gárdos G. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes // *Biochim. Biophys. Acta.* 1958. Т. 30, № 3. С. 653–654.
98. Cahalan S. M. и др. Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume // *eLife.* 2015. Т. 4. С. e07370.
99. Andrews D. A., Yang L., Low P. S. Phorbol ester stimulates a protein kinase C-mediated agatoxin-TK-sensitive calcium permeability pathway in human red blood cells // *Blood.* 2002. Т. 100, № 9. С. 3392–3399.
100. Bouyer G. и др. Erythrocyte peripheral type benzodiazepine receptor/voltage-dependent anion channels are upregulated by *Plasmodium falciparum* // *Blood.* 2011. Т. 118, № 8. С. 2305–2312.
101. Makhro A., Kaestner L., Bogdanova A. NMDA Receptor Activity in Circulating Red Blood Cells: Methods of Detection // *NMDA Receptors* / под ред. Burnashev N., Szepetowski P. New York, NY: Springer New York, 2017. Т. 1677. С. 265–282.
102. Makhro A. и др. Comparing the impact of an acute exercise bout on plasma amino acid composition, intraerythrocytic Ca²⁺ handling, and red cell function in athletes and untrained subjects // *Cell Calcium.* 2016. Т. 60, № 4. С. 235–244.

103. Strehler E. E. и др. Plasma Membrane Ca²⁺ ATPases as Dynamic Regulators of Cellular Calcium Handling // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007. Т. 1099, № 1. С. 226–236.
104. Hertz L. и др. Is Increased Intracellular Calcium in Red Blood Cells a Common Component in the Molecular Mechanism Causing Anemia? // *Front. Physiol.* 2017. Т. 8. С. 673.
105. Pierce K. и др. A Ca²⁺ influx in response to hypo-osmotic stress may alter osmolyte permeability by a phenothiazine-sensitive mechanism // *CELL CALCIUM.* 1988. Т. 9. С. 129–140.
106. Rapetti-Mauss R. и др. Red blood cell Gardos channel (KCNN4): the essential determinant of erythrocyte dehydration in hereditary xerocytosis // *Haematologica.* 2017. Т. 102, № 10. С. e415–e418.
107. Pierce S. K. и др. Evidence of calmodulin involvement in cell volume recovery following hypo-osmotic stress // *Cell Calcium.* 1989. Т. 10, № 3. С. 159–169.
108. Nunomura W. Regulation of Protein 4.1R Interactions with Membrane Proteins by Ca²⁺ and Calmodulin // *Front. Biosci.* 2006. Т. 11, № 1. С. 1522.
109. Kleinbongard P. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase // *Blood.* 2006. Т. 107, № 7. С. 2943–2951.
110. 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.
111. Bedard K., Krause K.-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology // *Physiol. Rev.* 2007. Т. 87, № 1. С. 245–313.
112. George A. и др. Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease // *Blood.* 2013. Т. 121, № 11. С. 2099–2107.
113. Chu H. и др. Identification of cytoskeletal elements enclosing the ATP pools that fuel human red blood cell membrane cation pumps // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012. Т. 109, № 31. С. 12794–12799.
114. Romero P. J., Romero E. A. The Role of Calcium Metabolism in Human Red Blood Cell Ageing: A Proposal // *Blood Cells. Mol. Dis.* 1999. Т. 25, № 1. С. 9–19.
115. D'Alessandro A. и др. Red Blood Cell Metabolism In Vivo and In Vitro // *Metabolites.* MDPI AG, 2023. Т. 13, № 7. С. 793.
116. Van Wijk R., Van Solinge W. W. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis // *Blood.* 2005. Т. 106, № 13. С. 4034–4042.
117. Benesch R., Benesch R. E. The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin // *Biochem Biophys Res Commun.* 1967. Т. 26, № 2. С. 162–167.
118. Wang Y. и др. Crystal Structure of Human Bisphosphoglycerate Mutase // *J. Biol. Chem.* Elsevier BV, 2004. Т. 279, № 37. С. 39132–39138.
119. Pandey K. B., Rizvi S. I. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells // *Biomed. Pap.* 2011. Т. 155, № 2. С. 131–136.

120. D'Alessandro A. и др. Protect, repair, destroy or sacrifice: a role of oxidative stress biology in inter-donor variability of blood storage? // *Blood Transfus.* 2019. № Blood Transfusion-4 2019 (July-August). С. 281–288.
121. Reisz J. A. и др. Oxidative modifications of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase regulate metabolic reprogramming of stored red blood cells // *Blood*. American Society of Hematology, 2016. Т. 128, № 12. С. e32–e42.
122. Van De Wetering C. и др. Glutathione-S-transferase P promotes glycolysis in asthma in association with oxidation of pyruvate kinase M2 // *Redox Biol.* Elsevier BV, 2021. Т. 47. С. 102160.
123. D'Alessandro A. и др. Effects of aged stored autologous red blood cells on human plasma metabolome // *Blood Adv.* 2019. Т. 3, № 6. С. 884–896.
124. Sun K. и др. Sphingosine-1-phosphate promotes erythrocyte glycolysis and oxygen release for adaptation to high-altitude hypoxia // *Nat. Commun.* 2016. Т. 7, № 1. С. 12086.
125. Sun K. и др. Structural and Functional Insight of Sphingosine 1-Phosphate-Mediated Pathogenic Metabolic Reprogramming in Sickle Cell Disease // *Sci. Rep.* 2017. Т. 7, № 1. С. 15281.
126. Thomas T. и др. Fatty acid desaturase activity in mature red blood cells and implications for blood storage quality // *Transfusion (Paris)*. 2021. Т. 61, № 6. С. 1867–1883.
127. Möller M. N. и др. Oxidants and Antioxidants in the Redox Biochemistry of Human Red Blood Cells // *ACS Omega*. 2023. Т. 8, № 1. С. 147–168.
128. Van 'T Erve T. J. и др. Heritability of glutathione and related metabolites in stored red blood cells // *Free Radic. Biol. Med.* 2014. Т. 76. С. 107–113.
129. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. // *J. Biol. Chem.* 1988. Т. 263, № 33. С. 17205–17208.
130. Ellison I., Richie J. P. Mechanisms of glutathione disulfide efflux from erythrocytes // *Biochem. Pharmacol.* 2012. Т. 83, № 1. С. 164–169.
131. Rossi R. и др. Blood Glutathione Disulfide: In Vivo Factor or in Vitro Artifact? // *Clin. Chem.* 2002. Т. 48, № 5. С. 742–753.
132. Schafer F. Q., Buettner G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple // *Free Radic. Biol. Med.* 2001. Т. 30, № 11. С. 1191–1212.
133. Johnson R. M. и др. Red cells from glutathione peroxidase-1-deficient mice have nearly normal defenses against exogenous peroxides // *Blood*. 2000. Т. 96, № 5. С. 1985–1988.
134. Poluektov Y. M. и др. Glutathione-related substances maintain cardiomyocyte contractile function in hypoxic conditions // *Sci. Rep.* 2019. Т. 9, № 1. С. 4872.
135. Mieyal J. J. и др. Molecular Mechanisms and Clinical Implications of Reversible Protein S -Glutathionylation // *Antioxid. Redox Signal.* 2008. Т. 10, № 11. С. 1941–1988.
136. Scirè A. и др. Glutathionyl Hemoglobin and Its Emerging Role as a Clinical Biomarker of Chronic Oxidative Stress // *Antioxidants*. 2023. Т. 12, № 11. С. 1976.

137. Ghezzi P. Protein glutathionylation in health and disease // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 2013. Т. 1830, № 5. С. 3165–3172.
138. Nonaka К. и др. Serum Levels of S-Glutathionylated Proteins as a Risk-Marker for Arteriosclerosis Obliterans // *Circ. J.* 2007. Т. 71, № 1. С. 100–105.
139. Mandal А. К. и др. Quantitation and characterization of glutathionyl haemoglobin as an oxidative stress marker in chronic renal failure by mass spectrometry // *Clin. Biochem.* 2007. Т. 40, № 13–14. С. 986–994.
140. Giustarini D. и др. Membrane Skeletal Protein S -Glutathionylation in Human Red Blood Cells as Index of Oxidative Stress // *Chem. Res. Toxicol.* 2019. Т. 32, № 6. С. 1096–1102.
141. Latypova L. и др. Hydration of methemoglobin studied by *in silico* modeling and dielectric spectroscopy // *J. Chem. Phys.* 2021. Т. 155, № 1. С. 015101.
142. Weed R. I., Reed C. F., Berg G. Is hemoglobin an essential structural component of human erythrocyte membranes? // *J. Clin. Invest.* 1963. Т. 42, № 4. С. 581–588.
143. Hardison R. C. и др. Access to a Syllabus of Human Hemoglobin Variants (1996) Via the World Wide Web // *Hemoglobin.* 1998. Т. 22, № 2. С. 113–127.
144. Ahmed M. H., Ghatge M. S., Safo M. K. Hemoglobin: Structure, Function and Allostery // *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins* / под ред. Hoeger U., Harris J. R. Cham: Springer International Publishing, 2020. Т. 94. С. 345–382.
145. Perutz M. F. и др. Structure of Hæmoglobin: A Three-Dimensional Fourier Synthesis at 5.5-Å. Resolution, Obtained by X-Ray Analysis // *Nature.* 1960. Т. 185. С. 416–422.
146. Perutz M. F. Stereochemistry of Cooperative Effects in Haemoglobin: Haem–Haem Interaction and the Problem of Allostery // *Nature.* 1970. Т. 228. С. 726–734.
147. Brazhe N. A. и др. New Insight into Erythrocyte through In Vivo Surface-Enhanced Raman Spectroscopy // *Biophys. J.* 2009. Т. 97, № 12. С. 3206–3214.
148. Fermi G. Three-dimensional fourier synthesis of human deoxyhaemoglobin at 2.5 Å resolution: Refinement of the atomic model // *J. Mol. Biol.* 1975. Т. 97, № 2. С. 237–256.
149. Meng F., Alayash A. I. Determination of extinction coefficients of human hemoglobin in various redox states // *Anal. Biochem.* 2017. Т. 521. С. 11–19.
150. Chintagari N. R., Jana S., Alayash A. I. Oxidized Ferric and Ferryl Forms of Hemoglobin Trigger Mitochondrial Dysfunction and Injury in Alveolar Type I Cells // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2016. Т. 55, № 2. С. 288–298.
151. Simmonds M. J., Detterich J. A., Connes P. Nitric oxide, vasodilation and the red blood cell // *Biorheology.* 2014. Т. 51, № 2–3. С. 121–134.
152. Gladwin M. T., Grubina R., Doyle M. P. The New Chemical Biology of Nitrite Reactions with Hemoglobin: R-State Catalysis, Oxidative Denitrosylation, and Nitrite Reductase/Anhydrase // *Acc. Chem. Res.* 2009. Т. 42, № 1. С. 157–167.
153. Sakai H. и др. Suppression of methemoglobin formation by glutathione in a concentrated hemoglobin solution and in a hemoglobin-vesicle // *Bulletin of the Chemical Society of Japan.* 1994. Т. 67, № 4. С. 1120–1125.

154. Stratton L. P. и др. The Reduction of Methemoglobin Levels by Antioxidants // *Hemoglobin*. 1988. Т. 12, № 4. С. 353–368.
155. Rubino F. M. The Redox Potential of the β -93-Cysteine Thiol Group in Human Hemoglobin Estimated from In Vitro Oxidant Challenge Experiments // *Molecules*. 2021. Т. 26, № 9. С. 2528.
156. Metere A. и др. Carbon Monoxide Signaling in Human Red Blood Cells: Evidence for Pentose Phosphate Pathway Activation and Protein Deglutathionylation // *Antioxid. Redox Signal*. 2014. Т. 20, № 3. С. 403–416.
157. Chen H.-J. С. и др. Multistage Mass Spectrometric Analysis of Human Hemoglobin Glutathionylation: Correlation with Cigarette Smoking // *Chem. Res. Toxicol.* 2014. Т. 27, № 5. С. 864–872.
158. Mitra G. и др. Glutathionylation induced structural changes in oxy human hemoglobin analyzed by backbone amide hydrogen/deuterium exchange and MALDI-mass spectrometry // *Bioconjug. Chem.* 2012. Т. 23, № 12. С. 2344–2353.
159. D'Alessandro A. и др. AltitudeOmics: Red Blood Cell Metabolic Adaptation to High Altitude Hypoxia // *J. Proteome Res.* 2016. Т. 15, № 10. С. 3883–3895.
160. D'Alessandro A., Zolla L. Biochemistry of red cell aging in vivo and storage lesions. 2013.
161. Sikora J. и др. Hemolysis is a primary ATP-release mechanism in human erythrocytes // *Blood*. 2014. Т. 124, № 13. С. 2150–2157.
162. Hernansanz-Agustín P. и др. Na⁺ controls hypoxic signalling by the mitochondrial respiratory chain // *Nature*. 2020. Т. 586, № 7828. С. 287–291.
163. Heinicke I. и др. Moderate altitude but not additional endurance training increases markers of oxidative stress in exhaled breath condensate // *Eur. J. Appl. Physiol.* 2009. Т. 106, № 4. С. 599–604.
164. Bogdanova A., Berenbrink M., Nikinmaa M. Oxygen-dependent ion transport in erythrocytes // *Acta Physiol.* 2009. Т. 195, № 3. С. 305–319.
165. Mamillapalli С. и др. COPD and Type 2 Diabetes // *Curr. Respir. Med. Rev.* 2019. Т. 15, № 2. С. 112–119.
166. Vasileiadis I. и др. Acid-Base Disturbances in Patients with Asthma: A Literature Review and Comments on Their Pathophysiology // *J. Clin. Med.* 2019. Т. 8, № 4. С. 563.
167. Sircar M., Bhatia A., Munshi M. Review of Hypoglycemia in the Older Adult: Clinical Implications and Management // *Can. J. Diabetes*. 2016. Т. 40, № 1. С. 66–72.
168. UK Hypoglycaemia Study Group. Risk of hypoglycaemia in types 1 and 2 diabetes: effects of treatment modalities and their duration // *Diabetologia*. 2007. Т. 50, № 6. С. 1140–1147.
169. Miwa S. Hereditary disorders of red cell enzymes in the embden-meyerhof pathway // *Am. J. Hematol.* 1983. Т. 14, № 4. С. 381–391.
170. Koralkova P., van Solinge W. W., van Wijk R. Rare hereditary red blood cell enzymopathies associated with hemolytic anemia - pathophysiology, clinical aspects, and laboratory diagnosis // *Int. J. Lab. Hematol.* 2014. Т. 36, № 3. С. 388–397.

171. Brinkmann C. и др. Influence of Glycemic Status and Physical Fitness on Oxidative Stress and the Peroxiredoxin System in the Erythrocytes of Non-Insulin-Dependent Type 2 Diabetic Men // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*. 2011. Т. 119, № 09. С. 559–564.
172. Yousefzade G., Nakhaee A. Insulin-induced hypoglycemia and stress oxidative state in healthy people // *Acta Diabetol*. 2012. Т. 49, № S1. С. 81–85.
173. Pompeo G. и др. Erythrocyte death in vitro induced by starvation in the absence of Ca²⁺ // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr*. 2010. Т. 1798, № 6. С. 1047–1055.
174. Ozuyaman B. и др. RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects // *Trends Mol. Med*. 2008. Т. 14, № 7. С. 314–322.
175. Yalcin O. и др. Nitric oxide generation by endothelial cells exposed to shear stress in glass tubes perfused with red blood cell suspensions: role of aggregation // *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol*. 2008. Т. 294, № 5. С. H2098–H2105.
176. Yamamoto A. и др. Flow Cytometric Analysis of Red Blood Cell Osmotic Fragility // *SLAS Technol*. 2014. Т. 19, № 5. С. 483–487.
177. Sun H.-L. и др. Blood cell-produced amyloid- β induces cerebral Alzheimer-type pathologies and behavioral deficits // *Mol. Psychiatry*. 2021. Т. 26, № 10. С. 5568–5577.
178. Chwalisz B. K. Cerebral amyloid angiopathy and related inflammatory disorders // *J. Neurol. Sci*. 2021. Т. 424. С. 117425.
179. Cozza M., Amadori L., Boccardi V. Exploring cerebral amyloid angiopathy: Insights into pathogenesis, diagnosis, and treatment // *J. Neurol. Sci*. 2023. Т. 454. С. 120866.
180. Sagare A. P., Bell R. D., Zlokovic B. V. Neurovascular Dysfunction and Faulty Amyloid -Peptide Clearance in Alzheimer Disease // *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. 2012. Т. 2, № 10. С. a011452–a011452.
181. Magnuson M., Majeed W., Keilholz S. D. Functional connectivity in blood oxygenation level-dependent and cerebral blood volume-weighted resting state functional magnetic resonance imaging in the rat brain // *J. Magn. Reson. Imaging*. 2010. Т. 32, № 3. С. 584–592.
182. Liu Y. и др. Correlation Between Cerebral Venous Oxygen Level and Cognitive Status in Patients With Alzheimer’s Disease Using Quantitative Susceptibility Mapping // *Front. Neurosci*. 2021. Т. 14. С. 570848.
183. Göttler J. и др. Reduced blood oxygenation level dependent connectivity is related to hypoperfusion in Alzheimer’s disease // *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2019. Т. 39, № 7. С. 1314–1325.
184. Wang M. и др. *APP^{swe} / PS1^{AE9}* mice exhibit low oxygen saturation and alterations of erythrocytes preceding the neuropathology and cognitive deficiency during Alzheimer’s disease // *CNS Neurosci. Ther*. 2023. Т. 29, № 7. С. 1889–1897.
185. Liu G. и др. Oxygen metabolism abnormality and Alzheimer’s disease: An update // *Redox Biol*. 2023. Т. 68. С. 102955.
186. Mensah-Kane P., Sumien N. The potential of hyperbaric oxygen as a therapy for neurodegenerative diseases // *GeroScience*. 2023. Т. 45, № 2. С. 747–756.

187. Shabir O. и др. Enhanced Cerebral Blood Volume under Normobaric Hyperoxia in the J20-hAPP Mouse Model of Alzheimer's Disease // *Sci. Rep.* 2020. Т. 10, № 1. С. 7518.
188. Lan J. и др. The peripheral blood of A β binding RBC as a biomarker for diagnosis of Alzheimer's disease // *Age Ageing.* 2015. Т. 44, № 3. С. 458–464.
189. Nakagawa K. и др. Amyloid β -induced erythrocytic damage and its attenuation by carotenoids // *FEBS Lett.* 2011. Т. 585, № 8. С. 1249–1254.
190. Mohanty J. G. и др. Do Red Blood Cell-b-Amyloid Interactions Alter Oxygen Delivery in Alzheimer's Disease? // *Adv Exp Med Biol.* 2008. Т. 614. С. 29–35.
191. Ravi L. B. и др. Influence of beta-amyloid fibrils on the interactions between red blood cells and endothelial cells // *Neurol. Res.* 2004. Т. 26, № 5. С. 579–585.
192. Mukherjee S. и др. Quantification of N-terminal amyloid- β isoforms reveals isomers are the most abundant form of the amyloid- β peptide in sporadic Alzheimer's disease // *Brain Commun.* 2021. Т. 3, № 2. С. fcab028.
193. Collins J.-A. и др. Relating oxygen partial pressure, saturation and content: the haemoglobin-oxygen dissociation curve // *Breathe Sheff. Engl.* 2015. Т. 11, № 3. С. 194–201.
194. Makhro A. и др. Red Cell Properties after Different Modes of Blood Transportation // *Front. Physiol.* 2016. Т. 7.
195. Petrushanko I. Y. и др. Beta-amyloid influences the content and trafficking of beta-amyloid precursor protein via Na,K-ATPase-Src kinase positive feedback loop // *Front. Pharmacol.* 2025. Т. 16. С. 1665715.
196. Petrushanko I. и др. Na-K-ATPase in rat cerebellar granule cells is redox sensitive // *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006. Т. 290, № 4. С. R916–R925.
197. Petrushanko I. Yu. и др. Oxygen-induced Regulation of Na/K ATPase in Cerebellar Granule Cells // *J. Gen. Physiol.* 2007. Т. 130, № 4. С. 389–398.
198. Mitkevich V. A. и др. Ribonuclease binase apoptotic signature in leukemic Kasumi-1 cells // *Biochimie.* 2013. Т. 95, № 6. С. 1344–1349.
199. Mishra R. и др. Quantifying morphological alteration of RBC population from light scattering data // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2015. Т. 59, № 4. С. 287–300.
200. Link A. J., LaBaer J. Trichloroacetic Acid (TCA) Precipitation of Proteins // *Cold Spring Harb. Protoc.* 2011. Т. 2011, № 8. С. pdb.prot5651.
201. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues // *Anal. Biochem.* 1969. Т. 27, № 3. С. 502–522.
202. Bogdanova A. Y. и др. Pivotal Role of Reduced Glutathione in Oxygen-induced Regulation of the Na⁺/K⁺ Pump in Mouse Erythrocyte Membranes // *J. Membr. Biol.* 2003. Т. 195, № 1. С. 33–42.
203. Liu M. и др. Improved WATERGATE Pulse Sequences for Solvent Suppression in NMR Spectroscopy // *J. Magn. Reson.* 1998. Т. 132, № 1. С. 125–129.
204. Fedorov D. A. и др. Na⁺/K⁺ imbalance contributes to gene expression in endothelial cells exposed to elevated NaCl // *Heliyon.* 2021. Т. 7, № 9. С. e08088.

205. Smith P. K. и др. Measurement of protein using bicinchoninic acid // *Anal. Biochem.* 1985. Т. 150, № 1. С. 76–85.
206. Laemmli U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. Т. 227, № 5259. С. 680–685.
207. Torres Filho I. P. и др. Measurement of hemoglobin oxygen saturation using Raman microspectroscopy and 532-nm excitation // *J. Appl. Physiol.* 2008. Т. 104, № 6. С. 1809–1817.
208. Slatinskaya O. V. и др. Conformational Changes that occur in Heme and Globin upon Temperature Variations and Normobaric Hypoxia // *Biofizika.* 2020. Т. 65, № 2. С. 213–221.
209. Slatinskaya O. V. и др. Changes in the Conformation and Distribution of Hemoglobin in the Erythrocyte upon Inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase Activity // *Biophysics.* 2022. Т. 67, № 5. С. 726–733.
210. González-Viveros N. и др. Characterization of glycated hemoglobin based on Raman spectroscopy and artificial neural networks // *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2021. Т. 247. С. 119077.
211. Wood B. R., Hammer L., McNaughton D. Resonance Raman spectroscopy provides evidence of heme ordering within the functional erythrocyte // *Vib. Spectrosc.* 2005. Т. 38, № 1–2. С. 71–78.
212. Ortiz-Prado E. и др. Partial pressure of oxygen in the human body: a general review // *Am. J. Blood. Res.* 2019. Т. 9, № 1. С. 1–14.
213. Carafoli E. Calcium signaling: A tale for all seasons // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002. Т. 99, № 3. С. 1115–1122.
214. Kerr P. M. и др. Endothelial calcium-activated potassium channels as therapeutic targets to enhance availability of nitric oxide // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2012. Т. 90, № 6. С. 739–752.
215. Gomez-Cabrera M. C. и др. Redox-related biomarkers in physical exercise // *Redox Biol.* 2021. Т. 42. С. 101956.
216. Giustarini D. и др. Micro-method for the determination of glutathione in human blood // *J. Chromatogr. B.* 2014. Т. 964. С. 191–194.
217. Hochachka P. W. Mechanism and Evolution of Hypoxia-Tolerance in Humans // *J. Exp. Biol.* 1998. Т. 201, № 8. С. 1243–1254.
218. Suh S., Kim J. H. Glycemic Variability: How Do We Measure It and Why Is It Important? // *Diabetes Metab. J.* 2015. Т. 39, № 4. С. 273.
219. Cryer P. E. и др. Evaluation and Management of Adult Hypoglycemic Disorders: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009. Т. 94, № 3. С. 709–728.
220. Zhang R. и др. Involvement of Calcium, Reactive Oxygen Species, and ATP in Hexavalent Chromium-Induced Damage in Red Blood Cells // *Cell. Physiol. Biochem.* 2014. Т. 34, № 5. С. 1780–1791.
221. Drvenica I. и др. The effects of incubation media on the assessment of the shape of human erythrocytes by flow cytometry: a contribution to mathematical data interpretation to enable wider application of the method // *Eur. Biophys. J.* 2021. Т. 50, № 6. С. 829–846.

222. McNamee A. P. и др. Erythrocyte morphological symmetry analysis to detect sublethal trauma in shear flow // *Sci. Rep.* 2021. Т. 11, № 1. С. 23566.
223. Szadkowska A. и др. Hypoglycaemia unawareness in patients with type 1 diabetes // *Pediatr. Endocrinol. Diabetes Metab.* 2018. Т. 24, № 3. С. 126–134.
224. Silbert R. и др. Hypoglycemia Among Patients with Type 2 Diabetes: Epidemiology, Risk Factors, and Prevention Strategies // *Curr. Diab. Rep.* 2018. Т. 18, № 8. С. 53.
225. Vega-Cano S., Cordero-Vázquez E., Mestre-Torres J. Hipoglucemia como forma de presentación de infiltración hipofisaria por un linfoma // *Med. Clínica.* 2021. Т. 156, № 7. С. 362–363.
226. Wang J. и др. Hypoglycemia and mortality in sepsis patients: A systematic review and meta-analysis // *Heart Lung.* 2021. Т. 50, № 6. С. 933–940.
227. Salehi M. и др. Hypoglycemia After Gastric Bypass Surgery: Current Concepts and Controversies // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2018. Т. 103, № 8. С. 2815–2826.
228. Amiel S. A. The consequences of hypoglycaemia // *Diabetologia.* 2021. Т. 64, № 5. С. 963–970.
229. Papachristoforou E. и др. Association of Glycemic Indices (Hyperglycemia, Glucose Variability, and Hypoglycemia) with Oxidative Stress and Diabetic Complications // *J. Diabetes Res.* / под ред. Sardu C. 2020. Т. 2020. С. 1–17.
230. Rogers T. B., Lokuta A. J. Angiotensin II signal transduction pathways in the cardiovascular system // *Trends Cardiovasc. Med.* 1994. Т. 4, № 3. С. 110–116.
231. Kosower N. S., Zipser Y., Faltin Z. Membrane thiol-disulfide status in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells. Relationship to cellular glutathione // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1982. Т. 691, № 2. С. 345–352.
232. Lang F. CHAPTER 6 - Cell Volume Control // Seldin and Giebisch's *The Kidney (Fourth Edition)*. 4-е изд. / под ред. Alpern R. J., Hebert S. C. Elsevier, 2008. Т. 1. С. 169–183.
233. Verbalis J. G. Disorders of body water homeostasis // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003. Т. 17, № 4. С. 471–503.
234. Haussinger D. Cellular hydration state: an important determinant of protein catabolism in health and disease // *The Lancet.* 1993. Т. 341, № 8856. С. 1330–1332.
235. Roma P. M. S. и др. Profiling of individual human red blood cells under osmotic stress using defocusing microscopy // *J. Biomed. Opt.* 2016. Т. 21, № 9. С. 090505.
236. Karabaliev M. и др. Change in Osmotic Pressure Influences the Absorption Spectrum of Hemoglobin inside Red Blood Cells // *Cells.* 2024. Т. 13, № 7. С. 589.
237. Beltrán A. и др. Flow Cytometry as a New Accessible Method to Evaluate Diagnostic Osmotic Changes in Patients with Red Blood Cell Membrane Defects // *Biomedicines.* 2024. Т. 12, № 7. С. 1607.
238. Gienger J. и др. Assessment of deformation of human red blood cells in flow cytometry: measurement and simulation of bimodal forward scatter distributions // *Biomed. Opt. Express.* 2019. Т. 10, № 9. С. 4531.

239. Whillier S., Raftos J. E., Kuchel P. W. Glutathione synthesis by red blood cells in type 2 diabetes mellitus // *Redox Rep.* 2008. Т. 13, № 6. С. 277–282.
240. Petrushanko I. Yu. и др. The ability of cells to adapt to low-oxygen conditions is associated with glutathionylation of Na,K-ATPase // *Mol. Biol.* 2015. Т. 49, № 1. С. 153–160.
241. Perutz M. F. Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins // *Q Rev Biophys.* 1989. Т. 22, № 2. С. 139–237.
242. 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.
243. Liu R. и др. Power dependent oxygenation state transition of red blood cells in a single beam optical trap // *Appl. Phys. Lett.* 2011. Т. 99, № 4. С. 043702.
244. Rao S. и др. Raman Study of Mechanically Induced Oxygenation State Transition of Red Blood Cells Using Optical Tweezers // *Biophys. J.* 2009. Т. 96, № 1. С. 209–216.
245. Sega M. F. и др. Fluorescence assay of the interaction between hemoglobin and the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3 // *Blood Cells. Mol. Dis.* 2015. Т. 55, № 3. С. 266–271.
246. Datta P. и др. Interaction of erythroid spectrin with hemoglobin variants: implications in β -thalassemia // *Blood Cells. Mol. Dis.* 2003. Т. 30, № 3. С. 248–253.
247. Dagur P. K., McCoy J. P. Collection, Storage, and Preparation of Human Blood Cells // *Curr. Protoc. Cytom.* 2015. Т. 73, № 1.
248. Wiegmann L. и др. Influence of Standard Laboratory Procedures on Measures of Erythrocyte Damage // *Front. Physiol.* 2017. Т. 8. С. 731.
249. Mancuso J. E., Jayaraman A., Ristenpart W. D. Centrifugation-induced release of ATP from red blood cells // *PLOS ONE* / под ред. Connes P. 2018. Т. 13, № 9. С. e0203270.
250. Larkin S. K. и др. The RoxyScan is a novel measurement of red blood cell deformability under oxidative and shear stress // *Sci. Rep.* 2024. Т. 14, № 1. С. 6344.
251. Petkova-Kirova P. и др. The Gárdos Channel and Piezo1 Revisited: Comparison between Reticulocytes and Mature Red Blood Cells // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. Т. 25, № 3. С. 1416.
252. Maher A. D., Kuchel P. W. The Gárdos channel: a review of the Ca^{2+} -activated K^{+} channel in human erythrocytes // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2003. Т. 35, № 8. С. 1182–1197.
253. Grygorczyk R. Temperature dependence of Ca^{2+} -activated K^{+} currents in the membrane of human erythrocytes // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1987. Т. 902, № 2. С. 159–168.
254. Orrico F. и др. Oxidative Stress in Healthy and Pathological Red Blood Cells // *Biomolecules.* 2023. Т. 13, № 8. С. 1262.
255. Mihov D. и др. Erythropoietin activates nitric oxide synthase in murine erythrocytes // *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 2009. Т. 297, № 2. С. C378–C388.

256. Ferrer-Sueta G. и др. Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration // *Chem. Rev.* 2018. Т. 118, № 3. С. 1338–1408.
257. Besedina N. A. и др. Persistent red blood cells retain their ability to move in microcapillaries under high levels of oxidative stress // *Commun. Biol.* 2022. Т. 5, № 1. С. 659.
258. Anong W. A. и др. Adducin forms a bridge between the erythrocyte membrane and its cytoskeleton and regulates membrane cohesion // *Blood.* 2009. Т. 114, № 9. С. 1904–1912.
259. Livshits L. и др. The Impact of Ca²⁺ on Intracellular Distribution of Hemoglobin in Human Erythrocytes // *Cells.* 2023. Т. 12, № 18. С. 2280.
260. Kelemen C., Chien S., Artmann G. M. Temperature Transition of Human Hemoglobin at Body Temperature: Effects of Calcium // *Biophys. J.* 2001. Т. 80, № 6. С. 2622–2630.
261. Kiss F. и др. The effect of centrifugation at various g force levels on rheological properties of rat, dog, pig and human red blood cells // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2016. Т. 62, № 3. С. 215–227.
262. Zhang X. и др. Red blood cells in biology and translational medicine: natural vehicle inspires new biomedical applications // *Theranostics.* 2024. Т. 14, № 1. С. 220–248.
263. Galili U. и др. Demonstration of a natural antigalactosyl IgG antibody on thalassemic red blood cells // *Blood.* 1983. Т. 61, № 6. С. 1258–1264.
264. Enomoto T. и др. Glycocalyx analysis of bladder cancer: three-dimensional images in electron microscopy and vicia villosa lectin as a marker for invasiveness in frozen sections // *Front. Cell Dev. Biol.* 2024. Т. 11. С. 1308879.
265. Demeyere R. и др. Comparison of fresh frozen plasma and prothrombin complex concentrate for the reversal of oral anticoagulants in patients undergoing cardiopulmonary bypass surgery: a randomized study: PCC for oral anticoagulant reversal in CPB surgery // *Vox Sang.* 2010. Т. 99, № 3. С. 251–260.
266. Machin D. R. и др. Advanced age results in a diminished endothelial glycocalyx // *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 2018. Т. 315, № 3. С. H531–H539.
267. Costa M., Páez A. Emerging insights into the role of albumin with plasma exchange in Alzheimer's disease management // *Transfus. Apher. Sci.* 2021. Т. 60, № 3. С. 103164.
268. Sitnikova V. и др. Increased activity of Piezo1 channel in red blood cells is associated with Alzheimer's disease-related dementia // *Alzheimers Dement.* 2025. Т. 21, № 6. С. e70368.
269. Cipriano A. и др. NADPH Oxidases: From Molecular Mechanisms to Current Inhibitors // *J. Med. Chem.* 2023. Т. 66, № 17. С. 11632–11655.
270. Simmonds M. J., Detterich J. A., Connes P. Nitric oxide, vasodilation and the red blood cell // *Biorheology.* 2014. Т. 51, № 2–3. С. 121–134.
271. Suhr F. и др. Moderate Exercise Promotes Human RBC-NOS Activity, NO Production and Deformability through Akt Kinase Pathway // *PLoS ONE* / под ред. Gaetano C. 2012. Т. 7, № 9. С. e45982.

272. Horn P. и др. Nitric oxide influences red blood cell velocity independently of changes in the vascular tone // *Free Radic. Res.* 2011. Т. 45, № 6. С. 653–661.
273. Barykin E. P. и др. Isomerization of Asp7 increases the toxic effects of amyloid β and its phosphorylated form in SH-SY5Y neuroblastoma cells // *Mol. Biol.* 2016. Т. 50, № 5. С. 762–767.
274. Yakushev S. и др. Cross talk between *S*-nitrosylation and *S*-glutathionylation in control of the Na,K-ATPase regulation in hypoxic heart // *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 2012. Т. 303, № 11. С. H1332–H1343.
275. Rohman A. и др. The use of FTIR and Raman spectroscopy in combination with chemometrics for analysis of biomolecules in biomedical fluids: A review // *Biomed. Spectrosc. Imaging.* 2020. Т. 8, № 3–4. С. 55–71.
276. Pirutin S. K. и др. Vibrational Spectroscopy as a Tool for Bioanalytical and Biomonitoring Studies // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Т. 24, № 8. С. 6947.
277. Byler D. M., Susi H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra // *Biopolymers.* 1986. Т. 25, № 3. С. 469–487.
278. Wood B. R., Tait B., McNaughton D. Micro-Raman characterisation of the R to T state transition of haemoglobin within a single living erythrocyte // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 2001. Т. 1539, № 1–2. С. 58–70.
279. Wood B. R., Kochan K., Marzec K. M. Chapter 13 - Resonance Raman spectroscopy of hemoglobin in red blood cells // *Vibrational Spectroscopy in Protein Research* / под ред. Ozaki Y. и др. Academic Press, 2020. С. 375–414.
280. Slatinskaya O. V. и др. The Hemoglobin Conformation in Erythrocytes at Different Levels of Oxygen Partial Pressure // *Biophysics.* 2021. Т. 66, № 5. С. 797–803.
281. Choi S. и др. Structural correlations and vinyl influences in resonance Raman spectra of protoheme complexes and proteins // *J. Am. Chem. Soc.* 1982. Т. 104, № 16. С. 4345–4351.
282. Hu S., Smith K. M., Spiro T. G. Assignment of Protoheme Resonance Raman Spectrum by Heme Labeling in Myoglobin // *J. Am. Chem. Soc.* 1996. Т. 118, № 50. С. 12638–12646.
283. Wood B. R., Tait B., McNaughton D. Micro-Raman characterisation of the R to T state transition of haemoglobin within a single living erythrocyte // *Biochim. Biophys. Acta.* 2001. Т. 1539, № 1–2. С. 58–70.
284. Dong A., Huang P., Caughey W. S. Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra // *Biochemistry.* 1990. Т. 29, № 13. С. 3303–3308.
285. Ye S. и др. The impact of the HbA1c level of type 2 diabetics on the structure of haemoglobin // *Sci. Rep.* 2016. Т. 6, № 1. С. 33352.
286. Bandekar J. Amide modes and protein conformation // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1992. Т. 1120, № 2. С. 123–143.
287. Yang H. и др. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy // *Nat. Protoc.* 2015. Т. 10, № 3. С. 382–396.
288. Belbachir K. и др. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy // *Anal. Bioanal. Chem.* 2009. Т. 395, № 3. С. 829–837.

289. Lorenz-Fonfria V. A. Infrared Difference Spectroscopy of Proteins: From Bands to Bonds // *Chem. Rev.* 2020. Т. 120, № 7. С. 3466–3576.
290. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 2007. Т. 1767, № 9. С. 1073–1101.
291. De Meutter J., Goormaghtigh E. FTIR Imaging of Protein Microarrays for High Throughput Secondary Structure Determination // *Anal. Chem.* 2021. Т. 93, № 8. С. 3733–3741.
292. Martins, С и др. Age-Related Fourier-Transform Infrared Spectroscopic Changes in Protein Conformation in an Aging Model of Human Dermal Fibroblasts // *Spectrosc J.* 2023. Т. 1. С. 37–48.
293. Cai S., Singh B. R. A Distinct Utility of the Amide III Infrared Band for Secondary Structure Estimation of Aqueous Protein Solutions Using Partial Least Squares Methods // *Biochemistry.* 2004. Т. 43, № 9. С. 2541–2549.
294. Singh B. R. и др. Fourier transform infrared analysis of amide III bands of proteins for the secondary structure estimation / под ред. Nafie L. A., Mantsch H. H. Los Angeles, CA, 1993. С. 47–55.
295. Cai S., Singh B. R. Identification of b-turn and random coil amide III infrared bands for secondary structure estimation of proteins. 1999.
296. Xie M. X., Liu Y. Studies on amide III infrared bands for the secondary structure determination of proteins // *Chem. J. Chin. Univ.* 2003. Т. 24. С. 226–231.
297. Волькенштейн М. В. Строение молекул. М.: АН СССР, 1947. 278 с.
298. Wang Y. и др. Two-Dimensional Fourier Transform Near-Infrared Spectroscopy Study of Heat Denaturation of Ovalbumin in Aqueous Solutions // *J. Phys. Chem. B.* 1998. Т. 102, № 34. С. 6655–6662.
299. Pauling L., Corey R. B., Branson H. R. The structure of proteins: Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1951. Т. 37, № 4. С. 205–211.
300. Kuleshova I. D. и др. Changes in Hemoglobin Properties in Complex with Glutathione and after Glutathionylation // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Т. 24, № 17. С. 13557.
301. Andleeb F. и др. Hemoglobin structure at higher levels of hemoglobin A1C in type 2 diabetes and associated complications // *Chin. Med. J. (Engl.)*. 2020. Т. 133, № 10. С. 1138–1143.
302. Lin J. и др. Raman Spectroscopy of Human Hemoglobin for Diabetes Detection // *J. Innov. Opt. Health Sci.* 2014. Т. 07, № 01. С. 1350051.
303. Niwa T. Protein glutathionylation and oxidative stress // *J. Chromatogr. B.* 2007. Т. 855, № 1. С. 59–65.
304. San Biagio P. L. и др. Temperature induced difference spectra of oxy and deoxy hemoglobin in the near IR, visible and Soret regions // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977. Т. 77, № 4. С. 1158–1165.
305. Wood B. R. и др. Resonance Raman spectroscopy of red blood cells using near-infrared laser excitation // *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. Т. 387, № 5. С. 1691–1703.

306. Hirsch R. E. Hemoglobin Fluorescence // Hemoglobin Disorders. New Jersey: Humana Press, 2003. Т. 82. С. 133–154.
307. Kiger L. и др. Thermodynamic Studies on the Equilibrium Properties of a Series of Recombinant β W37 Hemoglobin Mutants // Biochemistry. 1998. Т. 37, № 13. С. 4336–4345.
308. Manconi B. и др. A new β -chain haemoglobin variant with increased oxygen affinity: Hb Roma [β 115(g17)Ala \rightarrow Val] // Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. 2010. Т. 1800, № 3. С. 327–335.
309. Noble R. W. и др. Mutational Effects at the Subunit Interfaces of Human Hemoglobin: Evidence for a Unique Sensitivity of the T Quaternary State to Changes in the Hinge Region of the α 1 β 2 Interface // Biochemistry. 2001. Т. 40, № 41. С. 12357–12368.
310. Bettati S. и др. Structure and Oxygen Affinity of Crystalline des-His-146 β Human Hemoglobin in the T State // J. Biol. Chem. 1997. Т. 272, № 52. С. 33077–33084.
311. Kilmartin J. V. и др. Direct Measurement of the pK Values of an Alkaline Bohr Group in Human Hemoglobin // Proc. Natl. Acad. Sci. 1973. Т. 70, № 4. С. 1246–1249.
312. Rubino F. M. The Redox Potential of the β -93-Cysteine Thiol Group in Human Hemoglobin Estimated from In Vitro Oxidant Challenge Experiments // Mol. Basel Switz. 2021. Т. 26, № 9. С. 2528.