

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Н.А. Кленова, Р.О. Кленов

**СТРОЕНИЕ, МЕТАБОЛИЗМ
И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ
ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА
В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ**

Самара
Издательство «Самарский университет»
2009

УДК 612.111
ББК 28.91
К48

Рецензенты:

доктор медицинских наук, профессор В.М. Радомская
доктор биологических наук, доцент М.Ю. Языкова

Кленова, Н.А.

К48 Структура, метаболизм и функциональная активность эритроцитов человека в норме и патологии / Н.А. Кленова, Р.О. Кленов. – Самара: Издательство «Самарский университет», 2009. – 116 с.

ISBN 978-5-86465-455-2

В монографии рассматриваются современные научные данные о строении, биохимических процессах, функциональной активности эритроцитов человека, содержатся сведения о функционировании клеток в различных условиях, скорости старения и механизмах их апоптозной гибели. В работе также затронуты вопросы эндокринной активности эритроцитов, состояния клеток при патологии и представлены оригинальные данные исследований, проведенных авторами, и методы изучения эритроцитов человека.

Монография предназначена для специалистов в области биохимии человека и других млекопитающих, аспирантов, научных сотрудников, студентов-дипломников, специализирующихся по биохимии, а также медиков.

УДК 612.111
ББК 28.91

ISBN 978-5-86465-455-2

© Кленова Н.А., Кленов Р.О., 2009
© Самарский государственный университет, 2009
© Оформление. Издательство «Самарский университет», 2009

Глава 1

Структурно-функциональная организация эритроцита человека

Эритроцит человека имеет дисковидную, двояковогнутую форму, которая обеспечивает достаточную скорость сродного движения и устойчивость при интенсивном кровотоке. В норме процент клеток, имеющих дисковидную форму, достигает 97%, эти клетки принято называть дискоцитами или нормоцитами. Предполагают, что плоский диск лучше всего адаптирован к транспорту веществ из клетки и внутрь ее, а также к диффузии газов к центру клетки. Подсчеты, произведенные Prankerd (1961), показали, что двояковогнутая форма обладает незначительными диффузионными преимуществами. Однако объем, соответствующий диску, имеет в 1,7 раза большую поверхность, чем такой же объем, соответствующий сфере, и может умеренно изменяться без растяжения мембраны клетки [190]. Перемещение во внутрисосудистом русле организует клетки в виде «монетных столбиков», когда ток крови быстрее, они приобретают обтекаемую форму колокола.

При прохождении крови через капилляры, диаметр которых меньше диаметра эритроцита, происходит изменение формы клеток: эритроциты сильно вытягиваются и принимают форму гантели [164, 225]. Нормальная двояковогнутая форма эритроцитов приобретает как результат взаимодействия мембраны, имеющей наружный гликокаликс, и цитоскелета клетки. Избирательное изменение площади поверхности приводит к изменению формы клетки, которая может стать гантелевидной, каплевидной, принять вид стоматоцита (рис 1.1) [36].

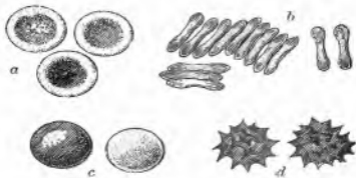


Рис.1.1. Различные формы клеток эритроцитов человека: а – дискоциты; б – гантелевидные клетки; с – сфероциты; д – эхиноциты [36]

В крови человека циркулируют эритроциты разных размеров (анизоцитоз). При повышении осмотического давления крови эритроциты уменьшаются, при понижении – увеличиваются за счет проникновения воды внутрь клетки. Заболевания, приводящие к нарушению синтеза гемоглобина (Hb), способствуют развитию микроцитоза. При недостатке витамина В₁₂ и фолиевой кислоты наблюдается мегалоцитоз. Кроме того, некоторые заболевания способны привести к необратимому изменению формы эритроцитов. Так, при серповидноклеточной анемии эритроциты принимают форму серпа, а при талассемии – форму мишени [36, 164, 225] (рис.1.2).

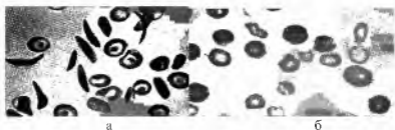


Рис.1.2. Вид эритроцитов при серповидноклеточной анемии (а) и талассемии (б)[164]

Диаметр эритроцита составляет 7,2-7,5 мкм, толщина по краям – 2,2 мкм, толщина в центре – 1 мкм, объем – 85-90 мкм³, площадь поверхности – 145 мкм² [221]. Такое соотношение площади и объема способствует деформируемости эритроцита. При уменьшении этого соотношения эритроцит становится менее деформируемым, что приводит к приобретению клеткой сферической формы [36, 164, 225]. Основным объемом эритроцита является объем краевого кольца (тора), составляющий 72%. Общая дыхательная поверхность эритроцитов человека равна 3800 м², что в 1500 раз превышает поверхность тела человека [113, 153].

В 1 мл крови у мужчин содержится 4-5 10^{12} эритроцитов, у женщин – 3,9-4,7 10^{12} . Всего в крови взрослого человека 25-30 10^{15} эритроцитов. Эту совокупность эритроцитов всей крови называют эритроном. Однако количество эритроцитов – величина не постоянная. Ее увеличение называется эритроцитозом, а уменьшение – эритропенией [164, 225].

Эритроцит человека лишен ядра. Он состоит из однородной электронно-оптически плотной цитоплазмы, лишенной органелл. 95% сухой массы эритроцита составляет гемоглобин, остальное приходится на долю липидов, углеводов, ферментов и солей [163, 191, 226]. Основной функцией эритроцитов является транспорт O₂ от легких к тканям и участие в переносе CO₂ от тканей к легким. Эритроцит потребляет в 200 раз меньше O₂, чем его ядерные предстadiumы [225]. Эритроциты регулируют кислородтранспортную функцию крови, быстро реагируя изменением уровня продукции 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) в зависимости от потребности организма в O₂ [127, 152, 254]. Кроме того, эритроциты переносят адсорбированные на их поверхности питательные вещества в виде аминокислотных остатков, биологически активные вещества, обмениваются липидами с плазмой крови. Имеются данные о влиянии адсорбции некоторых протеинов на мембране эритроцита на их реологические свойства. Установлено, что повышенная адсорбция существенно снижает текучесть суспензии, ведет к агрегации эритроцитов и деформации эритроцитарных мембран. Красные кровяные клетки способны адсорбировать различные яды, которые разрушаются затем клетками ретикулоэндотелиальной системы [161, 199].

Продолжительность жизни эритроцитов составляет 100-130 дней. Возраст эритроцитов сильно влияет на их функционирование. Старение эритроцитов сопровождается уменьшением образования в них АТФ в ходе метаболизма глюкозы. Нарушаются требующие энергетических затрат процессы восстановления формы эритроцитов, транспорта катионов, защиты компонентов клетки от окисления. Следствием этого

становится потеря клетками эластичности, в результате чего клетки разрушаются внутри сосудов или макрофагами селезенки, красного костного мозга и купферовыми клетками печени. В сутки погибает 0,8-0,9% эритроцитов (около 200 млрд.) [43, 220, 225, 260].

1.1. Строение мембраны и мембранного скелета эритроцита

Плазматическая мембрана эритроцита имеет толщину 6 нм и состоит из четырех слоев. Наружный образован гликопротеинами и содержит комплексы концевых отделов групповых антигенов. Средние два слоя образуют классическую двойную липидную мембрану. Обращенный в цитоплазму внутренний слой состоит из белков, с которыми связаны молекулы гликолитических ферментов и гемоглобина. Липидный слой оказывает большое влияние на состояние и свойства мембраны, ее осмотическую стабильность и проницаемость. Мембрана эритроцита обладает избирательной проницаемостью. Через нее проходят газы, вода, катионы – H^+ , анионы – OH^- , Cl^- , HCO_3^- . Она малопроницаема для глюкозы, мочевины, катионов K^+ и Na^+ и других водорастворимых молекул и совершенно не пропускает белки [113, 164, 236]. Мембранные фосфолипиды участвуют в поддержании конформации встроенных в мембрану белков, отчего зависит ферментативная активность последних. Молекулы липидов расположены перпендикулярно плоскости мембраны. Гидрофобные группы направлены наружу, а гидрофильные – внутрь. Липидный состав эритроцита представлен холестеролом – 24%, фосфатидилхолином – 23%, сфингомиелином – 18%, фосфатидилэтаноламином – 20%, фосфатидилсеринем – 8%, фосфатидилинозитолом – 3% [180]. Сфингомиелин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин находятся во внутренней части бислоя, а фосфатидилхолин – в наружной [153, 221]. Увеличение доли холестерина в мембране повышает ее вязкость, понижает текучесть и эластичность [171]. Помимо холестерина, который является основным стеринным компонентом мембран, в них обнаружены ланостерин, латостерин, демостерин, эфиры холестерина [89].

Фосфолипидный бислой составляет основу мембраны (около 60% ее химического состава) и играет важную роль в обеспечении формы и функциональной активности эритроцита. Он инкрустирован асиммет-

рично расположенными интегральными и соединенными с внутренней или наружной гидрофильной поверхностью периферическими белками.

Среди интегральных различают белок полосы 3 и гликофорин. Последний является трансмембранным гликопротеином, состоящим из 131 аминокислотного остатка. С его N-концевым участком, расположенным на наружной поверхности мембраны, связаны 16 олигосахаридных цепей. Наружные гидрофильные участки молекул гликофоринов образуют клеточный гликокаликс и несут отрицательный электрический заряд на сиаловых кислотах, распределенный в пространстве. Погруженные в цитоплазму гидрофильные C-концевые хвосты богаты кислыми аминокислотными остатками [60, 155, 199].

Белок полосы 3 – гликопротеид с молекулярной массой 90 кДа. Это трансмембранный белок, образующий анионный канал, по которому эритроциты освобождаются от CO_2 , заменяя HCO_3^- на Cl^- . Его полипептидная цепь (930 аминокислотных остатков) пронизывает бислой несколько раз. Цитоплазматический (N-конец) белка полосы 3 связан с гликолитическими ферментами, гемоглобином и анкирином. Цепь соединенных белком полосы 3 анкирина и спектрина связывает наружную и внутреннюю поверхности мембраны эритроцита [60, 113, 155]. Оба интегральных белка имеют олигомерную (обычно димерную) структуру, причем ось симметрии располагается перпендикулярно плоскости мембраны. Олигомерное строение обеспечивает возможность связывания с ними других белков. Например, белок полосы 3 может связывать две молекулы фермента глицеральдегидфосфатдегидрогеназы [129].

Основными белковыми компонентами мембранного скелета являются спектрин – 76%, актин – 5%, белок полосы 4.1 – 5% и другие белки [113, 236]. В мембране находятся молекулы белка анкирина, к которым присоединена спектриновая сеть. Молекула анкирина имеет сферическую форму и состоит из двух доменов: нейтрального и фосфорилированного. Фосфорилированный домен взаимодействует с β -субъединицей спектрина, нейтральный связывается с белком полосы 3 [60, 155, 199].

Спектрин представляет собой фибриллярную молекулу длиной 100 нм. Он является α, β -гетеродимером, состоящим из субъединиц массой 240 и 220 кДа. Полипептидные цепи гетеродимера закручены друг относительно друга в двойную спираль. Каждая цепь спектрина содержит более 2000 аминокислотных остатков и состоит из структурных доменов. Димеры спектрина могут образовывать тетрамеры длиной 200 нм. α -Цепь одного димера взаимодействует с β -цепью другого

димера по типу «голова к голове». Спектрин формирует сеть филаментов на внутренней поверхности мембраны, которая поддерживает форму эритроцита. Через анкирин спектрин взаимодействует с цитоплазматическим концом белка полосы 3. Кроме того, он регулирует подвижность интегральных белков [60, 113, 155, 199, 236].

Белок полосы 4.1 – глобулярный белок с молекулярной массой 80 кДа, осуществляющий связи между спектрином и актином, спектрином и гликофоорином С, который служит для прикрепления скелета к мембране [60, 155, 191] (рис.1.3).

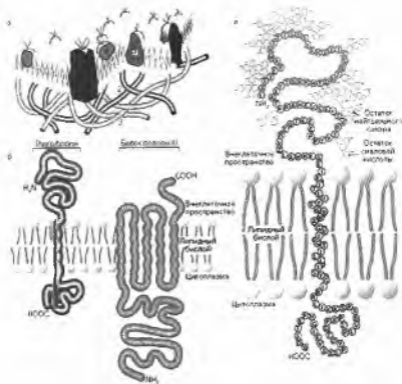


Рис. 1.3. Схема строения мембраны эритроцитов человека [90]:
 а – общий вид; 1 – интегральные белки, 2,3 – элементы цитоскелета;
 4,5 – периферические белки; б – гликофорин и белок полосы 3;
 в – развернутая схема строения гликофорина

Связанные с плазматической мембраной актиновые микрофиламенты определяют архитектуру цитоскелета. Они содержат 12-17 мономеров. Актин в виде олигомеров взаимодействует с N-концом молекулы спектрина и белками 4.1 и 4.9 [60]. С мембранным скелетом связано примерно 60% молекул белка полосы 3 и небольшая часть молекул гликофоринов, содержащихся в мембранном бислое. Остальные молекулы интегральных белков, химически не связанных с цитоскелетом, все же зависят от него. Взаимодействия между ними описываются матричной моделью ингибирования латеральной диффузии белков. Суть ее сводится к тому, что спектриновые молекулы, прилегающие к внутренней поверхности бислоя, разбивают его на ячейки. Молекулы интегральных белков, находящиеся в пределах одной ячейки, не могут покинуть ее за счет латеральной диффузии. При приближении молекул к границе ячейки ее цитоплазматическая часть вступает во взаимодействие со спектриновым филаментом, что препятствует переходу молекулы в соседнюю ячейку. Благодаря этому мембрана эритроцитов сохраняет свою форму [113, 142, 269].

Мембрана выполняет комплекс сложных приспособительных реакций. Ее состояние определяет протекание многих биохимических процессов и является исходным звеном в сложной цепи приспособительных модификаций на всех уровнях организации. В связи с этим чрезвычайно важна роль мембранных липидов и внутриклеточных сигнальных систем в формировании длительного эффекторного и адаптационного ответов клеток [45]. Мембрана эритроцита обладает определенной проницаемостью (ПЭМ). Показатель ПЭМ применяется в диагностике заболеваний, поскольку он обладает гибкой динамикой. На ПЭМ влияют возраст, энергоресурс клетки, осмотическая и кислотная резистентность, уровень эритропоза, гормонов, химический состав плазмы крови, скорость перекисного окисления липидов (ПОЛ), стрессовое состояние организма и др. [140].

Данные электронной микроскопии свидетельствуют о том, что мембранный скелет располагается на определенном расстоянии от липидного бислоя и, по-видимому, взаимодействует с ним. Известны три вида соединений: каждый спектриновый тетрамер может связываться с молекулой белка полосы 3, при этом участвует белок анкирин; актиновый протофиломент может связываться с мембранной частью молекулы гликофорина при участии белка полосы 4.1; и, наконец, возможно непосредственное взаимодействие участков спектриновых филаментов с внутренним слоем липидного бислоя [199]. Кроме периферических

белков, мембрана эритроцитов содержит четыре интегральных белка, среди которых главные – гликофорин А и белок полосы 3 (БП-3), составляющий (как и спектрин) около 25% от всех мембранных белков и представленный $1,2 \times 10^5$ копиями на клетку. С функциональной и структурной точек зрения молекулу БП-3 делят на 2 домена приблизительно одинаковой величины:

мембранный домен, встроенный в липидный бислой и охватывающий около 470 аминокислотных остатков, в основном гидрофобных;

цитоплазматический N-концевой домен (380 аминокислотных остатков), обогащенный остатками кислого характера.

Мембранный цитоскелет поддерживает форму эритроцита и обладает способностью к обратимой деформации. Он состоит из элементарных ячеек, имеющих ядро в виде актинового протофиламента, соединенного со спектриновыми гетеродимерами [236]. Взаимодействие между белками скелета и мембраны определяется уровнем фосфорилирования белковых компонентов цитоскелета, в частности спектрина. Активация процессов фосфорилирования спектрина приводит к упрочению связей в комплексе спектрин-белок 4.1-4.9 и, следовательно, к повышению стабильности мембраны за счет использования энергии АТФ [236]. Структура мембранного скелета поддерживается определенным соотношением АТФ и Ca^{2+} , так как протеинкиназы, осуществляющие фосфорилирование белков, являются кальцийзависимыми ферментами. Известно также, что поверхностная вязкость мембраны понижается при уменьшении содержания спектрина, сокращении мест связывания анкирина и нарушениях, вызванных изменениями белка полосы 4.1 [100]. Эластичность и вязкость мембраны играют очень важную роль в жизнедеятельности эритроцита, определяя его деформируемость.

Способность эритроцитов к изменению формы является важнейшим реологическим феноменом, который обуславливает возможность эритроцитов проходить через капилляры малого диаметра и определяет низкую вязкость крови в более крупных сосудах. Деформируемость зависит как от внешних сил (главным образом сдвигающего напряжения) и скорости сдвига, так и от внутренних факторов: вязкости цитоплазмы, вязкоэластичных свойств мембраны, вязкости раствора внутриклеточного гемоглобина и геометрии клетки (отношения площади к объему) [130]. Поверхностный индекс (избыток площади поверхности клетки по отношению к площади поверхности шара того же объема) у

эритроцита составляет примерно 30%, что позволяет ему чрезвычайно сильно деформироваться [97]. Деформируемость тесно связана с архитектурой мембраны и особенно мембранного скелета, важной особенностью которого является сравнительно малый размер его элементарных ячеек. Расстояние между центрами двух ячеек равно примерно 76 нм, в то время как длина соединяющего спектринового тетрамера близка к 200 нм. Тетрамеры, по-видимому, практически не пересекаются и соединяют только соседние ячейки, так как экспериментально измеряемая толщина мембранного скелета (около 10 нм) близка к толщине одного спектринового филамента. Отсюда следует вывод, что филаменты сильно изогнуты и у них имеется значительный запас длины, которая может изменяться в 2,6 раза. Минимальный диаметр капилляра, через который может пройти эритроцит, составляет 3 мкм. На возможность изменения формы влияет и сам фосфолипидный бислой, обеспечивающий мембране гибкость (текучесть).

Деформируемость эритроцита связана с качественными изменениями состояния гемоглобина, что в свою очередь зависит от активности АТФ-аз, которая регулируется через цАМФ-зависимые протеинкиназы [98]. При нехватке АТФ снижается деформируемость эритроцита, меняется форма клетки и повышается проницаемость мембраны к ионам [43, 85, 113]. Деформируемость эритроцитов понижается при старении, это связано не только с уменьшением энергоресурсов клетки, но и с изменениями в составе мембраны. При старении в мембране эритроцита возрастает содержание холестерина по отношению к фосфолипидам, снижается содержание ненасыщенных жирных кислот, изменяется фосфолипидный спектр и микровязкость мембран [34, 85]. На деформируемость эритроцитов влияют колебания осмотического давления, вызванные изменением концентрации электролитов и белкового состава плазмы.

Многие патологические состояния сопровождаются потерей клетками нормальной деформируемости, что связано с нарушением условий их функционирования. Подробнее это будет рассмотрено в дальнейшем.

Изменение формы эритроцитов во многом определяется также концентрацией ионов кальция внутри клеток и системой поглощения и выведения Ca^{2+} из них. Увеличение концентрации кальция внутри эритроцитарных клеток приводит к образованию эхиноцитов. В эритроцитах содержание Ca^{2+} в норме не превышает 100 мкМ, тогда как общая концентрация кальция в плазме крови поддерживается на уровне

2,48±0,29 мМ, причем примерно 40% от этого количества находится в свободной форме (активный кальций). Такое различие обусловлено низкой пассивной проницаемостью мембран эритроцитов для ионов кальция и функционированием Ca^{2+} -АТФ-азы [6, 16, 64]. Ca^{2+} -АТФ-аза эритроцитов обладает высоким сродством к ионам кальция ($K_m = 0,15-0,5$ мкМ), однако активность фермента низка и скорость транспорта ионов кальция из клетки невелика – 0,5 нмоль/сек. Концентрации кальция выше 1 мкМ в эритроцитах активирует Ca^{2+} -АТФ-азу [81].

При повышении концентрации кальция в цитоплазме ионы Ca^{2+} связываются с ферментом, находящимся в конформационном варианте высокого сродства к иону (E_1 -конформация). Связывание кальция вызывает Ca -зависимый перенос остатка фосфорной кислоты с АТФ на белок с помощью специфической киназы и образование фосфорилированного конформационного варианта АТФ-азы ($E_1\text{-P}$). На этой стадии происходит перестройка фермента в другой конформер – $E_2\text{-P}$, обладающий низким сродством к Ca^{2+} . Результатом становится высвобождение ионов во внеклеточное пространство (плазму крови) [178].

Ca^{2+} -АТФ-аза эритроцитов человека – хорошо изученный фермент, кодируемая аминокислотная последовательность его включает 1220 остатков, формирующих полипептид с молекулярной массой около 135 кДа. В структуре белка присутствуют обширные участки сходства с другими АТФ-азами [178]. Роль N-концевой экспонированной области недостаточно изучена, хотя наличие в ней кластера отрицательно заряженных аминокислотных остатков предполагает ее возможное участие в процессе связывания катионов. С-концевая область фермента играет существенную роль в регуляции активности Ca^{2+} -АТФ-азы. В этой области локализованы кальмодулинсвязывающий, аутоингибиторные центры, остатки серина и треонина, по которым происходит регуляторное фосфорилирование фермента цАМФ-зависимой протеинкиназой. Полагают, что расположенные по обе стороны от кальмодулинсвязывающего участка кластеры отрицательно заряженных аминокислотных остатков могут участвовать в процессах связывания и транслокации катиона, играя роль «селективного фильтра» Ca^{2+} -насоса [81].

Активность Ca^{2+} -АТФ-азы в клетке тонко регулируется. Она, а также сродство к ионам кальция значительно меняются под действием факторов белковой и небелковой природы – низкомолекулярного белка кальмодулина, кислых фосфолипидов, различных ионов, фосфатов. Модулирующее влияние оказывают также цАМФ-зависимые и ДАГ-

зависимые протеинкиназы, протеазы, осуществляющие ограниченный протеолиз [81].

Взаимодействие Ca^{2+} -АТФ-азы с кальмодулином приводит к увеличению сродства фермента к ионам кальция до $K_m = 0,5 \text{ мкМ}$ и десятикратному повышению скорости гидролиза АТФ и транспорта кальция.

Эритроциты содержат два функционально различных пула кальмодулина: один локализованный в цитоплазме, а другой – слабо связанный с мембраной [180]. В мембранном скелете кальмодулин связан со спектрином и усиливает его фосфорилирование через кальмодулин-зависимую спектриназу [95]. Фосфорилированный спектрин в свою очередь активирует процессы формирования гетеродимерных комплексов с актином, что приводит к изменению спектринфосфолипидного взаимодействия и изгибу эритроцитарной мембраны.

В настоящее время был выделен и структурно охарактеризован кальмодулинсвязывающий участок Ca^{2+} -АТФ-азы, для которого обычным является наличие большого числа положительно заряженных остатков лизина и аргинина, гидрофобных аминокислотных остатков, обязательное присутствие триптофана и двух-трех остатков серина [177]. Допускается существование и других областей связывания кальмодулина. Для максимальной активации необходимо и достаточно связывание одной молекулы активатора с молекулой фермента, хотя есть данные об одновременном связывании двух молекул кальмодулина с одной молекулой белка. Расчеты также указывают на наличие двух кальмодулинсвязывающих областей, предположительно с различным сродством к активатору. Причем слабо связанный с мембраной кальмодулин определяет степень активации Ca^{2+} -насоса, тогда как прочно связанный влияет на сродство фермента к ионам кальция [235].

Фосфолипидное окружение Ca^{2+} -АТФ-азы может не только влиять на функциональную и структурную целостность фермента, но и определять возможность его взаимодействия с кальмодулином.

Важнейшим свойством мембран клеток является электрическая прочность, обусловленная величиной поверхностного заряда. Особое значение в формировании поверхностного заряда эритроцитов имеет внешний примембранный слой – гликокаликс, выполняющий в клетке роль катионообменника. К заряду гликокаликса добавляется заряд липидного бислоя, сосредоточенный в некоторых его областях. Между ними существует отталкивание, поэтому заряд мембраны оказывается как бы распределенным в пространстве [183]. Показателем электрической прочности мембраны служит величина потенциала электри-

ческого пробоя (резкого возрастания тока через мембрану). Снижение электрической прочности при изменении свойств липидного бислоя может привести к электрическому пробую, при этом она теряет барьерные функции [183]. В основе явления электрического пробоя лежит самопроизвольное зарождение в липидном бислое водных каналов. Свободная энергия формирования канала зависит от радиуса поры, поверхностного натяжения на границе вода-мембрана и приложенного потенциала. Достижение хотя бы одной порой некоторого критического объема приводит к ее неограниченному росту вплоть до необратимого разрушения всей мембраны [1, 167, 236].

1.2. Структура и функции гемоглобина

Гемоглобин (Hb) является наиболее распространенным пигментом. Он содержится в эритроцитах всех позвоночных и некоторых беспозвоночных животных (черви, моллюски, членистоногие, иглокожие). Многие свойства гемоглобина зависят от особенностей его химического строения. Молекулярная масса гемоглобина эритроцитов человека составляет 64,5 кДа [164].

В одном эритроците находится около 400 млн. молекул гемоглобина. Концентрация гемоглобина такова, что его молекулы заполняют все пространство клетки, и среднее расстояние между ними составляет менее 5 нм. Содержание гемоглобина в крови подвержено индивидуальным колебаниям [175]. В крови здоровых мужчин содержание гемоглобина в среднем 145 г/л, женщин – 130 г/л [226]. Молекула Hb построена из четырех субъединиц, каждая из которых содержит α - или β -полипептидную цепь и гем. Субъединицы упакованы в тетрамере таким образом, что образуют макромолекулу несколько сферической формы длиной 64 Å, шириной 55 Å и высотой 50 Å. Каждая субъединица в одной из своих складок содержит плоское кольцо гема [89].

Гем – циклический тетрапиррол, производное порфирина, в котором в положениях 1, 3, 5, 8 находятся метильные группы, в положениях 2, 4 – винильные, в положениях 6, 7 – остатки пропионовой кислоты. Он имеет форму диска диаметром 15 Å и толщиной 3,7 Å. Гем состоит из четырех замещенных пиррольных колец, соединенных α -метилновыми мостиками, и атома двухвалентного железа [26, 167].

Атом железа соединен с полипептидной цепью через азот имидазольного конца гистидина [26]. Именно железо играет ключевую роль в

деятельности гемоглобина, являясь его активной простетической группой. Одна из его валентностей реализуется при связывании гема с глобином, ко второй присоединяется O_2 или другие лиганды – вода, CO_2 , азиды [164, 221]. Четыре гема ориентированы по отношению к молекуле так, что одним краем каждый гем обращен к внутренней области молекулы, а другим – наружу, в сторону водно-солевой среды.

Глобин (HbA) состоит из двух α - и двух β -полипептидных цепей. Одна пара идентичных субъединиц расположена параллельно друг другу двумя уплощенными вытянутыми сферами, пространство между которыми составляет до 10 Å. Вторая пара идентичных субъединиц по отношению друг к другу располагается также, но почти перпендикулярно первой. Молекула глобина образована 574 аминокислотными остатками, при этом α -цепь состоит из 141, β -цепь – из 146 аминокислотных остатков. Молекулы глобина могут быть образованы различными типами полипептидных цепей (α , β , γ , δ , S и др.) (рис. 1.4). По соотношению субъединиц различают следующие типы гемоглобинов: HbA ($\alpha_2\beta_2$), HbF ($\alpha_2\gamma_2$), HbS (α_2S_2), HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) [26].

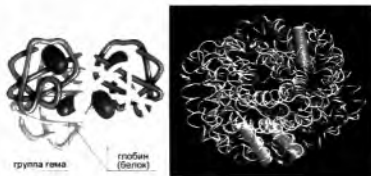


Рис. 1.4. Схема строения молекул гемоглобина [27]

Первичная структура α -цепи отличается от остальных [26]. Вторичная структура представлена восемью спиралями, обозначаемыми буквами от А до Н и соединенными неспиральными участками, в которых цепь делает поворот и оказывается уложенной в пространстве определенным образом. Пространственное расположение спирализованных полипептидных цепей в трехмерном пространстве определяет третичную структуру [154]. Гидрофобные участки размещаются внутри молекулы Hb, а гидрофильные – снаружи. Субъединицы Hb взаимодей-

вуют друг с другом, принимая определенное расположение в пространстве, и формируют четвертичную структуру. Внутри тетрамера существует свободная от атомов полость, пронизывающая всю молекулу по высоте. В полость обращены некоторые полярные группы аминокислотных остатков, среди которых серин и тронин, расположенные вдоль сегмента H цепи α . Многочисленные неполярные участки, образованные остатками глицина, аланина, валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, пролина, цистеина, метионина, тирозина, осуществляют гидрофобные взаимодействия, дающие выигрыш свободной энергии до 1,5 ккал/моль, что делает структуру весьма стабильной. Подобное гидрофобное окружение имеет каждый из гемов, за счет чего влияние водно-солевой среды на присоединение лигандов сведено к минимуму.

В образовании сложной пространственной конформации молекулы гемоглобина большое значение имеет взаимодействие со структурой растворителя. Стабильная структура воды поддерживается водородными связями, которые частично нарушаются, когда в эту среду «вторгается» молекула белка. Вода, связанная с каркасом молекулы, не является чем-то дополнительным в структуре, это обязательный компонент [89].

Основная функция гемоглобина состоит в осуществлении обратимого присоединения кислорода. Высокая структурно-конформационная подвижность молекулы гемоглобина является основой функционально важного кооперативного характера обратимого присоединения кислорода к четырем конформационно взаимосвязанным гемам [238].

Группу атомов, удерживающих O_2 , называют активным центром молекулы Hb. Всего имеется четыре активных центра в каждой гемовой структуре. Каждый гем расположен в складке между двумя спиральными сегментами E7 и F8 через дистальный и проксимальный гистидины. Со стороны дистального гистидина E7 нет прямых связей атома железа с аминокислотными остатками. Координационная связь железа с этой стороны свободна для присоединения лигандов. Но доступ к железу может быть ограничен из-за того, что в непосредственной близости к нему находится группа гистидина E7 и валина E11, где именно помещается кислород. Связывание O_2 с одним центром облегчает присоединение его к другим центрам [76, 77]. Присоединение молекулы O_2 к Hb разрывает некоторые ионные и водородные связи между субъединицами, что способствует более прочному связыванию кислорода [128,

141]. Оксигенация субъединиц Hb происходит последовательно. С кислородом сначала взаимодействуют α -, а затем β -цепи. В местах их контактов структура глобул меняется [26, 153]. При оксигенации тетрамер подвергается конформационным изменениям: α - и β -цепи сдвигаются, α -цепь поворачивается на $9,4^\circ$, а β -цепь — на $7,4^\circ$, но так как вращательные β -оси лежат около поверхности цепей, то в действительности они передвигаются больше, чем α -цепи. Расстояние между атомами железа в β -цепях увеличивается на $6,9 \text{ \AA}$. Молекула гемоглобина, присоединяя кислород, сжимается, а отдавая его, расширяется [76, 89]. Оксигенация субъединиц молекулы гемоглобина происходит не одновременно, а последовательно. Во взаимодействие с кислородом вступают сначала α -, а затем β -цепи. Каждая последующая молекула кислорода присоединяется легче, чем предыдущая. Это обусловлено быстрым переходом субъединиц из напряженной конформации T с малым сродством к кислороду в релаксивную R-конформацию с высоким сродством к кислороду. То же самое, только в обратном порядке, наблюдается при дезоксигенации. Это явление носит название гемового взаимодействия или кооперативного эффекта оксигенации \leftrightarrow дезоксигенации [9, 87, 238].

В процессе оксигенации Hb превращается в оксигемоглобин (HbO_2) без изменения валентности железа. С изменениями в четвертичной структуре гемоглобина связано явление *эффекта Бора*, или уменьшения сродства белка к кислороду при увеличении концентрации протонов. Оксигемоглобин обладает более выраженными кислотными свойствами, чем дезоксиформа. Дезоксигемоглобин способен связывать протоны, то есть обладает более основными свойствами. Различия в кислотно-основных свойствах окси- и дезоксигемоглобина обусловлены имидазольными группами C-концевых гистидинов β -цепей и α -аминогрупп α -цепей. В оксиформе белка эти группы свободны. Дезоксигенация сопровождается конформационными изменениями, которые приводят к образованию водородных связей C-концевого имидазола β -цепи с карбоксильной группой той же самой β -цепи [9, 26, 205, 206].

Количество гемоглобина обуславливает кислородную емкость крови. Она определяется как количество кислорода, связываемое 1 см^3 крови, и для нормальной крови человека равна $0,190 \text{ см}^3 \text{ O}_2$ [45, 160]. Сродство Hb к O_2 выражают парциальным давлением O_2 , при котором Hb насыщен O_2 на 50% (P_{50}). На эту величину влияют напряжение O_2 и CO_2 в крови, концентрация протонов, 2,3-дифосфоглицерата (ДФГ), АТФ, АДФ и неорганических фосфатов в эритроците. Сродство Hb к O_2

уменьшается при увеличении концентрации протонов. 2,3-ДФГ облегчает отдачу O_2 и ускоряет дезоксигенацию Hb [26, 153, 258].

Однако связывание гемоглобина с кислородом не всегда сопровождается сохранением валентности железа. Равновесное связывание O_2 может переключаться на реакцию необратимого аутоокисления Hb до метHb (HbOH), не способного к транспорту кислорода. Если молекула гемоглобина в дезоксисостоянии пребывает долго (чему, в частности, способствует понижение pO_2), то происходит конформационный переход R→T, в результате чего сродство гема к кислороду существенно снижается. В этом случае взаимодействие Fe^{2+} -содержащего гема с кислородом может привести не к образованию исходной системы Hb O_2 , а к окислению железа в состояние Fe^{3+} , в результате чего образуется метгемоглобин и анион-радикал [122,133,161]. У метгемоглобина вместо кислорода 6-е координационное место у железа гема занято молекулой воды. На процесс аутоокисления гемоглобина оказывают влияние различные ионогенные группировки. В частности, протонирование дистального гистидина молекулы глобина приводит к резкому повышению эффективности процесса аутоокисления, так как дистальный гистидин играет стабилизирующую роль, образуя водородную связь с молекулой кислорода. Основной вклад в энергию активации аутоокисления вносит сольватация порфиринового цикла водой. Совпадение значений энтальпий двух процессов позволяет предположить активное участие воды в аутоокислении гемоглобина. Вероятно, реакция аутоокисления гемоглобина представляет собой нуклеофильное вытеснение кислорода в виде супероксидного аниона встраиваемой молекулой воды, которая остается связанной ионом Fe^{3+} в шестом координационном положении, образуя акваметгемоглобин (рис.1.5).

В процессе аутоокисления происходит перенос электрона с железа на O_2 , при этом продуцируются супероксидный анион, который дисмутируется при участии супероксиддисмутазы в H_2O_2 , и гидроксильные радикалы [73]. В крови постоянно содержится 1-2% метHb, связывающего CN^- , OCN^- , SCN^- , N_3^- . метHb образуется при вдыхании окислов азота, паров нитробензола. Некоторые хиноны вызывают образование метHb и включение гема в мембрану клетки. Повышение концентрации метHb приводит к снижению кислородтранспортной функции крови [76, 178].

Окисление Hb индуцирует перекисное окисление липидов (ПОЛ) в мембране. Усиление окисления ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов мембраны вызывает гемолиз эритроцитов [9, 63, 73, 76]. Защита эритроцитов от действия перекисей и радикалов осуществляется с

помощью супероксиддисмутазы (СОД), ускоряющей взаимодействие двух молекул супероксидадикала с образованием H_2O_2 и O_2 . Перекись водорода разлагается каталазой на H_2O и O_2 . Супероксид-дисмутаза, ингибируя ПОЛ в мембранах, проявляет стабилизирующий эффект. Дисмутируя избыток супероксидадикалов, СОД регулирует их содержание в клетке.

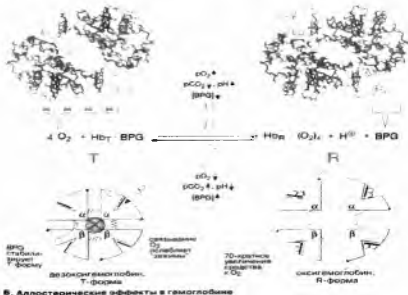
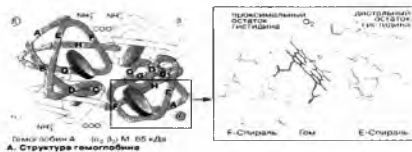


Рис. 1.5. Структура гемоглобина и его превращения при оксидеозигенации [90]

Компоненты нативной эритроцитарной мембраны эффективно защищены от неферментативного ПОЛ самой структурной организацией мембраны, наличием в ней антиоксидантов, а также ферментными системами, регулирующими концентрацию активных форм кислорода (АФК) [11, 18, 40, 63]. Особенности структурной организации мембраны, обеспечивающими некоторую защиту от АФК и продуктов ПОЛ, следует считать расположение в поверхностном монослое трудноокисляемых фосфолипидов и большей части холестерина, а также возможность быстрого обмена окисленных липидов с липидами плазмы крови. К ферментам антиоксидантной системы эритроцитов относятся ферменты, утилизирующие АФК и восстанавливающие гидроперекиси. Количество эритроцитарной СОД в 10 раз превосходит концентрацию, достаточную для полной дисмутации супероксида [276]. Такое количество фермента (как, впрочем, и многих других) может быть объяснено как низкой стабильностью ферментного белка – с одной стороны [68, 240, 276], так и невозможностью обновления из-за отсутствия систем синтеза – с другой. Образующаяся при дисмутации, а также в других процессах перекись водорода подвергается разложению с помощью эритроцитарной каталазы и глутатионпероксидазы. Из эритроцитарных ферментов каталаза занимает первое место по количеству и активности. Роль такого количества и высокой каталитической активности эритроцитарной каталазы в клетках, не имеющих значительного уровня оксигеназных процессов, еще далеко не выяснена [120]. Известно, что эндогенная перекись водорода используется в первую очередь пероксидантными системами эритроцитов, в частности глутатионпероксидазой [14].

Гель-хроматографически выявляется четыре активные фракции каталазы эритроцитов человека: K_1 , K_2 , K_3 , K_4 . Фракция K_1 гомогенна, а фракции K_2 , K_3 , K_4 содержат белок, электрофоретическая подвижность которого соответствует гемоглобину. Во фракциях K_2 - K_4 обнаруживаются тах пики поглощения при длинах волн 414, 541, 570 нм, что соответствует оксиформе гемоглобина. Комплекс каталазы с гемоглобином во фракции K_2 - K_4 достаточно прочен, особенно во фракции K_3 , где связь не разрывается даже при наложении электрического поля [120, 125]. Во всех фракциях ферменты представлены множественными конформерами, отличающимися оптимумами рН, электрофоретической подвижностью, количеством свободных сульфгидрильных групп [120, 125]. Предполагается, что структурные и кинетические различия отдельных молекулярных форм каталазы связаны с различной локализа-

цией их в эритроцитах и с некоторыми особенностями их физиологических функций. В постгемолитическом остатке также содержится особая молекулярная форма каталазы. Возможно, что физиологическая функция связанной с мембраной формы каталазы заключается в защите от эндогенной перекиси водорода.

В самом эритроците всегда присутствует перекись водорода в концентрации около 10^{-7} M. Каталаза совместно с глутатионпероксидазой конкурирует за субстрат, а также принимает участие в метаболизме формиата. Предполагается, что такими свойствами обладает форма каталазы, которая не связана ни с мембраной, ни с гемоглобином и идентифицирована как фракция K_1 . Каталаза, связанная с гемоглобином, возможно, принимает участие в процессах оксигенации и необходима для разложения H_2O_2 , образующейся при переходе оксигемоглобина в метгемоглобин [125]. Данные, полученные при изучении гетерогенности каталазы, поставили под сомнение существование настоящих изоформ (изменение условий элюирования, замена кислорода на азот приводят к объединению фракций) и позволяют рассматривать их как лабильные формы, отличающиеся конформацией молекул и изменением состояния сульфгидрильных групп в структуре. Вполне возможно, что генетическое происхождение всех форм едино, но участки локализации фермента в зрелых клетках и его связи в комплексе с гемоглобином, метгемоглобином и другими ферментными системами эритроцитов ведут к дифференциации свойств с соответствующей перестройкой в структуре молекул фермента.

В лизатах эритроцитов обнаружены три формы каталазы, обозначаемые I, II, III. Основная масса фермента представлена формами I и II, которые, по-видимому, могут переходить одна в другую при соответствующих условиях только частично. Форма III локализована в строме и сосредоточена в основном у поверхности клеток. Роль этой формы скорее всего связана с частичной метгемоглобинизацией молекул гемоглобина, приобретающего при этом повышенное сродство к молекулярному кислороду [125]. Авторами была предложена схема участия каталазы в процессах транспорта кислорода эритроцитами (рис. 1.6) [125].

Перекись водорода также утилизируется в глутатионпероксидазной системе цитозоля эритроцитов [14]. Глутатионпероксидаза катализирует восстановление перекиси водорода за счет окисления глутатиона, а также неспецифически превращает различные гидроперекиси, в том числе липидные, в оксипроизводные, фермент содержит в активном центре атом селена [63].

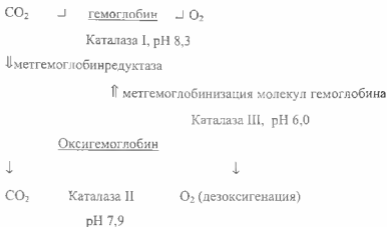
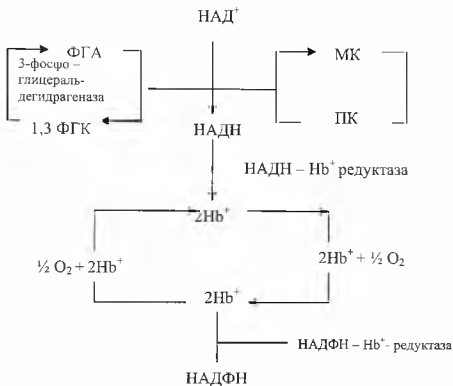


Рис. 1.6. Схема включения трех форм каталазы в процессы оксигенации гемоглобина [124]

В мембранах и цитозоле эритроцитов также содержится фермент, неспецифически восстанавливающий одноэлектронные окислители, подобные феррицианиду [256]. Установлено, что значительная часть мембранного фермента находится в латентной форме и переход его в активную зависит от скорости производства гидроперекисей [67, 256].

Участие метформы гемоглобина в процессе активации ПОЛ не вызывает сомнения, поэтому целесообразно рассматривать метгемоглобинредуктазную систему как компонент антиокислительной системы эритроцитов. Восстановление метгемоглобина в физиологических условиях, при которых ежедневно окисляется около 3% гемоглобина, практически полностью осуществляется НАДН-зависимой метгемоглобинредуктазой. В данном случае в качестве источника НАДН используется гликолитический процесс [13, 14]. Схема ферментной системы восстановления гемоглобина в эритроцитах представлена на рис.1.7.



*Рис.1.7. Восстановление метгемоглобина в эритроцитах [161].
 ФГА – фосфоглицериновый альдегид; МК – молочная кислота;
 ПК – пировиноградная кислота*

Активность и стабильность каждого из ферментов антиокислительной системы взаимосвязаны: известно, что супероксидный анион подавляет активность каталазы и глутатионпероксидазы, а пероксид водорода фрагментирует супероксиддисмутазу и инактивирует глутатионредуктазу.

К неферментативным компонентам АОЗ эритроцитов можно отнести глутатион, α -токоферол, аскорбиновую кислоту [13, 14, 162]. Глутатион – главный компонент резервной восстановительной системы, обеспечивающий структурно-функциональную целостность эритроцита. Данный трипептид, содержащий свободную SH-группу, участвует также в переносе ацильных групп. Сохранение глутатиона в восстановленном состоянии необходи-

мо для предохранения ряда ферментов от инактивации, ограждения мембраны клетки от действия перекисей и гемоглобина от окислительного денатурирования [226]. Окисленный глутатион восстанавливается в глутатионпероксидазной системе, а также с помощью НАДН и НАДФН-зависимых глутатионредуктаз [14,161, 226].

α -Токоферол благодаря специфическому взаимодействию между собственной боковой фитильной группой и жирнокислотными цепями фосфолипидов мембран способен приводить к более плотной упаковке липидов и уменьшению проницаемости мембран для активных форм кислорода (АФК). Кроме того, α -токоферол защищает биомембраны от повреждающего действия свободных жирных кислот за счет комплексования с ними и уменьшает скорость ПОЛ путем нейтрализации АФК и пероксидных радикалов липидов [51].

Все компоненты АОЗ эритроцитов взаимосвязаны и возможно подвергаются тонкой регуляции. Активность и стабильность некоторых ферментов взаимозависимы: известно, что супероксидный анион подавляет активность каталазы и глутатионпероксидазы, а пероксид водорода фрагментирует СОД и инактивирует глутатионредуктазу. Образующийся в ходе свободно радикальных процессов пероксидный радикал HO^{\bullet} с высокой эффективностью разрушает практически все белки, поэтому необходима согласованная работа всех ферментов АОЗ. Механизмы инактивации – активации таких ферментов, как СОД и КТ, еще до конца неизвестны. Является ли вся эритроцитарная СОД активной в нативном эритроците и постепенно инактивируется в ходе катализа или для нее возможно наличие перехода из латентной формы в активную через ограниченный протеолиз за счет специфической протеазы и протеинкиназы, как это происходит в гепатоцитах? [125]. Каковы причины и механизмы переходов гетерогенных форм каталазы? Эти вопросы пока остаются открытыми. Точно не установлены еще и механизмы активации и роль НАДФН-зависимого мембранного фермента, восстанавливающего гидроперекиси липидов. Предполагают, что исчерпание запасов этого фермента может играть роль в процессе старения и апоптозной гибели эритроцитов [260].

In vivo большое значение для АОЗ эритроцитов и их нормального функционирования имеют многие плазменные факторы, например церулоплазмин. Он ингибирует образование супероксидрадикалов значительно сильнее, чем внутриклеточные защитные ферменты СОД и КТ, взятые в той же концентрации [183]. Переход от пероксиданиона к перекиси водорода блокируется серусодержащими аминокислотами метионином, цистеином [148]. Хорошими ловушками радикалов являются алифатические спирты, перекисных радикалов – стероидные гормоны, убихинон, аскорбиновая кислота [148, 272, 281].

Глава 2

Метаболические процессы эритроцитов человека

Эритроцитарная клетка при всей своей физиологической значимости представляет несколько упрощенную по биохимической организации клетку. Зрелые клетки не способны метаболизировать пируват в цикле Кребса, синтезировать белки, нуклеиновые кислоты и липиды *de novo*, однако в этих клетках идет активный метаболизм [14, 15, 70]. В эритроцитах человека содержится более 140 ферментов. Функционирование эритроцитов обеспечивается метаболической активностью ферментов гликолиза, первых реакций пентозофосфатного пути, системы глутатиона и мембранного транспорта [171, 225, 257].

В процессе гликолиза происходит образование АТФ, 2,3-ДФГ и НАДН, который участвует в восстановлении метНв. В пентозофосфатном окислении глюкозы глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа восстанавливает НАДФ в НАДФН, который расходуется на поддержание в восстановленной форме SH-групп белков и глутатиона, что в свою очередь обеспечивает функциональную полноценность систем транспорта ионов и механическую целостность эритроцитов [225, 257].

Глюкоза является основным источником энергии в клетке, 1 мл эритроцитов утилизирует 2 мкмоль глюкозы в час [225]. Энергия, необходимая для многих биохимических процессов, образуется в ходе гликолиза по пути Эмбдена–Мейергофа. В процессе этого окисления расходуется 90% потребляемой эритроцитом глюкозы. Десятая часть ее окисляется в 6-фосфоглюконат, что обеспечивает эритроцит необходимым количеством НАДФН, используемым в других реакциях. Энергия молекул глюкозы используется для поддержания формы эритроцита, активного транспорта катионов через мембрану, предотвращения окисления Нв в метНв и синтеза глутатиона. Основное количество энергии, получаемой при утилизации глюкозы, запасается в молекулах АТФ [13, 14, 15, 225, 257].

Глюкоза проникает в клетку при помощи системы энергозависимого транспорта [10, 117, 146]. Установлено, что в этом принимает участие

белок полосы 3, но определяющая роль в транспортной системе принадлежит полипептиду минорной полосы 4.5.

Скорость проникновения глюкозы зависит от активности ее использования в обменных процессах [219]. Лимитирующим фактором в потреблении глюкозы может быть и проницаемость мембраны, и скорость гликолиза, определяемая интенсивностью гексокиназной реакции (0,2 мМ/л в мин) [266]. Переносчик глюкозы в эритроците не является строго специфичным. Кроме глюкозы, он способен транспортировать D-маннозу, D-галактозу, D-ксилозу, D-рибозу. Связывание сахара переносчиком происходит при помощи трех экваториальных ОН-групп. Предполагается наличие специфического липидного окружения белков-переносчиков в мембране эритроцита. Связывание сахара и переносчика сопровождается изменением конформации этой транспортной системы в мембране [199]. На транспорт глюкозы и сопряженные с ним ее ферментативные превращения оказывает влияние концентрация ионов Na^+ в среде. Увеличение внеклеточной концентрации Na^+ усиливает транспорт глюкозы в клетки [221], так как транспортный белок переносит ее в симпорте с ионами натрия. Кинетика переноса глюкозы через мембраны эритроцитов человека подчиняется зависимости Михаэлиса-Ментен.

Путь Эмбдена-Мейергофа осуществляют 13 ферментов вместо 11 за счет присутствия шунта Люберинга-Рапопорта (2,3-ДФГ-цикл, включающий два фермента – 2,3-ДФГ-мутазу и 2,3-ДФГ-фосфатазу). Превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат катализирует гексокиназа (ГК). Она имеет наименьшую активность среди ферментов гликолиза, а значит, определяет его скорость. Ингибируется гексокиназа 2,3-ДФГ и избытком АТФ. Фосфофруктокиназа (ФФК), катализирующая превращения фруктозо-6-фосфата во фруктозо-1,6-фосфат, ингибируется 2,3-ДФГ, АТФ и стимулируется АМФ, АДФ, фруктозо-1,6-дифосфатом, глюкозо-6-фосфатом и остатками фосфорной кислоты. Превращение глюкозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат снимает ингибирование ГК и активирует ФФК. Пируваткиназа (ПК) также ингибируется 2,3-ДФГ и АТФ [221].

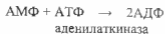
Предполагается существование таких форм надмолекулярной организации гликолиза, как «гомогенный суп» (когда все ферменты гликолиза находятся на расстоянии 60 нм друг от друга), адсорбция ферментов на мембране (когда ферменты гликолиза, взаимодействуя с белками мембраны, адсорбируются на ее внутренней поверхности), метаболон (когда все или часть ферментов гликолиза образуют скопление, адсор-

бирванное на мембранных белках или свободно плавающее в объеме эритроцита) [199, 225]. Ансамбль гликолитических ферментов обеспечивает полную трансформацию глюкозо-6-фосфата. Роль якорной площадки, обеспечивающей фиксацию гликолитического метаболита на мембране эритроцита, играют тримеры белка полосы 3 [129]. Сборка метаболита и диссоциация ферментов из ансамбля контролируются соотношением метаболитов и зависят также от конформации белка полосы 3.

Отличительной особенностью метаболизма эритроцитов является наличие 2,3-дифосфоглицератного шунта (Люберинга-Рапопорта). 2,3-ДФГ, являясь основным лигандом, уменьшающим сродство гемоглобина к кислороду, связывает кислородтранспортную функцию эритроцитов с энергетическим метаболизмом клетки. Дифосфоглицератный шунт не имеет энергетической ценности, поскольку образование 2,3-ДФГ идет в обход фосфоглицераткиназного этапа. При образовании одного моля 2,3-ДФГ из одного моля глюкозы синтез АТФ снижается с двух до одного моля. Количество 2,3-ДФГ зависит от конкуренции 2,3-ДФГ-фосфатазы и 2,3-ДФГ-мутаза, которая ингибируется избытком 2,3-ДФГ. 2,3-ДФГ-фосфатаза гидролизует 2,3-ДФГ с образованием 3-фосфоглицерата и фосфата, а 2,3-ДФГ-мутаза катализирует превращение 1,3-ДФГ в 2,3-ДФГ. Продукция 2,3-ДФГ зависит от pH среды. Сдвиг в щелочную сторону активизирует продукцию 2,3-ДФГ, поскольку усиливает процесс гликолиза. Ацидоз действует противоположным образом. Накопление в эритроцитах свободного 2,3-ДФГ и снижение внутриклеточного pH вызывает угнетение гликолиза. Следовательно, когда Hb в оксигенированном состоянии, гликолиз и образование 2,3-ДФГ в клетке замедляется. 2,3-ДФГ является резервом фосфатов в клетке, способствует поддержанию pH, уровня Na^+ , предотвращает окисление Hb в метHb, увеличивая содержание НАДН в эритроцитах [153, 225, 258].

Поддержание оптимальной концентрации АТФ – главная задача регуляции энергетического обмена эритроцитов. В клетке скорость производства АТФ всегда меньше удвоенной скорости потребления глюкозы из-за существования дифосфоглицератного шунта и гексозомонофосфатного шунта (ГМФС) [13]. Поддержание уровня АТФ в эритроцитах обеспечивается двумя метаболическими системами. Одна из них – гликолиз, в ходе которого из АДФ и ортофосфата синтезируется АТФ. Вторая система – метаболизм пуринов, определяющий концентрацию адениловых нуклеотидов в клетке. Аденозин может включиться в прямой путь синтеза адениловых нуклеотидов. В этом случае аде-

нозин фосфорилируется в АМФ при участии аденозинкиназы. Под действием аденилаткиназы АМФ превращается в АДФ.



Энергия АТФ расходуется на работу ионных насосов, поддержание концентрации Ca^{2+} в клетке и на многие другие энергозависимые процессы [14, 15, 71].

Гексозомонофосфатный шунт расходится с гликолизом на уровне глюкозо-6-фосфата и после дегидрогенирования и декарбоксилирования продуцирует пентозофосфаты, которые затем превращаются в фруктозо-6-фосфат и 3-фосфоглицеральдегид (ФГА). Окисление глюкозо-6-фосфата приводит к восстановлению НАДФ. В норме доля глюкозы, утилизируемой по гексозомонофосфатному шунту, не превышает 10%. Однако она увеличивается с понижением pH, и при $\text{pH} \leq 7,0$ по ГМФШ утилизируется 50% глюкозы [13]. Причем установлено, что это средний процент для популяции эритроцитов с нормальным соотношением молодых и старых форм клеток, то есть для молодых эритроцитов характерно преимущественное (75%) окисление глюкозы по пентозофосфатному пути. Оба пути тесно связаны между собой через ряд общих ферментных стадий. Гексокиназа является первым ферментом обеих систем и лимитирует скорость суммарного потока.

В пределах физиологических значений концентраций АТФ и НАДФН путь Эмбдена-Мейергофа и ГМФШ функционируют независимо. Однако когда концентрация НАДФН снижается до 80% от физиологического значения, система стабилизации концентрации АТФ перестает функционировать. Поток через пентозофосфатный путь определяется скоростью глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакции [13, 225].

2.1. Функциональная активность эритроцитов

Важнейшей всеобъемлющей функцией крови является осуществление и обеспечение гомеостаза. Главная роль в поддержании гомеостаза принадлежит эритроцитам, основные функции которых – кислород-транспортная и адаптивно-компенсаторная. Эритроцитарные клетки не только транспортируют кислород и углекислый газ, но и регулируют кислотно-щелочное равновесие [149], транспортируют и инактивируют многие гормоны и медиаторы [127, 181], принимают участие в ликви-

дации избытка глюкозы и холестерина [61], адсорбции и инактивации ядов и ксенобиотиков [52]. Наконец, в настоящее время имеются данные о том, что протеолитическая деградация гемоглобина в эритроцитах приводит к образованию биологически активных пептидов [99].

Транспорт кислорода и углекислого газа. Появление белков, а затем и клеток, транспортирующих кислород, обусловлено необходимостью снабжения тканей конечным акцептором электронов в процессах биологического окисления. Биологические системы эволюционировали по пути создания эффективного транспортного белка и высокорегулируемого процесса присоединения и отдачи кислорода.

Физиологическое значение эритроцитов прежде всего заключается в адекватном потребностям организма транспорте кислорода и поддержании на достаточно высоком уровне pO_2 в капиллярах микроциркуляторного русла. Эритроциты также транспортируют около 15% углекислого газа, связанного непосредственно с гемоглобином по свободным аминокетильным группам с образованием карбаминальных групп. Остальные 85% транспортируются плазмой в виде бикарбонатов натрия. Для оценки транспорта кислорода кровью обычно используют показатель, определяемый как произведение содержания кислорода в артериальной крови на скорость кровотока.

На начальном этапе транспорта кислорода в легких гемоглобин почти полностью оксигенируется и стабилизируется в R-конформации:



Высокое парциальное давление кислорода приводит к сдвигу равновесия в реакции в сторону образования оксигемоглобина, а увеличение количества протонов ведет к образованию угольной кислоты и разложению ее под действием карбоангидразы на углекислый газ и воду. Уменьшение содержания HCO_3^- в плазме усиливает его вход через анионный канал в эритроцит и выход Cl^- (обратный хлоридный сдвиг) в плазму. Карбонатный анион связывает свободные протоны, образовавшиеся в результате оксигенации гемоглобина, а расщепление угольной кислоты карбоангидразой и одновременное выведение углекислого газа через альвеолы сопровождается изменением pH внутри клеток (щелочной эффект Бора), увеличивает сродство гемоглобина к кислороду и способствует быстрой оксигенации. На перемещение молекулярного кислорода внутри эритроцита могут влиять диффузия растворенного в цитоплазме кислорода и оксигемоглобина, а также их конвекция в движущейся крови, причем относительное значение внутри-

клеточной конвекции кислорода и оксигемоглобина, по данным, полученным *in vitro*, оказывается выше, чем диффузионного транспорта [153, 280]. Диффузионная дистанция кислорода внутри эритроцита зависит от его формы и размеров [77, 85].

В тканях образующийся в процессах биологического окисления углекислый газ диффундирует в плазму крови и путем диффузии поступает по градиенту концентрации в эритроциты, где углекислый газ соединяется с водой под действием карбоангидразы. Диссоциация угольной кислоты приводит к образованию протонов и бикарбонатных анионов. Избыток протонов сдвигает равновесие в реакции оксигенации гемоглобина в сторону дезоксигенации.

Процесс дезоксигенации значительно ускоряется под действием 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ). По данным авторов [152, 85], лишенные 2,3-ДФГ эритроциты отдавали кислород значительно медленнее, чем при его наличии в обычной, характерной для зрелых эритроцитов концентрации.

Физиологическое значение 2,3-ДФГ заключается в уменьшении сродства гемоглобина к кислороду, ускорении перехода субъединиц из R-конформации в T-конформацию и стабилизации молекулы в этом конформационном варианте. Кроме 2,3-ДФГ, сродство гемоглобина к кислороду постоянно изменяется под действием различных компонентов внутриэритроцитарной среды. По выраженности влияния на сродство гемоглобина к кислороду лиганды распределяются следующим образом: 2,3-ДФГ > АТФ > АДФ > анионы фосфорной кислоты > другие анионы. К числу главных и постоянно действующих физиологических лигандов относят только O_2 , H^+ , CO_2 и 2,3-ДФГ.

2,3-Дифосфоглицерат, являясь основным лигандом, уменьшающим сродство гемоглобина к кислороду и регулирующим процесс оксигенации – дезоксигенации, связывает кислородтранспортную функцию эритроцитов с энергетическим катаболизмом клетки. Регуляция осуществляется сложным взаимодействием различных лигандов, основным является, вероятно, соотношение протонов и анионов (преимущественно фосфатов). Предполагается, что повышение уровня протонов ведет к снятию ингибирования с 2,3-дифосфоглицератмутазы и обеспечивает ускорение превращения 1,3-ДФГ в 2,3-ДФГ, что усиливает диссоциацию оксигемоглобина в дезоксиформу [153].

В то же время повышение содержания протонов увеличивает восстановительный потенциал клетки и тормозит процессы окисления по принципу обратной связи. По последним данным, не исключается ре-

гуляция за счет непосредственного активирующего влияния оксигемоглобина на фермент гликолиза – глицеральдегидфосфатдегидрогеназу [258] (рис.2.1).

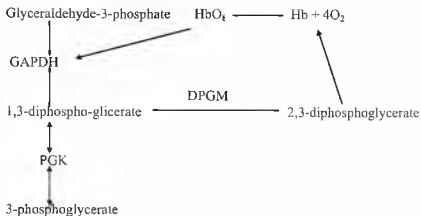


Рис.2.1. Схема регуляции производства 2,3-дифосфоглицерата через активацию глицеральдегидфосфатдегидрогеназы непосредственно оксигемоглобином [257].

GAPDH – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа;

PGK – фосфоглицераткиназа; DPGM – дифосфоглицератмутаза

Кроме главной функции – изменение сродства гемоглобина – 2,3-ДФГ является важнейшим анионом, уравнивающим внутриклеточный Na^+ , выступает в качестве буферного агента, поддерживающего стабильный pH и обмен внутриклеточной среды [86].

Участие эритроцитов в процессах сохранения гомеостаза. В начале прошлого века Пауль Эрлих впервые высказал мысль о более широкой физиологической роли эритроцитов, чем только участие в транспорте газов [118, 121]. В настоящее время это подтверждено данными многих исследователей. Установлено, что эритроциты участвуют в транспорте гормонов, адсорбции ядов, патогенных комплексов, которые затем разрушаются клетками ретикулоэндотелиальной системы [52, 127].

Сохраняемый в клетке сложный рецепторный аппарат позволяет эритроцитам связывать избыток гормонов, выделяемых в кровь. Важнейшей адаптивной функцией эритроцитов является связывание избытка адреналина β -рецепцией данных клеток.

В эритроцитах постоянно содержится 1-2% метHb, связывающего CN^- , OCN^- , SCN^- , N_3^- , что способствует утилизации этих агрессивных в химическом отношении анионов.

В настоящее время известно, что мембранные белки эритроцитов, а также гемоглобин легко подвергаются реакции гликирования, связывая избыточное количество глюкозы из плазмы крови.

Интересен тот факт, что эритроциты, будучи инсулиннезависимыми клетками, способны к переносу и депонированию инсулина. Образование комплекса инсулина с эритроцитами создает оптимальные условия для циркуляции и транскапиллярного переноса гормона за счет тесного контакта эритроцитов с эндотелием капилляров. Связывая избыток инсулина и отдавая его при повышении потребности в нем, эритроциты стабилизируют активную концентрацию гормона и сглаживают ее резкое изменение при физиологических сдвигах в его секреции и метаболизме. В подавляющем большинстве случаев выход инсулина из эритроцитов наблюдается при гипергликемии и лактатемии [145].

Эндокринная активность эритроцитов. Различные экстремальные состояния сопровождаются неспецифическим накоплением в крови гетерогенной группы соединений пептидной природы, молекулярная масса которых колеблется от 300 до 5000 Да. Это «средние молекулы», являющиеся продуктами распада белков [50, 86, 99, 103, 107, 108]. Они действуют как вторичные эндотоксины, вызывая угнетение многих функциональных процессов [50, 86, 234]. «Средние молекулы» обладают адаптогенными эффектами, направленность которых определяется их молекулярно-массовым распределением. Относительно высокополимерные «средние молекулы» оказывают иммуностимулирующее и стресс-протекторное действие. Кроме того, они повышают устойчивость к физическим нагрузкам [47, 108]. Основным источником образования молекул средней массы – усиление протеолиза, который является особой формой биологического контроля и быстрым ответом клеток на изменяющиеся условия [99, 132, 134]. В настоящее время выделено более 1000 различных биологически активных пептидных молекул. Как оказалось, эндогенные пептидные биорегуляторы имеют специфический неактивный белок-предшественник, из которого выщепляются биологически активные пептиды в результате процессинга, катализи-

руемого трипсिनоподобными ферментами. Секретируемые пептиды взаимодействуют со специфическими рецепторами клеточных мембран, оказывая многочисленные физиологические эффекты [78, 99, 108, 109, 229].

Выделено более 200 эндогенных пептидов, являющихся N- и C-концевыми фрагментами α - и β -цепей гемоглобина. Установлена аминокислотная последовательность и структура 33 пептидных фрагментов внутриэритроцитарной деградации гемоглобина. Авторами предложена модель постадийного расщепления цепей α - и β -глобинов. Первичные стадии внутриэритроцитарной протеолитической деградации Hb связаны с конформационной перестройкой, сопровождающей отщепление гема. В отсутствие гема цепи Hb претерпевают пространственную перестройку и становятся доступными для действия протеолитических ферментов. Участки расщепления цепей глобинов – Ala⁷¹-...-Leu⁸³ - для α -цепи и –Met⁵⁵-...-Leu⁸⁸ - для β -цепи. Первичное расщепление характеризуется равной вероятностью разрыва цепи по нескольким аминокислотным остаткам. Обнаруживается в эритроцитах и карбоксипептидазная активность, приводящая к появлению серии укороченных с C-конца на 1 остаток пептидов. Об этом свидетельствует существование фрагментов α -(1-33), α -(1-32), α -(1-30), α -(1-29). Участок расщепления в β -цепи – Met⁵⁵-...-Leu⁸⁸. Содержание в эритроцитах фрагментов β -глобина в 5 раз меньше, чем пептидов из α -цепи Hb [50, 96, 230].

Таким образом, на данный момент является очевидной потенциальная способность эритроцитов выполнять функции железы внутренней секреции, продуцирующей регуляторные пептиды широкого спектра действия [99]. Однако на механизм образования коротких пептидных молекул существует несколько точек зрения. По одной из них, пептиды образуются внутри эритроцитов, а затем выводятся из клеток. В этом случае скорость экскреции должна быть сравнима со скоростью их образования. По другой, из эритроцитов экскретируются длинные фрагменты, из которых затем в плазме образуются короткие пептиды. Существует также точка зрения, по которой образование коротких пептидов из длинных предшественников связано с действием на них мембраноассоциированного ферментативного комплекса при их прохождении через мембрану [50, 99, 229, 257]. Однако механизмы активации данного комплекса ферментов могут оказаться различными. Возможно, часть ферментов может активироваться в условиях ускорения ПОЛ и деградация фосфолипидного бислоя. Также активация протеаз может

происходить в условиях действия различных сигнальных молекул, что и стало предметом проводимых нами исследований [108, 109].

Многие внутриэритроцитарные пептидные молекулы являются аналогами природных биорегуляторов. Причем даже значительные модификации структуры молекул олигопептидов могут не влиять на способность связываться с соответствующими рецепторами. Обычно небольшие изменения структуры пептидов негативно сказываются на их биологической активности, однако перемены Phe-Tyr, Glu-Asp, Arg-Lys практически не отражаются на способности связывания пептидов с рецепторами. Это означает, что активностью природных биорегуляторов могут обладать молекулы средней массы, обнаруживающие лишь частичное сходство с ними или их активными фрагментами [50].

«Средние молекулы» ингибируют многие метаболические процессы (дыхание митохондрий, синтез ДНК в гепатоцитах, лимфоцитах, синтез и утилизацию глюкозы, синтез Hb, активность лактатдегидрогеназы и т.д.), нарушают процессы транспорта аминокислот, выведения креатинина, функции форменных элементов крови, угнетают процессы Е-розеткообразования лимфоцитов, ингибируют миграцию лейкоцитов и агрегацию тромбоцитов, эритропоэз. Молекулы средней массы ингибируют фагоцитарную активность лейкоцитов, пролиферацию фибробластов, разобщают окисление и фосфорилирование, ингибируют активность гексокиназы, пируваткиназы, аденилатциклазы, транскетолазы, нарушают регуляцию дыхания адениловыми нуклеотидами [50, 65]. Кроме того, многие пептиды обладают опиоидным действием [170]. Они проявляют неспецифический мембранотропный эффект, связываясь с липофильными структурами мембраны. Поверхностно-активные пептиды снижают электрическое сопротивление мембран. «Средние молекулы» уменьшают осмотическую устойчивость эритроцитов, нарушая K^+ , Na^+ -баланс, угнетая активность K^+ , Na^+ -АТФ-азы [43, 50]. Под влиянием некоторых пептидных молекул ингибируется глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, поддерживающая необходимый уровень НАДФН в клетке [47, 50].

2.2. Сигнальная система эритроцита человека.

Производство пептидов внутри клетки в условиях действия сигнальных молекул

Сигнальная система эритроцитов представлена сложным рецепторным аппаратом, который включает в себя значительное количество адренорецепторов, рецепторов к инсулину, различным классам иммуноглобулинов. Эритроциты человека имеют рецепторы для связывания липопротеинов низкой плотности (ЛНП), но их сродство и специфичность относительно низки ($K -1,1 \times 10^{-6}$ М). Одна клетка содержит примерно 200 таких рецепторов. В отличие от специфических рецепторов лимфоцитов и фибробластов, эритроцитарные рецепторы не требуют для своей работы ионов Ca^{2+} . Этот факт позволяет предположить, что взаимодействие ЛНП с эритроцитарной мембраной носит характер неионной адсорбции [140].

Ведущую роль в сигнальной системе эритроцитов выполняют адренорецепторы, которые сопряжены с ГТФ-зависимыми белками. Эти рецепторы обычно распределены на мембране случайным образом. После действия лиганда происходит инвагинация клеточной мембраны (рецептор-индуцируемый эндоцитоз) в месте окаймленной ямки (поры), с отшнуровыванием «детой» в кластриновую оболочку везикулы. Эта везикула, теряя кластриновую оболочку, трансформируется в рецептосому. Оболочка из белка кластрина возвращается к окаймленным ямкам на поверхности клетки [48, 171, 263].

Катехоламины действуют через два главных класса рецепторов: α -адренергические и β -адренергические. Каждый из них подразделяется на два подкласса. Эта классификация основана на относительном порядке связывания с различными агонистами и антагонистами. α -Адренорецепторы имеют уровень чувствительности к адреналину $>$ норадреналину $>$ изопротеренолу, а β -адренорецепторы чувствительны к изопротеренолу $>$ адреналину $>$ норадреналину. Адреналин связывается как с α -, так и с β -рецепторами, и поэтому его действие на ткань, содержащую рецепторы обоих классов, зависит от относительного сродства их к гормону [263]. Норадреналин связывается главным образом с α -рецепторами [155].

Рецепторы этих подклассов сопряжены с аденилатциклазной системой. Гормоны, связывающиеся с β -рецепторами, активируют аденилатциклазу, а гормоны, ассоциированные с α -рецепторами, ингибируют ее. У эукариотических организмов связь между рецептором и аденилатцик-

лазой осуществляется через ГТФ-зависимые белки (G-белки) [155, 217, 226]. Когда G-белок активируется комплексом гормон-рецептор, он одновременно связывает молекулу ГТФ, после чего и приобретает возможность либо ингибировать (G_i), либо активировать (G_s) аденилатциклазу. При этом эффект сохраняется, пока цела молекула ГТФ, и исчезает при гидролизе ее в ГДФ. Функция G_s -белка зависит от его субъединичной структуры. В его состав входят три полипептида: α -цепь ($G_{\alpha s}$), которая связывает ГТФ и активирует аденилатциклазу, и прочный комплекс β -цепи и γ -цепи, закоряивающий G_s на внутренней стороне цитоплазматической мембраны. В своей неактивной форме G_s существует как тример, с α -цепью которого связана ГДФ. При активации рецептора ГДФ меняется на ГТФ, в результате чего субъединицы разделяются. $G_{\alpha s}$ связывается с аденилатциклазой, активирует ее, и начинается синтез цАМФ [155, 263, 274]. Последняя фосфорилирует цитоплазматические белки, одним из которых является цАМФ-зависимая протеинкиназа А (РКА), каскадно фосфорилирующая по остаткам Ser и Thr молекулы других белков, выполняющих разнообразные функции. Менее чем за минуту $G_{\alpha s}$ гидролизует ГТФ до ГДФ, что приводит к отделению $G_{\alpha s}$ от аденилатциклазы и восстановлению неактивной формы G_s -белка [155, 217].

Одна и та же молекула может как повышать, так и понижать концентрацию цАМФ в зависимости от типа рецептора, с которым она связывается. Например, β -адренергические рецепторы повышают ее, а α_2 -адренергические – понижают. Это связано с тем, что последняя группа рецепторов действует не через активирующий, а через ингибирующий белок G_i , имеющий другую α -цепь ($G_{\alpha i}$) [154, 155, 226, 246].

Адренорецепторы эритроцитов по строению и структуре не отличаются от адренорецепторов других клеток [34, 154, 246]. Адренорецепторы – конформационно лабильные структуры. Их способность специфически связывать лиганды и трансформировать полученный сигнал зависит от присутствия или отсутствия одно- и двухвалентных ионов, циклических нуклеотидов и других низкомолекулярных соединений. Кроме того, адренорецепторы являются также динамическими структурами. Число адренорецепторов одного класса, соотношение между классами и подклассами, сопряжение адренорецепторов с определяющими их функциональную активность ферментами и другими регуляторными структурами в клетках могут меняться в процессе дифференцировки ткани, а также при изменении гормонального фона и воздействии различных физиологических и патологических факторов [42, 198].

Установлено, что связывание катехоламинов с β -адренорецепторами осуществляется благодаря ионному взаимодействию азота с Asp¹¹³ в третьем трансмембранном домене, а также ароматических гидроксильных групп с Ser²⁰⁴ и Ser²⁰⁷ в пятом трансмембранном домене. Связывание агониста с рецептором вызывает изменение его конформации, что активирует сопряженный с рецептором G-белок [246]. Под действием катехоламинов меняется деформируемость эритроцитов, возрастает их агрегация и осмотическая резистентность, однако активируется гликолиз [118, 160, 214, 262, 278].

Известен феномен «потери специфической чувствительности», заключающийся в исчезновении способности ткани реагировать на какой-нибудь препарат или гормон после длительной экспозиции ткани в повышенной концентрации этого соединения [42, 188]. Значительное снижение чувствительности аденилатциклазной системы у животных, получавших катехоламины, сопровождается соответствующим уменьшением концентрации мест связывания рецептора [48, 188, 217]. По другим данным, ухудшение чувствительности может быть вызвано уменьшением сродства рецептора к гормону либо изменением вязкости мембраны в местах окаймленных ямок [32, 48].

В первом случае понижающая регуляция (десенситизация) осуществляется путем связывания рецепторов в клетке, то есть отделения их от других компонентов системы клеточного ответа, в частности от регуляторной и каталитической субъединиц аденилатциклазы. Второй механизм десенситизации рецептора – ковалентная модификация рецепторов путем фосфорилирования. Это цАМФ-зависимый процесс, который не сопряжен с изменением числа рецепторов или их перемещением [23, 32, 155, 217]. Значительное уменьшение чувствительности адренорецепторов наблюдается при старении эритроцитов. Это связано как с энергетическими ресурсами клетки, так и с особенностями модификаций в мембране эритроцита, ухудшающими работу рецептора [34, 48, 144].

Рецепторы совершают медленные продольные движения. При этом во много раз возрастает частота столкновений гормон-рецепторных комплексов и возможность их олигомеризации, в результате которой уже через несколько минут после экспозиции клетки с гормоном в мембране образуются микрокластеры, включающие 2-10 гормон-рецепторных комплексов. Затем могут образовываться макрокластеры, состоящие из 11-100 мономерных единиц. Такая макрокластеризация начинает формировать в мембране впячивания, которые по мере созревания выстилаются белком кластрином. Эта структура в дальнейшем

способна отрываться от мембраны и интернализироваться внутрь клетки в виде эндосомы [155]. Таким образом, длительное связывание β -адренорецепторами агонистов имеет регуляторное значение: в результате уменьшается количество активных рецепторов, а значит, и тканевая чувствительность к катехоламинам [42, 188].

Поскольку мы предположили, что активация протеаз может осуществляться специфическими мембранными протеинкиназами, активность которых в свою очередь может зависеть от концентрации цАМФ, были проведены исследования скорости образования и изучены спектры пептидных соединений в условиях действия лиганда и блокатора адренорецепторов эритроцитов человека.

Блокаторы β -адренорецепторов представляют собой гетерогенную группу лекарственных препаратов, отличающихся по активности, продолжительности действия и биоусвояемости. Важной особенностью β -блокаторов является то, что их связь с β -рецептором обратима. Поэтому блокада рецептора может быть всегда преодолена путем увеличения дозы агониста. Все β -блокаторы состоят из изопреналиноподобной боковой цепи с различными ароматическими ядрами [136, 147, 214]. Некоторые β -блокаторы оказывают только блокирующее действие на β -рецептор, другие проявляют одновременно некоторое стимулирующее действие, то есть обладают внутренней симпатомиметической активностью [136]. β -Блокаторы вызывают подавление ионных токов. В случае Ca^{2+} -тока это связано с воздействием на Ca^{2+} -каналы или на аденилатциклазу, воздействие на Na^{+} -ток объясняется их неспецифическим связыванием с липидами мембраны. Кроме того, β -блокаторы стабилизируют мембраны, оказывая неспецифическое хиноноподобное действие [105, 173].

Результаты исследований показали, что инкубация гетерогенной популяции эритроцитов, выделенных из донорской крови, в течение 20 минут при температуре 37°C не сопровождается увеличением содержания пептидов в условиях активации адреналином и/или блокады обзиданом β -адренорецепторов. Однако при разделении фракции на молодые и старые клетки, а также уменьшении времени воздействия лиганда и антагониста до одной минуты добавление адреналина приводит к появлению пика увеличения содержания пептидов около 40% от контрольной пробы. Обзидан в присутствии лиганда частично блокирует этот эффект. Фракция старых клеток обнаруживала лишь тенденцию к повышению уровня пептидных соединений под действием адреналина [107, 108]. Наиболее четко эффект активации образования пептидов в

эритроцитах выявляется под действием адреналина в концентрациях, близких к физиологическим. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что активность примембранного комплекса протеаз зависит от скорости производства цАМФ, состояния мембраны эритроцита и энергоресурсов клеток.

Добавление в фракции молодых и старых эритроцитов экзогенного цАМФ не дали достоверного увеличения пептидных соединений в клетках, если использовать для обнаружения пептидов метод Лоури. Мы предположили, что при действии цАМФ экзогенно происходит образование более коротких пептидов, что сопровождается уменьшением пептидных связей, и метод Лоури при этом неэффективен. Вероятно, поступающий с экстрацеллюлярной стороны цАМФ активирует протеазы, расположенные в мембране, и они расщепляют пептиды на более короткие при выходе из клетки. Подобный факт укорочения пептидов при выходе из клетки наблюдали также А.А. Карелин и соавт. (1998) [99].

Исследование спектров пептидных соединений с помощью хроматографии показало их достоверное увеличение во фракции молодых эритроцитов при добавлении 200 мкг/мл цАМФ на 87%. Кроме того, пик, характерный для всех проб, приходился на первые 6 мл элюирования, что свидетельствует о присутствии пептидных соединений сходной длины.

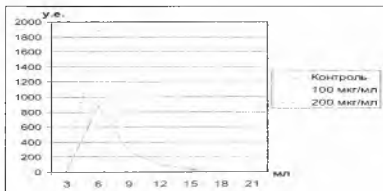


Рис. 2.2. Гель-хроматография экстрактов фракции молодых эритроцитов после воздействия экзогенного цАМФ

Хроматограммы пептидных соединений, полученных при добавлении цАМФ во фракцию старых эритроцитов, принципиально ничем не отличались от проб молодых эритроцитов. Наблюдалось лишь менее выраженное увеличение концентрации пептидных соединений (на 37%) при добавлении 200 мкг/мл цАМФ.

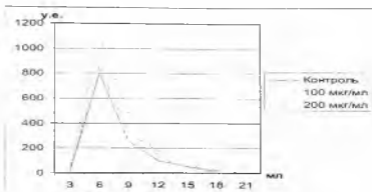


Рис. 2.3. Гель-хроматография экстрактов фракции старых эритроцитов после воздействия экзогенного цАМФ

Отсутствие существенных различий при воздействии на старые и молодые клетки объясняется экзогенным введением вторичного посредника, а не скоростью образования его внутри клетки. Так как предшественником цАМФ в клетках является АТФ, мы исследовали генерацию пептидов в эритроцитах при введении экзогенного АТФ.

При добавлении 100 и 200 мкг/мл АТФ во фракции молодых эритроцитов наблюдалось достоверное увеличение содержания пептидных соединений на 38 и 60% соответственно. Сходные результаты имели место и при использовании старых клеток. Таким образом, полученные данные доказывают, что скорость образования пептидов зависит прежде всего от ресурсов АТФ в клетках, а активация протеаз опосредована через цАМФ-зависимые протеинкиназы.

Глава 3

Старение и гибель эритроцитов. Влияние условий функционирования на срок жизни эритроцитов

Лишенные собственных систем обновления клеточных структур и компонентов метаболизма, эритроциты, попадая в кровоток, постепенно дезинтегрируются и подвергаются элиминации. Продолжительность эффективного функционирования красных кровяных клеток зависит от многих факторов. В условиях стойкого сдвига гомеостаза (патологический гомеостаз), действия ксенобиотиков, лекарственных препаратов популяция эритроцитов повреждается быстрее, что становится одной из причин усугубления нарушений гомеостаза.

Установлено, что старение эритроцитов негативно сказывается на активности аденилатциклазы и фосфодиэстеразы. При этом снижение активности не сопровождается изменением плотности и сродства β -адренорецепторов. Предполагается, что это связано с изменениями свойств одного из белков, приводящими к нарушению проведения сигнала от адренорецептора к каталитической субъединице аденилатциклазы [34].

3.1. Эритроцитарные популяции в условиях гипоксии и лактоацидоза

Условия гипоксии и лактоацидоза развиваются при различных физиологических и патологических состояниях: сердечно-сосудистых заболеваниях, физических нагрузках, подъеме на высоту, анемиях. При высокой мощности физической нагрузки возникает дефицит кислорода, что приводит к выходу миоцитов на анаэробный путь и, как следствие – развитию метаболического ацидоза. При высоком уровне содержания молочной кислоты в клетках и крови отмечается угнетение всех жизненно важных функций организма и развитие утомления, т.е. неспособности организма продолжать работу. У больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, анемиями различной этиологии состояние гипоксии и лактоацидоза развивается при более низких мощностях на-

грузки, чем у здоровых людей [56, 97, 159, 230], и при тяжелых формах – в условиях покоя.

Состояние гипоксии прежде всего характеризуется снижением сродства гемоглобина к кислороду за счет активации гликолиза и увеличения выхода 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) [90, 153]. Избыток протонов снимает ингибирование с 2,3-дифосфоглицератмутазы, и это способствует уходу 1,3-дифосфоглицерата в шунт Люберинга-Рапопорта.

Физические нагрузки сопровождаются развитием состояния гипоксии многих клеток и тканей, ростом содержания молочной кислоты от 3 до 6 раз по отношению к исходному в зависимости от возраста человека, мощности нагрузки и физиологического состояния организма [222]. Увеличение содержания в крови молочной, пировиноградной и других органических кислот в ходе нагрузок приводит к сдвигу кислотно-щелочного равновесия плазмы, рН уменьшается с $7,374 \pm 0,05$ до $7,120 \pm 0,001$. Сдвиг гомеостаза приводит к развитию компенсаторных процессов по типу количественной адаптации: увеличивается число эритроцитов [242], повышается содержание гемоглобина в клетках и возрастает количество эритроцитов большего объема [245]. Подобные изменения очевидно объясняются сменой популяции клеток за счет выброса из депо [165, 166]. В циркулирующей популяции возрастает число молодых клеток, более богатых гемоглобином, окисляющих глюкозу по пентозофосфатному пути (75%) [13], с высокой активностью метгемоглобинредуктазных систем и стабильностью мембран и метаболических процессов. У малотренированных людей длительное нахождение эритроцитов в депо сопровождается утратой их функциональной полноценности, более быстрой сферизацией клеток. Выброс таких клеток из депо в ходе нагрузок становится малоэффективен, так как популяция содержит много дестабилизированных клеток [101]. По данным [241], после больших по мощности физических нагрузок в кровотоке преобладают крупные эритроциты с большим количеством отростков, со сниженной фильтруемостью, низким удельным весом, высоким содержанием 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ), что позволяет отнести их к молодым формам.

У крыс, подверженных бегу на тредбане (скорость протяжки 25 м/сек), более чем в два раза уменьшается скорость выхода ионов калия, индуцируемого валиномицином [41].

Физические нагрузки сопровождаются активацией гликолиза не только в миоцитах, но и в эритроцитах, так как существует тесная

взаимосвязь скорости энергетических процессов в эритроцитах с метаболизмом тканей [84]. Активация гликолиза сопровождается увеличением производства 2,3-ДФГ, что вызывает сдвиг кривой диссоциации вправо. Для человека и высших животных снижение сродства гемоглобина к кислороду является типичным ответом на гипоксию [153]. Степень активации гликолиза и скорость производства 2,3-ДФГ будет зависеть и от выраженности лактоацидоза внутри эритроцитов на высоте нагрузочного теста [104].

Развивающееся в ходе мощных физических нагрузок метаболическое состояние обычно обозначают понятием анаэробного порога [230], которое определяется как резкое увеличение содержания молочной кислоты. Достижение анаэробного порога в ходе физических нагрузок сопровождается кроме метаболического ацидоза, характеризующегося увеличением содержания в крови молочной, пировиноградной и других кислот, усилением выброса катехоламинов и глюкокортикоидов, торможением образования и секреции инсулина [148]. Изменение гомеостатических параметров (снижение pH, увеличение концентрации органических кислот, гормональные сдвиги) сопровождается ухудшением состава эритроцитарных популяций. Можно отметить активацию процессов ПОЛ, снижение редукционного потенциала клетки, ускорение аутоокисления гемоглобина [104, 195]. Большая часть избытка молочной кислоты захватывается гепатоцитами и превращается в глюкозу при активации процессов глюконеогенеза глюкокортикоидами, другая часть утилизируется работающими мышцами. А поврежденные эритроцитарные клетки постепенно выбраковываются и заменяются за счет активации процессов гемопоэза.

В условиях гипоксии укорачиваются сроки созревания ретикулоцитов, при этом отмечают повышение осмотической резистентности эритроцитов, изменение проницаемости, увеличение буферной емкости эритроцитарных клеток [66]. Развитие железодифицитной анемии сопровождается усилением неэффективного эритропоэза и появлением в периферической крови эритроцитов, имеющих аномальную форму и сниженную продолжительность жизни. Важную роль в генезе этих нарушений принадлежит дефектам компонентов эритроцитарной мембраны, дефициту каталитических активностей каталазы, аконитазы, цитохромоксидазы. Одной из причин укорочения жизни эритроцитов является повышенная чувствительность к дефициту глюкозы и низкая способность к деформации из-за излишней жесткости не только вследствие изменения липидного компонента мембран, но и нарушения

функции мембранных АТФ-аз [189]. У новорожденных детей с хронической гипоксией отмечается понижение активности СОД и каталазы в эритроцитах [69].

В условиях хронической гипоксии и лактоацидоза, развивающихся у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями, наблюдается стойкое ухудшение эритроцитарной популяции циркулирующей крови. Исследователи отмечают ускорение процессов аутоокисления гемоглобина [194], снижение эффективности метгемоглобинредуктазных систем [62], уменьшение осмотической резистентности и деформируемости клеток [56], увеличение холестерина в мембранах и активацию фосфолипаз [19, 25, 54], усиление свободнорадикальных процессов и сферизацию клеток [20, 25, 36, 164].

Метаболический ацидоз, развивающийся у больных с послеоперационным шоком, вызывает снижение уровня 2,3-ДФГ, АДФ, АТФ и глутатиона в эритроцитах [242].

Одним из факторов нарушения микроциркуляции при развитии инфаркта миокарда является уменьшение способности мембраны эритроцитов к деформируемости и образование в кровяном русле патологических агрегатов эритроцитов. Отмечается снижение активности ацетилхолинэстеразы, увеличение активности Na^+ , K^+ -АТФ-азы и Ca^{2+} -АТФ-азы [237], повышение содержания диеновых конъюгатов и Шиффовых оснований в мембранах эритроцитов [54].

При гипертонической болезни наблюдается значительное снижение содержания общего фосфора в эритроцитах, что, по-видимому, связано с его уменьшением во всех фракциях фосфолипидов [163], и увеличение скорости Na^+/H^+ обмена [169]. Авторы связывают это с повышением активности протеникиназ С, изменением структурного состояния мембраны, контролируемого белками цитоскелета, увеличением содержания молекул переносчика на единицу площади мембраны [168, 169]. При артериальной гипертензии в эритроцитах понижается активность Na^+ , K^+ -АТФ-азы, увеличивается микровязкость [169].

Изучение влияния избытка лактата *in vitro* на состояние эритроцитов показало, что при лактоацидозе повышается степень ненасыщенности жирнокислотных остатков фосфатидилхолина в эритроцитарных мембранах и это увеличивает степень погружения триптофановых остатков гемоглобина в бислой [222]. При высокой степени ненасыщенности жирнокислотных остатков фосфолипидов создаются условия, способствующие не только заглублению гемоглобина, но и его окислению, так как гемоглобин, как и все гемсодержащие белки, инициирует

ПОЛ, продукты которого в свою очередь окисляют гемоглобин [76, 77, 83, 167, 174, 205].

В условиях избытка протонов в эритроцитах снижается скорость гликолитических процессов. Некоторые исследователи отмечают наличие ингибирующего эффекта лактата на один из ключевых ферментов гликолиза – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (ГАФДГ). В настоящий момент получены новые данные, свидетельствующие об активации ГАФДГ непосредственно оксиформой гемоглобина, содержание которой увеличивается в условиях защелачивания [258]. Таким образом, ингибирование ГАФДГ при избытке молочной кислоты может быть вторичным и регулироваться за счет уменьшения содержания оксиформы гемоглобина.

Лактоацидоз сопровождается существенными изменениями в функционировании мембран эритроцитарных клеток, что отражается, прежде всего, на изменении ее проницаемости для ионов. Уменьшается проницаемость мембраны и для ионов калия за счет высокой чувствительности K^+ , Na^+ -АТФ-азы к рН среды [30, 41].

Однако, по мнению других исследователей, молочная кислота в высоких концентрациях является не только физиологическим сигналом кислородной недостаточности, но и стабилизирующим агентом, способствующим сохранению нормального катионного состава эритроцитов [88]. Наличие столь противоречивых данных и обусловило проведение нами комплексных исследований по изучению воздействия лактоацидоза различной степени выраженности на состояние эритроцитов человека.

Нами были изучены механизмы развития процессов дезинтеграции эритроцитов в условиях лактоацидоза различной степени выраженности (7,5, 10, 20 Мм/л лактата) при действии на клетки *in vitro*. Условия лактоацидоза дозозависимо приводили к ускорению метгемоглобинообразования, увеличению фракции мембраносвязанного гемоглобина, росту скорости химического окисления гемоглобина феррицианидом калия. Наблюдалось нарастание степени дезинтеграции мембранных структур эритроцитов: увеличивалась мембранная проницаемость клеток для мочевины, процент перекисного гемолиза, снижалась деформируемость. О дезинтеграции фосфолипидного слоя мембраны и неблагоприятном изменении белок-белковых взаимодействий свидетельствовало увеличение активности 5'-нуклеотидазы и снижение активности Na^+ , K^+ -АТФ-азы. Метгемоглобинредуктазная активность компенсаторно нарастала до условий лактоацидоза 10 мМ/л, затем снижалась. В условиях сильного

лактоацидоза происходило уменьшение активных концентраций ферментов АОЗ: каталазы и СОД [105, 106].

Полученные нами данные свидетельствуют о чрезвычайно важном значении в сохранении стабильности эритроцитарных клеток изменений концентрации протонов не только внутри клеток, но и в плазме. Закисление окружающей среды, вероятно, сопровождается уменьшением рН и в эритроцитах, что приводит к ускорению производства 2,3-ДФГ и снижению уровня синтеза АТФ. Длительное снижение рН в окружающей среде ведет к постепенному нарастанию энергодифицита и ускорению дезинтеграционных процессов в клетке. Кроме того, уменьшение сродства гемоглобина к кислороду за счет увеличения содержания 2,3-ДФГ будет сопровождаться потерей кислорода в более крупных сосудах еще до входа эритроцитов в капилляры. Так как лактоацидоз является прямым следствием гипоксии, можно предположить, что ускорение дезинтеграционных процессов из-за развития энергодифицита характерно для эритроцитов, находящихся в условиях гипоксии.

Изучение состояния популяции эритроцитов *in vivo*, находящихся в условиях временной или относительно постоянной гипоксии и лактоацидоза, позволяет обнаружить подобные описанным выше повреждения клеток.

Временное состояние гипоксии и лактоацидоза воспроизводится в условиях дозированных физических нагрузок (ФН). У нетренированных практически здоровых людей с толерантностью к ФН около 150 Вт на высоте нагрузочного теста содержание молочной кислоты в плазме крови возрастает трехкратно и через 10 минут после окончания нагрузки еще остается выше на 50%, чем до нагрузки. Таким образом, эритроциты попадают в условия временного лактоацидоза. Исследования показали, что на субмаксимальном уровне нагрузки в популяции эритроцитов практически здоровых нетренированных людей возрастает количество клеток с высокой скоростью метгемоглобинообразования. Возможно, это связано не столько с повреждением циркулирующей популяции, сколько с малой эффективностью перераспределительного эритроцитоза, когда из депо выходят уже частично поврежденные или состарившиеся клетки в различной стадии развития дезинтеграционных процессов. Ускорение метгемоглобинообразования и выброс из депо уже в некоторой степени поврежденных клеток приводит к временному ухудшению популяции циркулирующих клеток у нетренированных людей. Однако более быстрое старение и разрушение эритроцитов в

этом случае может оказаться полезным для обновления популяции, так как стимулирует эритропоэз [165, 241]

Условия хронической гипоксии и лактоацидоза могут сопровождать такое заболевание, как ишемическая болезнь сердца (ИБС). Анализ большого количества данных состояния эритроцитарных популяций у больных ИБС, стабильной стенокардией напряжения II и III функциональных классов позволяет рассматривать изменения как результат действия условий хронической гипоксии и лактоацидоза. Практически у 80-90% больных обнаруживается повышенный уровень молочной кислоты в плазме, что сопровождается ускорением метгемоглобинобразования, снижением активных концентраций большинства ферментов, кроме 5'-нуклеотидазы и фосфолипазы A₂, активация которых свидетельствует об усилении дезинтеграции фосфолипидного бислоя мембраны. Из всех показателей четко коррелируют с уровнем молочной кислоты и классом стенокардии только интегральные показатели состояния клеток: концентрация метгемоглобина и мембрано-связанного гемоглобина, способность клеток к деформации цитоскелета, величина электродиффузионного потенциала пробоя мембраны. Процент изменения активных концентраций ферментов подвержен значительным вариациям, что объясняется различием состава популяции в момент исследования, индивидуальным состоянием процессов эритропоэза, тяжестью и длительностью заболевания, особенностями анамнеза и лечения, уровнем компенсации сдвигов гомеостаза.

Исследование эритроцитов из капиллярной крови в ходе физических нагрузок позволяет оценить степень повреждения их популяции как в циркулирующей крови, так и в кровяных депо и подтверждает, что основным повреждающим фактором является закисление среды функционирования клеток.

Изучение нами состояния популяций эритроцитов у больных с постгеморрагической анемией показало, что в циркулирующей крови увеличивается доля неактивного гемоглобина, что усугубляет явления гипоксии. Для оценки степени повреждения популяции эритроцитов, кроме определения процента метгемоглобина, нами был использован простой и информативный метод подсчета коэффициента отношения мембраносвязанного гемоглобина к общему содержанию гемоглобина [46].

3.2. Действие условий окислительного стресса и реоксигенации

Для высших форм жизни необычайно важен молекулярный кислород, реакция восстановления которого до воды составляет основу биоэнергетики организма человека и животных. Наряду с окислительным фосфорилированием, в которое вовлекается около 90% потребляемого человеком кислорода, в живых системах постоянно протекают реакции с образованием активированных кислородных метаболитов (АКМ): $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , HO^{\cdot} , $HOCl$, RO_2 и других [83]. Роль АКМ в клетках и организмах чрезвычайно велика, по мнению ведущих биохимиков, они являются главным пусковым механизмом многих регуляторных процессов. Их генерация приводит к изменениям соотношения информонов, регулирующих пролиферацию, апоптоз, воспалительные реакции, тонус сосудов, старение, развитие многих патологических процессов и даже фенотип [82, 200].

Прежде всего, генерация АКМ запускает процессы ПОЛ, имеющие важное значение для обновления фосфолипидов клеточных мембран и поддержания структурного гомеостаза. Однако в клетках ПОЛ носит цепной характер и сопровождается образованием гидроперекисей жирных кислот, что значительно повреждает функции мембран [51, 82, 84], поэтому различные антиоксидантные системы клеток обеспечивают поддержание ПОЛ на стационарном уровне. Действие внешних прооксидантов и активация эндогенных механизмов антиоксидантной защиты приводят к развитию так называемого окислительного стресса, который может проявляться на клеточном, тканевом и организменном уровнях [84].

Эритроцитарные клетки, постоянно контактирующие с молекулярным кислородом, весьма устойчивы к действию АКМ, генерируемых в процессе отдачи кислорода за счет аутоокисления гемоглобина в метформу [76, 77, 238, 240]. Устойчивость клеток определяется прежде всего мощной системой антирадикальной защиты клетки, на которой остановимся позже.

С точки зрения устойчивости к перекисному окислению наиболее трудноокисляемыми являются сфингомиелин (СМ) и холестерол (ХС), расположенные преимущественно в наружной части мембраны. Наименее устойчивый и легко окисляемый липид эритроцитарной мембраны – фосфатидилэтаноламин, около 70% которого локализовано на внутренней стороне бислоя [9, 189].

Зрелые эритроциты не синтезируют липидов, но последние находятся в динамическом равновесии с соответствующими плазменными жирными кислотами, которые активно инкорпорируются в фосфолипиды эритроцитов. Наиболее интенсивным является обмен холестерина. Увеличение его количества в плазматической мембране клетки тормозит обмен фосфолипидов [61, 91, 203, 221]. Обмен жирных кислот фосфолипидов плазмолеммы эритроцитов осуществляется с участием фосфолипазы А₂ и ацилтрансферазы. Эта система дереацилирования участвует в процессах обеспечения гомеовязкостной адаптации биомембраны и репарации последствий ПОЛ [209]. Большая часть холестерина (ХС) локализована во внешнем монослое, что связано с высоким сродством ХС и СМ, и лишь 1/3 – во внутреннем. Однако мембрана эритроцита характеризуется высокой скоростью обмена ХС между монослоями (flip-flop переход) вследствие хорошо известной ее способности обменивать свой холестерин на холестерин липопротеинов плазмы крови, являющихся для эритроцитов основными донорами и акцепторами ХС [19, 33, 61, 91].

Для понимания повреждений мембраны эритроцитов, вызываемых окислительным стрессом, особый интерес представляет строение и функционирование БП-3.

Гликозилированный участок мембранного домена БП-3 имеет антигены узнавания для аутологических антител к стареющим и аномальным эритроцитам. Кроме того, мембранный домен отвечает за анионный транспорт, через этот анионный канал происходит быстрый обмен ионов CO_3^- и Cl^- . Цитоплазматический домен играет важную роль в поддержании формы эритроцитов и его метаболизме. Здесь локализованы участки высокого сродства к гликолитическим ферментам: глицеральдегид-фосфатдегидрогеназе, альдолазе, фосфофруктокиназе. Кроме того, цитоплазматическим доменом связываются каталаза, гемоглобин и гемихромы [155, 156]. Цитоплазматический домен осуществляет также связь с цитоскелетом через якорный белок – анкирин [95, 236].

Структура гемоглобина (Hb) – главного функционального белка эритроцита – хорошо изучена и описана [89, 96, 204, 205, 239]. Однако гораздо меньше внимания уделяется топографии молекулы в клетке и характеру ее взаимодействия с плазматической мембраной. В частности, пока до конца не выяснена физиологическая роль взаимодействия Hb с мембраной и цитоскелетом эритроцита, хотя известно о высоком сродстве к Hb N-концевых остатков кислых аминокислот цитоплазматического домена БП-3 [157], что позволяет предположить функциональную значимость их интеграции.

В то же время некоторые авторы [173, 174, 188, 220, 235] указывают на способность гемоглобина к взаимодействию с липидами бислой мембраны, так как для него характерно чередование гидрофильных участков молекулы, подобное интегральным мембранным белкам. Отмечается возможность замены водного микроокружения молекулы Hb на липидное благодаря наличию в молекуле шести остатков триглицерина, локализованных в N-концевой части субъединиц, не закрепленных жестко в структуре и непосредственно взаимодействующих с окружающей средой [221, 236]. Однако в интактных эритроцитах Hb непосредственно с мембранными липидами не взаимодействует, а при различных повреждениях клетки такой процесс становится более вероятным [209, 218]. Поскольку Hb является основным функциональным белком эритроцита, чрезвычайно важными оказываются различия во взаимодействии его функциональных форм с мембраной клетки. Так, дезоксиформа обнаруживает более высокое сродство с цитоплазматическим доменом БП-3 (ЦПДБП-3), чем оксигемоглобин [155]. Пять-семь кислых остатков ЦПДБП-3 оккупируют полость в дезоксигемоглобине, которую обычно занимает 2,3-дифосфоглицерат (2,3-ДФГ). Механизм связывания оксиформы представляется иным. По-видимому, оксигемоглобин сначала диссоциирует на димеры, которые взаимодействуют с ЦПДБП-3, а затем происходит вновь ассоциация в тетрамер. В модельных условиях показано, что до 50% ЦПДБП-3 может связываться с оксигемоглобином при нормальной концентрации O_2 и 2,3-ДФГ. Оба эти процесса могут иметь непосредственное отношение к регуляции обмена O_2 в эритроците и процессам окисления гемоглобина в метформу [10, 156].

3.2.1. Окислительное повреждение эритроцитарной мембраны

Мембрана и цитоскелет эритроцита являются не только важными структурными компонентами, но и активно участвуют в метаболизме клетки. Вполне естественно, что нарушение этих структур отражается на общем метаболическом состоянии эритроцита, его функциях и времени жизни. Процессы ПОЛ, развивающиеся при окислительном стрессе, могут приводить к модификации или повреждению всех основных функций биомембраны: барьерной, рецепторной и каталитической [20, 51, 150].

Исследования [150, 272, 276] показали активацию ПОЛ в эритроцитах, подвергнутых окислительному стрессу. Значительная активация

окисления фосфолипидов (ФЛ) приводит к характерному изменению их индивидуальных фракций. В частности, отмечается значительное снижение содержания уровня наиболее легко окисляемой фракции – фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина в мембране, а также низкое процентное содержание полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), например, арахидоновой кислоты. *In vivo* отмечается параллельное снижение содержания фосфолипидов в плазме крови, что свидетельствует о существовании обменных процессов между эритроцитарной мембраной и плазмой крови [68].

Сильный окислительный стресс или хронический стресс *in vivo* в стадии истощения приводит к выраженному увеличению содержания первичных продуктов ПОЛ – конъюгированных диенов, уровень которых возрастает в эритроцитах практически вдвое [189]. Параллельно увеличивается и скорость образования малонового диальдегида (МДА), одного из конечных продуктов окисления ПНЖК. Ряд авторов [19, 25, 44, 56, 61, 75, 91] также отмечает увеличение содержания ХС в мембранах эритроцитов в условиях активации ПОЛ. Такие изменения характерны для ситуаций *in vivo* за счет поглощения ХС из плазмы крови при усилении процессов окисления ФЛ в составе ЛНП, что приводит к вытеснению ХС из мицелл. В исследованиях влияния ХС на скорость ПОЛ в эритроцитах, индуцированных введением Fe^{2+} , было обнаружено торможение этих процессов. Однако такое торможение, обусловленное снижением прежде всего микровязкости мембраны, характерно для неокисленного ХС, тогда как для окисленных форм ХС наблюдается стимуляция ПОЛ [90]. Это связано с появлением в окисленном ХС новых полярных группировок – гидроксильных, карбонильных, карбоксильных, повышающих его растворимость в воде и, соответственно, реакционную способность.

Биологическое действие липидных перекисей на мембранные белки связано, с одной стороны, с их высокой эффективностью как окислителей, а с другой – со способностью некоторых продуктов ПОЛ (альдегидов и кетонов) образовывать стабильные ковалентные связи с отдельными функциональными группами белков. В частности, полярные продукты ПОЛ способны оказывать прямое повреждающее действие на SH-группы Na^+ , K^+ -АТФ-ного комплекса, инактивируя его аллостерические и каталитические центры, что рассматривается как одна из причин катионного дисбаланса в эритроците при стрессе [71, 91, 139, 185]. Эффективное окисление SH-групп осуществляется, вероятнее всего, промежуточными продуктами ПОЛ – свободными радикалами, тогда как в образовании поперечных сшивок и полимеризации белковых мо-

лекул ведущую роль играют конечные продукты ПОЛ (типа малонового диальдегида). В создании липид-белковых комплексов могут участвовать два механизма: образование прочной химической связи между свободными аминными группами аминокислот и альдегидными или карбоксильными группами окисленных липидов; образование димеров и полимеров белковых молекул за счет возникновения поперечных связей. В этих процессах принимают участие МДА и N-концевые участки полипептидных цепей:

$\text{O}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{HC}=\text{O} + 2\text{NH}_2\text{-активный фермент}-2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{неактивный фермент}-\text{N}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{N-неактивный фермент}.$

По отношению к ряду ферментов перекиси липидов могут выступать в роли и активаторов, и аллостерических эффекторов. Известно, что в условиях повышения скорости ПОЛ и уменьшения вязкости фосфолипидного слоя мембраны активируются такие ферменты, как фосфолипазы А, С, 5'-нуклеотидазы, НАДН-феррицианидредуктазы [67, 189, 194].

Процесс перекисного окисления затрагивает не только интегральные мембранные белки эритроцитов, но и белки, локализованные на внутренней стороне мембраны, в частности, белки цитоскелета. Так, повышенная чувствительность спектрина к окислительному повреждению объясняется топографической близостью его SH-групп к ПНЖК, которые усиленно окисляются. Повреждается и белок полосы 4.1, который взаимодействует со спектрином, актином, гликофорином, БП-3, мембранными фосфолипидами. При окислительном повреждении белок полосы 4.1 имеет плохую связь с актином и спектрином, что приводит к распространению перекисного стресса через трансмембранный перенос липидных гидроперекисей. Это наблюдалось при исследовании модели фотоперекисленных С-14, меченных по холестеролу теней эритроцитов (доноры перекисей), и однослойных липосом (акцепторы) [275].

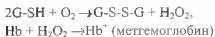
Таким образом, активация ПОЛ сопровождается изменением соотношения ХС/ФЛ в пользу первого за счет уменьшения вторых, что приводит к уплотнению мембран, снижению эффективной проницаемости, тогда как неспецифическая агрегация белков вследствие образования сшивок и полимеризации способствует формированию пор и дефектов.

3.2.2. Окислительное повреждение гемоглобина

Во многих работах приводятся результаты изучения процессов окисления гемоглобина в модельных системах [76, 77, 158, 209, 217], что позволяет лучше понимать процессы, происходящие в клетке. Описано влияние продуктов ПОЛ на интенсивность перехода оксигемоглобина в дезоксиформу, которое в свою очередь активирует ПОЛ, что регистрируется по возрастанию МДА [76, 83]. Предполагается, что аутоокисление HbO_2 ускоряется образующейся в процессе перекисью водорода. Это было подтверждено на модели с добавлением каталазы, тормозящей аутоокисление гемоглобина [280]. Для снижения скорости аутоокисления гемоглобина наиболее важна активность каталазы, роль супероксиддисмутазы незначительна, так как обнаружено, что добавление каталазы снижает скорость процесса на 1/3. Из этого следует, что генерируемый кислород быстро переходит в H_2O_2 , которая активно участвует в окислении гемоглобина [161].

При работе с изолированными цепями гемоглобина обнаружена большая скорость окисления α -цепей ($0,025 \text{ ч}^{-1}$) по сравнению с β -цепями ($0,009 \text{ ч}^{-1}$). Предполагается, что промежуточным продуктом окисления оксигемоглобина являются валентные гибриды $\alpha_2^+\beta_2$. Это означает, что при наблюдаемом, например, 20%-ном окислении HbO_2 фактически окислением затронуто 40% гемоглобина, что имеет серьезные физиологические последствия [76, 217].

Известно, что блокирование SH-групп гемоглобина способствует его диссоциации на димеры и мономеры, а это возможно при окислении SH-содержащих аминокислотных остатков продуктами ПОЛ. В связи с этим важен тот факт, что в условиях диссоциации оксигемоглобина на димеры неполярные агенты весьма эффективно модифицируют структуру гемоглобина, делая ее существенно менее устойчивой к аутоокислению. Это связано с наличием у димерного оксигемоглобина открытой контактной поверхности $\alpha^1\text{-}\beta^1$ со значительными гидрофобными участками, весьма чувствительными к неполярным агентам. Особый интерес представляет аутоокисление HbO_2 в присутствии восстановителей, например, глутатиона. Показано [161], что скорость образования метгемоглобина (Hb^+) пропорциональна квадрату концентрации глутатиона, что позволяет предположить следующую схему процесса:



Таким образом, ускорение метгемоглобинообразования в присутствии глутатиона обусловлено генерацией перекиси водорода.

Гемоглобин, который циркулирует в составе эритроцитов (*in vivo*), постоянно подвергается аутоокислению и ревосстановлению с помощью редуктазных систем эритроцита [14], при этом в эритроцитах в норме содержится 1-2% метформы гемоглобина. Метгемоглобин играет определенную физиологическую роль. Он активно связывает некоторые токсичные анионы: CN^- , OCN^- , N_3^- , которые имеют высокое сродство к $Fe(III)$ [161]. Окисление гемоглобина молекулой кислорода – сложный процесс, включающий изменение спинового состояния иона железа, увеличение размеров ядра порфиринового цикла, изменение третичной структуры соответствующей субъединицы, перестройку четвертичной структуры всей молекулы гемоглобина [76]. Присоединение кислорода к гемоглобину при образовании оксиформы представляет собой диамагнитный комплекс, в котором гемовое железо имеет валентность два. Л. Полинг полагал, что связь $Fe(II)$ и O_2 осуществляется с участием двух d -электронов $Fe(II)$ и двух p -электронов положительно заряженного атома кислорода диамагнитного диполя. Оставшиеся четыре d -электрона располагаются на двух t_{2g} орбиталях железа. Оксигемоглобин имеет ряд структурных отличий от дезоксиформы: железо гема находится в плоскости порфиринового кольца, тогда как в гемоглобине оно смещено в сторону проксимального гистидина на $0,75\text{Å}$ [238, 280]. В присутствии кислорода оксиформа медленно переходит в метформу, у которой 6-е координационное положение занято молекулой воды, а железо находится в III валентном состоянии. Переходу $Fe(II) \rightarrow Fe(III)$, скорее всего, предшествует обратимая диссоциация оксиформы в дезокси:



Если молекула гемоглобина пребывает долго в дезоксисостоянии (этому способствует понижение pO_2), то происходит конформационный переход релаксивной формы субъединиц (R) в напряженную (T), в результате чего сродство гема к кислороду существенно снижается. В этом случае взаимодействие Fe^{2+} -гема с кислородом может привести не к образованию оксигемоглобина, а к окислению железа в Fe^{3+} , в результате чего образуется метгемоглобин и генерируется супероксидный радикал. Супероксидный радикал может быть превращен в H_2O_2 эритроцитарной СОД, перекись водорода разрушается каталазой [76, 77]. В процесс аутоокисления гемоглобина вносят вклад различные

ионогенные группировки. В частности, протонирование дистального гистидина молекулы гемоглобина приводит к резкому повышению эффективности процесса аутоокисления, так как дистальный гистидин в гемоглобине играет стабилизирующую роль, образуя водородную связь с O_2 [77, 122]. Химически реакция аутоокисления гемоглобина, скорее всего, представляет собой нуклеофильное замещение супероксидного аниона молекулой воды, которая остается связанной с Fe^{3+} гема в шестом координационном положении [161]. Стабилизация Т-конформации (дезоксиформа) органическими фосфатами, протонирование дистального гистидина, образование внутри-, межсубъединичных и межмолекулярных шивков, генерируемых при воздействии продуктов ПОЛ (альдегидов, кетонов), ускоряет процесс аутоокисления гемоглобина [76].

Нами были изучены механизмы повреждения эритроцитов, инкубированных в условиях окислительного стресса, имитирующего гипоксию, при которой возникает избыток Fe^{2+} (модель 10) [272], а также сочетание избытка двухвалентного железа с желточными липопротеидами (модель 2) [101]. Инкубация эритроцитов с инициаторами окисления приводила к ускорению метгемоглобинообразования, снижению сродства гемоглобина к кислороду. В клетках повышался уровень молочной кислоты на фоне снижения активной концентрации глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, что свидетельствовало о возрастании процента старых, поврежденных эритроцитов. В мембранах отмечалось ускорение производства перекисленных продуктов жирных кислот и холестерина, что сопровождалось снижением общей антиокислительной и каталазной активности эритроцитарных гемолизатов. Присутствие липопротеинов низкой плотности (модель 2) также приводит к возрастанию процента поврежденных клеток в популяции, увеличению скорости метгемоглобинообразования, снижению сродства гемоглобина к кислороду. Содержание первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов – в меньшей степени зависело от добавления желточных липопротеидов, возможно, за счет активного обмена между фосфолипидами мембран и внешними фосфолипидами желтка, однако наблюдалось снижение осмотической резистентности и увеличение мембранной проницаемости клеток для мочевины. По-видимому, окисление липидов приводит к резкому нарушению физико-химической структуры мембраны, усилению миграции трансмембранных белков за счет появления гидрофильных включений в гидрофобном слое [9, 150]. Наличие в бислое фосфолипидов гидроксильных и полярных продуктов ПОЛ мо-

жет приводить к образованию водных пор, резко нарушающих стабильность мембраны и увеличивающих вероятность ее разрыва.

Метаболические изменения характеризуются, вероятно, сначала усилением гликолитических процессов, так как удается обнаружить увеличение производства 2,3-ДФГ и молочной кислоты в эритроцитах. Снижение сродства гемоглобина к кислороду на фоне уменьшения производства АТФ усиливает генерацию активных форм кислорода (АФК), сопровождающуюся дезинтеграцией фосфолипидного бислоя мембран. Это приводит к снижению активных концентраций ряда ферментов, зависящих от организации бислоя глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, каталазы, лактатдегидрогеназы. В то же время наблюдается более высокая активность СОД и НАДН-цитохром-*b₅*-редуктазы, то может быть обусловлено переходом части латентных форм этих ферментов в активные при дезинтеграции фосфолипидного бислоя.

Дальнейшее усиление генерации АФК способствует превращению части гемоглобина, углубленного в мембрану, в кластеры гемихрома. Так как гемихром обладает более высоким сродством к цитоплазматическому домену белка полосы 3 [175], происходит изменение белок-белковых и белок-липидных взаимодействий, ускоряющее сферизацию клеток.

Наши исследования показали, что в условиях окислительного стресса наблюдается увеличение генерации в плазму биологически активных пептидных соединений эритроцитами (рис. 3.1). Пептиды являются фрагментами гемоглобина, следовательно, окислительное повреждение гемоглобина ускоряет его протеолитическое расщепление. При этом результаты ВЭЖХ-хроматографии регистрируют изменение не только количества, но и спектра пептидных соединений.



Рис. 3.1. Содержание пептидных соединений в ТХУ-экстрактах эритроцитов (мг/мл) при инкубации в условиях окислительного стресса. Достоверность отличий – $P < 0,05$ [103]

Особенно опасным избыток Fe^{2+} и восстановленных эквивалентов, накопившихся в условиях гипоксии, становится при реоксигенации [200]. Для изучения влияния условий реоксигенации на процессы дезинтеграции эритроцитов мы исследовали кровь больных ИБС, стабильной стенокардии напряжения III функционального класса после проведения операции аортокоронарного шунтирования (АКШ). В первые сутки после проведения АКШ на фоне традиционной антиангинальной терапии наблюдается резкое ухудшение циркулирующей популяции эритроцитов. Ускоряется аутоокисление гемоглобина, уровень метгемоглобина превышает 3%, стимулируется ПОЛ. Процессы происходят на фоне роста молочной кислоты в плазме крови и снижения антиокислительная активность (АОА) плазмы крови, что неизбежно приводит к ухудшению условий функционирования эритроцитов и, собственно, росту количества поврежденных клеток. Замедления этого можно добиться введением в терапию препарата или препаратов, обладающих антиоксидантными свойствами. В нашем исследовании хороший эффект был получен при добавлении в постоперационное лечение больных триметазидина (предуктала) [105].

3.3. Метаболическое состояние эритроцитов в условиях гипо- и гипергликемии

Основным источником энергии является АТФ, образованная в процессе гликолиза.

Пентозофосфатный путь (ПФП) в норме составляет не более 10% от общего метаболизма глюкозы, однако значение его для клетки очень велико, поскольку он обеспечивает ее защиту от деструктивных окислительных процессов. Образующийся в ПФП NADPH используется для поддержания необходимой концентрации активной формы глутатиона [14, 161].

Есть данные о существовании взаимосвязи между гликолитическим окислением глюкозы и ПФП через связанный с эритроцитами инсулин. Это вызвано тем, что гормон активирует глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу при увеличении содержания в клетке лактата [145].

3.3.1. Состояние эритроцитов в условиях гипогликемии и хранения крови

При хранении крови в эритроцитах происходит постепенное снижение содержания органических фосфатов и накопление неорганических. Уменьшение содержания 2,3-ДФГ сопровождается увеличением сродства гемоглобина к кислороду до P_{50} – 18 мм рт. ст., в то время как P_{50} свежей крови составляет 26 мм рт. ст.

Содержание АТФ в эритроцитах при хранении изменяется медленнее, чем содержание 2,3-ДФГ. При истощении эритроцитов в среде без глюкозы концентрация АТФ снижается на 50% за 2-3 часа, а до нуля – более чем за 10 часов.

По мере хранения крови при $+12-14^{\circ}\text{C}$ нарастает концентрация аммиака, мочевой кислоты, мочевины, креатинина, повышается концентрация калия в плазме, а натрия в эритроцитах [89, 111]. Ингибирование Na^+ , K^+ -АТФ-азы ведет к увеличению соотношения Na^+/K^+ , а изменение мембранной проницаемости сопровождается повышением пассивной диффузии Na^+ , тогда как пассивная проницаемость для K^+ и H^+ не изменяется [30, 111, 168, 169].

В мембранах эритроцитов, полученных после выдерживания в безглюкозной среде, происходит изменение соотношения основных белков. Отношение спектрина и актина к белкам полосы 3 возрастает. При понижении концентрации АТФ в клетке более чем на 50% из мембран освобождаются везикулы, содержащие белки полосы 3 [200].

При консервации крови уменьшается электрический заряд клетки, так как функционально изменяется поверхность мембраны, снижается также осмотическая резистентность эритроцитов [110].

Хранение крови в холодильной камере при температуре 10-12⁰С в течение 3 дней использовалось нами в качестве модели для изучения механизмов дезинтеграции эритроцитов в условиях энергодифицита и лактоацидоза. На третьи сутки хранения количество глюкозы в плазме крови уменьшилось в 3,75 раза, а молочной кислоты увеличилось в 2,25 раза.

Популяция эритроцитов, полученных из храненной в течение 3 дней крови, характеризовалась изменениями, аналогичными для сочетания гипогликемии и лактоацидоза: наблюдалось снижение сродства гемоглобина к кислороду, увеличение содержания метформы и мембраносвязанного гемоглобина, рост скорости химического окисления гемоглобина, уменьшение антиокислительной активности эритроцитарных гемолизатов, увеличение мембранной проницаемости клеток для мочевины, снижение активных концентраций каталазы [105].

Даже незначительная гипогликемия (2,5 мМ) в сочетании с лактоацидозом оказывает большее повреждающее воздействие, чем небольшой избыток глюкозы. Основной причиной, по-видимому, является усугубление и ускорение развития энергодифицита при недостатке глюкозы. Однако скорость гемоглобинообразования в эритроцитах из донорской крови выше в условиях гипергликемии в сочетании с лактоацидозом. Это обстоятельство объясняется, вероятно, непосредственным влиянием гликирования гемоглобина на скорость его аутоокисления. Процент содержания метгемоглобина увеличивается при сочетании лактоацидоза с гипогликемией в 1,35 раза, с гипергликемией (10 мМ) – в 2,2 раза.

В эритроцитах больных ИБС, осложненной сахарным диабетом, наблюдается иное направление изменений содержания метгемоглобина при сочетании гипо- и гипергликемии с лактоацидозом. Процент роста аутоокисления гемоглобина выше в условиях гипогликемии и лактоацидоза, это состояние для них становится более опасным.

3.3.2. Гипергликемия. Состояние эритроцитарных клеток в условиях гипергликемии

Состояние хронической гипергликемии может развиваться в результате воздействия многих экзогенных и генетических факторов, часто дополняющих друг друга. Особое значение имеют гормональные нарушения: гиперсекреция катехоламинов и глюкагона в сочетании с не-

достаточностью инсулина, при этом концентрация глюкозы в крови возрастает в 5-7 раз [54, 127].

Вследствие гипергликемии развиваются процессы неферментативного гликозилирования белков крови и клеточных структур форменных элементов крови [49, 54, 57]. Модификация поверхности мембран эритроцитов ведет к изменению потенциала, увеличению его отрицательности, что оказывает существенное влияние на характер взаимодействия мембранных рецепторов со специфическими лигандами, в том числе и рецепторов инсулина [49].

Глюкоза оказывает опосредованное влияние на активность ферментов: супероксиддисмутазы и каталазы, что, возможно, связано с реакцией неферментативного гликозилирования. Среди аминокислот чаще всего гликозилируется лизин, который в каталазе расположен в составе геминовой группы, ответственной за ее каталитическую активность [49, 57, 112]. Весьма интенсивным при гипергликемии является процесс гликозилирования гемоглобина. Глюкоза присоединяется к β -цепям гемоглобина, что возможно благодаря наличию в этом месте отрицательного заряда, и на первом этапе ведет к образованию Шиффа основания. Эта фаза обратима и протекает достаточно медленно, но при высокой концентрации глюкозы реакция смещается в сторону образования устойчивой кетоаминной связи и, как завершение второй стадии, возникает стабильная форма гликозилированного гемоглобина. В норме содержание гликозилированного гемоглобина колеблется (по данным разных авторов) [117, 219, 283] в пределах от 4 до 6% от общего гемоглобина. При сахарном диабете его содержание увеличивается по мере развития патологии до 7-12%. Многие ученые [117, 283] отмечают положительную корреляцию между концентрацией глюкозы в среде и степенью гликозилирования гемоглобина. Процессу гликирования подвергаются и белки мембраны и цитоскелета эритроцитов – белок полосы 3, гликофорин, спектрин. Многие авторы [117, 219, 283] считают, что гликирование белков мембраны эритроцитов носит компенсаторный характер, уменьшая высокий уровень глюкозы в плазме крови.

В условиях действия 25 мМ/л глюкозы на эритроциты *in vitro* мы наблюдали почти 4-кратное увеличение степени гликозилированности мембранных белков клетки, снижение активных концентраций каталазы, возможно, за счет гликирования по лизину, расположенному вблизи геминовой группировки, повышение мембранной проницаемости к мочевины [105].

Образование гликированных белков и особенно гемоглобина существенно сказывается на кислородтранспортной функции эритроцитов. Связывание 2,3-ДФГ ингибируется молекулой глюкозы, соединенной с гемоглобином, так как она присоединяется (так же, как и 2,3-ДФГ) к N-концевой валину β -цепи гемоглобина. Результат – увеличение сродства гемоглобина к кислороду и уменьшение эффективной отдачи его тканям и нарастание гипоксии [139, 283].

Гликирование мембранных белков эритроцитов приводит к конформационным перестройкам, которые сопровождаются нарушением третичной структуры с разрывом дисульфидных связей и экспонированием наружу SH-групп. Экспонирование SH-групп белка полосы 3 может служить одной из причин нарушения кислородтранспортной функции эритроцитов, так как они участвуют в транспорте кислорода [54, 117].

При гипергликемии наблюдается и избыточное поступление глюкозы внутрь клетки (148% от нормы) [146]. Попадая в нее, глюкоза приводит к неферментативному гликированию клеточных белков и, в частности, ферментов, что сопровождается снижением их активности. Торможение метаболических процессов понизит производство восстановленных эквивалентов, АТР, будет сопровождаться ускорением ПОЛ. Есть сведения, что ПОЛ усиливает процесс гликирования за счет увеличения доступности аминокрупп белков [18]. Более того, существует мнение, что гликированию может подвергаться и липидный бислой.

Во многих работах сообщается о прямой корреляции между уровнем гликемии и степенью активации ПОЛ [36, 83, 150], что приводит к повреждению мембраны, изменяя качественный и количественный состав липидов; отмечается [79, 150] увеличение уровня холестерина, отношения холестерин/фосфолипиды, степени насыщенности жирных кислот. Наибольшие качественные и количественные изменения происходят во фракции фосфолипидов, поскольку, в основном, именно они подвергаются окислению. Кроме того, этому способствует и дефицит АТР, уменьшающий резистентность к действию эндогенных фосфолипаз. Обобщая данные литературы [18, 79, 115, 139], можно отметить, что у больных сахарным диабетом повышается уровень фосфатидилсерина, сфингомиелина и лизофосфатидилсерина, количество фосфатидилэтаноламина остается без изменений, уровень фосфатидилхолина снижается.

Увеличение содержания холестерина в мембране, по мнению некоторых ученых [61], носит компенсаторный характер, так как он спосо-

бен тормозить ПОЛ. В то же время холестерин способствует уплотнению мембраны, повышает вязкость, снижает деформируемость. Уменьшению пластичности мембраны эритроцитов способствует также и высокий уровень сфингомиелина [92, 112]. Повышение уровня фосфотидилхолина, накапливающего отрицательный заряд, влияет на распределение поверхностного заряда липидного бислоя. Изменение состояния фосфолипидов и заряда приводит к нарушению каталитической активности многих ферментов клетки: снижается активность Na⁺, K⁺-АТФ-азы, ключевых ферментов пентозофосфатного шунта и гликолиза, повышается активность фосфолипаз. В результате нарушается нормальный баланс клетки: увеличивается содержание Na⁺, Ca²⁺, уменьшается содержание K⁺, снижается осмотическая и механическая стойкость эритроцитов [222]. Все эти изменения ведут к сферизации клетки и ее гемолизу.

Сахарный диабет часто является заболеванием, сопутствующим ИБС, и, наоборот, ишемическая болезнь развивается на фоне сахарного диабета. У больных ИБС, осложненной сахарным диабетом, состояние гипергликемии может сопровождаться гипоксией и лактоацидозом, поэтому нами было изучено действие условий гипергликемии и лактоацидоза (7,5 мМ/л) на эритроциты *in vitro*. Гипергликемия в сочетании с лактоацидозом приводит к ускорению аутоокисления гемоглобина как в эритроцитах доноров, так и в эритроцитах больных ИБС, осложненной сахарным диабетом. Наблюдается увеличение фракции мембраносвязанного гемоглобина, снижение активных концентраций каталазы, причем степень выраженности изменений больше в эритроцитах, выделенных из крови больных [106].

3.4. Воздействие химических соединений и лекарственных препаратов на эритроцитарные клетки

3.4.1. Действие нитританионов и лекарственных препаратов, содержащих нитрогруппировки

Оксид азота (NO) участвует во многих жизненно важных физиологических процессах. Он является нитротрансмиттером, цитотоксическим агентом, эндогенным вазодилатором [186, 187]; вторичным посредником, включая обратную связь системы внутриклеточной передачи сигнала от Ca²⁺-мобилизирующих рецепторов через активацию гуанилатциклазной системы [185, 194]. Окись азота может существовать в

виде относительно стабильного, нейтрально заряженного радикала NO с липофильными свойствами и резко выраженной тенденцией взаимодействовать с молекулами, обладающими неспаренными электронами, такими как супероксидный анион, Fe^{1+} , молекулярный кислород. Кроме того, он может подвергаться одноэлектронному восстановлению с образованием нитроксианиона NO^- или, наоборот, отдав электроны, превращаться в ион нитрозония (NO^+).

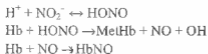
Синтез NO в клетках организма человека и животных осуществляется в результате 5-электронного окисления концевго атома азота гуанидина L-аргинина с помощью семейства ферментов, определяемых как NO-синтазы (NOS), гем-содержащие, подобные цитохрому P-450 [259]. Конститутивные NOS, функционально связанные с плазматической мембраной, обеспечивают базальное освобождение NO. Этот тип ферментов содержит места связывания для НАДФ, ФАД, тетрабиоптерина, и его активность строго регулируется Ca^{2+} -кальмодулином [259]. Образовавшийся NO представляет собой многофункциональную эффекторную молекулу. Основной его мишенью в клетке является растворимая гуанилатциклаза. Связываясь с железом гема фермента, NO активирует фермент, ускоряя производство гуанилатциклазой цГМФ из ГТФ. Расслабляющий эффект цГМФ-зависимых протеинкиназ заключается в блокировании фосфолипаз класса C и снижении продукции 1,4,5-инозитолтрифосфата, активации кальцевых АТФ-аз и Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов [264]. Есть данные, что NO может снижать вход Ca^{2+} в гладкомышечные клетки через L-тип кальцевых каналов [258]. В настоящее время также установлено, что NO обладает способностью снижать Ca^{2+} -чувствительность сократительных белков за счет активации внутриклеточных фосфатаз, осуществляющих дефосфорилирование легких цепей миозина [277, 278]. Важной мишенью для NO в клетке являются белки, содержащие SH-группы [259]. Производные NO, ион нитрозония (NO^+), пероксиданион легко реагируют с SH-группами, образуя биологически активные S-нитрозосоединения.

В последние годы установлено, что активаторами растворимой гуанилатциклазы являются гуанидинотиолы, являющиеся дополнительными субстратами NO-синтазы. Образующийся из гуанидиновой группировки аргинина NO взаимодействует с SH-группами этого соединения с образованием нестойкого внутримолекулярного нитрозотиола, способствующего переносу оксида на гем гуанилатциклазы и активации фермента [35, 194].

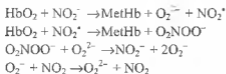
При поступлении в организм животных высоких доз нитратов и нитритов основное токсическое действие этих соединений выражается в гемической и гистотоксической гипоксии. Гемическая гипоксия обусловлена в значительной мере метгемоглинообразующим действием нитритов [186].

Под действием нитританиона в метформу окисляется как дезо-, так и оксиформа гемоглобина. Скорость метгемоглинообразования зависит от концентрации H^+ и увеличивается с ростом кислотности среды.

При окислении дезоксиформы гемоглобина могут образоваться метгемоглобин и нитрозокомплексы:



При окислении оксиформы гемоглобина образуются реакционно способные радикалы, запускающие цепной процесс генерации активных форм кислорода, метгемоглобина, радикалов NO_2 :



Одним из основных механизмов токсического действия нитритов и нитратов является превращение гемоглобина в метгемоглобин и образование R и T-конформеров Hb-NO комплексов [247]. При попадании нитритов в кровь вследствие взаимодействия ионов NO_2^- с гемоглобином образуются только стабильные R-конформеры Hb-NO комплексов, у которых железо гема присоединено к проксимальному гистидину. Восстановление ионов NO_2^- в NO вызывает R→T переход Hb-NO комплексов.

При взаимодействии ионов NO_2^- с оксигемоглобином последний переходит в окисленную форму. Однако образование Hb-NO комплексов в течение первых 1-3 часов не происходит. Была предложена гипотеза, согласно которой при взаимодействии гемоглобина с ионами NO_2^- происходит образование комплекса с перераспределением электронной плотности, осуществляемой таким образом, что оксигемоглобин переходит в квазиокисленное состояние. Предлагается два воз-

возможных направления по спонтанному и индуцированному окислению оксигемоглобина: к лигандсвязанному кислороду и к белку глобину [4]. Причиной того, что нитритные ионы не могут акцептировать электрон с оксигемоглобина, по-видимому, является наличие связанного с гемом иона кислорода, который препятствует осуществлению контакта между донорской орбиталью гема и акцепторной орбиталью NO_2^- . Однако после диссоциации оксигемоглобина происходит распад NO_2^- и образование NO , который прочно связывается с гемоглобином. Уменьшение сродства гемоглобина к кислороду, например при подкислении, приводит к более быстрому восстановлению NO_2^- в NO и, следовательно, способствует образованию прочных комплексов гемоглобин- NO . Все это снижает кислородтранспортную функцию гемоглобина. Из всех метгемоглобинемий нитритная хуже всех подвергается лечению. Достаточно эффективным средством лечения нитритной метгемоглобинемии является липоевая кислота. Найден защитный эффект унитиола, токоферола в экспериментах на животных. Хорошим протекторным действием в экспериментах обладает NaHCO_3 , инозин, аденозин. Выраженный защитный эффект проявляют соединения, способные утилизировать активные формы кислорода (АФК), а также разрушающие Hb (IV) -гемихром [17].

В результате взаимодействия окиси азота с супероксидным радикалом образуется ONOO^\cdot . Деструктивное действие NO^\cdot во многом связано с образованием ONOO^\cdot , который и сам, и продукты распада его протонированной формы (OH^\cdot и NO_2) повреждают или разрушают биологические структуры путем их окисления или нитрозолирования. Основной атаке ONOO^\cdot подвергаются остатки тирозина, что сопровождается блокированием тирозиназных сигнальных путей клетки. Протекторным действием обладают доноры SH-групп, способные взаимодействовать с ONOO^\cdot с образованием нитротиолов. Время полужизни ONOO^\cdot при pH 7,4 и температуре 37°C около 1 сек. За это время он успевает диффундировать на расстояние, равное нескольким клеточным диаметрам, обеспечивая сильные разрушительные процессы. При повышении NO до 2-4 мкМ способность СОД конкурировать с NO за супероксид резко падает и синтез ONOO^\cdot увеличивается. Степень токсичности $\text{NO}/\text{ONOO}^\cdot$ определяется местом его образования. Гидрофобный, липофильный характер NO приводит к компартиментализации его в липидном бислое, что препятствует его реакции с гидрофильным супероксидом. Однако внутри липидного слоя ONOO^\cdot способен реагировать с продуктами ПОЛ [269]. Образование стабильных

R-NO₂ (органических нитратов) эффективно тормозит ПОЛ и, следовательно, является защитной клеточной реакцией.

Действие нитританионов на фоне лактоацидоза характеризовалось более высокой скоростью дезинтеграции эритроцитов, о чем свидетельствовал более быстрый рост содержания метгемоглобина, уменьшение скорости поступления глюкозы в клетку. При действии нитритов на фоне лактоацидоза мы наблюдали снижение протекторного влияния доноров SH-групп (цистеина, унитиола), что возможно обусловлено ингибирующим эффектом нитрозотиолов на глицеральдегидфосфатдегидрогеназу и лактатдегидрогеназу [248].

3.4.2. Действие других лекарственных и химических веществ на эритроциты

В исследованиях многих авторов [174, 176] показано защитное действие L-аргинина при многих патологиях на эритроцитарные клетки. Особенно выражен этот эффект при гипоксических состояниях. По данным [37], полученным в экспериментах на крысах, L-аргинин служит эндогенным источником NO *in vivo* (при введении его внутривенно) и *in vitro* (при воздействии на клетки и ткани).

Нами было изучено влияние нитрита натрия и L-аргинина в эквивалентных концентрациях (2 мМ/л) на активность фосфолипазы А₂. Действие *in vitro* сопровождалось ингибированием активности фермента, хотя эффект не был продолжительным и через 15 минут инкубации наблюдался рост активности фосфолипазы до исходного уровня.

Традиционным при ИБС является лечение с применением нитропрепаратов, оказывающих значительный вазодилатирующий эффект за счет образования окиси азота.

В работах [22] было показано, что инкубация разнообразных нитровазодилаторов (органические нитраты, нитриты, тионитриты) с оксигемоглобином приводит к его нитрозилированию и окислению до метгемоглобина. Авторы считают, что подобные реакции имеют место и *in vivo*. Аутоокисление гемоглобина до гемихрома происходит при физических и химических воздействиях на белковую часть гемоглобина. Конформационные перестройки приводят к сближению гемового железа с атомом азота дистального гистидина, который выступает в качестве внутримолекулярного нуклеофильного заместителя. Для превращения гемоглобина в гемихром требуются достаточно жесткие условия: нагревание, высокие концентрации сильных органических кислот, пиридина, мочевины, ацетилфенилгидразина [22].

Анионные (кислые) лизофосфатиды (ЛФ), такие как лизофосфатидилсерин, лизофосфатидилэтанол, лизофосфатидилинозит, лизофосфатидная кислота, являются сильными эффекторами превращения как окси-, так и метгемоглобина в гемихром [8]. Цвиттерионные ЛФ (лизофосфатидилэтанолламин, лизофосфатидилхолин, лизофосфатидилсфингомиелин) практически не действуют на оксигемоглобин, а для активации превращения метгемоглобина в гемихром требуются более высокие концентрации, чем кислых ЛФ. Нейтрализация отрицательного заряда на фосфатидной группировке кислых ЛФ кальцием (Ca^{2+}) приводит к полной или частичной потере эффекторных свойств. Превращение гемоглобина в гемихром индуцируют высокие концентрации ароматических карбоновых кислот, мочевины, производные гидрозина [8].

Процессы аутоокисления гемоглобина ускоряют одноэлектронные окислители, например феррицианид калия [232]. Уменьшение рН среды резко увеличивает скорость окисления гемоглобина с помощью феррицианида калия. Это может быть связано с протонированием дистального His молекулы белка и увеличением доступности иона железа гема внешним окислителем. Оксиформа гемоглобина более устойчива к окислению, чем дезоксиформа [76].

Аутоокисление гемоглобина, особенно в оксиформе, индуцируют жирные кислоты, оно сопровождается генерацией АФК [8]. С другой стороны, амидные производные жирных кислот, по данным D.E. Erps, 1983 [цит. 22], теряют свойства окислительных эффекторов. В частности, этаноламиды насыщенных и моноеновых жирных кислот в условиях гипоксии приводят к блокированию Ca^{2+} -каналов и уменьшают скорость выхода ионов кальция из органелл. Было высказано предположение о возможности защиты кардиомиоцитов в условиях гипоксии с помощью этаноламидных производных жирных кислот. При экспериментальной проверке оно подтвердилось, наиболее сильное защитное воздействие оказывал олеилэтанолламин [22].

Нами был осуществлен синтез и изучено протекторное действие N-(2-оксиптил)-амида-цис-9-октадеценевой кислоты (ОЭА) на скорость дестабилизации эритроцитарных клеток в условиях гипоксии и лактоацидоза [105]. В условиях лактоацидоза (7,5 мМ) ОЭА увеличивал способность клеток к деформируемости, повышал процент осморезистентных клеток и снижал процент клеток с повышенной мембранной проницаемостью для мочевины. Наблюдалось также уменьшение скорости аутоокисления гемоглобина, повышение активных концентраций глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы и каталазы, увеличение скорости поглощения глюкозы эритроцитами.

3.4.3. Действие антагонистов кальция, лигандов и блокаторов β -адренорецепторов

Нами было изучено действие антагонистов кальция (финаптин, нифедексал) и бета-блокаторов (талинолол, обзидан) в условиях лактоацидоза, характерного для крови больных ИБС. Добавление данных лекарственных препаратов в концентрациях, равных одноразовой терапевтической дозе, сопровождалось уменьшением скорости метгемоглобинообразования, снижением доли мембраносвязанного гемоглобина, улучшением мембранной проницаемости и механической резистентности клеток, увеличением активных концентраций каталазы. Оптимизируя кальцийзависимые процессы, антагонисты кальция и бета-блокаторы стабилизируют работу основных систем клетки в условиях закисления и снижали процент поврежденных клеток.

Для более детального выявления механизма стабилизирующего действия бета-блокаторов на эритроцитарные клетки мы изучили влияние обзидана в условиях гиперадреналинемии (воздействующая концентрация адреналина превышала физиологическую в 20 раз). Инкубация цельной крови в этих условиях сопровождается увеличением количества адреналина, адсорбированного на мембране эритроцитов. Это дает возможность предполагать, что в начальный период времени обзидан эффективно связывается с рецептором, а затем постепенно вытесняется лигандом [105]. Десенситизация рецепторов в присутствии обзидана идет более медленно за счет связывания антагониста, а высокая скорость разрушения адреналина по сравнению со временем полувыведения обзидана обеспечивает стабилизацию мембраны и приводит к уменьшению подвижности анулярного слоя липидов вокруг бета-блокатора и затруднению интернализации рецептора. Уменьшение скорости интернализации рецепторов, с одной стороны, способствует связыванию с ними адреналина и уменьшению интенсивности действия его на бета-адренорецепторы сосудов, с другой – снижает повреждения эритроцитарной мембраны.

3.5. Механизмы разрушения эритроцитов в норме и при патологии

3.5.1. Внутрисосудистый гемолиз эритроцитов

Основная масса эритроцитов разрушается путем фрагментации (эритрорексиса) с последующим лизисом и эритрофагоцитозом в органах ретикулогистиоцитарной системы, преимущественно в селезенке [160,

241, 260]. Нормальный эритроцит проходит синусы селезенки благодаря своему свойству изменять форму [155, 160]. По мере старения эритроциты теряют способность деформироваться, задерживаются в синусах селезенки и секвестрируются. Продолжительность жизни эритроцитов составляет 100-130 дней. Разрушение начинается уже в кровотоке. Эритроцит превращается в микроцит, образуются обломки, шизоциты, которые фагоцитируются макрофагами ретикулогистиоцитарной системы, где заканчивается распад гемоглобина. За сутки разрушается более 200 млрд. клеток, и такое же количество молодых эритроцитов образуется и выходит в кровоток [260].

Внутрисосудистый гемолиз характеризуется распадом эритроцитов непосредственно в кровяном русле, в норме он не должен превышать 10% от всех клеток. Это приводит к выходу свободного гемоглобина в плазму крови, его количество составляет в норме от 1 до 4 мг на 100 мл. Освобожденный гемоглобин связывается гаптоглобином, комплекс поглощается ретикулоэндотелиальной системой и разрушается.

Причиной развития патологического внутрисосудистого гемолиза могут стать различные повреждения мембраны эритроцитов. Они вызываются токсинами, АФК, излучениями, иммунными комплексами, избытком гормонов, лекарственными препаратами. Рядом авторов [160, 175] отмечается, что преждевременный гемолиз клеток может произойти из-за осаждения на мембране эритроцитов агрегатов гемоглобина. Различные факторы, дестабилизирующие структуру гемоглобина и индуцирующие его окисление, могут приводить к образованию в эритроцитах включений, локализованных на внутренней стороне мембраны и жестко с ней связанных (тельца Гейнца) [255].

Продукты окисления гемоглобина и, в частности, гемихромы обладают высоким сродством к цитоплазматическому домену белка полосы 3. Связывание гемихрома с этим доменом приводит к образованию кластеров и вызывает необратимые изменения в мембране эритроцитов. Этот процесс стимулирует образование аутоиммунных антител, сайты узнавания для которых на внешней поверхности эритроцитов локализуются на эпитопе БП-3 [160]. Возможно, именно эти процессы и служат естественным сигналом для деструкции эритроцитов *in vivo*.

Патологический гемолиз может возникнуть при наследственной неполноценности мембран эритроцитов, недостаточности ферментов, нарушениях синтеза гемоглобина, вследствие изоиммунологического конфликта по групповой и резус-принадлежности крови матери и плода, избыточного количества эритроцитов. Усиленный гемолиз наблюдается при микросфероцитарной, овалоцитарной анемиях, гемоглобинопатиях, физиологической желтухе и эритробластозе новорожденных [161, 196].

3.5.2. Апоптоз эритроцитов млекопитающих

Апоптоз – запрограммированная гибель клеток. Процесс апоптоза связан с фрагментацией ядерного материала, образованием апоптозных телец (фрагментов клетки, окруженных мембраной) [192]. Применительно к клеткам животных и человека апоптоз связан с активацией каспаз, представляющих собой семейство эволюционно консервативных цистеиновых протеаз, специфически расщепляющих белки после остатков аспарагиновой кислоты. Мишенью каспаз является поли(АДР-рибозо)полимераза (ПАРП), фермент, участвующий в процессах репарации ДНК.

Особую форму апоптоза претерпевают эритроциты млекопитающих. Потерю ядра эритробластом можно рассматривать как форму апоптоза. Есть два мнения на механизм потери ядра эритроцитарными клетками млекопитающих: 1) на этапе эритробласта ядро выталкивается из клетки и пожирается макрофагом [158]; 2) деструкция ядра с образованием телец Жолди и их последующий распад и лизис внутри клетки. Лишенный ядра и митохондрий эритроцит, по-видимому, представляет собой клетку с включенной программой гибели. Однако многие детали механизма «исполнения» этой программы еще предстоит выяснить. Наличие гликолитического процесса, систем антиоксидантной защиты клетки, систем регуляции и сохранения гомеостаза позволяет эритроциту эффективно выполнять кислородтранспортную функцию, а также участвовать в сохранении организменного гомеостаза, рецептируя избыток информационных молекул, адсорбируя на мембране различные ксенобиотики и т. д. Кроме того, в определенных условиях ускоряется процесс протеолитической деградации гемоглобина, что сопровождается генерацией в плазму биологически активных пептидных соединений.

Изменение условий функционирования эритроцитов, как показали наши исследования, оказывает существенное влияние на скорость реализации программы апоптозной гибели данных клеток [105]. Лактоацидоз дозозависимо сопровождается уменьшением сродства гемоглобина к кислороду и ускорением процессов метгемоглобинообразования, что способствует нарастанию энергодефицита клетки и более быстрой дестабилизации мембраны и метаболических систем эритроцита. Если условия лактоацидоза переходят в хроническую форму, процент поврежденных клеток в циркулирующей популяции постепенно возрастает, что выявляется у больных ИБС, а также у больных с анемиями. Это приводит к ухудшению кислородтранспортной и адаптивной функций клеток и усугублению явлений гипоксии. Более быстрая гибель клеток и активация эритропоза может исчерпать компенсаторные возможно-

сти организма и будет наблюдаться обострение заболевания. Повреждения популяции клеток еще быстрее развиваются при сочетании лактоацидоза с гипогликемией, так как это усугубляет энергодефицит и способствует ускорению дезинтеграции мембран. Вместе с тем, избыток глюкозы также дозозависимо ускоряет процессы дезинтеграции эритроцитов за счет неспецифического гликирования белков и, прежде всего, гемоглобина. Лактоацидоз увеличивает процент поврежденных клеток и в условиях гипергликемии.

Нитропрепараты, стимулируя метгемоглобинообразование, ускоряют процессы дезинтеграции клеток, лактоацидоз усугубляет их действие, и степень повреждений нарастает. Нитрозотиолы в условиях избытка молочной кислоты утрачивают протекторные свойства и способствуют ускорению старения эритроцитов. Антагонисты кальция и бета-блокаторы в условиях лактоацидоза оказывают положительное воздействие, уменьшая скорость дезинтеграции клеток. Гипоксия и реоксигенация сопровождаются ускорением старения и апоптозной гибели эритроцитов. В этих условиях эффективно замедлить этот процесс можно добавлением антиоксидантов и мембранотропных соединений.

Осуществление программы апоптозной гибели эритроцитов связано с процессами протеолитической деградации гемоглобина и секрецией биологически активных пептидов эритроцитами. Изменение спектров пептидов в зависимости от степени дезинтегрированности мембран позволяет предположить наличие новых условий для реализации адаптивно-компенсаторной функции эритроцитов. Оценка популяции по степени дезинтеграции и скорости протекания процессов старения может служить отправной точкой для определения возможностей включения компенсаторных механизмов, ликвидирующих патологические изменения гомеостаза.

Глава 4

Методы изучения эритроцитов человека

4.1. Отмывка эритроцитов и разделение их на фракции

Отмывка. Выделение эритроцитов из цельной крови осуществляется трехкратной отмывкой крови 0,154 М холодным (+4+8°С) раствором хлористого натрия, доведенного до рН 7,2 двухзамещенным фосфатом натрия 0,2 М. Режим центрифугирования: 600g, 10 минут, температура – +4°+6°С. Предварительно рекомендуется осуществить первое центрифугирование в том же режиме, но без добавления раствора хлористого натрия и убрать плазму. Отмывочный раствор добавляется в соотношении не менее 5:1 (на 1 мл суспензии форменных элементов 5 мл раствора хлористого натрия). После последнего центрифугирования надосадочная жидкость убирается непосредственно перед дальнейшими исследованиями.

Если предполагается некоторое время сохранять фракцию, можно не отсасывать надосадочную жидкость и поместить пробирки в холодильник, но не более чем на один час. Более длительное сохранение фракции чистых эритроцитов возможно только при отсасывании надосадочной жидкости и добавлении в соотношении 1:1 раствора Рингера-Локка или Хенкса, но не более чем 4-6 часов. Отсутствие плазменных белков дестабилизирует эритроциты, поэтому чистая фракция клеток быстро повреждается. Сохранить клетки возможно только в цельной крови при температуре +8+10°С в течение 1-2 суток (максимум).

Разделение эритроцитов на фракции по возрасту. В периферической крови циркулируют эритроциты различного возраста (от 0 до 120 дней). Самые молодые клетки эритроцитарного ряда, попадающие в периферическую кровь, – это ретикулоциты. По мере созревания эритроциты становятся плотнее, их объем уменьшается. Поэтому большинство методов сепарации (разделения) эритроцитов по возрасту основано на различии их плотности. Наиболее легкие и крупные клетки –

ретикулоциты – концентрируются в верхних слоях эритроцитарного столба при применении центрифугирования. Однако при разделении эритроцитов по плотности быстрое всплывание легких фракций клеток, которое происходит в первые несколько секунд, препятствует дальнейшей миграции эритроцитов различной плотности. В связи с этим для улучшения возрастной сепарации эритроцитов стали применять разделение в градиенте плотности разных сред.

Для выделения возрастных фракций эритроцитов в различное время применяли: 30%-ный раствор альбумина, эфиры фталатов, фиколл, арабиногалактан, ренографин с фиколлом, людокс с поливинилпирролидоном, декстран, ренографин с арабино-галактаном, фиколл-верографин и другие [38]. Все эти вещества имеют недостатки: они могут быть неизотоничными и гемолизировать клетки, не смешиваться с водой, токсически повреждать эритроциты.

Описано использование среды, состоящей из суспензии перколла в растворе ренографина. Метод прост, быстр в проведении, нетоксичен для эритроцитов. В верхней фракции эритроцитов можно получить обогащение ретикулоцитами более чем в 10 раз. Среда изотонична, низкой вязкости, с физиологическим рН.

Предложен метод разделения по плотности путем центрифугирования при 30°C с использованием углового ротора в режиме 1500 об/мин (500g) в течение 1 часа. Применение углового ротора улучшает внутреннюю циркуляцию клеток, а температура 30°C уменьшает вязкость крови.

Разделение эритроцитов на фракции методом серийного центрифугирования (Авраамова, 1975). Свежезабранную кровь с цитратом натрия в отношении 1:9 центрифугировать с угловым ротором при 600-700g (4°C) в течение 20 минут. Осторожно собрать плазму, удалить лейкоцитарную пленку. Затем отобрать верхнюю половину эритроцитарного столба и перенести в новую пробирку, ресуспендировать плазмой на 50% и центрифугировать в том же режиме. Процедуру повторить 4 раза. Метод позволяет отделить фракцию молодых клеток от старых.

Чистоту фракций можно оценить по индексу фильтруемости и активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. У молодых клеток эти показатели должны быть достоверно выше, чем у старых.

4.2. Определение соотношения форм гемоглобина

Определение общего гемоглобина циангемоглобиновым методом (используются стандартные наборы).

Реактив Драбкина содержит 1 г кислого углекислого натрия; 0,2 г феррицианида калия (красная кровяная соль) и 50 мг цианистого калия на 1000 мл раствора в дист. воде. Можно воспользоваться наборами для определения гемоглобина, где имеется также стандартный раствор гемоглобина (150 г/л).

Ход определения: 20 мкл свежезятой крови или суспензии отмытых эритроцитов добавить в 5 мл реактива Драбкина. Перемешать. Через 15 минут измерить оптическую плотность против реактива Драбкина, длина волны 540 нм, кювета 1 см. Одновременно определяется ОП стандартной пробы: 20 мкл стандартного раствора + 5 мл реактива Драбкина.

Расчет: $\Delta E \text{ оп.} / \Delta E \text{ ст.} \times 150 = X \text{ Hb г/л (мг/мл)}$.

Гемоглобин легко подвергается окислению путем отдачи одного электрона и редукции, что может являться как источником, так и резервуаром гашения свободных радикалов. Автоокисление гемовых структур продуцирует супероксид O_2^- и косвенно через его дисмутацию перекись водорода H_2O_2 . Гемоглобин также взаимодействует с редокс-активными ксенобиотиками и метаболитами, образуя ксенобиотические радикалы и другие виды оксидантов, что часто сопровождается окислительной денатурацией гемоглобина. Это регистрируется как наличие в клетках телец Хайнца [280].

Окисление оксигемоглобина продуцирует супероксид и метгемоглобин. Если глобиновые структуры дестабилизированы, метгемоглобин может превратиться в гемихром, в котором процессы денатурации идут легко. Гемихромы представляют собой главные компоненты телец Хейнца. Термин *хологлобин* используется для описания денатурированного гемоглобина, в котором порфириновое кольцо было гидроксильровано и раскрыто. Феррилгемоглобин ($Hb^{2+}H_2O_2$) – это Fe IV комплекс с перекисью водорода, образуется при реакции метгемоглобина с перекисью водорода.

Реакции взаимодействия $оксиHb$ или $метHb$ с радикал- или оксидантгенерирующими системами могут исследоваться спектрально, как в очищенных растворах гемоглобина, так и в суспензии эритроцитов и цельной крови. Спектры pH-зависимы, поэтому требуют строгого соблюдения определенного pH среды.

Оценить скорость процессов аутоокисления гемоглобина и соотношение форм гемоглобина можно, используя различные методы, представленные ниже.

Определение окси-, дезокси- и метформы и других форм гемоглобина. [14, 77, 280]. Для определения соотношения форм гемоглобина использовали измерение оптической плотности гемолизатов в 5 мМ Натрий-фосфатном буфере, рН 7,4 максимумов поглощения: оксигемоглобина – 577 нм; дезоксигемоглобина – 554 нм; метгемоглобина – 630 нм. Количество выражали в процентах к общему содержанию гемоглобина.

Ход определения. В 5 мл 5 мМ натрий-фосфатного буфера, рН 7,6 добавить 20 мкл либо цельной крови, либо суспензии отмытых эритроцитов. Перемешать, эритроциты при этом должны полностью гемолизироваться. Сразу же провести измерения оптической плотности при трех длинах волн против фосфатного буфера. Расчет проводится по формулам:

$$\text{оксиHb, \%} = \frac{\Delta E_{\lambda 577} \times 100}{\sum \Delta E_{\lambda 577} + \Delta E_{\lambda 554} + \Delta E_{\lambda 630}}$$

$$\text{дезоксиHb, \%} = \frac{\Delta E_{\lambda 554} \times 100}{\sum \Delta E_{\lambda 577} + \Delta E_{\lambda 554} + \Delta E_{\lambda 630}}$$

$$\text{метHb, \%} = \frac{\Delta E_{\lambda 630} \times 100}{\sum \Delta E_{\lambda 577} + \Delta E_{\lambda 554} + \Delta E_{\lambda 630}}$$

Можно рассчитать и более точное соотношение форм гемоглобина для смесей чистых белков [280]

Если в смеси присутствуют только *окси- и метгемоглобин*, то их соотношение можно посчитать по следующим формулам:

$$\text{оксиHb, } \mu\text{M} = 66A_{577} - 80A_{630}$$

$$\text{метHb, } \mu\text{M} = 279A_{630} - 3,0A_{577}$$

Для оксигемоглобина можно также использовать при расчете следующую формулу:

$$\text{оксиHb, } \mu\text{M} = A_{577}/0,0110$$

Растворы, включающие гемихром и холеглобин. Если в результате аутоокисления или окисления ксенобиотиками образуются также геми-

хром и холеглобин, последний следует осадить центрифугированием (1000g, 1 мин). Измерьте ОП при следующих длинах волн: 560, 577, 630 и 700 нм. Из каждого показания (кроме 700 нм) отнимите вклад холеглобина – $A_{700} \cdot 0,005$ (если концентрация оксигемоглобина примерно 40 μM). Затем вычислите микромолярные концентрации окси-, метгемоглобина и гемихрома.

$$\text{оксиHb, } \mu\text{M} = 119A_{577} - 39A_{630} - 89A_{560}$$

$$\text{метHb, } \mu\text{M} = 28A_{577} + 307A_{630} - 55A_{560}$$

$$\text{гемихром, } \mu\text{M} = -133A_{577} - 114A_{630} + 233A_{560}$$

Растворы, включающие феррилгемоглобин.

Количество феррилгемоглобина рассчитывается по формуле:

$$\text{феррилHb} = 96A_{560} - 55A_{577} - 47A_{630}. \text{ При этом метгемоглобин и оксигемоглобин рассчитываются по следующим формулам:}$$

метHb = – 82 A_{560} + 43 A_{577} + 319 A_{630}

$$\text{оксиHb} = 4A_{560} + 68A_{577} - 83A_{630}.$$

Тиолокисление гемоглобина. Тетрамер гемоглобина включает шесть цистеиновых остатков. Четыре спрятаны и практически недоступны для оксидантов, а два остаются незащищенными. Тиолокисление может быть измерено с помощью реактива Элмана – 2,3-дитиобис(5-нитропиридин). Преимущество этого реактива состоит в том, что пик его поглощения не совпадает с пиком Сорета гемоглобина.

Анализ содержания свободных тиолов. Разбавленный раствор гемоглобина (концентрация 5-15 μM) в 10 мМ фосфатном буфере, pH 8,0 – 1 мл, 2,3-дитиобис(5-нитропиридин) 10 мМ (3,1 мг/мл этанола) – 10 мкл. Через 20 минут промерить ОП на длине волны 360 нм против раствора, не содержащего гемоглобин, но содержащего все остальные компоненты. Для расчета используется молярный коэффициент, равный 14,0 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Для расчета общего количества тиоловых групп применяются те же реактивы, только в фосфатный буфер добавляют 1% додецилсульфата натрия.

Определение мембраносвязанного гемоглобина [218]. Использовали основу метода, описанного З.С. Токтамысовой, Н.Х. Биржановой (1990) с применением гемолизирующего буфера.

Ход определения. 20 мкл отмытых эритроцитов или цельной крови внести в 5 мл 0,05 М фосфатного буфера, pH 7,6. Определить оптическую плотность при длине волны 540 нм (кувета 10 мм) (ΔE_1). Затем пробы центрифугировать при 3000-4500g в течение 15-10 минут (соответственно ускорению) и вновь измерить оптическую плотность при длине волны 540 нм (ΔE_2).

Количество мембраносвязанного гемоглобина выражается в процентах по отношению к пробам до центрифугирования.

$$\text{Мембр.св. Hb, \%} = (\Delta E_1 - \Delta E_2) \times 100 / \Delta E_1$$

Определение скорости химического окисления гемоглобина [162].
Используется как основа метод А.Е. Мышкина и Л.Д. Богдановой (1990).

Ход определения. 0,15 мл водного гемолизата эритроцитов или цельной крови 1:20 добавить в 4 мл 5 мМ Na-фосфатного буфера, рН 7,2. Окисление проводится 0,2 мл $3,0 \times 10^{-5}$ М раствором феррицианида калия. Оптическая плотность измеряется сразу после добавления железа и через 10 минут в области поглощения оксигемоглобина – 577 нм.

Расчет производится по формуле:

$$X \text{ мкМ оксиHb /мин на г Hb в л гемолизата} = \Delta E \times 4,35 \times 1000 / 15,37 \times 10 \times 0,15 \times \text{гHb/л, где:}$$

ΔE – разница оптической плотности (начальной и через 10 минут);

4,35 – объем пробы, в которой проводится измерение, мл;

1000 – пересчет на л;

15,37 – молярный коэффициент экстинкции оксиHb на длине волны 577 нм;

10 – время измерения, мин;

0,15 – количество гемолизата, мл;

гHb/л – содержание гемоглобина в г/л.

Определение телец Хейнса в интактных эритроцитах [280]. Осаждение гемоглобина внутри клеток в виде телец Хейнса может быть оценено определением числа и размера включений в фиксированном количестве эритроцитов, окрашенных метиленовым фиолетовым и наблюдаемых с помощью микроскопа. Простая количественная оценка относительного числа телец Хейнса может быть осуществлена с помощью гипотонического разрушения и измерения мутности полученного раствора.

Ход определения. Лизис клеток осуществляется 5 мМ фосфатным буфером, рН 7,4. Добавляется 0,1 мл 10%-ной клеточной суспензии в 1 мл буфера, перемешивается, оставляется на 15 минут. Измеряется ОП при длине волны 700 нм против буфера. Затем следует отцентрифугировать 1 минуту при 1000g и снова измерить ОП. Разность показывает количество телец Хейнца.

Выделение и кристаллизация гемоглобина

Эритроциты отмываются физиологическим раствором от плазмы и других клеток. Затем гемолизируются 10-кратным объемом дистиллированной воды с добавлением 5%-ного диэтилового эфира. Гемолизат центрифугируют при 650g (3000 об/мин) в течение 10 минут. Надосадочную жидкость оставляют на ночь при 4°C. На следующий день добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония и удаляют образующийся осадок фильтрованием. Фильтрат снова оставляют на ночь при той же температуре, затем кристаллы оксигемоглобина собирают фильтрованием на воронке Бюхнера.

Гемоглобин можно выделить одноэтапно с помощью колоночной хроматографии гемолизата на DEAE-Sephadex. В 3 мл гемолизата с концентрацией гемоглобина 1 г/мл добавить 3 мл 50 мМ ТРИС-буфера, содержащего 0,1 мМ EDTA, pH 8,3 и нанести на колонку с DEAE-Sephadex A-50 (размер колонки 25 × 1,5 см), промытого вышеуказанным буфером. Гемоглобин элюируется со скоростью 0,5 мл/мин. Линейный градиент pH создает 350 мл начального буфера с pH 8,3 и 350 мл буфера, доведенного до pH 7,0 с помощью HCl [280].

4.3. Методы исследования состояния мембраны эритроцитов

Определение осмотической резистентности эритроцитов [176].
Ход определения. В 5 мл Na-фосфатного буфера 5 мМ, pH 7,2, содержащего 68,5 мМ хлористого натрия, добавить 20 мкл цельной крови или фракции чистых эритроцитов. Центрифугировать в режиме 600g 15 минут. Измерить ОП при длине волны 540 нм, кювета 1 см (E_1). Затем в каждую пробу добавить 0,1 мл 20%-ного раствора тритона X-100 для полного гемолиза. Пробы тщательно перемешать до получения прозрачности. Измерить ОП при той же длине волны (E_2).

Расчет: % погибших клеток = $E_1 \times 100 / E_2$;

% резистентных клеток = $(E_2 - E_1) \times 100 / E_2$

Определение мембранной проницаемости для мочевины [92].
Используется смесь 0,154М растворов мочевины и хлористого натрия в соотношении 45:55.

Ход определения. В 5 мл смеси добавить 20 мкл цельной крови или суспензии фракции чистых эритроцитов, центрифугировать в режиме 600g 15 минут. Измерить ОП при длине волны 540 нм, кювета 1 см (E_1). Мембранную проницаемость определяют по степени гемолиза по от-

ношению к 100%-ному. Полный гемолиз осуществляют добавлением 0,1 мл 20%-ного раствора тритона X-100. Пробы тщательно перемешивают и измеряют ОП при той же длине волны (E_2)

Расчет: % разрушенных клеток = $E_1 \times 100 / E_2$

Определение степени механического гемолиза [158, 176]. *Ход определения* Пробы эритроцитов или цельной крови в соотношении 1:20 помещают в 25 мМ раствор ТРИС HCL, pH 7,4 и инкубируют при 37°C в течение 10 минут. Далее пробы центрифугируют при 600g 10 минут. Оптическую плотность измеряют на длине волны 540 нм (E_1). Степень механического гемолиза рассчитывают в процентах гемолизированных клеток по отношению к полному гемолизу. Осуществляют полный гемолиз добавлением 0,1 мл 20%-ного раствора тритона X-100. Измеряют ОП при той же длине волны (E_2).

Расчет: % разрушенных клеток = $E_1 \times 100 / E_2$

Определение степени гликозилированности мембран эритроцитов [223]. Для определения степени гликозилированности использовали принцип, описанный у Б.И. Фелькорена и соавт. (1991).

Метод основан на способности гликозилированных остатков белков восстанавливать нитросиний тетразолий в щелочной среде. Концентрация нитросинего тетразолия 0,75 мМ в 0,1 М карбонатном буфере, pH 10,35.

Ход определения. 100 мкл суспензии эритроцитов гемолизировать в 20 мл холодной дист. воды, центрифугировать при 7500g, осадок мембран промывать 0,09%-ным раствором хлористого натрия и центрифугировать в том же режиме. Полученные мембраны ресуспендировать в 0,2 мл 0,09%-ного хлористого натрия. К 0,1 мл суспензии мембран добавить 2 мл раствора нитросинего тетразолия, инкубировать при 37°C и измерить ОП через 10 минут (длина волны 540 нм, кювета 0,5 см) и через 25 минут. Контроль – 0,1 мл дист. воды и 2 мл нитросинего тетразолия. Степень гликозилированности мембранных белков выразить в единицах прироста оптической плотности за 15 минут.

X (y.e.) = $\Delta E \times 100$

Определение индекса фильтруемости эритроцитов [278]. Используется фильтр немецкой фирмы Filtrak желтой или красной маркировки, укрепляется в установке, напоминающей паяльцы. Следует избегать фильтров со слишком малой и слишком большой скоростью фильтрации буфера (оптимум – 20-25 сек).

Ход определения. Измерить время фильтрации t_1 (сек) 0,2 мл 0,145 М хлористого натрия, содержащего 20 мМ Na-фосфатного буфера, pH 7,4 путем нанесения его в центр фильтра. Затем на центр фильтра нанести

0,03 мл суспензии эритроцитов, разбавленной 0,154 М раствором хлористого натрия (1:1) или цельной крови. Время фильтрации эритроцитов – t_2 .

Индекс фильтруемости определяется как отношение t_1/t_2 . Выражается в условных единицах (у.е.).

Модификация метода определения индекса фильтруемости эритроцитов [39]. Рассчитывается отношение диаметра пятна растекания суспензии эритроцитов к диаметру пятна растекания физиологического раствора.

Используются фильтры марки *Filtrak-388*, растянутые на рамке. Строго в центр наносят вертикально 0,2 мл физиологического раствора. Через 60 сек после полного растекания пятна наносят 20 мкл суспензии отмытых эритроцитов, доведенных до 60%-ного гематокрита. Диаметры пятен измеряют и рассчитывают их отношение, выражают в процентах:

$$\text{ИД ФЭ} = \text{Д эр.} / \text{Д физ. раствора} \times 100\%.$$

Определение электродиффузионного потенциала (ЭДП) пробоя мембраны эритроцитов [183]. *Принцип метода:* при помещении эритроцитов в изоосмотическую гипохлоридную сахарозную среду происходит обмен $\text{Cl}^- \leftrightarrow \text{OH}^-$ через мембрану, за счет которого на ней генерируется трансмембранный водородный потенциал. При достижении критической величины потенциала ϕ^* возможно явление электрического пробоя мембраны, при котором предполагается сильный ток K^+ наружу через поры.

Определяя зависимость генерируемого потенциала ΔpH от внешней концентрации ионов Cl^- , можно найти точку отклонения от логарифмической зависимости, она и будет соответствовать ϕ^* .

Ход определения. В систему, содержащую 10 мл смеси сахарозы и хлористого натрия (см. табл.), добавить 0,2 мл суспензии отмытых эритроцитов. Начальная рН 7,2 доводится ex tempore в кювете рН-метра. Фиксируется максимальная ΔpH в каждой концентрации ионов хлора.

Расчет потенциалов и определение ϕ^* проводятся с использованием формулы Нернста, которая при условии $\lg C_0/C_i = \Delta \text{pH}$ и температуре 20°C превращается в

$$\Delta \phi = 58 \times \Delta \text{pH} \text{ (мВ)}$$

**Соотношение компонентов смеси
для определения ЭДП пробы мембраны эритроцитов**

N	Сахароза 290 мМ, мл	Хлористый натрий 145 мМ, мл	Хлористый натрий 14,5 мМ, мл	Концентра- ция ионов хлора	Логарифм отношения C_0/C_1
1	8,0	2,0	-----	29,0	0,67
2	9,0	1,0	-----	14,5	1
3	9,6	0,4	-----	5,8	1,4
4	9,9	0,1	-----	1,45	2,0
5	9,75	-----	0,25	0,362	2,6
6	9,9	-----	0,1	0,145	3,0

Вычислив таким образом $\Delta\phi$ для каждой концентрации ионов хлора, строят график зависимости $\Delta\phi = f(\lg C_0/C_1)$. Перегиб зависимости будет соответствовать ϕ^* .

Обычные изменения потенциала лежат в области 40-70 мВ.

**Определение активности
ферментов – маркеров состояния мембраны**

Эритроциты человека содержат два типа пиридиннуклеотиддегидрогеназ, связанных с процессами восстановления метгемоглобина в оксигемоглобин: НАДН-дегидрогеназу – НАДН-цитохром- b_5 -редуктазу и флавинзависимую НАДН-дегидрогеназу [113]. Первый фермент находится в эритроцитах в меньшем количестве, но его удельная активность выше. НАДН-цитохром- b_5 -редуктаза может существовать в водорастворимой и мембраносвязанной формах.

Определение метгемоглобинредуктазной активности эритроцитов (НАДН-цитохром- b_5 -редуктаза) [256]. Подготовка гемолизата для проведения исследований: в 0,1 мл упакованных эритроцитов добавить 0,2 мл 0,2%-ного раствора тритона X-100 и 0,7 мл дист. воды. Полученный гемолизат можно использовать для определения активности ферментов, содержания молочной кислоты и восстановленного глутатиона в эритроцитах (основной гемолизат).

О метгемоглобинредуктазной активности судят по способности эритроцитарных гемолизатов восстанавливать феррицианид калия в присутствии НАДН [256].

Ход определения. Инкубационная смесь содержит 10 мМ ТРИС-НСL с 5 мМ ЭДТА, рН 8,0; 0,2 мМ феррицианида калия; 0,2 мМ НАДН.

На 3,5 мл инкубационной смеси добавляют 20 мкл гемолизата, содержащего 3,5-4 г гемоглобина на 1 л. Для этого основной гемолизат разводят дистиллированной водой в 4 раза. Для определения мембраносвязанной формы можно использовать 0,2 мл теней эритроцитов в 0,2%-ном тритоне X-100.

Падение оптической плотности регистрируют на длине волны 340 нм в течение 10 минут при температуре 37°C. Следует учитывать ферментативное взаимодействие НАДН с феррицианидом калия за этот промежуток времени с помощью подготовки контрольной пробы, не содержащей гемолизата.

При расчете используют молярный коэффициент НАДН (длина волны 340 нм), который равен $6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, активность выражают в мкМ НАДН/мин на гНб в литре гемолизата или в мМ/мин без пересчета на количество гемоглобина в гемолизате.

Гемоглобин определяют циангемоглобиновым методом с использованием реактива Драбкина и стандартных наборов.

Оценка метгемоглобинредуктазной активности в интактных эритроцитах. Может быть проведена по скорости превращения метгемоглобина в гемоглобин.

Ход определения. Чистую фракцию клеток обработать 5 мМ нитритом натрия для образования метгемоглобина. Примерное соотношение: 1 мл суспензии 1:1 с 0,154 М раствором хлористого натрия и 20 мкл 5 мМ нитрита натрия. После 5-минутного воздействия клетки отмыть от нитрита натрия в режиме обычного отмывания. Определить количество метгемоглобина в пробах.

Провести 5-минутное инкубирование клеток при 37°C в растворе, содержащем 30 мМ глюкозы и 5 мМ лактата натрия (соотношение 1:1), что должно сопровождаться восстановлением метгемоглобина. Отмыть эритроциты от среды инкубации и снова определить метгемоглобин.

Расчет ведется по разнице в содержании метгемоглобина, отнесенной к времени инкубации (5 минут).

Определение активности ацетилхолинэстеразы [264]. Активность определяется по методу Элмана в модификации H.Igusu и соавт. (1980).

Основной гемолизат разводится в 20 раз дистиллированной водой перед определением активности фермента.

Ход определения. Инкубационная смесь содержит 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,4; 0,015 мМ ацетилтиохолина, 0,1 мкМ реактива Элмана (5,5'-дитиобис-2-нитробензойная кислота); 0,1 мл разведенного гемолизата на 2,9 мл инкубационной среды. Инкубировать 10 минут при 37°C. Регистрировать изменение оптической плотности при длине волны 412 нм до и после инкубации.

При расчете активности использовать коэффициент молярной экстинкции для тионитрофенольного аниона (ТНФА) реактива Элмана, образующегося в ходе реакции: $\epsilon_{\lambda 412} = 11400 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Активность выразить в мкМ ТНФА/мин на грамм гемоглобина в литре гемолизата.

Определение активности 5'-нуклеотидазы [189]. Систематическое название: 5'-рибонуклеотид-фосфогидролаза, фермент специфически гидролизует 5'-нуклеотиды. 5'-нуклеотидаза – ведущая составная часть регуляторной системы метаболизма нуклеиновых кислот, синтеза и трансмембранного транспорта аденозина. Активация данного фермента при стрессе может свидетельствовать об ослаблении связи фермента с мембраной по причине дегградации фосфолипидного бислоя.

Для определения активности используют следующий гемолизат: 0,1 мл отмытых эритроцитов, упакованных при 600g (10 минут) + 0,2 мл 0,2%-ного тритона X-100 + 0,1 мл 1%-ного раствора ЭДТА + 0,6 мл дист. воды.

Ход определения. Инкубационная среда содержит 4,0 мМ АТФ; 1,0 мМ хлористого магния; 50 мМ ТРИС-НСL, рН 7,0; t = 37°C. Время инкубации 60 минут. Общий объем среды 0,5 мл.

Реакцию останавливают 1 мл 10%-ного холодного раствора ТХУ кислоты. В пробах определяют количество неорганического фосфата [59].

Контрольные пробы: 1) содержание фосфора в исследуемом материале (проба без инкубации); 2) содержание свободного фосфора в АМФ (инкубация без добавления исследуемого материала).

Расчет проводится с использованием стандартной пробы, и активность выражается в мкМ P_н/мин на грамм гемоглобина в литре гемолизата.

Определение Na⁺, K⁺, -АТФ-ной активности [240]. Подготовка гемолизата: 1 мл отмытых эритроцитов инкубируют с 1 мл 1%-ного ТВИН-20 на 0,25 М растворе сахарозы в 0,02 М ТРИС, рН 7,6 в течение 60 минут

при комнатной температуре. Затем взвесь разводят в 2 раза 0,25 М сахарозой с ТРИС-буфером (без ТВИН-20).

Ход определения. Инкубационная среда содержит: 50 мМ ТРИС-НСL; 1 мМ ЭДТА; 100 мМ NaCL; 10 мМ KCL; 2 мМ АТФ; 3 мМ MgCL₂, 0,1 мл суспензии эритроцитов

Инкубация проводится при 37⁰С в течение 30 минут. Реакцию останавливают добавлением 0,2 мл 5%-ной ТХУ.

В пробах определяется содержание фосфора неорганического (любым чувствительным методом). Одновременно ставятся контрольные пробы на содержание фосфора неорганического в исследуемом материале до инкубации и в растворе АТФ.

Активность выражается в мкМ P_i/мин на грамм гемоглобина в литре гемолизата.

Определение активности Ca²⁺ АТФ-азы [80]. Эритроциты отмывают 3-4 объемами среды, содержащей 150 мМ хлористого натрия, 10 мМ ТРИС-НСL, рН 7,4. Последняя отмывка осуществляется средой А (135 мМ KCL, 10 мМ ТРИС-НСL, 10 мМ НЕPЕС, рН 7,4, 0,025 мМ MgCL₂).

Ход определения. Отмытые эритроциты вносят в среду В, содержащую 135 мМ KCL, 0,04%-ного сапонина, 10 мМ ТРИС, 10 мМ НЕPЕС, 0,025 мМ MgCL₂, 1 мМ АТФ, 1 мМ ЭГТА, 1,1 мМ CaCL₂, рН 7,4. Соотношение 1:5. Одновременно готовят пробу со средой, содержащей все компоненты, кроме хлористого кальция. Инкубируют пробы при 37⁰С в течение 20 минут. Реакцию останавливают добавлением ТХУ кислоты до конечной концентрации 5%. В пробах определяют содержание фосфора неорганического любым чувствительным методом. Активность Ca²⁺ АТФ-азы определяют по разнице накопления фосфатов в пробах с кальцием и без него.

Определение активности фосфолипазы A₂ [23]. Ферментный препарат получают путем гемолиза трижды отмытых 0,154 М раствором хлористого натрия эритроцитов или используя сразу цельную кровь. Гемолиз вызывают добавлением равного объема охлажденной дистиллированной воды. Экстракцию проводят 2 М раствором NaCL в течение 10 минут при 37⁰С (соотношение 2:1). Ферментный препарат готовят смешиванием равных объемов экстракта и ТРИС-буфера 0,05 М, рН 7,5. В качестве субстрата используют 10%-ный раствор лецитина в растворителе, состоящем из 95%-ного диэтилового эфира и 5%-ного метанола.

Ход определения. В контрольную пробу последовательно вносят 25 мкл ферментного препарата, 3 мл этанола (абсолютного) и 2 мл раство-

ра субстрата. В опытные пробы этанол не вносят. Пробы помещают на 10 минут в водный термостат при температуре 37 °С, затем в опытные пробы также добавляют этанол.

Активность фосфолипазы оценивают по степени просветления лецитиновой эмульсии на длине волны 500 нм. За единицу активности принимают уменьшение ОП на 0,01 за 1 мин. Удельную активность рассчитывают в пересчете на грамм гемоглобина в литре гемолизата (у.е.).

4.4. Изучение состояния антирадикальной защиты клетки

Определение активности супероксиддисмутазы [68]. Используется метод, описанный Е.Е. Дубининой и соавт. (1983).

Ход определения. В 0,25 мл основного гемолизата добавить 0,2 мл смеси этанола и хлороформа (1:3) и 25 мг кристаллического K_2HPO_4 . После перемешивания и последующего центрифугирования при 600g в течение 15 минут прозрачный центрифугат используется для определения активности фермента.

Инкубационная смесь содержит 0,1 мл ЭДТА (1 мМ); 1,6 мл фосфатного буфера 0,1 М, рН 7,8; 1 мл нитросинего тетразолия (2 мМ); 0,2 мл феназинметасульфата (8 мМ); 0,1 мл НАДН (6 мМ); супернатант 100 мкл.

Пробы инкубируются при комнатной температуре в темноте в течение 15-20 минут. Затем проводится измерение ОП на длине волны 540 нм против смеси, содержащей все компоненты, кроме НАДН.

Активность выражается в условных единицах: процент торможения реакции восстановления нитросинего тетразолия за 1 минуту на грамм гемоглобина в литре гемолизата.

Определение активности каталазы [123]. Принцип метода основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс.

Реактивы: 4%-ный раствор молибдата аммония; 0,03%-ный раствор перекиси водорода.

Ход определения. В 2 мл 0,03%-ной перекиси водорода добавить 0,1 мл гемолизата (1:40) (опытная проба), 0,1 мл дист. воды – холостая проба. Через 10 минут в обе пробы добавить 1 мл 4%-ного молибдата аммония. Одновременно приготовить контрольную пробу: 0,1 мл гемолизата, 1 мл 4%-ного молибдата аммония и 2 мл перекиси водорода. Измерить интенсивность окраски проб против контроля на реактивы (фоно-

вая проба) – 2,1 мл воды + 1 мл молибдата аммония. Длина волны 410 нм, кювета 0,5 см.

Активность каталазы рассчитать по формуле:

$$X \text{ мМ/сек} = E \text{ хол. пр} - (E_x - E_0) / 0,1 \text{ мл} \times 600 \text{ сек} \times 22,2 \times 10^3 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$$

Содержание диеновых конъюгатов и кетонов [124]. Диеновые конъюгаты и кетоновые соединения элюировали в смесь гептан-изопропиловый спирт в отношении 1:1. После добавления 1,5 мл дист. воды для разделения фаз гептановая фаза отсасывалась и использовалась для определения окисленных форм холестерина, триглицеридов ($\lambda = 233 \text{ нм}$, $\epsilon = 28\,000 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$). Измерение кетоновых форм проводили на длине волны 273 нм (тот же молярный коэффициент).

В целях удаления из нижней фазы воды и водорастворимых соединений к пробе добавляли 1,5 г хлористого натрия и интенсивно встряхивали, отбирали верхнюю спиртовую фазу и спектрофотометрировали при тех же длинах волн.

Скорость образования малонового диальдегида [7]. *Принцип метода*: при высокой температуре в кислой среде малоновый диальдегид реагирует с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), образуя окрашенный триметиновый комплекс с максимумом поглощения при длине волны 532 нм.

Можно использовать модификацию классического метода Л.И. Андреевой и соавт. (1988) [7], преимуществом которого является обеспечение оптимального рН с помощью 1%-ного раствора ортофосфорной кислоты.

Ход определения. К 0,3 мл свежеприготовленного гемолизата 1:9 (0,1 мл эритроцитов + 0,9 мл дист. воды) добавить 3 мл 1%-ного раствора ортофосфорной кислоты, 1 мл 0,6%-ного раствора ТБК и 0,1 мл раствора сернокислого железа (28 мг $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в 10 мл воды). Пробирки поместить на 5 минут в водный термостат для инициации ПОЛ. Затем переместить в кипящую водяную баню на 60 минут. Охладить под струей воды и добавить 4 мл бутанола, тщательно перемешать, центрифугировать 10 минут 650g. Измерить ОП верхней фазы при $\lambda = 535 \text{ нм}$ против бутанола. Контрольная проба: 0,3 мл воды + 3 мл H_3PO_4 + 1 мл ТБК + 0,1 мл $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, проводится через все операции, как и опытная.

Расчет проводят с учетом молярного коэффициента экстинкции $\epsilon_{532} = 1,56 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Скорость образования МДА в $\mu\text{М/мин} = \Delta E \times 10^6 \times 4 / 1,56 \times 10^5 \times 0,3 / 5$, где ΔE – ОП по разнице с контролем; 10^6 – пересчет в $\mu\text{М}$; 4 –

объем пробы в кювете, мл; 0,3 – объем исследуемой жидкости, мл; 5 – время развития ПОЛ, мин; $1,56 \times 10^5$ – молярный коэффициент экстинкции, $M^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Определение антиокислительной активности эритроцитарных гемолізатов [197]. *Принцип метода:* используется процесс окисления 2,6-дихлорфенолинодофенола (ДХФИФ) двухвалентным железом в присутствии и отсутствии эритроцитарных гемолізатов. Антиокислительная активность (АОА) рассчитывается по константе ингибирования данного процесса.

Инкубационная смесь содержит 0,25 М натрий-фосфатный буфер, 0,8 мМ 2,6-ДХФИФ, 3,2 мМ сульфата железа, гемолізат 1:20.

Ход определения. Опытная проба: в пробирку внести 1,5 мл буфера, 0,5 мл 2,6-ДХФИФ, 0,1 мл гемолізата, 1,9 мл дист. воды. Перемешать, добавить 0,5 мл сульфата железа. Перемешать, после исчезновения окраски измерить ОП при $\lambda=510$ нм ($E_{1 \text{ оп}}$). Затем поместить пробу в водяной термостат (37°C) на 5 минут. Измерить $E_{2 \text{ оп}}$. Контрольная проба: 1,5 мл буфера + 2 мл воды + 0,5 мл 2,6 ДХФИФ + 0,5 мл сульфата железа. Проводится через все операции, как опытная ($E_{1 \text{ конт.}}$; $E_{2 \text{ конт.}}$). Холостая проба (2,6-ДХФИФ полностью окислен): 1,5 мл буфера, 0,5 мл 2,6-ДХФИФ, 0,1 мл гемолізата, 2,4 мл воды. Сразу же измерить ОП, E_{∞} .

Расчет: $K_{\text{конт.}} = E_{\infty} - (E_{2 \text{ конт.}} - E_{1 \text{ конт.}})$; $K_{\text{оп.}} = E_{\infty} - (E_{1 \text{ оп.}} - E_{2 \text{ оп.}})$

K_i (у.е.) = $K_{\text{конт.}} - K_{\text{оп.}} / C$, где $K_{\text{конт.}}$ – константа ингибирования скорости окисления 2,6-ДХФИФ в контрольной пробе; $K_{\text{оп.}}$ – константа ингибирования скорости окисления 2,6-ДХФИФ в опытной пробе; C – концентрация материала в пробе (разведение гемолізата, содержание гемоглобина).

4.5. Показатели состояния метаболических процессов в клетке

Определение активности лактатдегидрогеназы [253].

Использовали метод E. Beutler (1971).

Инкубационная смесь содержит 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,4; 0,2 мМ НАДН; 27 мМ пирувата натрия.

На 3,5-3,7 мл инкубационной среды можно использовать 20 мкл гемолізата (0,1 мл эритроцитов. 0,2 мл 0,2%-ного тритона X-100, 0,7 мл воды) для определения активности фермента. Для определения активности используется тест Варбурга. Реакция проводится в кювете спектро-

фотометра, длина волны 340 нм. Стартуется добавлением пирувата. Падение ОП измеряется в течение 3 мин. Для расчета используется молярный коэффициент экстинкции для НАДН – $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Активность лучше выражать в мМ или мкМ НАДН в минуту на грамм гемоглобина в литре гемолизата.

Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [253]. Фермент катализирует первую реакцию пентозофосфатного расщепления глюкозы, локализован в мембране. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы гораздо выше в молодых клетках, поэтому определение используется для оценки возраста и функциональной активности эритроцитов [13].

Инкубационная среда содержит 0,1 мл 0,3 М хлористого магния, 1,0 мл 0,19 М ТРИС-буфера (рН 8,0), 1,0 мл 0,02 М глюкозо-6-фосфата, 0,2 мл 0,002 М НАДФ, 1,5 мл дист. воды, 0,1 мл гемолизата 1.10, содержащего 0,2%-ного тритон-Х-100 в отношении 1:5. Время инкубации 10 минут. Расчет проводят, используя молярный коэффициент экстинкции $\epsilon_{\lambda 340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Активность выражается в мкМ НАДН в минуту на грамм гемоглобина в литре гемолизата.

Активность фермента быстро падает при разрушении клетки, поэтому измерение необходимо проводить сразу после приготовления гемолизата. Можно использовать концентрирование фермента путем осаждения мембран центрифугированием гемолизата (1000g, 5 минут). Верхний слой отбрасывается, а в нижний добавляется такое же количество буфера.

Можно воспользоваться наборами фирмы Boehringer Mannheim GmbH, W.Germany.

В данном случае также используется метод Конберга (1955).

Реактивы: триэтаноламиновый буфер 50 мМ с 5 мМ ЭДТА, рН 7,6; НАДФ, 10 мМ; глюкозо-6-фосфат-натриевая соль, 31 мМ; дигитонин, 0,02%-ный.

Ход определения. 0,2 мл крови отмыть 2 мл холодного 154 М раствора хлористого натрия трижды. Режим центрифугирования: 10 минут, 3000 об/мин (650g). В полученную суспензию добавить 0,5 мл раствора дигитонина для экстракции фермента, оставить на 15 мин при 4°C, отцентрифугировать в том же режиме, 0,1 мл полученного супернатанта развести в 10 раз 0,154 М раствором хлористого натрия. Полученный гемолизат быстро используется для определения активности фермента.

В пробу добавить 3,0 мл буфера, 0,1 мл раствора НАДФ, 0,1 мл гемолизата, инкубировать 5 минут при 25°C (можно в кювете СФ). Затем добавить 0,1 мл глюкозо-6-фосфата, перемешать, измерить E_1 (340 нм). Оставить на 10 минут, измерить E_2 .

Для расчета используется коэффициент, предлагаемый в инструкции к наборам фирмы Boehringer Mannheim GmbH, W.Germany.

X мУ/мл эрит. гемолизата в мин. = $154770 \times \Delta E / 10$

U – международная единица удельной активности ферментов.

4.6. Определения содержания субстратов и среднемолекулярных соединений

Для осаждения белков в эритроцитах можно использовать 1 М хлорную кислоту или 3, 10, 15%-ные растворы ТХУ-кислоты.

В 0,5 мл основного гемолизата или цельной крови добавляли 1 мл 1 М раствора хлорной кислоты для осаждения белков. Пробы центрифугировали при 600g в течение 15 минут. Надосадочная жидкость используется для определения различных метаболитов.

Определение восстановленного глутатиона (SH-групп) [252].

Ход определения. К 1 мл центрифугата добавляют 2,5 мл 0,3 М ТРИС-HCL, pH 8,0 и 0,2 мл реактива Эллмана (3 мг в 2 мл буфера). Через 30 минут измеряют оптическую плотность при длине волны 412 нм. При расчете используется молярный коэффициент экстинкции $\epsilon_{\lambda 412} = 11400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Содержание выражается в мкМ ТНФА на грамм гемоглобина в литре гемолизата.

Определение содержания молочной кислоты [Bergmeyer, 1974].

Молочную кислоту можно определить энзиматическим методом, используя наборы фирмы Boehringer Mannheim GmbH, W.Germany. Для этого берут 0,1 мл хлорного экстракта (1:2), либо гемолизата, либо цельной крови и выражают содержание лактата в мМ/л (для цельной крови) и в мкМ на грамм гемоглобина в литре гемолизата (для эритроцитов). Для приготовления экстракта используется 0,6 М хлорная кислота. Осадок удаляется центрифугированием 10 минут, 3000 об/мин (около 650g).

Используемые реактивы: гидразин (0,4 М)-глициновый (0,5 М) буфер, pH 9,0; НАД⁺ 27 мМ; препарат ЛДГ (около 650 U/мл).

Ход определения. В 3 мл буфера добавить 0,25 мл экстракта, 0,25 мл НАД⁺ и измерить начальную ОП. Стартовать реакцию добавлением

20 мкл препарата ЛДГ, разведенного 1:10. Измерить ОП через 15 минут. Контрольная проба не содержит экстракта.

Расчет проводится с использованием коэффициента из унифицированного метода фирмы Boehringer Mannheim GmbH.W.Germany:

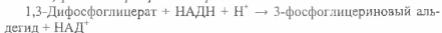
$$X \text{ мМ/л лактата} = (\Delta E \text{ оп.} - \Delta E \text{ конт.}) \times 5,47$$

Определение содержания АТФ. Используются наборы фирмы Boehringer Mannheim GmbH.W.Germany. Принцип метода основан на запуске трех сопряженных реакций:

Фосфоглицераткиназа



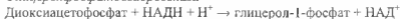
Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа



Триозофосфатизомераза



Глицеролфосфатдегидрогеназа



Реактивы. триэтаноламинный буфер 0,5 М, содержащий глицеральдегид-3-фосфат 6 мМ, сернокислый магний 4 мМ; НАДН 2,5 мМ; суспензии ферментов: фосфоглицераткиназы (≥ 560 U/ml; 450 U/ml); глицеролфосфатдегидрогеназы (≥ 80 U/ml); триозофосфатизомеразы; (≥ 1000 U/ml); 0,6 Н раствор хлорной кислоты.

Приготовление экстракта. К 1 мл крови или суспензии отмытых эритроцитов добавить 4 мл 0,6 Н раствора хлорной кислоты. Хорошо перемешать, оставить на 10 минут при 20-25 °С. Центрифугировать 10 минут при 3000 об/мин. Супернатант используется для определения содержания АТФ (а также и других субстратов).

Ход определения. В пробу добавить 2,0 мл буфера, 0,2 мл НАДН, 0,2 мл супернатанта. Перемешать, измерить $E_{1,}$ длина волны 340 нм, кювета 1 см.

Определение содержания среднемолекулярных соединений [62]. Использовали хлорные и трихлоруксусные экстракты эритроцитарных суспензий, упакованных в режиме отмывки. Концентрация хлорной кислоты 0,6 М, концентрация трихлоруксусной кислоты – 10%. Соотношение кислоты и суспензии эритроцитов 2:1. После центрифугирования в режиме 800g, 15 минут, 0,2 мл надосадочной жидкости добавляют в 3,0 мл дист. воды. Снимают спектр поглощения против контрольных проб, содержащих 0,2 мл кислоты и 3,0 мл воды в области поглощения от 238 до 308 нм.

Хроматографический анализ пептидных соединений. Хроматографический анализ [267] проводят, используя жидкостной хроматограф с УФ-спектрометрическим детектором. Колонка (80 × 2 мм) заполнена силикагелем с привитыми октадецильными группами марки Separon SGX RPS, удельная поверхность 320 м²/г, размер частиц 5 мкм. Элюент: смесь (50 × 50) ацетонитрил-вода, содержащая 0,25%-ный раствор трихлоруксусной кислоты. Объектами исследования служили ТХУ-экстракты эритроцитов из донорской крови. Экстракт вводили в колонку с помощью автосамплера. Объем пробы составлял 1 мкл, расход элюента – 100 мкл/мин.

При использовании жидкостного хроматографа Waters 600S со спектрофотометрическим детектором Waters 2487 ($\lambda = 254$ нм) применяют колонку стальную фирмы Altech размером 150×4,6 мм, которая заполняется силикагелем с привитыми октадецильными группами. Для приготовления подвижной фазы используют ацетонитрил (квалификации «для хроматографии») и бидистиллированную воду. Скорость элюирования составляет 1 мл/мин, объем проб – 10 мкл [268]. Обработка результатов хроматографического анализа проводится с помощью компьютерной программы Millenium (Waters). В работе можно использовать стандартные растворы пептидов фирм Aldrich.

Библиографический список

1. Абидор, И.Г. Механизм электрического пробоя биологической мембраны / И.Г. Абидор // Доклады АН СССР. – 1979. – Т.245. – №5. – С.1239-1242.
2. Авраимова, Т.В. Анализ регуляции в системе красной крови / Т.В. Авраимова, Т.И. Боровкина, И.М. Титова. – Красноярск, 1975. – С. 175-180.
3. Адамов, С.А. Спектрофотометрический количественный анализ основных дериватов гемоглобина / С.А. Адамов, С.А. Александрова, А.Н. Денисов // Биохимия – 1998. – Т.63. – Вып.12. – С.1705-1718.
4. Ажица, Я.И. Конформационные изомеры комплексов гемоглобина с окисью азота, возникающие в крови при действии нитрита натрия / Я.И. Ажица, В.П. Реутов, Л.П. Каюшин // Изв. АН СССР. Сер. биол. – 1983. – №2. – С. 240-244.
5. Алатырцев, В.В. Содержание 2,3-дифосфоглицерата и АТФ в эритроцитах и кислотно-щелочное равновесие у взрослых и новорожденных крыс при острой гипоксии / В.В. Алатырцев, А.Е. Александров, А.И. Лекманов // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1995. – №6. – С.631-633.
6. Алибеков, М.И. Влияние свинца на активность Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-зы и Na^+ , K^+ -АТФ-зы плазматических мембран гладкомышечных клеток / М.И. Алибеков // Физиологический журнал им. Сеченова. – 1995. – №1. – С. 126-134.
7. Андреева, Л.И. Модификация метода определения ПОЛ в тесте с ТБК / Л.И. Андреева, Л.А. Кожемякин, А.А. Кишкун // Лаб. дело. – 1988. – №5. – С. 56-59.
8. Андреюк, Г.М. Образование гемихрома при взаимодействии гемоглобина с полярными производными фосфатидилхолина / Г.М. Андреюк, М.А. Кисель // Биорг. химия. – 1997. – №9. – С. 1570-1577.
9. Антонов, В.Ф. Структура биомембран / В.Ф. Антонов // Соровский образовательный журнал. – 1998. – №10(35). – С. 1-13.
10. Апуховская, Л.И. Структурные особенности интегрального белка 3 мембран эритроцитов крыс при D-гиповитаминозе / Л.И. Апуховская // Укр. биохим. журнал. – 1991. – Т.63. – №3. – С. 77-80.
11. Арошенко, Г.К. Аллостерическая регуляция дезоксигенации гемоглобина и антиоксидантная защита в эритроцитах при холодовой гипоксии / Г.К. Арошенко, Е.Л. Бородин, Г.П. Бородина // Фармакологическая коррекция гипоксических состояний: мат. 2-й Всесоюз. конф. – Гродно, 1991. – С. 402-403.

12. Асатиани, В.С. Ферментные методы анализа / В.С. Асатиани. – М.: Наука, 1969. – 740 с.
13. Атауллаханов, Ф.И. Взаимодействие пути Эмбдена-Мейергофа и гексозомонофосфатного шунта эритроцитов / Ф.И. Атауллаханов, В.Н. Буравцев, А.М. Жаботиновский // Биохимия. – 1981. – Т.46. – Вып.4. – С. 723-725.
14. Атауллаханов, Ф.И. Влияние гликолиза на метаболизм аденилатов в эритроцитах человека / Ф.И. Атауллаханов, В.М. Витвицкий, А.М. Жаботиновский // Биохимия. – 1984. – Т.49. – Вып.1. – С. 104-110.
15. Атауллаханов, Ф.И. Энергозависимые процессы и метаболизм аденилатов в эритроцитах человека / Ф.И. Атауллаханов, В.М. Витвицкий, С.В. Комарова // Биохимия. – 1996. – Т.61. – Вып.2. – С. 266-274.
16. Атауллаханов, Ф.И. Регуляция объема эритроцитов человека. Роль калиевых каналов, активируемых кальцием / Ф.И. Атауллаханов, В.М. Витвицкий, А.Б. Княткин // Биофизика. – 1998. – Т.38. – Вып.5. – С. 809-822.
17. Баев, В.И. О неизвестной физиологической роли углекислоты / В.И. Баев, И.В. Васильева, С.Н. Львов // Физиол. журнал им. И.М. Сеченова. – 1995. – Т.81. – №2. – С. 47-52.
18. Балашова, Т.С. Перекисное окисление липидов и антиокислительная защита эритроцитов у больных сахарным диабетом 1-го типа / Т.С. Балашова // Тер. архив. – 1993. – №10. – С. 23-27.
19. Балмуханов, Б.С. Влияние содержания холестерина в мембранах эритроцитов на скорость оседания, электрофоретическую подвижность и скорость восстановления феррицианида калия / Б.С. Балмуханов, К.Е. Булеганов, А.Т. Басенова // Биофизика. – 1990. – Т.35. – №2. – С. 293-296.
20. Бароненко, В.А. Поверхностные свойства эритроцитарной мембраны – показатель адаптации организма к стрессу / В.А. Бароненко, Г.С. Тупиневич // Физико-химические процессы исследования в медицине. – Уфа: Наука, 1985. – С. 48-52.
21. Безуглов, В.В. Биоактивные амиды жирных кислот / В.В. Безуглов, М.Ю. Бобров, А.В. Арчаков // Биохимия. – 1998. – Т.63. – Вып.1. – С. 27-37.
22. Безуглов, В.В. Влияние липидных производных динитроглицерина и нитроэтилснгликоля на спектральные параметры гемоглобина человека / В.В. Безуглов, Г.М. Андрюк, И.В. Серков // Биохимия. 2000. – Т.65. – Вып. 6. – С. 804-809.
23. Безруков, Г.А. Метод определения фосфолипазной активности эритроцитов / Г.А. Безруков, В.И. Рубин // Лаб. дело. – 1989 – №8. – С. 18-20.
24. Березов, Т.Т. Биологическая химия / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 1990. – 544 с.
25. Белоусов, С.С. Липидная пероксидация при ИБС / С.С. Белоусов // Гипоксия и окислительные процессы. – Нижний Новгород, 1992. – С. 56-65.

26. Биохимия человека / Р. Марри [и др.]; пер. с англ. – М.: Мир, 1993. – Т.1. – 384 с.
27. Биохимия человека. / Р. Марри [и др.]; пер. с англ. – М.: Мир, 1993. – Т.2. – 415 с.
28. Блюменфельд, Л.А. Гемоглобин / Л.А. Блюменфельд // Соровский образовательный журнал. – 1998. – №4(29). – С. 33-38.
29. Богатская, Л.Н. Возрастные изменения гликолиза и содержания модуляторов кислородтранспортной функции гемоглобина в эритроцитах человека / Л.Н. Богатская, О.В. Коркушко, А.В. Писарук // Укр. биохим. журн. – 1986. – Т.58. – №2. – С. 41-44.
30. Болдырев, А.А. Na^+ , K^+ -зависимая АТФ-аза / А.А. Болдырев // Усп. физиол. наук. – 1981. – Т.12. – №2. – С. 4-12.
31. Бондаренко, С.В. Изучение взаимодействия гемоглобина с фосфолипидными мембранами различного состава / С.В. Бондаренко, И.П. Ушакова, Л.Ф. Левин // Биоорганическая химия. – 1985. – Т.11. – №10. – С. 1385-1389.
32. Борисенко, Г.М. Особенности β -адренергического рецептора при гипертонической болезни и спонтанной гипертензии у крыс / Г.М. Борисенко // Кардиология. – 1982. – Т.XXII. – №3. – С. 120-125.
33. Бородин, Е.А. Теоретическое обоснование использования ненасыщенных фосфолипидов для восстановления структур и функций поврежденных биомембран / Е.А. Бородин, А.И. Арчаков, Ю.М. Лопухин // Докл. АМН СССР. – 1985. – Вып. 3. – С. 84-90.
34. Бурчинский, С.Г. Возрастные аспекты рецептор-эффекторных реакций и регуляции активности аденилатциклазы / С.Г. Бурчинский, О.К. Кульчицкий // Укр. биохим. журнал. – 1985. – Т.57. – №4. – С. 24-27.
35. Бусыгина О.Г. Роль SH-группы гуанидинотислов – новых субстратов NO-синтетазы – в стимуляции активности гуанилатциклазы / О.Г. Бусыгина, Н.Б. Григорьева, И.С. Ссверина // Биохимия. – 1996. – Т.61. – Вып.1. – С. 119-125.
36. Быкова, И.А. Морфологические особенности эритроцитов периферической крови в норме и патологии / И.А. Быкова // Гематология и трансфузиология. – 1991. – Т.36. – №6. – С. 466-469.
37. Ванин, А.Ф. L-Аргинин – эндогенный источник окиси азота в тканях животных *in vivo* / А.Ф. Ванин, Л.Н. Кубрина, И.В. Маленкова // Биохимия. – 1991. – Т.56. – Вып.5. – С. 935-939.
38. Варламова, С.В. Методы сепарации возрастных фракций эритроцитов / С.В. Варламова // Лаб. дело. – 1989. – №9. – С. 32-35.
39. Васильев, А.П. Определение индекса фильтруемости эритроцитов / А.П. Васильев // Лаб. дело. – 1991. – №9. – С. 44-46.

40. Верболович, В.П. Зависимость резистентности эритроцитов от активности антиокислительных ферментов / В.П. Верболович // Гемат и трансф. – 1985. – №5. – С. 311-315.
41. Верещагина, В.М. Анализ выхода калия из эритроцитов при физической нагрузке и моделировании лактатного ацидоза / В.М. Верещагина, Е.И. Маевский // Пат физиол. и экспер. терапия. – 1980. – Т.5 – №1. – С. 42-51.
42. Взаимодействие гормонов с рецепторами / под ред. Дж. Леви. – М.: Мир, 1979. – 564 с.
43. Викулов, А.Д. Активность Na, K-АТФазы эритроцитов у физически активных лиц / А.Д. Викулов, И.А. Осетров, А.А. Мельников // Физиология человека. – 2001. – Т.27. – №3. – С. 129-132.
44. Витриченко, Е.Е. Состояние эритроцитов крыс при эмоциональном стрессе / Е.Е. Витриченко // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1985. – №12. – С. 675-677.
45. Вишневский, А.А. Мембранные и внутриклеточные компоненты адаптации к физическим факторам гор / А.А. Вишневский, В.М. Яковлев // Физиология человека. – 2002. – Т.28. – №6. – С. 40-44.
46. Володин, О.П. Скорость редукции и окисления гемоглобина у оперированных больных с язвенной болезнью желудка / О.П. Володин, И.В. Зоткин, Н.А. Кленова // Самарский медицинский архив. – 1998. – Вып.6. – С. 2-5.
47. Волчегорский, И.А. «Средние молекулы» как вероятные регуляторы системы эритрона у спортсменов-лыжников / И.А. Волчегорский, Д.А. Дятлов, Е.И. Львовская // Физиология человека. – 1996. – №3. – С. 136-141.
48. Выборнова, И.И. Исследование механизмов влияния температурного и химического факторов на функционирование биологических мембран / И.И. Выборнова, С.Ю. Елифанов, В.Н. Каданцев // Физиология человека. – 1997. – Т.23. – №1. – С. 70-80.
49. Выдоборец, С.В. Изменение эритроцитов при сахарном диабете / С.В. Выдоборец // Врачебное дело. – 1990. – №2. – С. 56-61.
50. Галактионов, С.Г. Пептиды группы «средних молекул» / С.Г. Галактионов, В.М. Цейтин, В.И. Леонова // Биоорганическая химия. – 1984. – Т.10. – №1. – С. 5-17.
51. Гауко, Г.Г. Перекисное окисление липидов в тканях крыс различного возраста в норме и при старении / Г.Г. Гауко, М.М. Мажуль, Е.А. Позднякова // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1982. – №4. – С. 30-32.
52. Гладышев, Ю.В. Связывание патогенных лигандов эритроцитами плаценты человека / Ю.В. Гладышев, С.И. Колесников, Л.А. Рычкова // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1992. – №12. – С. 639-641.

53. Голенда, И.Л. Кинетический способ исследования адренорецепторов в эритроцитах / И.Л. Голенда, А.И. Голенда, А.Р. Галлеев // Физиология человека. – 1994. – Т.20. – №3. – С. 151-155.
54. Голенок, В.А. Гликозилированные протеиды и реологические свойства эритроцитов при нарушениях углеводного обмена / В.А. Голенок, И.В. Ханыхина // Тер. архив. – 1991. – №12. – С. 113-117.
55. Голиков, А.П. Перекисное окисление липидов при ишемической болезни сердца / А.П. Голиков, П.Н. Голиков, Б.В. Давыдов // Физиология человека. – 1997. – Т.23. – №5. – С. 49-57.
56. Гологорский, В.А. Ухудшение деформируемости эритроцитов как один из факторов, определяющих тяжесть состояния больных / В.А. Гологорский, Е.Б. Петухов, Н.П. Александрова // Анастезиол. и реаниматолог. – 1982. – №1 – С. 38-41.
57. Голубев, А.Г. Изнанка метаболизма / А.Г. Голубев // Биохимия. – 1996. – Т.61. – №11. – С. 2018-2939.
58. Голыщенко, С.П. Значение исходного состояния в реакции системы гемостаза на физическую нагрузку до утомления / С.П. Голыщенко, М.Р. Тайрова // Физиология человека. – 2002. – Т.28. – №4. – С. 98-104.
59. Гончар, М.В. Микрометод определения неорганических фосфатов в крови / М.В. Гончар, В.А. Монастырский // Лаб. дело. – 1982. – №2. – С. 29-31.
60. Гончарова, Е.И. Белки цитоскелета эритроцитов / Е.И. Гончарова, Г.П. Пинаев // Цитология. – 1988. – Т.30. – №1. – С. 5-18.
61. Гончаренко, М.С. Влияние холестерина на устойчивость мембраны / М.С. Гончаренко, И.И. Катков // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 1985. – №3. – С. 441-445.
62. Горанчук, В.В. Биохимические детерминанты и механизмы развития экстремальной гипоксической гипоксии / В.В. Горанчук, Е.Б. Шустов, Л.И. Андреева // Физиол. человека. – 1999. – Т.25. – №4. – С. 118-123.
63. Гусейнов, Т.М. Участие селена в регуляции перекисного окисления липидов биомембран и активность глутатионпероксидазы / Т.М. Гусейнов, Э.М. Насибов, А.М. Джафаров // Биохимия. – 1990. – Т.55. – Вып.8. – С. 499-508.
64. Давтян, Т.К. Влияние адриамицина бромистого этидия на Ca^{2+} -зависимый K^+ -канал эритроцитов человека / Т.К. Давтян, А.В. Гюльханданян, С.С. Гамбаров // Цитология. – 1996. – Т.38. – №2. – С. 135-145.
65. Дамбинова, С.А. Влияние эндогенных пептидов на состояние медиаторных систем и компенсацию двигательных расстройств при паркинсонизмах / С.А. Дамбинова, Ф.А. Гурчин, К.А. Шевченко // Физиология человека. – 1995. – Т.21. – №1. – С. 10-16.
66. Доброзравов, А.В. Метаболические аспекты начальных этапов разрушения эритроцитов при гемолитической болезни новорожденных /

А.В. Добронравов, А.В. Новицкая, Н.К. Вознесенский // *Вопр охраны мат. и детства*. – 1975. – №6. – С. 30-36.

67. Довгий, И.Е. Влияние ионизирующей радиации на НАДН-феррицианидредуктазную активность эритроцитов крыс / И.Е. Довгий, Б.С. Фоменко, И.Г. Акоев // *Радиобиология*. – 1983. – №2. – С. 71-73.

68. Дубинина, Е.Е. Сравнительный анализ активности супероксиддисмутазы и каталазы эритроцитов и цельной крови новорожденных детей при хронической гипоксии / Е.Е. Дубинина, Л.Ф. Ефимова, Л.Н. Сафронова // *Лаб. дело*. – 1988. – №8. – С. 18-19.

69. Дубинина, Е.Е. Выделение и свойства супероксиддисмутазы плазмы крови человека / Е.Е. Дубинина, В.В. Туркин, Г.А. Бабенко // *Биохимия*. – 1992. – Т.57. – №12. – С. 1892-1900.

70. Дудиньска, В. Метаболизм пуринов в эритроцитах человека / В. Дудиньска, А.Й. Хлынчак, Е. Скотницка // *Биохимия*. – 2006. – Т.71. – Вып.5. – С. 581-591.

71. Ермаков, Г.Л. Надмолекулярная регуляция гликолиза эритроцитов. I. Состав цитоплазмы / Г.Л. Ермаков // *Биохимия*. – 1995. – Т.60. – №4. – С. 560-567

72. Ермаков, Г.Л. Надмолекулярная регуляция гликолиза эритроцитов. IV. Вязкость цитоплазмы / Г.Л. Ермаков // *Биохимия*. – 1995. – Т.60. – №4. – С. 568-572.

73. Ершова, Л.И. Механизмы гемолиза при действии экстремальных факторов / Л.И. Ершова, Н.А. Горбунова // *Бюлл. exper. биол. и мед.* – 1991. – №4. – С. 363-365.

74. Ефимов, А.С. Активность мембраносвязанной протеинкиназы С и АТФ-аз эритроцитов при диабетической ангиопатии / А.С. Ефимов // *Проблемы эндокринологии*. – 1993. – №1. – С. 20-22.

75. Журавлева, А.К. Мембраны эритроцитов при злокачественном росте / А.К. Журавлева, В.В. Мурашко, М.П. Щерстнев // *Бюлл. exper. биол. и мед.* – 1984. – №11. – С. 596-598.

76. Заводник, И.Б. Процессы окисления гемоглобина человека / И.Б. Заводник, Е.А. Лапшина // *Биохимия*. – 1996. – Т.61. – Вып.1. – С. 42-48.

77. Заводник, И.Б. Аутоокисление и оксигенация гемоглобина человека / И.Б. Заводник, Т.Б. Пилецкая, И.И. Степура // *Молекулярная биология*. – 1992. – Т.26. – Вып.2. – С. 321-327.

78. Замятин, А.А. Эндогенные регуляторные олигопептиды: структура, функции, локализация // *Журнал общей биологии*. – 1990. – Т.51. – №2. – С. 147-162.

79. Зелинский, П.А. Спектр фосфолипидов у больных сахарным диабетом и влияние на него антиоксидантов / П.А. Зелинский, А.В. Паламарчук // *Проблемы эндокринологии*. – 1994. – №2. – С. 14-17.

80. Землянских, Н.Г. Модификация активности Ca^{2+} -АТФазы эритроцитов человека под влиянием глицерола: роль кальмодулина / Н.Г. Землянских, О.А. Кофанова // Биохимия. – 2006. – Т.71. – Вып.8. – С. 1112-1118.

81. Зварич, Е.И. Ca^{2+} -АТФ-за плазматических мембран. Структура и функции / Е.И. Зварич // Биологические мембраны. – 1991. – Т.8. – №6. – С. 565-585.

82. Зенков, Н.К. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах / Н.К. Зенков, Е.Б. Менщикова // Усп. совр. биол. – 1993. – Т.113 – №3 – С. 286-295.

83. Зенков, Н.К. Внутриклеточный окислительный стресс и апоптоз // Усп. совр. биол. – 1999. – №5. – С. 440-450.

84. Зимин, Ю.В. Типологические особенности активности лактатдегидрогеназы эритроцитов собак при изменении режима индивидуально дозированной физической нагрузки / Ю.В. Зимин. – М., 1989. – 11 с. – Деп. в ВИНТИ. № 7539 В-39.

85. Зинчук, В.В. Деформируемость эритроцитов: физиологические аспекты // Усп. физиол. наук. – 2001. – Т.32. – №3. – С. 66-78.

86. Иванов, В.П. Выделение, структура и свойства новых эндогенных пептидов / В.П. Иванов, А.А. Карелин, И.И. Михайлова // Биоорганическая химия. – 1992. – Т.18 – №10-11. – С. 1271-1311.

87. Иванов, Г.П. Современные представления о транспорте кислорода / Г.П. Иванов // Усп. физиол. наук. – 2001. – Т.32. – №4. – С. 15-18

88. Ивашкевич, С.П. Влияние стероидов различной химической структуры и сквалена на осмотическую стойкость эритроцитов / С.П. Ивашкевич, Л.И. Ануховская, В.П. Вендт // Биохимия. – 1981. – Т.46. – Вып. 8. – С. 1420-1424.

89. Иржак, Л.И. Буферные свойства гемоглобина и его сродство к кислороду / Л.И. Иржак // Докл. АН СССР. – 1984. – Т.387. – №4. – С. 925-927.

90. Иржак, Л.И. Состав и функции крови / Л.И. Иржак // Соровский образовательный журнал. – 2001. – №2. – С. 11-19.

91. Каган, В.Е. Индукция ПОЛ в эритроцитах в ходе окисления холестерина, катализируемого холестериноксидазой / В.Е. Каган, О. Монович, С.Р. Рабаров // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1985. – №8. – С. 179-181.

92. Кадывкина, З.М. Проницаемость эритроцитарных мембран у больных с хроническими заболеваниями печени / З.М. Кадывкина, В.М. Колмаков, В.Г. Радченко // Клиническая медицина. – 1987. – №8. – С. 157-159.

93. Казеннов, А.М. Структурно-биохимические свойства мембраны безъядерных эритроцитов / А.М. Казеннов, М.Н. Маслова // Физиологический журнал им. Сеченова. – 1987. – №12. – С. 1587-1598.

94. Казеннов, А.М. Исследование активности АТФ-зы эритроцитов млекопитающих / А.М. Казеннов, М.Н. Маслова, А.Д. Шалабодов // Биохимия. – 1984. – Т.46. – Вып.7. – С. 1089-1095.
95. Казеннов, А.М. Влияние мембранного скелета безъядерных эритроцитов на свойства транспортных АТФ-аз / А.М. Казеннов, М.Н. Маслова // Цитология. – 1991. – Т.33. – №11. – С. 32-41.
96. Калиман, П.А. Строение и биологические функции гемсвязывающих белков млекопитающих / П.А. Калиман, Т.В. Баранник // Усп. совр. биол. – 2000. – Т.120. – №1. – С. 60-72.
97. Калинин, В.М. Метаболический ацидоз при мышечной деятельности / Теория и практика физической культуры. – 1981. – №12. – С. 12-14.
98. Карабанов, Г.Н. Деформируемость эритроцитов / Г.Н. Карабанов // Анестезиология и реаниматология. – 1984. – №1. – С. 71-73.
99. Карелин, А.А. Протеолитическая дегградация гемоглобина в эритроцитах приводит к образованию биологически активных пептидов / А.А. Карелин, М.М. Филиппов, О.Н. Яцкин // Биоорганическая химия. – 1998. – Т.24. – №4 – С 271-281.
100. Катюхин, Л.Н. Реологические свойства эритроцитов. Современные методы исследования / Л.Н. Катюхин // Физиологический журнал им. Сеченова. – 1995. – №6. – С. 122-129.
101. Киршенблат, Я.Д. Общая эндокринология / Я.Д. Киршенблат. – М.: Высшая школа, 1971. – 384 с.
102. Клебанов, Г.И. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов / Г.И. Клебанов, И.А. Бабенкова, Ю.О. Теселкина // Лаб. дело. – 1988. – №5. – С. 59-60.
103. Кленов, Р.О. Образование пептидных соединений эритроцитарными клетками человека в условиях гипердреналинемии и действия β -блокатора / Р.О. Кленов // Тез. докл. XXXII Сам. обл. студенческой научной конференции. – 2006. – Ч. 1. – С.137.
104. Кленова, Н.А. Изменения метаболических процессов в эритроцитах практически здоровых мужчин в ходе физических нагрузок / Н.А. Кленова. – М., 1997 – 10 с. – Деп. в ВИНТИ, №2090-В97.
105. Кленова, Н.А. Биохимические механизмы дезинтеграции эритроцитов человека в разных условиях функционирования: автореф. дисс. д-ра биол. наук. – Тюмень, 2003. – 45 с.
106. Кленова, Н.А. Механизмы дестабилизации эритроцитарных клеток в условиях лактоацидоза и действия нитрозотиолов / Н.А. Кленова // Вест. СамГУ. ест.науч. серия. – 2002. – №2(24). – С. 158-163.
107. Кленова, Н.А. Образование пептидных соединений в эритроцитах в условиях окисл. стресса / Н.А. Кленова, О.Ю. Елистратова, Ю.Л. Полякова // Вест. СамГУ. ест.науч. серия. 1-й специальный выпуск. – 2004. – С. 163-170.

108. Кленова, Н.А. Механизм образования пептидных соединений в эритроцитах человека / Н.А. Кленова, Р.О. Кленов // *Естествознание и гуманизм. сборник научных трудов.* – Томск, 2006. – Т.3. – №4. – С. 16-17.
109. Кленова, Н.А. Механизмы генерации пептидов эритроцитами человека / Н.А. Кленова, Р.О. Кленов // *Вест. СамГУ. Ест.науч. серия. Биология.* – 2006. – №7 (47). – С. 75-79.
110. Клиническая трансфузиология / под. ред. В. Рудовского и С. Лавельского. – Варшава: Польское медицинское изд-во, 1974. – 516 с.
111. Кобаль, А.М. Модификация ион-транспортирующих систем эритроцитов человека при хранении / А.М. Кобаль, С.Н. Орлов, Н.И. Покудин // *Бюлл. экспер. биол. и мед.* – 1990. – №8. – С. 151-153.
112. Козлов, Г.С. Липидный спектр эритроцитарной мембраны при различных видах сахаропонижающей терапии / Г.С. Козлов // *Советская медицина* – 1990. – №6. – С. 10-13.
113. Козлов, М.Н. Мембранный скелет эритроцита: теоретическая модель / М.Н. Козлов, В.С. Маркин // *Биол. мембраны.* – 1986. – Т.3. – №4. – С. 404-422.
114. Козлов, Н.М. Зависимость активности метгемоглобинредуктазы эритроцитов человека от температуры / Н.М. Козлов, Е.А. Черницкий // *Биохимия.* – 1994. – Т.56. – Вып.2. – С. 342-345.
115. Козлов, Ю.А. Система крови при сахарном диабете / Ю.А. Козлов, В.С. Лавров // *Усп. совр. биол.* – 1988. – №3. – С. 505-520.
116. Козлова, Н.М. Зависимость активности метгемоглобинредуктазы эритроцитов человека от температуры / Н.М. Козлова, Е.А. Черницкий // *Биохимия.* – 1991. – Вып.2. – С. 342-345.
117. Козлова, Н.М. Транспорт пирувата и глюкозы через эритроцитарные мембраны и роль спектрина в этом процессе / Н.М. Козлова // *Биофизика.* – 1983. – Т.28 – Вып.5. – С. 826-827.
118. Колобова, Е.В. Оценка β -адренореактивности эритроцитов у рожавших женщин / Е.В. Колобова, С.А. Дворянский, В.И. Циркин // *Физиология человека.* – 1998. – Т.24. – №3. – С. 134-142.
119. Колмакова, Е.В. Состояние эритроцитарных мембран у больных с хроническими заболеваниями почек / Е.В. Колмакова // *Лаб. дело* – 1988. – №7. – С. 11-14
120. Комов, В.П. О молекулярной гетерогенности каталазы в эритроцитах человека / В.П. Комов, Т.Ф. Рахманина // *Биохимия.* – 1974. – Т.39. – Вып.6. – С. 1128-1131
121. Коральник, Б.В. Эритроциты, их рецепторы и иммунитет / Б.В. Коральник // *Усп. совр. биол.* – 1992. – Т.112. – Вып.1. – С. 52-61.
122. Коржуев, П.А. Проблемы оксигенации гемоглобина / П.А. Коржуев // *Успехи физиологических наук.* – 1973. – Т.4. – №3. – С. 69-112.

123. Королук, М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королук, Л.И. Иванова, И.И. Майорова // Лаб. дело. – 1988. – №1. – С. 16-19.
124. Костюк, В.А. Использование системы гептан-изопропанол для экстракции первичных продуктов перекисного окисления липидов / В.А. Костюк // Укр. биохим. журн. – 1991. – Т.63. – №1. – С. 98-101.
125. Крайнев, С.И. О формах каталазы в эритроцитах человека / С.И. Крайнев // Биохимия – 1970. – Т.35. – №4. – С. 662-669.
126. Крыжановский, Г.Н. Патология регуляторных механизмов / Г.Н. Крыжановский // Пат. физиол. и exper. тер. – 1990. – №2. – С. 3-9.
127. Кузнецов, С.А. Измененис уровня инсулинсодержащих эритроцитов в крови животных и человека под влиянием этанола / С.А. Кузнецов, С.С. Кузнецов // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1992. – №12. – С. 639-641.
128. Кузнецова, Н.П. Повышение кислородтранспортной эффективности гемоглобина при его химической модификации / Н.П. Кузнецова, Л.Р. Гудкин, Р.Н. Мишаева // Биохимия. – 1996. – Т.61. – Вып.4. – С. 680-689.
129. Курганов, Б.И. Адсорбция периферических ферментов на олигомерных якорных белках мембран / Б.И. Курганов // Биологические мембраны. – 1984. – №4. – С. 363-370.
130. Левин, Г.Я. Модификация методов изучения деформируемости эритроцитов / Г.Я. Левин, Ю.А. Шереметьев // Лаб. дело. – 1981. – №9. – С. 527-529.
131. Ленинджер А. Биохимия. Молекулярные основы структуры и функций клетки / А. Ленинджер; пер. с англ. – М.: Мир, 1976. – 960 с.
132. Локшина, Л.А. Протеолитические ферменты в процессинге белков / Л.А. Локшина, В.С. Былинкина // Усп. совр. биологии. – 1990. – Т.109. – Вып.2. – С. 219-237.
133. Лукьянова, Л.Д. Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние / Л.Д. Лукьянова, Б.С. Балуханов, А.Т. Уголев – М.: Наука, 1982. – 301 с.
134. Лурье, Б.Л. Среднемолекулярные пептиды крови больных с психическими нарушениями сосудистого генеза / Б.Л. Лурье, Ф.М. Фель // Лаб. дело. – 1986. – №3. – С. 192.
135. Луцик, Е.Г. Активность внутриэритроцитарных ферментов и сродство гемоглобина к кислороду у спортсменов при воздействии физ. нагрузок / Е.Г. Луцик, М.И. Попичев, С.В. Коношеноко // Физиология человека. – 2001. – Т.27. – №2. – С. 140-142.
136. Мазур, Н.А. Основы клинической фармакологии и фармакотерапии в кардиологии / Н.А. Мазур. – М.: Медицина, 1988. – 304 с.

137. Мазурина, А.В. Особенности липидного и фосфолипидного состава плазмы крови и эритроцитов при геморрагических васкулитах у детей / А.В. Мазурина // Гемат. и трансфузиол. – 1994. – №2. – С. 37-39.
138. Макаренко, Е.В. Комплексное определение активности СОД и глутатионредуктазы в эритроцитах у больных с хроническими заболеваниями печени / Е.В. Макаренко // Лаб. дело. – 1983. – №6. – С. 24-26.
139. Максимова, Н.В. Роль ионного транспорта в регуляции сродства гемоглобина к кислороду при сахарном диабете / Н.В. Максимова, А.В. Наговицын, Г.В. Максимов // Бюлл. экспер. биол. и мед. – 2002. – Т.133. – №4. – С. 456-458.
140. Макшанова, Г.П. Изменение проницаемости эритроцитарных мембран и показателей липидного обмена у больных с политравмой при раннем и отсроченном оперативном лечении / Г.П. Макшанова, И.М. Устьянцева // Физиология человека. – 2003. – Т.29. – №1. – С. 95-99.
141. Маринов, Б.А. Противоположно направленная донорами и акцепторами регуляция сродства кислорода к гемоглобину / Б.А. Маринов, Р.Х. Резнева // Биохимия. – 1990. – Т.55. – Вып.9. – С. 1616-1623.
142. Маркин, В.С. Механические свойства мембранного скелета эритроцитов / В.С. Маркин, М.М. Козлов // Биологические мембраны. – 1986. – №5. – С. 519-525.
143. Маслова, М.Н. Активность мембранных ферментов эритроцитов при различных стрессорных воздействиях / М.Н. Маслова // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 1994. – Т.80. – №7. – С. 76-80.
144. Маслова, М.Н. Молекулярные механизмы стресса / М.Н. Маслова // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2005. – Т.91. – №11. – С. 1320-1328.
145. Матулявичус, В.Б. Инсулинподобное вещество и инсулиндеградирующий комплекс эритроцитов человека / В.А. Матулявичус, Э.И. Варейкис, Л.В. Ламас // Биохимия. – 1986. – Т.51. – Вып.2. – С. 278-281.
146. Матус, В.К. Влияние ионов кальция на проникновение глюкозы в розовые тели эритроцитов / В.К. Матус // Цитология. – 1979. – Т.24. – Вып.2. – С. 242-243.
147. Машковский, М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. – М.: Новая волна, 1996. – Т.2. – 685 с.
148. Меерсон, Ф.З. Адаптация к стрессовым ситуациям и физическим нагрузкам / Ф.З. Меерсон, М.Г. Пшеничкова. – М.: Медицина, 1988. – 256 с.
149. Мельничук, Л.А. Метаболическая система кислотно-щелочного гомеостаза в организме человека и животных / Л.А. Мельничук // Укр. биохим. журнал. – 1989. – Т.61. – №3. – С. 3-21.

150. Микаелян, Э.М. Перекисное окисление липидов в эритроцитарных мембранах и крови при стрессе / Э.М. Микаелян, Ю.А. Князев, А.Г. Максина // Журнал exper. биологии и клин. мед. – 1984. – №2. – С. 123-130.
151. Милютин, Н.П. Антирадикальный и антиоксидантный эффект аргинина и его влияние на активность ПОЛ при гипоксии / Н.П. Милютин, А.А. Ананян, В.С. Шуралей // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1990. – №9. – С. 263-265.
152. Могильницкая, Л.В. Влияние аргинина на свойства эритроцитарных мембран в условиях гипоксии / Л.В. Могильницкая, А.И. Фан, Н.Ю. Баранова // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1992. – №5. – С. 497-498.
153. Моисеева, О.И. Транспорт кислорода кровью (роль эритроцитов) / О.И. Моисеева // Физиол. журнал СССР им. И.М. Сеченова. – 1986. – Т.72. – №1. – С. 93-103.
154. Молекулярная биология клетки / Б.Альбертс [и др.], пер. с англ. – М.: Мир, 1994. – Т.1. – 520 с.
155. Молекулярная биология клетки / Б.Альбертс [и др.] пер. с англ. – М.: Мир, 1994. – Т.2. – 538 с.
156. Молекулярная структура мембран эритроцитов и их механические свойства / Р.А. Сторожок, А.Г. Санников, Ю.М. Захаров. – Тюмень. ТюмГУ, 1997. – 140 с.
157. Молчанова, Т.П. Основы молекулярной организации белков мембраны эритроцитов и их дефекты, приводящие к гемолитическим анемиям / Т.П. Молчанова // Гемат. и трансфузиология. – 1989. – Т.134. – №7. – С. 32-41.
158. Морозова, В.Т. Лабораторная диагностика гемолиза эритроцитов / В.Т. Морозова // Лаб. дело. – 1988. – №3. – С. 77-79.
159. Москаленко, Н.П. Применение велоэргометрических проб при оценке функционального состояния сердечно-сосудистой системы / Н.П. Москаленко, М.Г. Глезер // Клинич. медицина – 1988. – №6. – С. 13-20.
160. Муравьев, А.В. Вне- и внутриклеточные механизмы изменения агрегации эритроцитов / А.В. Муравьев, А.А. Муравьев // Физиология человека – 2005. – Т.31. – №4. – С. 108-112.
161. Мышкин, А.Е. Окисление гемоглобина / А.Е. Мышкин // Успехи химии. – 1984. – Т.53. – Вып.6. – С. 1045-1071.
162. Мышкин, А.Е. Феррицианидный способ тестирования препаратов гемоглобина / А.Е. Мышкин, Л.Д. Богданова // Гематология и трансфузиология. – 1990. – №9. – С. 33-35.
163. Надирадзе, Н.И. Проницаемость мембран эритроцитов для Na^+ и K^+ и их фосфолипидный состав у больных гипертонической болезнью / Н.И. Надирадзе, А.Н. Грекулова, В.Г. Кавтарадзе // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1993. – №2. – С. 135-136.
164. Начала физиологии / А.Д. Ноздрачев [и др.]; под ред. А.Д. Ноздрачева. – СПб.: Изд-во «Лань», 2001. – 1088 с.

165. Ненашев, А.А. Функциональная активность эритрона при гипоксических состояниях / А.А. Ненашев, Д.Д. Отарова, О.Х. Тегаева. – М., 1993. – 12 с. – Деп. в ВИНТИ, №23695.
166. Ненашев, А.А. Механическая резистентность эритроцитов и массоперенос кислорода при гипоксических состояниях разного генеза / А.А. Ненашев, И.И. Тищенко, З.А. Шидов // Физиол. журнал СССР им. И.М. Сеченова. – 1985. – Т.31. – №6. – С. 650-657.
167. Одинокова, В.А. Морфофункциональные изменения эритроцитарных мембран при экстремальных состояниях / В.А. Одинокова, Н.Н. Квитко, Н.Я. Ольшанский // Советская медицина. – 1985. – №10. – С. 20-22.
168. Орлов, С.Н. Na^+/H^+ и Na^+/Na^+ противотранспорт в эритроцитах человека, кролика и крысы: доказательство существования двух независимых ион-транспортующих систем / С.Н. Орлов, С.Р. Кузнецов, И.А. Колосова // Биохимия. – 1994. – Т.59. – Вып.5. – С. 639-647.
169. Орлов, С.Н. Увеличенный Na^+/H^+ обмен в эритроцитах больных гипертонической болезнью / С.Н. Орлов, И.Ю. Постников, Н.И. Покудин // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1988. – №9. – С. 286-288.
170. Осадчий, О.Е. Исследование электрофизиологических свойств сердца человека при введении регуляторных пептидов / О.Е. Осадчий, С.Г. Канорский, В.М. Покровский // Физиология человека. – 2001. – Т.27. – №5. – С. 105-110.
171. Основы физиологии человека / под ред. Б.И. Ткаченко. – СПб.: Международный фонд истории науки, 1994. – Т.1. – 567 с.
172. Парахонский, А.П. Роль гормонов и рецепторов в адаптационных стратегиях при неблагоприятных условиях / А.П. Парахонский // Усп. совр. естествознания. – 2005. – №4. – С. 65-68.
173. Перцева, М.Н. Мембранный комплекс гормон-рецептор аденилатциклаза и его функциональное формирование в онтогенезе / М.Н. Перцева // Усп. совр. биологии. – 1982. – Т.93. – Вып.3. – С.382-396.
174. Петренко, Ю.М. Роль поверхностного заряда в поддержании осмотической резистентности / Ю.М. Петренко, Ю.А. Владимиров // Гематология и трансфузиология. – 1987. – № 10. – С. 15-19.
175. Петренко, Ю.М. Агрегация гемоглобина в эритроцитах как фактор нарушения их структурно-функциональной целостности / Ю.М. Петренко, Ю.А. Владимиров // Гематология и трансфузиология. – 1987. – №10. – С. 44-47.
176. Петров, В.К. Взаимодействие некоторых вазоактивных веществ с фосфолипидами и эритроцитарными мембранами / В.К. Петров // Фармакология и токсикология. – 1985. – №2. – С. 72-76.
177. Петруняк, В.В. Взаимодействие кальция и протеинкиназ в регуляции ионотранспортирующих АТФ-аз плазматических мембран /

В.В. Петрунякка, Е.А. Панюшкина // Биологические мембраны. – 1991. – Т.8. – С. 1138-1142.

178. Покудин, Н.И. Ca^{2+} -насос и Ca^{2+} -АТФ-за эритроцитов больных гипертонической болезнью / Н.И. Покудин, С.Н. Орлов, Ю.В. Постнов // Кардиология. – 1986 – Т.26. – №3. – С. 94-99.

179. Поличев, М.И. Внутриэритроцитарный метаболизм и средство гемоглобина к кислороду у спортсменов различной квалификации при воздействии интенсивных нагрузок / М.И. Поличев, С.В. Коношенко, Н.В. Толкачева // Физиология человека. – 1999. – Т.25 – №6. – С. 123-125.

180. Постнов, Ю.В. Транспорт кальция и распределение кальмодулина в эритроцитах при первичной артериальной гипертонии / Ю.В. Постнов, С.Н. Орлов, Н.И. Покудин // Кардиология. – 1982. – Т.22. – №12. – С. 63-66.

181. Позтова, В.Т. Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов / В.Т. Позтова [и др.]. – М.: Наука, 1967 – 352 с.

182. Пучкова, А.В. Некоторые свойства рецептора церулоплазмина, выделенного из мембраны эритроцитов человека / А.В. Пучкова, И.А. Вербина, В.В. Денежкина // Биохимия. – 1990. – Т.55. – №12. – С. 2182-2189.

183. Пучкова, Т.В. Снижение электрической прочности как основной механизм нарушения барьерной функции мембран / Т.В. Пучкова, А.В. Путвинский, Ю.А. Владимиров // Докл. АН СССР. – 1983. – Т.270. – №6. – С. 1489-1492.

184. Пушкарь, Н.С. Теория и практика криогенного сублимационного консервирования / Н.С. Пушкарь. – Киев: Наукова думка, 1984. – 252 с.

185. Реутов, В.П. Физиологическое значение гуанилатциклазы и роль окиси азота и нитросоединений в регуляции активности этого фермента / В.П. Реутов, С.Н. Орлов // Физиология человека. – 1993. – №1. – С. 67-75.

186. Реутов, В.П. Физиологическая роль цикла азота в организме человека / В.П. Реутов, Л.П. Каюшин, Е.Г. Сорокина // Физиология человека. – 1994. – Т.20. – №3. – С. 52-56.

187. Реутов, В.П. Цикл окиси азота в организме млекопитающих / В.П. Реутов // Усп. биол. наук. – 1995. – Т.35. – С. 189-228.

188. Розен, В.Б. Основы эндокринологии / В.Б. Розен. – М.: Изд-во МГУ, 1994. – 384 с.

189. Рожковский, Я.В. Активность маркерных ферментов и состояние липидного матрикса мембран эритроцитов при стрессе и его медикаментозной коррекции / Я.В. Рожковский // Укр. биохим. журн. – 1991. – №1. – С. 98-101.

190. Руденко, С.В. Изменение формы эритроцитов в зависимости от времени / С.В. Руденко, Дж.Х. Кроув, Ф. Таблин // Биохимия. – 1998. – Т.63. – Вып.12. – С. 1630-1639.

191. Руководство по гематологии: в 2 томах. Т.1 / под ред. А.И. Воробьева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 1985. – 448 с.

192. Самуилов, В.Д. Программируемая клеточная смерть / В.Д. Самуилов, А.В. Одескин, Е.М. Лагунова // Биохимия. – 2000. – Т.65. – №8. – С. 1029-1046.
193. Сандуляк, Л.И. Свойства эритроцитов депонировать и транспортировать инсулин / Л.И. Сандуляк // Усп. совр. биол. – 1987. – Т.103. – №2. – С. 207-216.
194. Северина, И.С. Растворимые формы гуанилатциклаз. Механизмы активации оксидом азота, роль в агрегации тромбоцитов / И.С. Северина // Вестник Российской АН. – 1995. – №2. – С. 41-46.
195. Селезнев, Е.И. Особенности эритроцитарного метаболизма в ходе велоэргометрической нагрузки у больных ишемической болезнью сердца / Е.И. Селезнев, В.Н.Фатенков, Н.А. Кленова / Ранняя диагностика и профилактика сердечно-сосудистых заболеваний. Ч. 2: мат. Всесоюзн. конф. – Новосибирск, 1983. – С. 263-265.
196. Селезнев, Е.Ф. Изменение показателей гематологического исследования под влиянием лекарственных препаратов / Е.Ф. Селезнев, В.И. Криков // Лаб дело. – 1988. – №2. – С. 68-77.
197. Семенов, В.Л. Влияние гипоксии на окислительное фосфорилирование и ПОД митохондрий печени крыс при воспалении легких / В.Л. Семенов, А.М. Ярош // Укр. биохим. журнал. – 1991. – Т.63. – №2. – С. 95-101.
198. Сергеев, П.В. Рецепторы физиологически активных веществ / П.В. Сергеев, Н.Л. Шимановский. – М.: Медицина, 1987. – 400 с.
199. Сим, Э. Биохимия мембран / Э. Сим. – М.: Мир, 1985. – 112 с.
200. Скулачев, В.П. Феноптоз: запрограммированная смерть организма / В.П. Скулачев // Биохимия. – 1999. – Т.64. – Вып.12. – С. 1679-1688.
201. Слобожанина, Е.И. Содержание внутриклеточного АТФ и структурное состояние белков в эритроцитарной мембране / Е.И. Слобожанина, Е.А. Черницкий, Н.М. Козлова // Биофизика. – 1982. – Т.27. – №3. – С. 425-429.
202. Смирнов, И.Ю. Влияние адсорбированных протеинов на реологические характеристики эритроцитов / И.Ю. Смирнов, В.Н. Левин // Физиология человека. – 2004. – Т.30. – №2. – С. 117-121.
203. Сороковой, В.И. Ультраструктура эритроцитов при кальций-активированном старении *in vitro* / В.И. Сороковой, Н.Н. Моченова, Р.М. Никитина // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1994. – №5. – С. 555-558.
204. Стародуб, Н.Ф. Гетерогенная система гемоглобина / Н.Ф. Стародуб. – Киев: Наукова думка, 1987. – 359 с.
205. Стародуб, Н.Ф. Гетерогенная система гемоглобина. Структурные особенности, физико-химические и функциональные свойства отдельных форм гемоглобина и их роль в биохимической адаптации организма к ус-

ловиям жизни / Н.Ф.Стародуб // Усп. совр.биол. – 1985. – Т.99. – №3. – С. 385-400.

206. Стародубцев, М.Н. Повреждения эритроцитов, инициированные взаимодействием нитритионов с гемоглобином / М.Н. Стародубцев, В.А. Игнатенко, С.Н. Черенкевич // Биофизика. – 1999. – Т.44. – №6. – С. 1068-1072.

207. Стародубцев, М.Н. Механические свойства мембран эритроцитов человека при действии пероксинитрита / М.Н. Стародубцев, Т.Г. Кузнецова, С.Н. Черенкевич // Бюлл. exper. биол. и мед. – 2007. – №2. – С. 227-230.

208. Степуро, И.И. Превращение гемоглобина в гемихром под действием лизофосфатидов / И.И. Степуро, М.А. Кашко // Биохимия. – 1999. – Т.64. – Вып.2. – С. 244-249.

209. Степуро, И.И. Неэнзиматическое восстановление метгемоглобина под действием радикалов НАД, генерируемых в присутствии НАДН и солей Fe(II). Антиоксидантные свойства метгемоглобина / И.И. Степуро, Н.В. Ковалова // Биофизика. – 1992. – Т.37. – №5. – С. 879-883.

210. Сторожок, С.А. Основы молекулярной организации белков мембраны эритроцитов и их механические свойства / С.А. Сторожок, А.Г. Санников, Ю.М. Захаров – Тюмень: ТюмГУ, 1997. – 140 с.

211. Сторожок, С.А. К вопросу регуляции уровня АТФ в эритроцитах в процессе сдвиговой деформации / С.А. Сторожок, А.Г. Санников // Научный вестник Тюменского госуниверситета. – 1999. – №6. – С. 34-41.

212. Сторожок, С.А. Структурные и функциональные особенности цитоскелета мембраны эритроцитов / С.А. Сторожок, С.В. Соловьев // Вопр. мед. химии. – 1992. – №2. – С. 14-17.

213. Сухомлинов, Б.Ф. Влияние адреналина на структурно-функциональные свойства мембраны, активность лактатдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы эритроцитов крыс / Б.Ф. Сухомлинов, З.В. Гузар // Мол. генетика и биофизика. – 1990. – №15. – С. 20-22.

214. Тихомирова, И.А. Анализ взаимосвязи электрофоретической подвижности и агрегационных свойств эритроцитов человека / И.А. Тихомирова, А.В. Муравьев, Л.А. Михайличенко // Физиология человека. – 2006. – Т.32. – №6. – С. 133-135.

215. Титов, В.Ю. Механизм окисления оксигемоглобина, индуцированный перекисью водорода / В.Ю. Титов, Ю.М. Петренко, В.А. Петров // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1991. – №7. – С. 46-49.

216. Ткаченко, Б.И. Соотношение изменений давления в предсердиях и показателей системной гемодинамики при применении катехоламинов / Б.И. Ткаченко, В.И. Евлахов, И.З. Поясов // Рос. физиол. журн. им И.М. Сеченова. – 2005. – Т.91. – №6. – С. 625-635.

217. Ткачук, В.А. Молекулярные механизмы сопряжения G-белков с мембранными рецепторами и системами вторичных посредников / В.А. Ткачук, А.Э. Авакян // Рос. физиол. журн. им И.М. Сеченова. – 2003. – Т.89. – №12. – С. 1478-1490.
218. Токтамысова, З.С. О мембраносвязанном гемоглобине / З.С. Токтамысова, Н.Х. Биржанова // Биофизика. – 1990. – Т.35. – №6. – С. 1019-1020.
219. Торосян, Л.Г. Гликозилированный гемоглобин: методологические приемы и диагностическое значение (обзор литературы) / Л.Г. Торосян // Лаб. дело. – 1988. – №2. – С. 3-8.
220. Тюмина, О.В. Влияние этанола на гемолитическую устойчивость эритроцитов / О.В. Тюмина, М.Д. Хангельман, В.Д. Прокопьева // Биохимия. – 2000. – Т.65. – №2. – С. 218-224.
221. Уайт, А. Основы биохимии / А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит; пер. с англ. – М.: Мир, 1981. – Т.1. – 536 с.
222. Ушакова, И.П. Изучение взаимодействия гемоглобина с фосфолипидными везикулярными мембранами различного состава / И.П. Ушакова, И.А. Василенко, Г.А. Серебренникова // Биоорганическая химия. – 1981. – Т.7. – №4. – С. 613-617.
223. А. с. Способ диагностики стабильной стенокардии напряжения / В.Н. Фатенков [и др.]. №1399688; опубл. 1.02. 1988 г.
224. Фелькорен, Б.И. Исследование параметров метода определения гликозилированных белков сыворотки крови / Б.И. Фелькорен, Е.И. Осипова, Т.П. Коцедуб // Лаб. дело. – 1991. – №5. – С. 56-58.
225. Физиология эритропоэза: руководство по физиологии / О.И. Моисеева [и др.]. – Л.: Наука, 1979. – 360 с.
226. Физиология человека / под ред. Г.И. Косицкого. – М.: Медицина, 1985. – 560 с.
227. Филев, Л.Б. Цитоспектрофотометрическое исследование гемоглобина в эритроцитах / Л.Б. Филев, И.И. Енохин, И.И. Захаров // Цитология. – 1989. – Т.31. – №3. – С. 336-343
228. Филиппов, П.П. Как внешние сигналы передаются внутрь клетки / П.П. Филиппов // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – №3. – С. 28-35.
229. Филиппова, М.М. Биологически активные протеолитические фрагменты функциональных белков, полученные *in vitro* / М.М. Филиппова, А.А. Карелин, В.Т. Иванов // Биоорганическая химия. – 1997. – Т.23. – №5. – С. 388-409.
230. Флоря, В.Г. Анаэробный порог: физиологическое значение и методы определения / В.Г. Флоря, В.Ю. Марков // Кардиология. – 1993. – Т.33. – №5. – С. 40-46.

231. Фокина, К.В. Участие глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в регуляции образования 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах / К.В. Фокина, М.Ю. Языкова, П.В. Даньшина // Биохимия. – 2000. – Т.65. – Вып.4. – С. 547-552.
232. Фок, М.В. Динамика оксигенации *in vitro* / М.В. Фок, А.Р. Зарицкий // Биофизика. – 1988. – Т.33. – №4. – С. 622-625.
233. Фултон, А. Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки / А. Фултон. – М.: Мир, 1987. – 117 с.
234. Чаленко, В.В. Возможные причины повышения концентрации молекул средней массы при патологии / В.В. Чаленко // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1991. – №4. – С. 13-14
235. Чекман, И.С. Кальмодулин / И.С. Чекман // Фармакология и токсикология. – 1988. – Т.51. – №3. – С. 53-58.
236. Черницкий, Е.А. Структура и функции эритроцитарных мембран / Е.А. Черницкий, А.В. Воробей. – Минск: Наука и техника, 1981. – 216 с.
237. Черномордик, Л.В. Биомедицинское приложение электрического пробоя клеточной мембраны / Л.В. Черномордик // Усп. совр. биологии. – 1985. – Т.99. – Вып.1. – С. 67-80.
238. Чернух, А.М. Изучение активности ацетилхолинэстеразы и АТФ-аз и некоторые структурные особенности мембран эритроцитов при экстремальной ишемии миокарда / А.М. Чернух, Л.А. Коптева, А.С. Шевченко // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1980. – №9. – С. 270-272.
239. Чернышов, В.П. Гемоглобин. Современные представления о структуре и функциях / В.П. Чернышов, Е.И. Филиппович, Р.П. Евстигнессва // Хим.-фарм. журнал. – 1971. – №1. – С. 37-41.
240. Шалабодов, А.Д. Механизмы регуляции активности транспортных АТФ-аз эритроцитов млекопитающих / А.Д. Шалабодов // Научный вестник Тюменского государственного университета. – 2001. – №3. – С. 22-27.
241. Шаронов, Ю.А. Структура и функции гемоглобина / Ю.А. Шаронов, Н.А. Шаронова // Мол. биология – 1975. – №9. – С. 145-169.
242. Шашкин, А.В. Продукция и деструкция эритроцитов в организме / А.В. Шашкин. – Новосибирск: Наука, 1986. – 88 с.
243. Шепотиновский, В.И. Обменные процессы в эритроцитах при стрессе и экстремальных воздействиях / В.И. Шепотиновский // Пат. физиол. и exper. терапия. – 1984. – №2. – С. 70-73.
244. Шимквич, И.А. Современное состояние вопроса о кислород-транспортной системе крови / И.А. Шимквич, С. Ш. Хараас, А.С. Стирнов // Биохимия. – 1995 – Т.60. – Вып.4. – С. 54-56.
245. Ширяев, В.В. Изменения эритроцитов при физической нагрузке / В.В. Ширяев, Н.В. Ширяев // Физиология человека. – 1994. – Т.20. – №4. – С. 168-170.

246. Шишкина, Г.Т. Молекулярная физиология адренергических рецепторов / Г.Т. Шишкина, Н.Н. Дыгало // Усп. физиол. наук. – 1997. – №1 – Т.28. – С. 61-69.
247. Шугалей, И.В. Окисление гемоглобина нитритом натрия и способы защиты белка от окислительного повреждения / И.В. Шугалей, И.В. Целинский // Журн. общей химии. – 1995. – №11. – С. 1889-1917.
248. Щербакова, Н.Л. Влияние мембран эритроцитов и тубулина на активность NAD-зависимых дегидрогеназ / Н.Л. Щербакова, Н.К. Наградова, В.И. Муронец // Биохимия. – 1996. – Т.61. – №8. – С. 1432-1440.
249. Языкова, М.Ю. Фосфорилирование лактатдегидрогеназы протеинкиназами / М.Ю. Языкова, С.П. Петухов, В.И. Муронец // Биохимия. – 2000. – Т.65. – Вып.10. – С. 1409-1414.
250. Bennett, V. Biochemistry of blood in health and disease / V. Bennett // J. Biol. Chem. – 1992. – V.267. – P. 8703-8706.
251. Beutler, E. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency / E. Beutler // Am. J. Clin. Pathol. and Clin. Med., – 1963. – V.63. – N3. – P. 203.
252. Beutler, E. Improved methods determination of blood glutation / E. Beutler // Journ. Lab. and Clin. Med. – 1963. – V.61. – N5. – P.882-888.
253. Beutler, E. Red cell metabolism a monul biochemical methodes / E. Beutler. – N-Y; L., 1971. – P. 63.
254. Bergmeyer, H.U. Methods of Enzymatic Analysis / H.U. Bergmeyer. – Verlag: Chemie Weinheim. – 1974. – Bd II. – P. 1431-1435.
255. Bloch, R.J. A modell of red blood cell spectrin as a concertina in the erythrocyte membrane / R.J. Bloch, D. Pumplun // Trends Cell Biol. – 1992. – V.2. – N7. – P. 186-189.
256. Board, P.G. NADH-Ferricyanide reductase a coevenient approach the evolution of NADH-Methemoglobin reductase on human erythrocytes / P.G. Board // Clinica Chemica Acta. – 1981. – V.109. – N.2. – P. 233-237.
257. Brecher, A.S. Membrane protease interaction III. A consideration of the difference in binding potential of pancreatic protease erythrocytes and erythrocyte ghost / A.S. Brecher, M. Rosen, D.E. Burkholder // Digestive Diseases and Sc. – 1999. – №9. – P. 1774-1779.
258. Brookes, P.S. Stimulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by oxyhemoglobin / P.S. Brookes, J.M. Land, J.B. Clark, S.J. Heales // FEBS Lett. 416. – 1997. – P. 90-92.
259. Busse, R. Nitric oxide formation in the vascular wal: regulation and functional implications / R. Busse, I. Fleming, V. Schini // The role of nitric oxide in physiology and pathophysiology / eds. H. Koprowski, H. Maeda. – Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1995. – P. 7-18.
260. Clarc, M.R. The Red Cell Production, Metabolism, Destruction / M.R. Clarc, N. Mohandas, S.B. Shohet // Blood. – 1983. – V.610. – P. 899-910.

261. Clapp, L. Modulation of calcium movements by nitroprusside in isolated smooth muscle cells / L. Clapp, A. Garney // *Pflug Arch.* – 1991. – V. 418. – P. 462-470.
262. Horga, J.F. A beta-2-adrenergic receptor activates adenylate cyclase in human erythrocyte membranes at physiological calcium plasma concentrations / J.F. Horga, J. Gisbert, J.C. De Agustin // *Blood Cells. Molecules and Diseases.* – 2000. – V.26. – №3. – P. 223.
263. Hilario, S. The effect of adrenaline upon human erythrocyte properties. Sex-related differences? / S. Hilario, C. Saldanha, J. Martins-Suva // *Bioreology.* – 1999. – V.36. – №1/2. – P. 124.
264. Igusu, H. Erythrocyte acetylcholinesterase in ducheune muscular dys / H. Igusu, S. Mawatari, Y. Kuroiwa // *Clin.Chem. Acta.* – 1980. – V.105. – P. 241-247.
265. Kaiser, G. Occurrence of adenylate cyclase activity in human erythrocytes / G. Kaiser, K. Quiring, D. Gauger // *Blood.* – 1974. – V.29. – P. 115.
266. Lefkowitz, R.J. Indentefication and regulation of alpha- and beta-adrenergic receptors / R.J. Lefkowitz // *Fed. Proc.* – 1978. – V.37. – P. 123.
267. Lincoln, T. Pleotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase / T. Lincoln, P. Komonvilas, T. Cornwell // *Hypertension.* – 1994. – V. 23. – P. 1141-1147
268. Mant, C.T. High-Performance Liquid chromatography of Peptides and Proteins: Separation, Analysis and Conformation / C.T. Mant, R.S. Hodges. – CRC, 1991. – 938 p.
269. Michalak, K. Integration of red blood cell spectrin with lysophospholipids / K. Michalak // *Biophys. Membr. Transp.* 11 SCH. *Biophys. Membr. Transp.*, Koscielisko-Zakopane, 4-13 May, 1992. – Sch. Proc. Pt. Wroslaw, 1992. – P. 307.
270. Padmaja, S. The reaction of nitric oxide with organic peroxyd radicals / S. Padmaja, R. Huie // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1993. – N5. – P. 539-544.
271. Rapoport, J. The regulation of glicolisis in mamalian erythrocytes / J. Rapoport // *Essays in Biochemistry* 4. – London; N.Y., 1968. – P. 69-104.
272. Rathore, N. Lipid peroxidation and antioxidant in isoproterenol induced oxidative stress in rat erythrocytes / N. Rathore, M. Kale, D. Bhatnagar // *Indian J. Physiol. Pharmacol.* – 2000. – V.44. – N2:161-6 PMID: 10846629.
273. Rise-Erans, C. Iron-mediated oxydative stress in erythrocytes / C. Rise-Erans, E. Bay-Sal // *Biochem. J.* – 1987. – V.244. – N1. – P. 191-196.
274. Sager, G. Effect of plasma on human erythrocyte beta-adrenergic receptors / G. Sager, S. Jacobsen // *Biochem. Pharmacol.* – 1985. – V.343. – P. 767.

275. Siems, W.G. Erythrocyte free radical and energy metabolism / W.G. Siems, O. Sommerburg, T. Grune // *Clin Nephrol.* – 2000. – V.53. – P. 9-17.
276. Scoot, M.D. Enhancement of erythrocytes superoxyde dismutase activity: effects on cellular oxidant defense / M.D. Scoot, J.W. Eaton, F.A. Kuypers // *Blood.* – 1989. – V.74. – N7. – P. 2542-2549.
277. Soloviev, A. Nitric oxide but not peroxynitrite relaxes a-toxin permeabilized smooth muscle of rattail artery / A. Soloviev, P. Hellstrand, A. Stefanov // *J.Vasc.Res.* – 1997. – V.34 (1). – P. 138-140.
278. Tannert, T.C. Spreading of red cell blood suspensions on paper as a simple test of cell deformability / T.C. Tannert, K. Lux // *Acta biol. med. germ.* – 1981. – V.40. – P. 739-742.
279. Tuvia, S. Beta-adrenergic agonists regulate cell membrane fluctuations of human erythrocytes / S. Tuvia, A. Moscs, N. Gulayev // *J.Physiol.* – 1999. – V.516. – P. 781.
280. Winterbourn, C.C. Oxidative Reactions of Hemoglobin / C.C. Winterbourn // *Methods in Enzymology.* – 1990. – Vol. 186. – P. 104-107.
281. Zander, R. Intracellular mechanisms of oxygen transport in flowing blood / R. Zander, H. Schmid-Schonbein // *Respir. Physiol.* – 1973. – Vol. 19. – N3. – P. 279-289.
282. Yedgar, S. Red blood cell intracellular interaction in oxidative stress states / S. Yedgar, T. Hovav, G. Barshtein // *Clin Hemorheol Microcirc.* – 1999. – V.21 – P. 189-193.
283. Yki-Javvinen, H. Hyperglycemia decreases glucose uptake in type I diabetes / H. Yki-Javvinen // *J. Diabetes.* – 1987. – P. 892-896.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Глава 1. Структурно-функциональная организация эритроцита человека	3
1.1. Строение мембраны и цитоскелета эритроцита	6
1.2. Структура и функции гемоглобина	14
Глава 2. Метаболические процессы эритроцитов человека	25
2.1. Функциональная активность эритроцитов	28
2.2. Сигнальная система эритроцита человека. Производство пептидов внутри клетки в условиях действия сигнальных молекул	35
Глава 3. Старение и гибель эритроцитов. Влияние условий функционирования на срок жизни эритроцитов	41
3.1. Эритроцитарные популяции в условиях гипоксии и лактоацидоза	41
3.2. Действие условий окислительного стресса и реоксигенации	48
3.2.1. Окислительное повреждение эритроцитарной мембраны	50
3.2.2. Окислительное повреждение гемоглобина	53
3.3. Метаболическое состояние эритроцитов в условиях гипо- и гипергликемии	58
3.3.1. Состояние эритроцитов в условиях гипогликемии и хранения крови	58
3.3.2. Гипергликемия. Состояние эритроцитарных клеток в условиях гипергликемии	59
3.4. Воздействие химических соединений и лекарственных препаратов на эритроцитарные клетки	62
3.4.1. Действие нитританионов и лекарственных препаратов, содержащих нитрогруппировки	62
3.4.2. Действие других лекарственных и химических веществ на эритроциты	66
3.4.3. Действие антагонистов кальция, лигандов и блокаторов β-адренорецепторов	68
3.5. Механизмы разрушения эритроцитов в норме при патологии	68
3.5.1. Внутрисосудистый гемолиз эритроцитов	68
3.5.2. Апоптоз эритроцитов млекопитающих	70

Глава 4. Методы изучения эритроцитов человека	72
4.1. Отмывка эритроцитов и разделение их на фракции	72
4.2. Определение соотношения форм гемоглобина	74
4.3. Методы исследования состояния мембраны эритроцитов	78
4.4. Изучение состояния антирадикальной защиты клетки	85
4.5. Показатели состояния метаболических процессов в клетке	87
4.6. Определения содержания субстратов и среднемолекулярных соединений	89
Библиографический список	92