

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА

НАКОНЕЧНА ЛЮДМИЛА ВІКТОРІВНА

Допускається до захисту
завідувач кафедри біофізики і
фізіології,
к.х.н., доцент

_____ Доценко О. І.
« » _____ 2024__

МЕТГЕМОГЛОБІНРЕДУКТАЗНА АКТИВНІСТЬ В ЕРИТРОЦИТАХ
ЛЮДИНИ В УМОВАХ ГІПОКСІЇ

Спеціальність 091 Біологія

Кваліфікаційна (магістерська) робота

Науковий керівник:
Доценко О.І. завідувач кафедри
Біофізики і фізіології.....,
к.х.н., доцент

Оцінка: _____ / _____ / _____
(бал/за шкалою ЕКТС/за національною шкалою)

Голова Е.К.: _____
(підпис)

Вінниця 2024

Наконечна Л.В. Метгемоглобінредуктазна активність в еритроцитах людини в умовах гіпоксії. Спеціальність 091 «Біологія». Освітня програма «Біологія». Донецький національний університет імені Василя Стуса, Вінниця, 2024.

Розроблена кінетична математична модель метаболізму еритроцитів із залученням O_2 -чутливих механізмів гемоглобіну та метгемоглобінредуктазних систем для прогнозування тимчасових змін внутрішньоклітинних метаболітів, потоків реакцій і клітинної енергетики у відповідь на гіпоксію. В експериментах *in silico* досліджена робота двох метгемоглобінредуктазних систем. Показано, що отримані експериментальні дані дослідження активностей NADP(NAD)H залежних метгемоглобінредуктаз співпадають з результатами моделювання.

Nakonechna L.V. Methemoglobin reductase activity in human erythrocytes under hypoxia conditions. Specialty 091 «Biology». Educational program «Biology». Vasyl Stus Donetsk National University, Vinnytsia, 2022.

A kinetic mathematical model of erythrocyte metabolism involving O_2 -sensitive mechanisms of hemoglobin and methemoglobin reductase systems was developed to predict temporal changes in intracellular metabolites, reaction flows, and cellular energy in response to hypoxia. The work of two methemoglobin reductase systems was studied in *in silico* experiments. It is shown that the obtained experimental data of the NADP(NAD)H-dependent methemoglobin reductase activity studies coincide with the simulation results.

ЗМІСТ

Список основних скорочень	3
ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1. Метгемоглобінредуктаза еритроцитів, локалізація, функції, активність	6
1.2. Особливості метаболічних процесів в еритроцитах людини за умов гіпоксії	12
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	
2.1. Розробка математичної моделі	21
2.2. Математичні методи, що використовували в роботі	25
2.3. Експериментальна перевірка результатів моделювання	26
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТУ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	28
3.1. Моделювання змін гліколітичного потоку за умов гіпоксії	29
3.2. Аналіз <i>in silico</i> роботи метгемоглобінредуктазних систем	33
3.3. Експериментальне дослідження активності цитоплазматичних NAD(P)H–метгемоглобінредуктаз еритроцитів при інкубуванні в окислювальному середовищі Cu^{2+} – AscH	36
ВИСНОВКИ	39
СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	40

Список основних скорочень

Hb – гемоглобін,

metHb – метгемоглобін,

deoxyHb – дезоксигемоглобін,

oxyHb – оксигемоглобін,

НАД – нікотинамідаденіндинуклеотид,

НАДФ – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат,

cytb5 - цитохром b5,

cytb5R, (NADH-dependent) - цитохром b5 редуктаза,

FR, (NADPH-dependent) - флавін редуктаза,

GAPDH - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа,

G6PDH - глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа,

GSSG – окислений глутатіон,

GSH - відновлений глутатіон,

LDH – лактатдегідрогеназа,

Вступ

У циркулюючих еритроцитах окислення гемоглобіну в метгемоглобін відбувається безперервно, не тільки за участю внутрішньоклітинних і позаклітинних активних форм кисню, але також за участю екзо і ендогенних нітритів і окису азоту [1]. Метгемоглобінемія діагностується, коли рівень metHb перевищує 1% від загального вмісту гемоглобіну клітини [2,3], незважаючи на те, що клінічні ознаки цього захворювання відсутні, поки рівень metHb не досягає 10% від загальної кількості. Ціаноз з'являється при рівні metHb 10% або більше. Рівень metHb, що перевищує 20%, пов'язаний з головним болем, запамороченням, втомою і тахікардією. Кома і смерть можуть з'явитися на рівнях 60-70% metHb. Накопичення metHb в еритроцитах зменшує їх здатність постачати кисень, крім того, циклічні процеси за участю гемоглобіну і metHb пов'язані з постійним виробництвом супероксид аніон-радикала, потенційно призводить до додаткового окислювального навантаження [4, 5].

У нормальних еритроцитах вміст metHb підтримується на рівні менш ніж 1% від загального вмісту гемоглобіну за допомогою двох основних ферментативних систем відновлення metHb [6, 4]. Один з цих шляхів - окислювально-відновний цикл, що складається з цитохрому b5 (cytb5) і цитохром-b5-редуктази (cytb5R), який передає електрони від NADH на cytb5. Вважається, що цей шлях відповідальний більш ніж за 95% відновлює здатність в еритроцитах при експериментальних умовах [5]. Добре відомо, що нікотин-аденін-динуклеотид-фосфатний шлях і антиоксиданти, включаючи відновлений глутатіон і аскорбінову кислоту [2], також беруть участь у відновленні metHb.

Еритроцити сприйнятливі до окисного пошкодження через високі концентрації молекулярного кисню, мембранних поліненасичених жирних кислот, а також зв'язаних з гемом і вільних атомів заліза [8]. Попередні дослідження показали, що зміни конформації гемоглобіну під різними градієнтами кисню можуть впливати на антиоксидантну здатність еритроцитів [9]. Вплив гіпоксії викликає окисне пошкодження вільними радикалами в

різних тканинах. За різних фізіологічних і патологічних станів активні форми кисню (АФК), що утворюються в результаті метаболізму, атакуватимуть еритроцити, що призводить до ряду пошкоджень, таких як окислення гемоглобіну, перекисне зшивання мембранних білків і перекисне окислення мембранних ліпідів, що спричиняє перенесення кисню та дисфункцію деформації еритроцитів, і зрештою стає потенційним патогенним фактором серцево-судинних і цереброваскулярних захворювань. Еритроцити мають чудову антиоксидантну здатність для своєчасного видалення АФК з клітин, плазми та тканин [9, 10]. Однак роль метгемоглобінредуктазних систем еритроцитів в умовах окислювального стресу реакція антиоксидантів на зміни градієнтів кисню в еритроцитах все ще залишається незрозумілою.

Метою роботи була розробка кінетичної математичної моделі метаболізму еритроцитів із залученням O_2 -чутливих механізмів гемоглобіну та метгемоглобінредуктазних систем для прогнозування тимчасових змін внутрішньоклітинних метаболітів, потоків реакцій і клітинної енергетики у відповідь на гіпоксію.

Завдання досліджень:

1. Скорегувати існуючу математичну модель для аналізу перебудови метаболічних процесів еритроцитів у стані гіпоксії.
2. Дослідити *in silico* роботу метгемоглобінредуктазних систем у стані гіпоксії.
3. Експериментально дослідити зміни активностей NAD(P)H-залежних цитоплазматичних метгемоглобінредуктаз еритроцитів при інкубуванні їх у системах $Cu^{2+} - AscH$.
4. Порівняти результати моделювання з експериментальними даними.

Предмет дослідження: робота метгемоглобінредуктазних систем у стані гіпоксії.

Об'єкт дослідження – еритроцити людини.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Метгемоглобінредуктаза еритроцитів, локалізація, функції, активність

Ферментативне відновлення гемопротейдів, здатних до зв'язування кисню, - гемоглобіну, міоглобіну і леоглобіну - процес, необхідний для підтримки їх у фізіологічно активному стані. З даного питання є велика кількість публікацій. Історію вивчення редуктаз, які відновлюють гемопротейди, слід вести з початку досліджень метгемоглобінемії - захворювання, пов'язаного з тим, що значна частина гемоглобіну людини знаходиться в формі Hb^+ - окисленої форми (метгемоглобін), що не здатна до зв'язування кисню. Метгемоглобінемія може викликатися дією хімікатів, різними захворюваннями, а також виникати без явної причини [11].

У 1928 р Конант і Скотт [11] показали, що метгемоглобін відрізняється від нормального гемоглобіну валентністю заліза гема [(II) у нормального, (III) у метгемоглобіну], що стало дуже важливим фактом для дослідження як метгемоглобінемії, так і процесу відновлення Hb^+ .

Хітценбергер в 1932 р припустив можливість спадкової успадкованої метгемоглобінемії. Дикман припустив, що метгемоглобінемія може бути пов'язана з наявністю або виробленням речовин, що окислюють Hb . Надалі були висунуті гіпотези, що це захворювання викликається зниженою здатністю Hb^+ до відновлення [11]. Гібсон в 1948 р показав, що поряд з цим, в еритроцитах спостерігається дефіцит коензим-фактора I (діафораза), а в роботі Скотта і Гріффіта 1959 року було описано відсутність ферменту, що відновлює Hb^+ з використанням NADH в якості донора електронів, в еритроцитах хворих зі спадковою метгемоглобінемією [11]. Саме цією роботою можна датувати початок досліджень метгемоглобінредуктази - ферменту, що відновлює окислений гемоглобін.

Слід зазначити, що в еритроцитах були виявлені як розчинна, так і мембрано-пов'язана форма мет- Hb редуктази. Найбільше число досліджень присвячено розчинному ферменту [3, 12- 15].

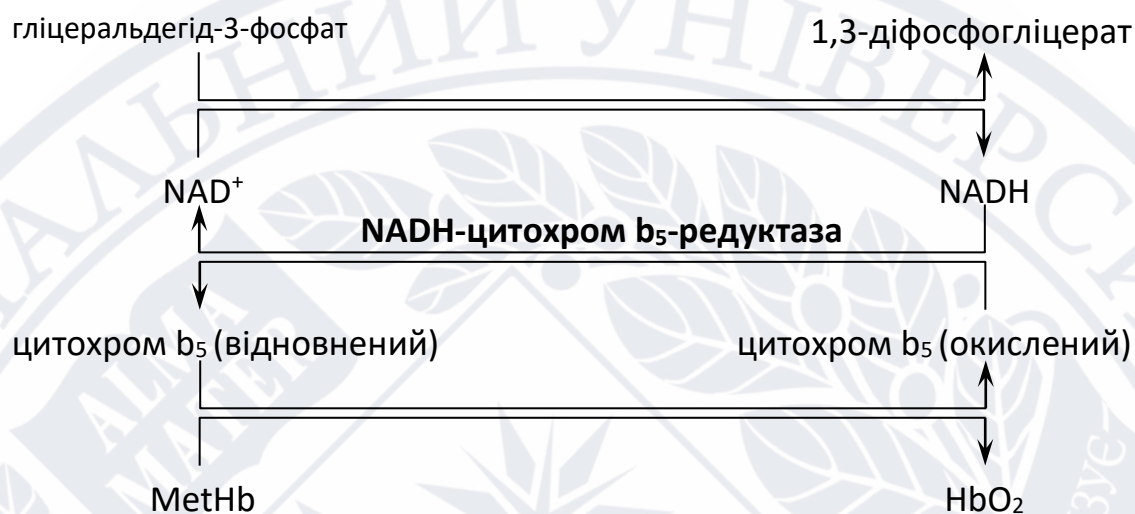
Було показано [16], що фермент, здатний відновлювати Hb^+ і електрофоретично ідентичний мет- Hb редуктазі еритроцитів, міститься і в інших тканинах організму людини: в лейкоцитах, печінці, м'язах, тромбоцитах і нервових клітинах. Автори статті припустили, що в клітинах, що не містять гемоглобін, даний фермент може діяти на інші гем-вмісні білки.

Натепер відомо [3, 17, 18], що цитохром b_5 -редуктаза еритроцитів здатна відновлювати Hb^+ за участю NADH , як донора електронів і цитохрому b_5 , та як проміжного переносника електронів. Імунохімічними методами була показана ідентичність NADH -мет- Hb редуктази еритроцитів і цитохром b_5 -редуктази мікросом печінки щура і плаценти людини. Таким чином, в даний час вважається загально визнаним, що мет- Hb -редуктаза і цитохром b_5 -редуктаза являє собою один і той самий фермент, який внесений в номенклатуру ферментів під назвою NADH : феріцитохром b_5 -оксидоредуктаза (К.Ф. 1.6.2.2.). У зв'язку з цим, в даний час для позначення ферменту з еритроцитів, який бере участь в процесі ферментативного відновлення гемоглобіну, застосовуються обидві назви: і мет- Hb редуктаза, і цитохром b_5 -редуктаза. Після цих досліджень стало зрозуміло, що саме цитохром b_5 є природним проміжним переносником електронів при ферментативному відновленні Hb^+ . Раніше при вивченні мет- Hb редуктази використовували штучний проміжний переносник електронів, в якості якого найчастіше застосовували метиленовий синій [19]. Крім того, в даний час вважається, що дані, отримані при вивченні цитохром b_5 -редуктази з інших джерел (з мікросом печінки або плаценти), стосуються і мет- Hb -редуктази еритроцитів.

Таким чином, головним компонентом метгемоглобін відновної системи є нікотинамідаденіндинуклеотид- H -цитохром b_5 -редуктаза (NADH-метгемоглобінредуктази, діафораза-1). Реакція відновлення метгемоглобіну двоступенева: ензиматичне відновлення цитохрому b_5 і неензиматичне відновлення метгемоглобіну [18].

Доведено, що системою NADH - метгемоглобінредуктаза відновлюється близько 70-90% метгемоглобіну до гемоглобіну. В останні роки встановлено,

що ця редукційна система складається з двох ферментів - цитохром b5-редуктази і цитохрому b5 [3, 17].



Існує два типи недостатності цитохром b5-редуктази: «еритроцитний тип», коли недостатність ферменту спостерігається тільки в еритроцитах, і «основний тип», коли вона спостерігається і в інших тканинах хворого [20]; генетичні механізми цих проявів поки не вивчені. Особливо виділяється метгемоглобінемія, пов'язана з розумовою неповноцінністю хворих [19]. Таке порушення може бути пов'язано з тим [11], що цитохром b5-редуктаза бере участь в обміні жирних кислот, і при недостатній активності ферменту відбувається порушення такого обміну, що згубно позначається на діяльності нервових клітин.

На основі отриманих експериментальних даних був запропонований наступний механізм відновлення метгемоглобінуза участю цитохром b5-редуктази [21]: в зв'язуванні беруть участь карбоксильні групи цитохрому b5 і групи лізину Hb^+ , при цьому створюються найбільш сприятливі умови для передачі електронів. Таким чином, в даний час вважається, що мет- Hb -редуктаза відновлює цитохром b5, який, вже неензиматично, відновлює Hb^+ . Слід в той же час зазначити, що було показано [22], що при певним чином підібраних умовах мет- Hb -редуктаза може відновлювати Hb^+ і без проміжних переносників електронів, хоча відновлення йде в цьому випадку слабкіше.

У багатьох роботах різними методами була показана гетерогенність розчинної мет-Нв-редуктази - наявність декількох активних фракцій [22, 23]. Така гетерогенність може бути пов'язана з різними факторами: як з існуванням різних генів, що відповідають за синтез ферментів, здатних до відновлення Нв⁺, так і з посттрансляційною модифікацією ферменту. Пов'язано це може бути і з тим, що *in vitro* відновлення Нв⁺ можуть каталізувати і ферменти, які не виконують такої функції *in vivo*. У той самий час в роботах багатьох авторів вивчалася мет-Нв-редуктаза, яка, швидше за все, виконує свою функцію *in vivo*.

Мет-Нв-редуктаза не володіє суворю субстратною специфічністю щодо акцептора електронів. Вона здатна відновлювати також Мв⁺, цитохром b5, дихлорфеноліндофенол, калію ферриціанід [11]. Мембраннозв'язана мет-Нв-редуктаза з еритроцитів людини може використовувати в якості акцепторів електронів цитохром c, цитохром b5, калію ферриціанід, діхлорфеноліндофенол, Нв⁺-ферриціанідний комплекс [24].

Молекулярна маса розчинної мет-Нвредуктази, встановлена різними методами, дорівнює 30 кДа [20, 22]. Тривимірні структури мет-Нвредуктази (b5R) людини, щура і свині [2] були розкриті за допомогою рентгенівської кристалографії. Згідно з цими дослідженнями, у b5R людини кофактор FAD був здатний нековалентно прилипати до великої, широкої граничної щілини між двома основними доменами, тоді як молекула NADH могла вписуватися в міждоменну щілину на зворотному боці ізоалоксазинового кільця FAD [2]. Грунтуючись на спостереженні, що Pe194 розташований у проксимальній області NADH-зв'язуючого мотиву, було припущено, що ця заміна амінокислоти вплине на зв'язування субстрату. Однак мутація Pe194Leu не вплинула на K_m для NADH, коли активність b5R вимірювали в присутності ферриціаніду як акцептора електронів, що означає, що залишок Pe194 не відіграє ключової ролі в спорідненості з NADH. Крім того, хоча відмінності в середніх значеннях інших кінетичних параметрів спостерігалися між ферментами дикого типу та мутантними ферментами Pe194Leu, статистично значущої різниці не

було показано. Ці результати показали, що заміна Pe194Leu не може вплинути на ферментативну функцію b5R.

Для розчинної NADH-мет-Hb-редуктази визначено амінокислотну послідовність. Фермент складається з 275 амінокислотних залишків, що становить за масою 31260 Да без урахування FAD. У молекулі переважають гідрофобні амінокислоти (56%) та відзначено високий вміст проліну (9,5%), N-кінцева послідовність подібна до відповідної послідовності ферментів з мікросом печінки вола. Для ферментів з еритроцитів людини та мікросом печінки вола інваріантними є 17 залишків [22], для ферментів з еритроцитів людини та мікросом печінки свині – 19 залишків.

Мембранозв'язана мет-Hbredуктаза значно менше вивчена. Була виділена високомолекулярна мембранозв'язана мет-Hbredуктаза [24]. Її молекулярна маса виявилася рівною 144 кДа. На підставі даних електрофорезу з додецилсульфатом натрію автори [24] прийшли до висновку, що фермент є олігомером з масою субодиниць 36 кДа. У той же час при інкубації ферменту з лізосомальним катепсином печінки щура на електрофореграмі з'являється смуга, відповідна розчинного ферменту з молекулярною масою близько 30 кДа. Автори статті [24] роблять припущення, що розчинна NADH-цитохром b5-редуктаза еритроцитів може бути продуктом обмеженого протеолізу субодиниць мембрано-зв'язаного ферменту.

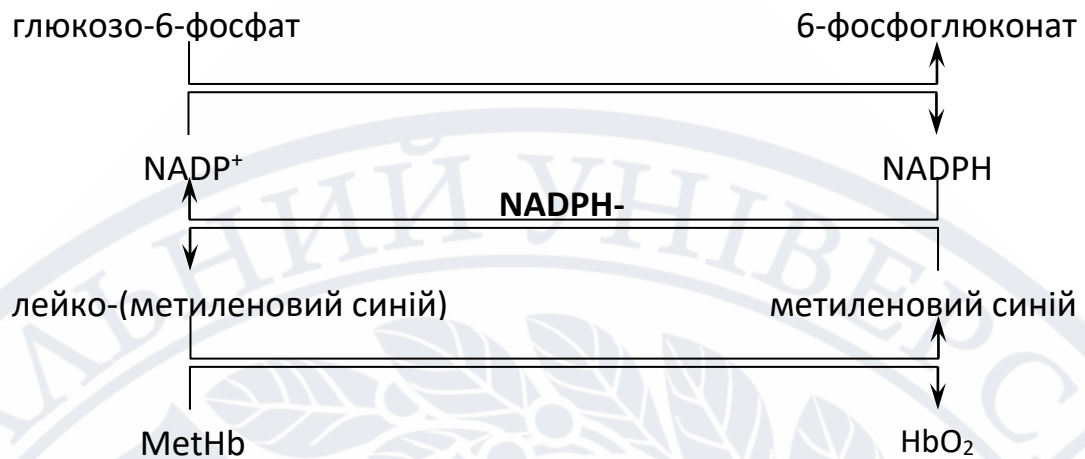
Цікаво, що наявність та співвідношення цитоплазматичної та мембранно-пов'язаної форм ферменту відрізняється в еритроцитах різних видів тварин. В еритроцитах людини виявлено обидві форми [21], те ж саме в еритроцитах опосума. Розчинна мет-Hbredуктаза виділена з еритроцитів кролика, мембранозв'язана - з еритроцитів білого леггорна, дорослої жаби-бика та пуголовків того ж виду. Мет-Hbredуктазна активність відсутня в розчинній фракції еритроцитів індички, курки та японської курішки та локалізована у мембранній фракції, причому при обробці детергентами відбувається солубілізація ферменту [11]. З еритроцитів різних видів риб також була виділена тільки мембранно-пов'язана мет-Hbredуктаза.

Гомогенний препарат мет-Нв-редуктази з цитозоллю еритроцитів кролика має максимуми поглинання при 273, 390 та 462 нм та плечі при 370, 435, 488 нм [24]. Спектр поглинання мембранно-пов'язаного ферменту з еритроцитів людини має максимуми поглинання при 392 і 460 нм та плечі при 435 та 488 нм.

Багатьма авторами були виділені редуктази, що здатні відновлювати Нв⁺, але для більшості цих редуктаз були необхідні проміжні переносники електронів. Кіесе із співавт. [11] виділили фермент, що містить FAD як простетичну групу. Хеннекенс із співавт. [11] очистили в 180 разів NADPH-дегідрогеназу з гемолізатів еритроцитів, що відновлює Нв⁺. Обидва автори назвали виділені ними ферменти гемоглобінредуктазами. Було показано, що при відновленні Нв⁺ NADPH-дегідрогеназою остання відновлює метиленову синь, яка вже неензиматично відновлює Нв⁺. Встановлено також, що нестача NADPH-дегідрогеназної активності не пов'язана із метгемоглобінемією.

Скотт із співавт. [11] виділили та охарактеризували дві NADPH-дегідрогенази. Вони містили гем, але не містили флавінів, були здатні відновлювати Нв⁺, проте з дуже низькою швидкістю, хоча могли функціонувати і без метиленової сині. Ці редуктази давали приблизно 5% від загальної активності еритроцитів відновлення Нв⁺ і містилися у пацієнтів зі спадковою метгемоглобінемією.

Таким чином, інший ензиматичний шлях перетворення метгемоглобіну в гемоглобін відбувається за участю ферменту нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат-Н-метгемоглобінредуктази (NADPH-метгемоглобінредуктази, діафори-2). Цей фермент фізіологічно інертний, але може активуватися екзогенними акцепторами електронів, наприклад, метиленовим синім, рибофлавіном [25 - 27].



Діафораза-2 виконує роль резервної ензиматичної системи, на її частку припадає 5-6% відновленого гемоглобіну [26]. Вона може відновлювати і більшу кількість метгемоглобіну в гемоглобін, що в значній мірі залежить також від стану вуглеводного обміну в еритроцитах.

Вважають [5], що відновлення Hb⁺ *in vivo* йде двома шляхами: за участю NADH-мет-Нб-редуктази (NADH-цитохром b5-редуктази) та NADPH-мет-Нб-редуктази (NADPH-флавінредуктази), причому найбільше фізіологічне значення має відновлення під дією NADH-мет-Нб-редуктази. Переконливі дані на користь найважливішої ролі NADH-мет-Нб-редуктази наводять автори [12], проте, як зазначалося вище, висловлювалося думка, що основне відновлення метгемоглобіну відбувається в за участю мембранно-зв'язаної мет-Нб-редуктази.

1.2. Особливості метаболічних процесів в еритроцитах людини за умов гіпоксії

Еритроцити потребують надійних антиоксидантних систем щоб протистояти значному окислювальному навантаженню, яке виникає під час кровообігу. Це особливо актуально під час фізіологічного стресу. Деоксигенація гемоглобіну (Hb) призводить до виробництва метгемоглобіну та супероксид-аніону [4, 10]. Ці процеси активізуються, коли віддача кисню збільшується, наприклад, в умовах зниженого кровотоку або гіпоксії. Зазвичай

ці та пов'язані з ними вільні радикали залучаються до судинної сигналізації, яка відповідає за гомеостаз доставки кисню. Проте в умовах тривалої гіпоксії каскади АФК можуть перевищувати антиоксидантну здатність, залишаючи біохімічний слід окисного стресу, спричиненого гіпоксією. Ці хімічні процеси призводять до дезадаптивних модифікацій білків, до яких особливо вразливі мембранні тіоли [28].

Структура Hb була еволюційно адаптована для транспорту кисню, але вона не строго спеціалізована для виконання тільки одного цього завдання і може бути використана для каталізу і передачі сигналу [29].

Еритроцитарний Hb не є класичним сигнальним білком, в той же час його функціонування в організмі в якості переносника кисню пов'язане з сенсорною функцією. Детекція кисню здійснюється за таким самим механізмом, як його транспорт, тобто, за участю алостеричних властивостей гемоглобіну. Сигнальна функція Hb спрямована насамперед на регуляцію периферичного кровотоку, що здійснюється за допомогою двох основних механізмів: вивільнення сигнальних метаболітів (NO, АТР, АDР, аденозин, K^+ , NAD(P)H, PGE2) та зміни механічних властивостей мембрани, тобто, реологічних властивостей еритроцитів. Початковим етапом у ланцюзі передачі сигналу є утворення комплексу deoxyHb-CDB3, проте послідовність подальших подій поки невідома. Не ідентифіковані проміжні компоненти цього шляху, що модулюють такі властивості клітини, як деформованість та лізис.

Нещодавно визнано, що тіоли еритроцитарної мембрани відіграють центральну роль у передачі сигналів судин за участю еритроцитів, слугуючи платформою для контекстно-залежної обробки як ROS, так і RNS [10]. Еритроцити також відіграють важливу роль у метаболізмі вільних радикалів, слугуючи поглиначем АФК під час окисного стресу [28, 29]. Примітно, що як очищення АФК, так і передача судинних сигналів еритроцитами вимагають регенерації окислених тіолів для постійної функціональності.

Зміна швидкості метаболізму глюкози. У еритроцитах глюкоза метаболізується двома шляхами: шляхом Ембдена-Мейєргофа (ЕМР) і

гексозомонофосфатним шляхом (НМР; також називається пентозним шунтом) (рис. 1.1.). Обидва шляхи використовують глюкозо-6-фосфат (G6P) як вихідний субстрат. НМР є єдиним джерелом NADPH в еритроцитах і генерує фруктозо-6-фосфат (F6P) або гліцеральдегід-3-фосфат (G3P), які знову приєднуються до ЕМР перед гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназою (G3PD), ключовим регуляторним моментом у ЕМП. ЕМР генерує NADH, що використовується метHb-редуктазою, а також АТФ (для керування іонними насосами) і 2,3-DPG (для модуляції р50 гемоглобіну). Відносний потік через ЕМР і НМР модулюється O₂-зв'язаними переходами в конформації Hb через конкурентне зв'язування для цитоплазматичного домену Band 3 (cdB3) між дезоксиHb і ключовими ферментами ЕМР (PFK, ALD, G3PD, PK і LDH).

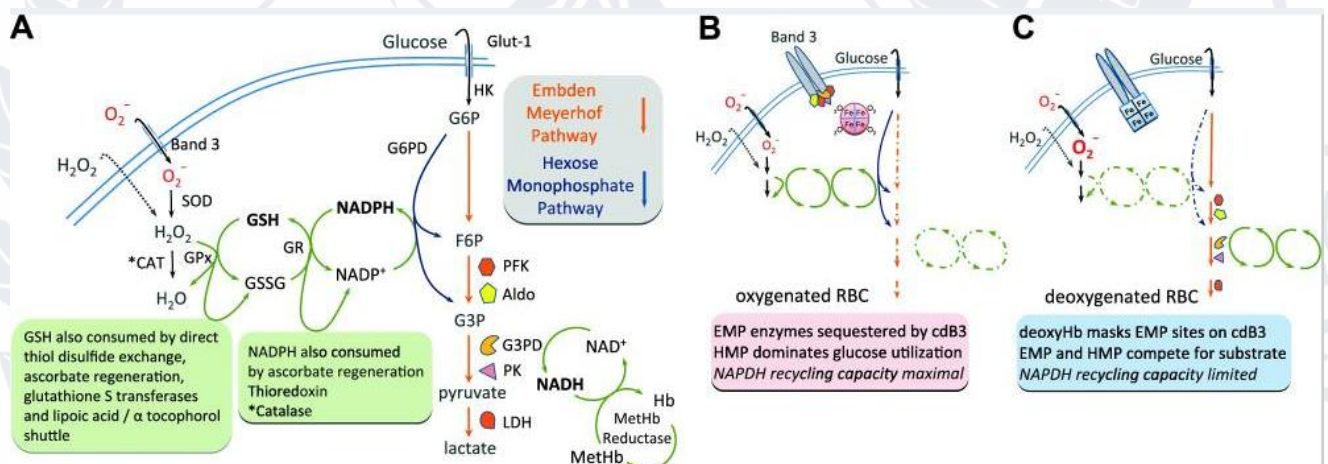


Рис. 1.1. Спрощена схема метаболізму глюкози в еритроцитах (А), яка протікає або шляхом Ембдена-Мейєргофа (ЕМР, помаранчеві стрілки), або шляхом гексозомонофосфату (НМР, сині стрілки) [10]. CAT, каталаза; GSH, глутатіон; GR, глутатіонредуктаза; NADPH, нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат; ПФК, фосфофруктокіназа; Aldo, альдолаза; РК, піруваткіназа; ЛДГ, лактатдегідрогеназа.

Оскільки зв'язування з cdB3 інактивує ферменти ЕМР, блокування потоку через гліколітичний шлях є функцією насичення гемоглобіну киснем (SO₂) (рис. 1.1). Таким чином, гіпоксія може спричинити безперервну субстратну конкуренцію між ЕМР і НМР і стримувати збільшення потоку глюкози через НМР. У результаті гіпоксичні еритроцити можуть втратити свою

здатність регенерувати НАДФН, який є ключовим відновлювальним еквівалентом для переробки GSH, який є ключовим для антиоксидантного захисту на основі тіолів (рис. 1.1).

У повністю насичених киснем еритроцитах (рис. 1.1, В) ці ензими ЕМР інактивуються секвестрацією на cdB3, в результаті чого глюкоза проходить через HMP, максимізуючи здатність рециркуляції NADPH (і, отже, GSH). У деоксигенованих еритроцитах (рис. 1.1, С) ферменти ЕМР від'єднуються від cdB3, створюючи конкуренцію за G6P як субстрат і тим самим обмежуючи здатність до рециркуляції NADPH і GSH та стійкість до атаки ROS.

За останні двадцять років ці уявлення були розширена, щоб представити концепцію «транспортного метаболону», який включає смугу 3. Будучи найпоширенішим мембранним білком еритроцитів (1×10^6 копій/клітину), смуга 3 модулює транспорт газу CO_2 в еритроцитах через так званій «зсув хлоридів» (обмін $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$), таким чином сприяючи гомеостазу рН і вивільненню кисню шляхом сприяння «ефекту Бора» [45]. Припущення збирання «транспортного метаболону» заснована на спостереженні що N-кінцевий цитозольний домен смуги 3, який містить численні кислотні залишки, може стабілізувати дезоксигемоглобін шляхом прямого зв'язування. Білок смуги 3 приєднується до інших трансмембранних білків, утворюючи комплекси з анкірином, до яких прикріплена горизонтальна цитоскелетна мережа спектрину [3]. Зв'язування дезоксиHb або metHb з цитозольним доменом білка смуги 3 викликає від'єднання анкірину та сітки спектрину від смуги 3. У результаті мембрани деоксигенованих еритроцитів стають менш жорсткими та більш деформованими, але також більш крихкими. Подібні, але більш серйозні зміни в структурі цитоскелету спостерігаються у пацієнтів зі спадковим сфероцитозом, спричиненим мутаціями білка смуги 3, анкірину або спектринів [3]. Той самий механізм також може спостерігатися і у випадку метгемоглобінемії.

Перекис водню (H_2O_2) і супероксид (O_2^-) є основними ендogenous ROS, з якими стикаються еритроцити. Обидва ROS можуть бути згенеровані

внутрішньоклітинно, однак тільки H_2O_2 може безпосередньо перетинати мембрану. O_2^- потрапляє в еритроцити через смугу 3 (аніонообмінний білок 1 або AE1). H_2O_2 і O_2^- остаточно відновлюються до води каталазою або глутатіонпероксидазою (GPx).

Знижена активність цytb5-метгемоглобінредуктази призводить до зниження споживання NADH, що, у свою чергу, може впливати на АТФ-залежне виробництво та підтримку пулу GSH у клітинах [3]. Альтернативно, metHb може стимулювати гліколіз в еритроцитах шляхом заміни гліколітичних ферментів у цитозольному домені білка смуги 3 [30]. Якщо останнє вірно, підвищення рівня GSH слід спостерігати лише у важких випадках метгемоглобінемії, коли вміст metHb порівняний із вмістом дезоксиHb.

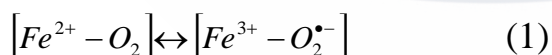
Деглутатіонування гемоглобіну в умовах гіпоксії. Зниження насичення гемоглобіну киснем до 50% або менше, яке спостерігається у здорових людей під час перебування на великій висоті або в суспензії еритроцитів, призводить до підвищення внутрішньоеритроцитарного рівня GSH, пропорційного зниженню насичення гемоглобіну киснем [31]. Цей ефект не був викликаний стимуляцією синтезу GSH de novo або його вивільненням під час деглутатіонування цистеїнів Hb. Гемоглобін (Hb) оборотно нековалентно зв'язує GSH. З чотирьох молекул GSH, зв'язаних з окси-Hb, дві вивільнюються при деоксигенації. Мілімолярні кількості GSH, що з'являються в цитозолі деоксигенованих еритроцитів, значно перевищують кількість GSH, яку можна відновити з пулу GSSG [14], але можна порівняти з кількістю GSH, яка може бути вивільнена в ході масивної де-глутатіонування цистеїнових залишків Hb. Доступність залишків цистеїну α -104, β -112 і β -93 для S-глутатіонування моделювалася in silico для окси- та дезокси-Hb. Аналіз доступних кристалічних структур окси- та дезокси-Hb показує, що тільки група βCys93 є єдиним тіолом, зверненим всередину в окси-Hb, але переміщується в положення, спрямоване назовні, коли Hb деоксигенується, тоді як інші тіоли не витісняються зі змінами оксигенації. Якщо GSH зв'язаний з цією тіоловою групою, його деглутатіонування можливе лише тоді, коли Hb знаходиться в

деоксигенованому стані, і глутаредоксин 1 може наблизитися до нього. Тіольна група $\alpha\text{Cys}104$ недоступна для S-глутатіонілування, і те, що $\beta\text{Cys}112$ доступний для зв'язування або вивільнення GSH незалежно від стану оксигенації Hb, впливає з аналізу площі поверхні, доступної розчиннику.

Цитозольна концентрація гемоглобіну (5,4 мМ) порівнянна з концентрацією GSH (1,2–3,5 мМ) і BPG (2–7 мМ) залежно від тяжкості гіпоксії, тоді як концентрації НАДН (10–4 мМ) і НАДФН (10–2 мМ) є нижчими і порівнянними з рівнями GSSG. В умовах хронічної депривації O_2 , наприклад під впливом гіпоксії, концентрація BPG зростає [7], збільшуючи ймовірність зв'язування BPG з Hb навіть у насиченому киснем стані. Приєднання BPG до центральної порожнини тетрамеру гемоглобіну скомпromетувало б навантаження O_2 в легені, навіть якщо його спорідненість до окси-Hb низька ($K_d = 4,75$ мМ для окси-Hb проти 0,1 мМ для дезокси-Hb). Зв'язування BPG з дезокси-Hb не порушується GSH, а вивільнення GSH з Hb під час деоксигенації не змінюється BPG. Збільшення SO_2 до 50% або більше призведе до зв'язування GSH з додатковими ділянками і буде перешкоджати зв'язуванню BPG з Hb, таким чином сприяючи зв'язуванню O_2 з Hb у гіпоксичних легенях. Досягаючи гіпоксичної периферії, GSH вивільняється з порожнини, а BPG зв'язується з високоафінним сайтом. Поріг деоксигенації для вивільнення GSH згідно з нашими вимірюваннями *in vitro* становить приблизно 50% SO_2 .

Аутоокиснення гемоглобіну в умовах гіпоксії.

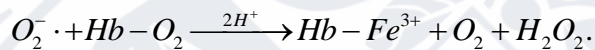
У молекули гемоглобіну є чотири субдиниці, що складаються з двох α і двох β ланцюгів. Кожна субдиниця має гемову групу, з якою кисень зв'язується оборотно. Залізо в дезоксигемоглобіні знаходиться в $2+$ ступені окислення, і коли кисень зв'язується з ним, утворюється проміжна структура, в якій електрон делокалізований між залізом і киснем (рівняння 1). Молекула оксигемоглобіну може бути перетворена до супероксиданіон радикалу і метгемоглобіну, нездатного зв'язувати кисень.



Аутоокислення гемоглобіну (Hb) до метгемоглобіну (Hb⁺) включає утворення супероксидних аніон-радикалів (O₂^{•-}). Іон Fe²⁺ в оксигемоглобіні функціонує як донор електронів для одновалентного відновлення молекулярного кисню [32]:



Радикали кисню, що утворюються, будуть далі реагувати з оксигемоглобіном, утворюючи кисень і перекис водню (H₂O₂):

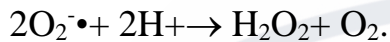


Утворення H₂O₂ під час аутоокислення гемоглобіну хребетних було описано Caughey & Watkins (1985), які стверджують, що присутність ефективного донора електронів, такого як CN, підвищує швидкість аутоокислення Hb і призводить до прямого виробництва H₂O₂.

Аутоокислення відбувається з повільною швидкістю ($k = 4,5 \times 10^{-7} \text{ c}^{-1}$) [8, 28] і прискорюється в частково деоксигенованому Hb. Швидкість утворення метгемоглобіну лінійно залежить від концентрації оксигемоглобіну. При внутрішньоклітинній концентрації оксигемоглобіну 0,005 М, швидкість виробництва метгемоглобіну складає 13.8 μМ/год. З урахуванням того, що швидкість утворення метгемоглобіну в чотири рази вище за відсутності каталази і супероксиддисмутази [33] (у зв'язку з тим, що O₂^{•-} і H₂O₂ можуть реагувати далі з оксигемоглобіном) швидкість утворення метгемоглобіну в інтактних еритроцитах повинна складати 3.45 μМ/год.

Зворотна реакція (відновлення metHb O₂^{•-}) також можлива при $k = 4000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Крім того, O₂^{•-} може утворюватися ферментативно NADPH-оксидазами (Nox2, EC 1.6.3.1) або як побічний продукт мітохондріального дихання в ендотеліальних клітинах і лейкоцитах. Крім того, фермент ксантинооксидаза (EC 1.17.3.2) який зв'язується з глікозаміногліканами на ендотеліальних поверхнях, також може виробляти O₂^{•-}. Хоча O₂^{•-} може спонтанно дисмутувати до кисню та пероксиду водню (H₂O₂), фермент

супероксиддисмутаза (SOD1, EC 1.15.1.1), присутній у еритроцитах прискорює цю реакцію в кілька разів:



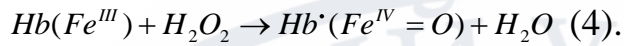
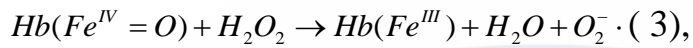
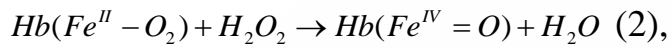
Супероксид сам по собі не дуже шкідливий і не є сильним окислювачем; навіть більше, іноді він може діяти як відновник. Було запропоновано, що реакція з гідропероксидами ліпідів дає алкоксильні радикали та сприяє окисленню ліпідів, що зрештою призводить до лізису еритроцитів, але концентрація гідропероксидів ліпідів у свіжих еритроцитах дуже низька. Альтернативним токсичним шляхом є реакція з оксидом азоту ($\text{NO}\cdot$) з утворенням пероксинітриду.

Більшість H_2O_2 походить від $\text{O}_2^{\cdot-}$, але деякі оксидази можуть утворювати H_2O_2 безпосередньо. Окрім мікробіцидних властивостей, H_2O_2 модулює різні клітинні функції, включаючи проліферацію та виживання ендотеліальних клітин, рекрутинг тромбоцитів, секрецію інсуліну та ремоделювання серця, індукований гіпертензією. H_2O_2 може дифундувати через мембрану еритроцитів дуже швидко, без участі аквапоринів. H_2O_2 не є дуже окислювальною молекулою, але може давати високореакційноздатний гідроксильний радикал ($\text{HO}\cdot$) шляхом відновлення металами (реакція Фентона):



За нормальних фізіологічних умов концентрація вільного або лабільного заліза, доступного для реакції Фентона, підтримується на дуже низькому рівні позаклітинними та внутрішньоклітинними білками, запобігаючи шкідливим реакціям, опосередкованим залізом. Однак різні генетичні порушення можуть призвести до надлишку заліза.

Дві третини заліза в організмі присутні в циркулюючих еритроцитах як частина Hb [28, 29]. У еритроцитах реакція H_2O_2 з гемом оксиHb дає проміжний продукт (рівняння 2), який може реагувати з другою молекулою H_2O_2 з утворенням metHb (рівняння 3). Реакція H_2O_2 з metHb дає ferrylHb з білковим радикалом, який легко виявляється за допомогою ЕПР (рівняння 4).



Щоб запобігти цим потенційно шкідливим реакціям, еритроцити оснащені надійною системою для зниження вмісту H_2O_2 , включаючи пероксиредоксин 2, каталазу та глутатіонпероксидазу.

Досить добре узгодження між рівнем дезоксиHb і H_2O_2 і супутнє підвищення обох параметрів під час гіпоксії вказують на те, що аутоокислення гемоглобіну може бути основним, хоча, ймовірно, не єдиним джерелом кисневих радикалів під час гіпоксії в дихальних рідинах безхребетних. Згідно з Rifkind et al. (1988), аутоокислення гемоглобіну посилюється при зниженому тиску кисню у ссавців [32].

РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи дослідження

2.1. Розробка математичної моделі

Схема метаболізму еритроцитів, на підставі якої була побудована математична модель, показана на рис. 2.1. Центральний вуглецевий змодельований з використанням моделі Holzhütter [14], у якій 38 диференціальних рівнянь було побудовано на підставі точних кінетичних рівнянь.

Модель центрального вуглецевого метаболізму Holzhütter була доповнена кінетичними рівняннями, що описують наступні процеси: а) дифузійні потоки екзогенних O_2 і H_2O_2 , б) оксигенації гемоглобіну, в) генерації внутрішньоклітинного супероксиданіон-радикалу і перекису водню, г) інактивації ендogenous перекису водню в реакціях, що каталізуються каталазою і глутатіонпероксидазою, д) відновлення метгемоглобіну, г) реакціями, що описують взаємодії між Hb та гліколітичними ферментами.

Оборотне зв'язування гліколітичних ферментів (PFK, ALD, GAPDH) та двох алостеричних форм Hb (R- та T-станів) з білком смуги 3 (band3 protein) на мембрані здійснювали на основі індивідуальних констант зв'язування, наведених у [35]. Hb у T-стані (дезоксигемоглобін) має в 100 разів вищу спорідненість до білка смуги 3 і набагато частіше і міцніше асоціюється з цим білком, ніж Hb у R-стані (оксигемоглобін). Каталітична активність фосфофруктокінази (PFK), альдолази (ALD) та гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GAPDH) гальмується завдяки їх специфічному зв'язуванню з білком смуги 3, але утворення таких комплексів є оборотним [36].

На основі цих висновків у кінетичних рівняннях, що описують активності ферментів, V_{max} було представлено як $k_{cat} \cdot E$ (де E - концентрація ферменту у клітині), що дозволило враховувати збільшення концентрації ферментів у цитозолі при зв'язуванні Hb у T-стані з білком смуги 3. У такий спосіб ми математично описуємо конкурентне зв'язування гемоглобіну та PFK, ALD,

GAPDH з білком смуги 3, а також можливі зміни у швидкості гліколізу відповідно до змін в напрузі кисню (pO_2 у мм рт. ст.).

В моделі також враховані процеси, що відбуваються за участю глутатіону, проте вклад цих процесів у метаболізм клітини у роботі аналізуватися не буде.

Список реакцій і ферментів, доданих до моделі Holzhütter, наведений в таблиці 2.1. У таблиці 2.2. наведені відповідні значення параметрів моделі для процесів, доданих до початкової моделі.

Таблиця 2.1. Основні реакції, включені в модель, і ферменти, що відповідають їм

Реакція	Фермент/Характеристика процесу	
1. Реакції за участю гемоглобіну		
1. $O_{2_out} \rightleftharpoons O_{2_in}$	Дифузія O_2	
2. $O_{2_in} + Hb \rightleftharpoons HbO_2$	Утворення і дисоціація оксигемоглобіну	
3. $HbO_2 \rightarrow MetHb + O_2\cdot$	Аутоокислення гемоглобіну	
4. $Hb + O_2\cdot \rightarrow MetHb + H_2O_2$	Окислення гемоглобіну	Hb_ox
5. $MetHb + FMNred \rightarrow Hb + FMNox$	Неферментативний процес	
6. $FMNox + NADPH \rightarrow FMNred + NADP$	Флавінметгемоглобін редуктаза	RFMN-metHb
7. $MetHb + cyt5red \rightarrow Hb + cyt5ox$	Неферментативний процес	
8. $cyt5ox + NADH \rightarrow cyt5red + NAD^+$	Цитохром-65-метгемоглобін редуктаза	Rb5-metHb
2. Метаболізм ендогенного H_2O_2		
9. $H_2O_{2_out} \rightleftharpoons H_2O_{2_in}$	Дифузія H_2O_2	

10. $2O_2 \cdot + 2H^+ \rightarrow H_2O_{2_in}$	Супероксиддисмут аза	SOD
11. $2GSH + H_2O_{2_in} \rightarrow GSSG + H_2O$	Глутатіонпероксид аза	GPx
12. $2H_2O_{2_in} \rightarrow O_2 + 2H_2O$	Каталаза	Cat
3. Зв'язування з білком смуги		
13. $Band3 + ALD \rightleftharpoons Band3_ALD$		
14. $Band3 + GAPDH \rightleftharpoons Band3_GAPDH$		
15. $Band3 + PFK \rightleftharpoons Band3_PFK$		
16. $Band3 + LDG \rightleftharpoons Band3_LDG$		
17. $Band3 + deoxyHb \rightleftharpoons Band3_deoxyHb$		
18. $Band3 + oxyHb \rightleftharpoons Band3_oxyHb$		
4. Взаємодія між Hb і 2,3BPG		
19. $deoxyHb + 2,3\ BPG \rightleftharpoons deoxyHb2,3\ BPG$		
20. $oxyHb + 2,3\ BPG \rightleftharpoons deoxyHb2,3\ BPG + O_2$		

Таблиця 2.2. Кінетичні параметри, концентрації ферментів і метаболітів, використовуваних в моделі відновлення metHb в еритроцитах

Параметр	Величина	Літературне джерело
Дифузія кисню		[37]
D_{O_2}	$0,00684\ h^{-1}$	
Дифузія H_2O_2		
$D_{H_2O_2}$	$15,12\ h^{-1}$	[38]
Каталаза (CAT)		
k	$7,5 \cdot 10^6\ mM^{-1} \cdot h^{-1}$	[39]
Аутоокислення та окислення гемоглобіну		[40]
k (аутоокислення)	$1 \cdot 10^{-5}\ h^{-1}$	

Параметр	Величина	Літературне джерело
k (окислення)	$14400 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	
Глутатіонпероксидаза (GPx)		[41]
k_1	$1,32 \cdot 10^{-8}$	
k_2	$6,97 \cdot 10^{-6}$	
Супероксиддисмутаза		[42]
k	$300 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	
Реакція FMN-metHb		
K	$1,98 \cdot 10^7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	[5]
Реакція b5- metHb		
k_1	$2,23 \cdot 10^4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	[5]
k_{-1}	$2,099 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	[5]
Реакція FR		[5]
k_{cat}	$3,56 \cdot 10^2 \text{ h}^{-1}$	
K_{mNADPH}	$9,7 \cdot 10^{-4} \text{ mM}$	
K_{mFMN}	$5,28 \cdot 10^{-4} \text{ mM}$	
K_{iNADPH}	$5,5 \cdot 10^{-4} \text{ mM}$	
K_{iNADP^+}	$4,89 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$	
Реакція b5R		[5]
k_{cat}	$1,5 \cdot 10^6 \text{ h}^{-1}$	
K_{mNADH}	$3,1 \cdot 10^{-4} \text{ mM}$	
K_{mb5}	$1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mM}$	
[FR]	$9,09 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$	
[cytb5R]	$7,0 \cdot 10^{-5} \text{ mM}$	
[cytb5]	$8,12 \cdot 10^{-4} \text{ mM}$	
[flavin]	$1,4 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$	[5]
Band3 binding region	$2,71 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$	[7,35]

Параметр	Величина	Літературне джерело
(free)		
Band3-ALD complex	$2.70 \cdot 10^{-4}$ mM	[7,35]
Band3-GAPDH complex	$6.47 \cdot 10^{-3}$ mM	[7,35]
Band3-PFK complex	$1.02 \cdot 10^{-4}$ mM	[7,35]
ALD (free)	$9.95 \cdot 10^{-2}$ mM	[7,35]
GAPDH (free)	1.19 mM	[7,35]
PFK (free)	$7.54 \cdot 10^{-3}$ mM	[7,35]
Band3-deoxyHb complex	$1.05 \cdot 10^{-3}$ mM	[7,35]
Band3-oxyHb complex	$1.30 \cdot 10^{-3}$ mM	[7,35]
deoxyHb (free)	$3.86 \cdot 10^{-2}$ mM	[7,35]
oxyHb (free)	$4.78 \cdot 10^{-2}$ mM	[7,35]
metHb	$3.86 \cdot 10^{-2}$ mM	[7,35]
deoxyHb_2,3BPG complex	$1.41 \cdot 10^{-5}$ mM	[35]

2.2. Математичні методи, що використовували в роботі:

1. Розрахунок стаціонарних концентрацій і потоків реакцій.

У стаціонарному стані усі похідні за часом $dC_i / dt (i = 1, \dots, n)$ в лівих частинах системи диференціальний рівнянь перетворюються на нуль. Прирівнюючи до нуля праві частини, отримують систему алгебраїчних рівнянь для визначення стаціонарних значень змінних $\bar{C}_1, \bar{C}_2, \bar{C}_3 \dots \bar{C}_n$:

$$f_1(\bar{C}_1, \bar{C}_2 \dots \bar{C}_n) = 0 ;$$

...

$$f_n(\bar{C}_1, \bar{C}_2 \dots \bar{C}_n) = 0$$

Розраховані стаціонарні значення змінних можуть служити для перевірки адекватності моделі, що розробляється. Цей режим використовувався в роботі для виконання процедури «Parameter Scan».

2. Сканування параметрів.

Часто моделі біохімічних мереж використовуються для того, щоб дізнатися, як деякі параметри впливають на певні аспекти системи. COPASI підтримує цю процедуру, забезпечуючи гнучку схему зміни величин параметрів, пов'язаних з моделюванням, яку називають "Parameter Scan" [43]. Використовуючи процедуру "Parameter Scan" для стаціонарного стану моделі аналізували змінення величин потоків реакцій при зміні pO_2 від 0 до 120 мм рт ст. pO_2 100 мм рт.ст. це фізіологічне значення в альвеолах [7].

2.3. Експериментальна перевірка результатів моделювання

При виконанні експериментальних досліджень використовували:

- Буферні розчини:

1. Na-фосфатний буфер (0,015 моль, рН 7,4), що містить 0,15 моль NaCl;
2. 0,01 М Na-K-фосфатний буфер (рН 7,4) для гемолізу еритроцитів.
3. Трис-НСl, 0,05 М, рН 7,4.

- Робочі розчини:

1. аскорбінова кислота (AscH), 1,5 ммоль/л. Наважку AscH розчиняли в середовищі Na-фосфатного буфера складу 1;
2. розчин купрум (II) хлориду, 40 мкмоль/л. Наважку $CuCl_2$ розчиняли в середовищі Na-фосфатного буфера складу 1;

3. Розчини для визначення активностей цитоплазматичної NADH(NADPH)-метгемоглобінредуктази еритроцитів:

3.1. NADH, $1 \cdot 10^{-3}$ М. Наважку NADH розчиняли в Трис-НСl буфері, 0,05 М, рН 7,4. Використовували лише свіжоприготовлені розчини.

3.2. NADPH, $1 \cdot 10^{-3}$ М. Наважку NADPH розчиняли в Трис-НСl буфері, 0,05 М, рН 7,4.

3.2. Розчин $K_3Fe(CN)_6$, $1 \cdot 10^{-2}$ М.

Еритроцити тричі відмивали центрифугуванням з Na-фосфатним буфером (0,015 моль, рН 7,4), що містив 0,15 моль NaCl. Відмиті від плазми та упаковані еритроцити ресуспендували у цьому ж буфері. Еритроцити інкубували протягом 5-ти годин при 25⁰С в окисних середовищах наступного складу: середовище 1– аскорбінова кислота (AscH) $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, Cu^{2+} – $5,3 \cdot 10^{-6}$ моль/л, Na- фосфатний буфер (0,015 моль, 0,15 моль NaCl, рН 7,4). Кількість еритроцитів у середовищі інкубування підтримували на рівні, що відповідає вмісту гемоглобіну 2,1-2,6 мг/мл.

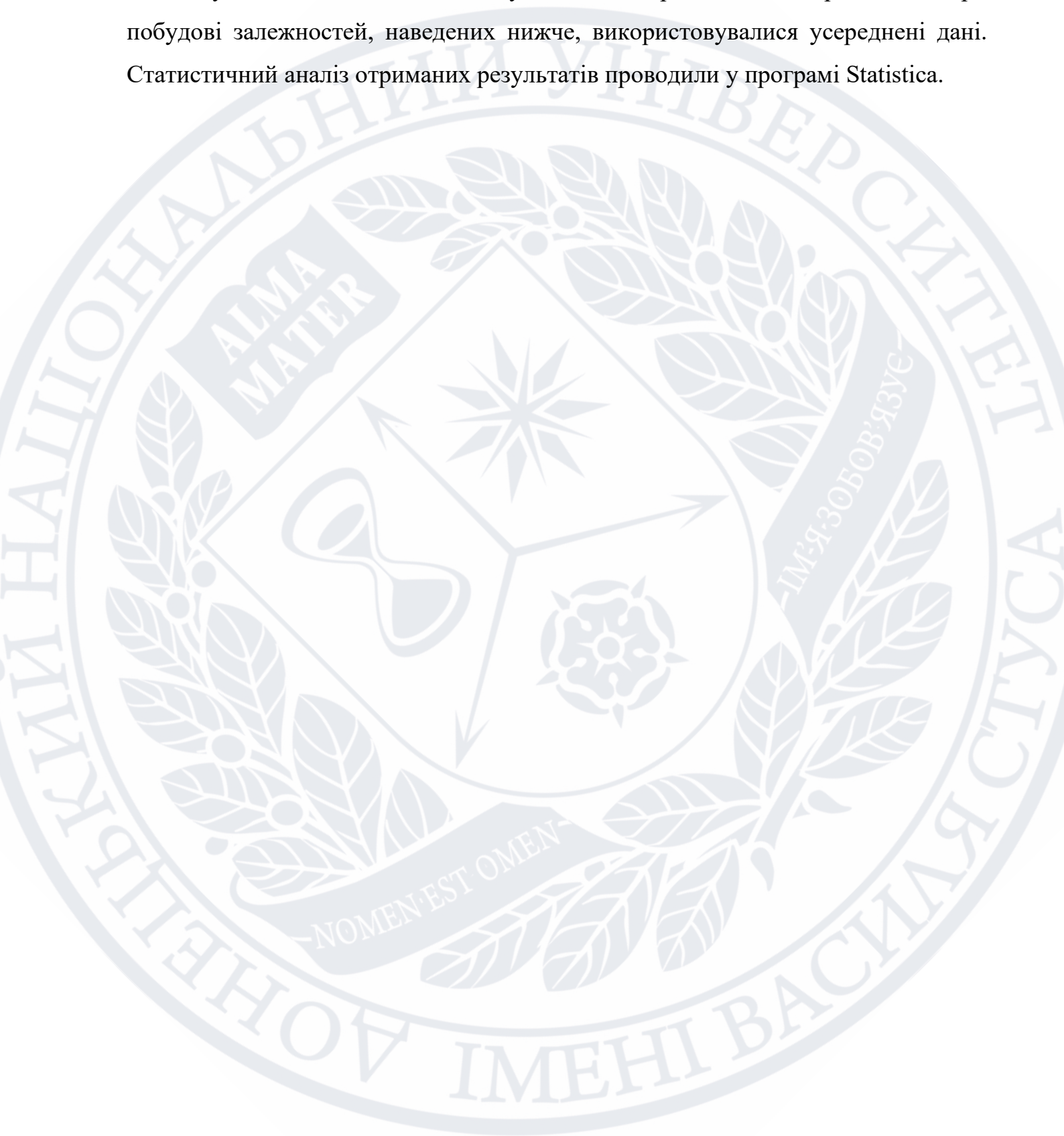
Через певні часові інтервали проби відмивали центрифугуванням з Na-фосфатним буфером (рН 7,4), після чого відмиті еритроцити лізували в 5 мл буфера 2 на холоді протягом 40 хв. Гемолізат відокремлювали шляхом центрифугування. Активність цитоплазматичних NADH- та NADPH-метгемоглобінредуктаз визначали в гемолізатах клітин.

Принцип методу визначення активності ферментів заснований на реєстрації швидкості відновлення $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ у присутності NADH при $\lambda=400$ нм. Активність ферментів виражали в мкмоль відновленого $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($\epsilon=1020$ моль⁻¹см⁻¹) за 1 хв на мг Нв.

У 1,4 мл буферного розчину (Трис-HCl, 0,05 М, рН 7,4) вносили 0,2 мл гемолізату еритроцитів. та 0,2 мл розчину NADH (NADPH). Суміш інкубували 10 хв при 37⁰С. Реакцію ініціювали додаванням 0,2 мл розчину $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Зменшення оптичної густини розчину реєстрували при 400 нм в автоматичному режимі протягом 4-х хв щодо реакційного середовища, що міститься в кюветі порівняння [44].

Вміст гемоглобіну в еритроцитах визначали геміглобінціанідним уніфікованим методом за стандартними наборами. 0,02 мл вихідної еритроцитарної суспензії вносили в 5 мл трансформуючого реактиву, витримували 15 хв і фотометрували проти трансформуючого реактиву при довжині хвилі 540 нм. Для визначення концентрації гемоглобіну використовували калібрувальну залежність, побудовану за стандартними розчинами гемоглобінціаніду [45].

Кожний вплив окисного середовища зазначеного вище складу досліджувалося щонайменше ніж у п'яти повторюваних експериментах. При побудові залежностей, наведених нижче, використовувалися усереднені дані. Статистичний аналіз отриманих результатів проводили у програмі Statistica.



РОЗДІЛ 3. Результати експерименту та їх обговорення

3.1. Моделювання змін гліколітичного потоку за умов гіпоксії

На рис. 3.1. наведена схема метаболічних процесів, залучених до моделі.

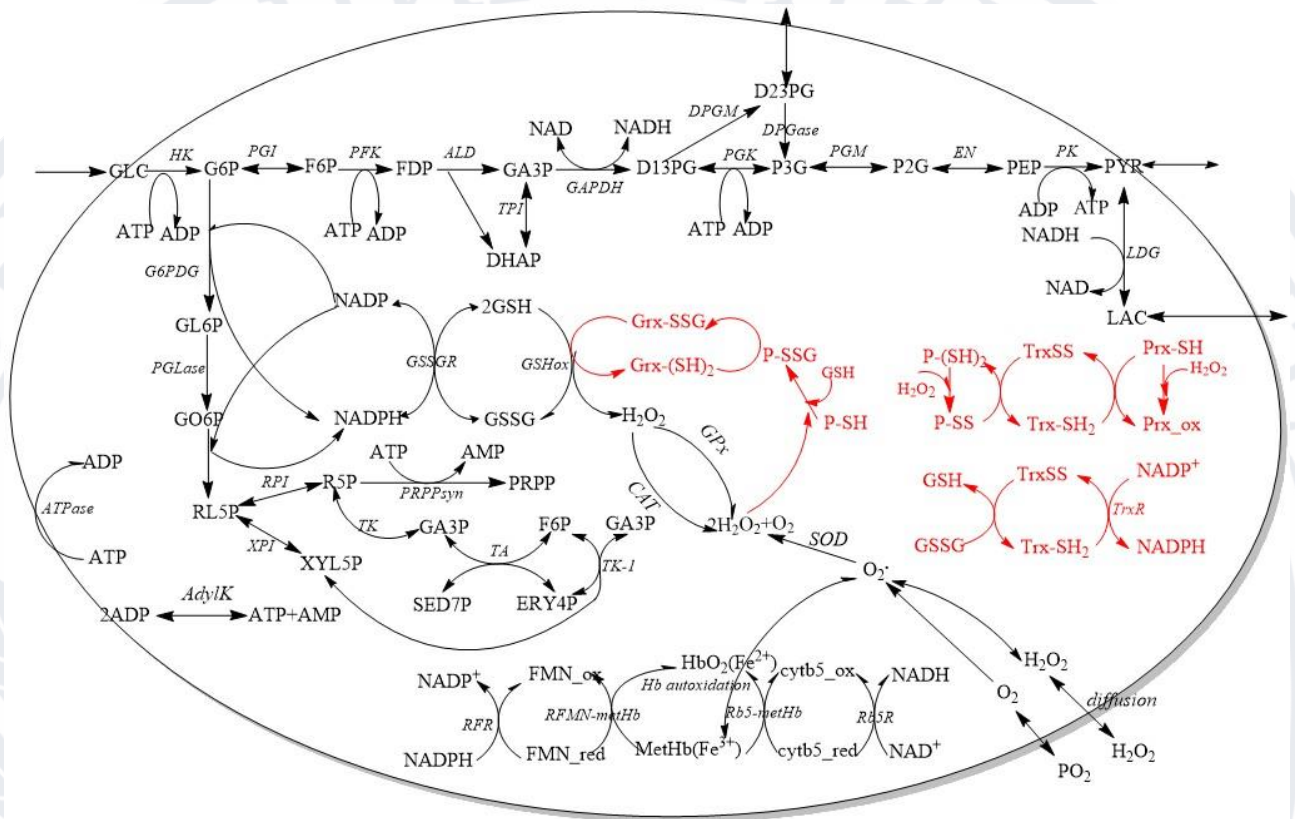


Рис. 3.1. Схематичне представлення процесів, включених в модель метаболізму еритроцитів. GLC- глюкоза; G6P- глюкозо-6-фосфат; F6P - фруктозо-6-фосфат; FDP - фруктозо-1,6-дифосфат; DHAP - дигідроксиацетон фосфат; GA3P - гліцеральдегід-3-фосфат; GL6P - глюконолактон-6-фосфат; GO6P - глюконат-6-фосфат; RU5P - рибулозо-5-фосфат; R5P - рибозо-5- фосфат; X5P - ксилозо-5-фосфат; S7P - седогептулозо-7-фосфат; E4P - еритрозо-4-фосфат; PYR - піруват; LAC – лактат; cytb5- цитохром b5; b5R- цитохром b5-редуктаза; FR- флавін-редуктаза, GAPDH - гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа; G6PDG - глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа; GSSG- окислений глутатіон; GSH-відновлений глутатіон; GSSG- окислений глутатіон; LDG –лактатдегідрогеназа; MetHb- метгемоглобін; FMN- флавін; CAT-каталаза; GPx–глутатіонпероксидаза; SOD –супероксиддисмутаза, Grx(SH)₂ - глутаредоксин відновлений; GrxSSG – глутаредоксин окислений; TrxSS – тіоредоксин окислений, TrxSH₂ – тіоредоксин відновлений; Prx_{ox} – пероксиредоксин окислений; PrxSH - пероксиредоксин відновлений, TrxR – тіоредоксинредуктаза, PSH- монотіольний білок; P(SH)₂ – дитіольний білок; PSS – дисульфідні групи білка.

Гемоглобін є не тільки переносником кисню, але ще й регулятором його доставки до органів та тканин. Цю функцію гемоглобін здійснює декількома способами: через регуляцію механічних властивостей мембрани еритроциту; через синтез та депонування NO в еритроциті; через вивільнення АТФ із еритроциту [46]. У всіх випадках сигнально-регуляторна дія опосередкована змінами четвертинної структури гемоглобіну (конформаційними R-T-переходами), що модулюються парціальним тиском кисню (pO_2).

Модель «транспортного метаболону» заснована на спостереженні що N-кінцевий цитозольний домен смуги 3, який містить численні кислотні залишки, може стабілізувати дезоксигемоглобін шляхом прямого зв'язування [36, 46, 47]. Однак N-кінцева область смуги 3 також служить місцем стикування для ключових гліколітичних ферментів, включаючи фосфофруктокіназу (PFK), альдолази (ALD) і гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GAPDH). Ці ферменти функціонально пригнічуються зв'язуванням із смугою 3 при високому насиченні киснем, таким чином сприяючи пізній гліколітичній блокаді та переходу до пентозофосфатного шляху (PPP), що генерує антиоксидант NADPH. Зв'язування дезоксигемоглобіну зі смугою 3 сприяє витісненню та активації пізніх гліколітичних ферментів, таким чином сприяючи гліколізу.

Для моделювання цих взаємодій до програми були додані наступні рівняння, що описують оборотну взаємодію ALD, PFK, GAPDH, LDG та двох алостеричних форм гемоглобіну з білком смуги 3 (рівняння 13- 18, табл. 2.1.).

Кінетику взаємодії з білком смуги 3 ми описали наступним чином:

$$v = K_a \cdot A \cdot B - K_d \cdot P, \text{ де}$$

A, B – реагуючі білки, P – комплекс білок-білок.

Константи зв'язування і дисоціації, використані в роботі, наведені у таблиці 3.1.

Також ми врахували взаємодію окси- і дезоксигемоглобуну з 2,3BPG (рівняння 19- 20, табл. 2.1.).

Таблиця 3.1. Константи зв'язування гліколітичних ферментів та сполук гемоглобіну з білком полоси 3.

Параметр	Величина [7, 35]
Band3-ALD	
Ka	11000000
Kd	1200
Band3-GAPDH	
Ka	24000000
Kd	1200
Band3-PFK	
Ka	60000000
Kd	1200
Band3-deoxyHb	
Ka	12000000
Kd	1200
Band3-oxyHb	
Ka	120000
Kd	1200

Таким чином, вдалося змодельовати взаємодію ферментів і гемоглобіну з білком смуги 3, яка керується вмістом кисню. На рис. 3.1 і 3.2 показані зміни у зв'язуванні залежно від PO_2 . Видно, що з зниженням вмісту кисню, зв'язування ферментів з білком смуги 3 знижується, а дезоксигемоглобіну посилюється.

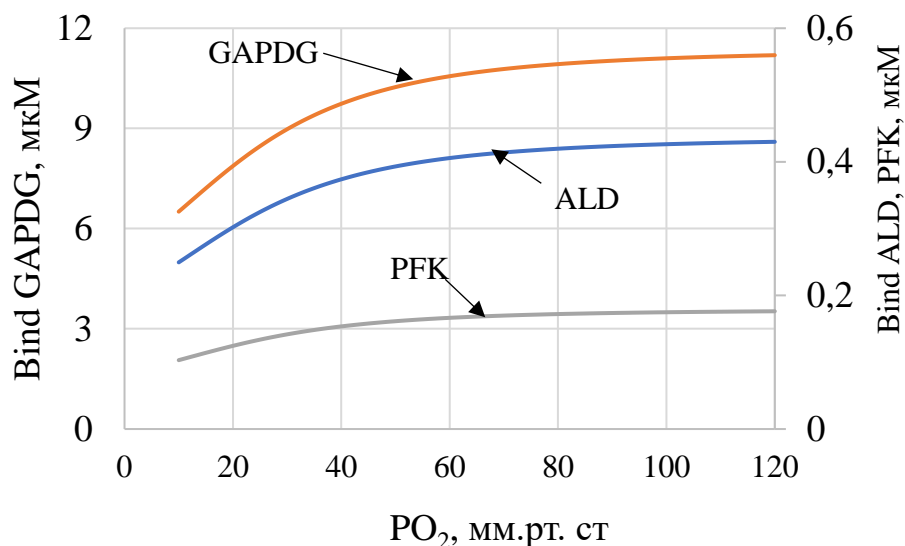


Рис. 3.1. Зв'язування гліколітичних ферментів з білком смуги 3 залежно від парціального тиску кисню.

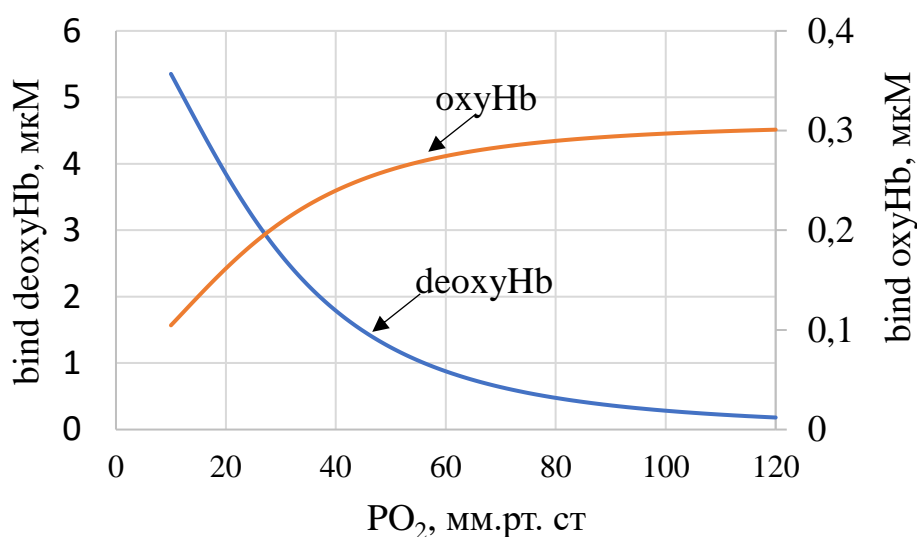


Рис. 3.1. Зв'язування гемоглобіну з білком смуги 3 залежно від парціального тиску кисню.

Відповідно до моделі, гіпоксія посилює потік через з класичний гліколітичний процес Ембдена-Мейєргофа та послаблює потік через PPP, наслідком чого буде нестача відновних еквівалентів, зокрема NADPH. Проте, виходячи з результатів моделювання, ці зміни є незначними.

3.2. Аналіз *in silico* роботи метгемоглобінредуктазних систем

Розраховані потоки через флавінредуктазу і цитохром-b5-редуктазу показані на рис. 3.3. З отриманих залежностей видно, що за умов нормоксії активна флавінредуктаза і при незначному зниженні кисню саме вона швидко активізується і відповідає за відновлення метгемоглобіну.

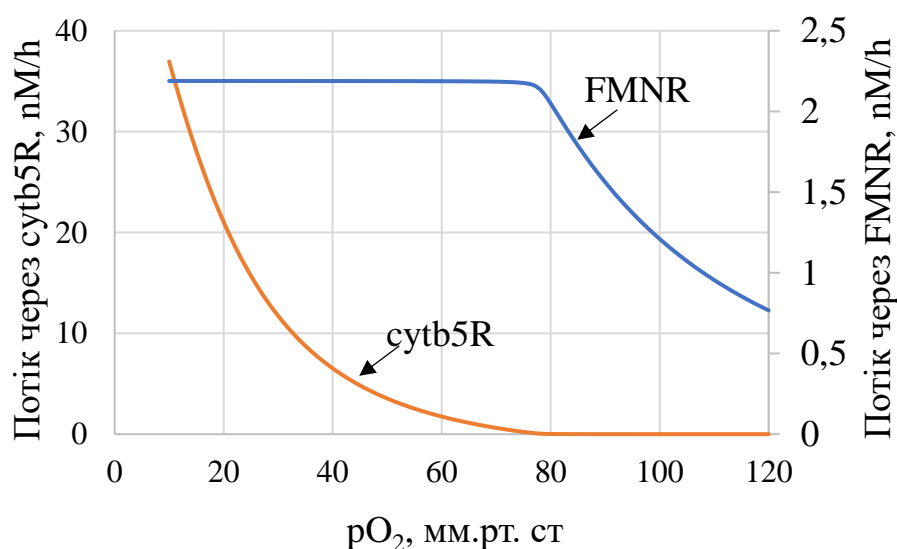


Рис. 3.3. Потоки через флавінредуктазу і цитохром-b5-редуктазу залежно від парціального тиску кисню.

За умов $PO_2 < 80$ її активність максимальна і далі підтримується на цьому рівні при зниженні PO_2 . Цитохром-b5-редуктаза активізується тільки за умов гіпоксії і аноксії, коли рівень PO_2 стає меншим за 60 мм. Потік через цю відновлювальну систему на порядок перевищує потік через флавінредуктазу.

Отримані дані моделювання співпадають з літературними даними про те, що перемикання відновлення з флавін-NADPH на cytb5-NADH шлях відбувається після досягнення максимальної допустимої швидкості NADPH-залежної флавінредуктази [5]. До цього часу роль шляху флавін-NADPH не зовсім зрозуміла. Однак, результати моделювання вказують, що шлях флавін-NADPH може відігравати істотну роль у відновленні metHb за фізіологічних умов.

Навпаки, для cytb5-NADH шляху характерна висока константа каталітична константа для cytb5 -редуктази, яка в 4000 раз вище порівняно з флавінредуктазою. Проте цей шлях низьку константу швидкості для неферментативного процесу і при низьку концентрацію cytb5 . Ці властивості могли б зробити цей шлях ефективним при високих рівнях окисної напруги і, як показано в роботі, при низьких рівнях кисню.

Оскільки для шляху флавін-NADPH характерна низька редуктазна активність при посиленні окислювальної напруги (як відомо, стан гіпоксії приводить до активації аутоокиснення гемоглобіну) відновлення флавіном було б недостатньо, щоб задовольнити вимоги відновлення metHb . Фактично, основне призначення джерела відновлювальних еквівалентів NADPH в еритроцитах – перетворення окисленої форми глутатіону (GSSG) на його відновлену форму (GSH) у реакції, що каталізується глутатіонредуктазою. Використання ж NADH як джерела відновлювальних еквівалентів для metHb дозволить уникнути конкуренції за NADPH між двома шляхами відновлення – глутатіону та гемоглобіну.

На рис. 3.4 і 3.5 показні зміни концентрацій основних учасників двох шляхів відновлення метгемоглобіну.

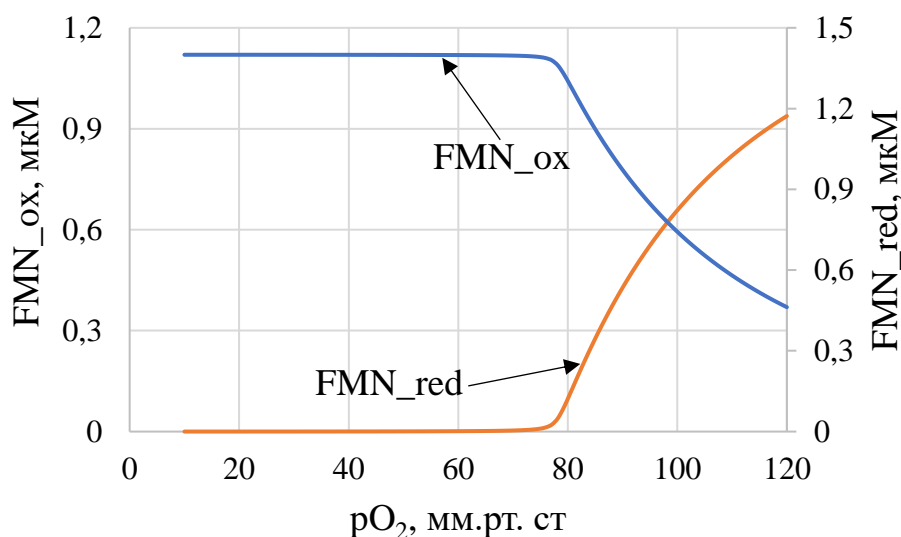


Рис. 3.4. Зміни вмісту окисленої і відновленої форм FMN залежно від парціального тиску кисню.

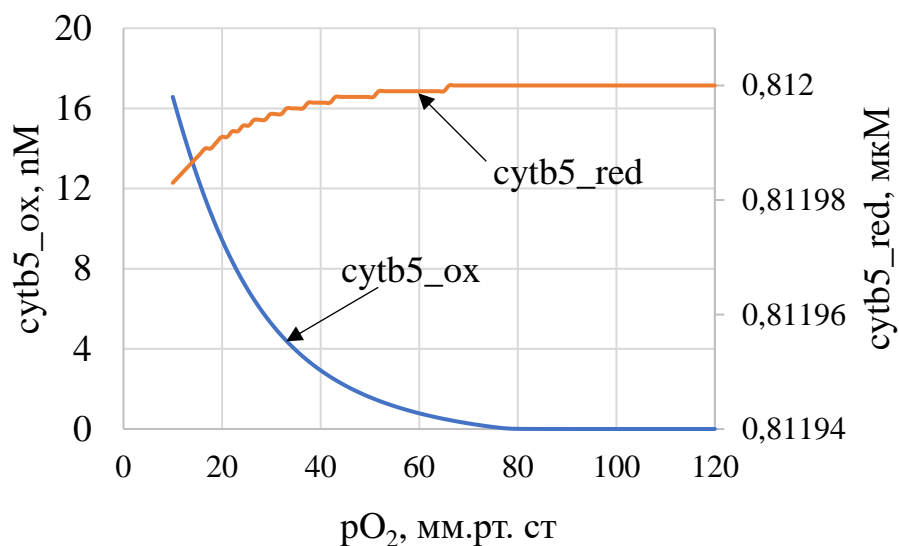


Рис. 3.4. Зміни вмісту окисленої і відновленої форм cytb5 залежно від парціального тиску кисню.

Видно, що FMN дуже швидко переходить в окислену форму, cytb5 достатньо стійкий, рівень відновленого cytb5 залишається високим навіть за аноксії.

На рис. 3.6 показані розраховані концентрації окси-, дезокси і метгемоглобіну в еритроцитах.

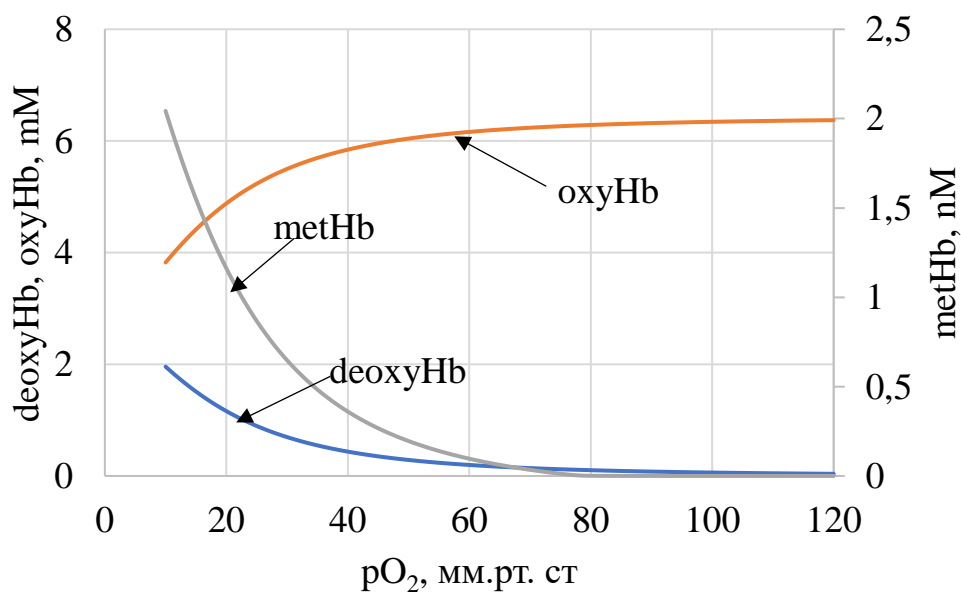


Рис. 3.6. Отриманий в ході моделювання вміст окси-, дезокси і метгемоглобіну в еритроцитах залежно від парціального тиску кисню.

Відповідно до літературних джерел [32] аутоокислення гемоглобіну посилюється при зниженому тиску кисню у ссавців. Бачимо, що за умов $pO_2 < 60$, рівень metHb зростає (рис. 3.6), проте його вміст низький і не співпадає з літературними даними. Можливо таке неспівпадіння є певним недоліком моделі, в якій не враховані додаткові джерела утворення метгемоглобіну, зокрема в пероксидазних реакціях за участю гемоглобіну.

3.3. Експериментальне дослідження активності цитоплазматичних NAD(P)H–метгемоглобінредуктаз еритроцитів при інкубуванні в окислювальному середовищі Cu^{2+} – AscH

Середовище Cu^{2+} – AscH здатно регенерувати активні форми кисню і перекис водню. Раніше [48] було показано, що система Cu^{2+} – AscH достатньо ефективно генерує активні форми кисню (H_2O_2 , $\cdot OH$, $\cdot O_2^-$) продовж тривалого проміжку часу. AscH відновлює Cu^{2+} до Cu^+ у водному середовищі з константою швидкості $3,5 M^{-1}\cdot c^{-1}$. Іони одновалентного купруму можуть долучатися до реакції Габера-Вейса і Фентона, у якій утворюються гідроксильні радикали ($\cdot OH$). Причому необхідно відзначити, що константа швидкості продукції АФК при взаємодії іонів Cu^{2+} з H_2O_2 в реакції Фентона дуже висока $-4,7\cdot 10^3 M^{-1}\cdot c^{-1}$ (для аналогічної системи з Fe^{2+} $-76 M^{-1}\cdot c^{-1}$). Далі Cu^+ окислюються до іонів Cu^{2+} , які потім знову можуть відновлюватися аскорбат іонами до Cu^+ . Монодегідроаскорбіл-радикал та дегідроаскорбат, що утворюються, здатні окислювати Cu^+ до Cu^{2+} . Теоретично подібний цикл може продовжуватися безкінечно, однак частина дегідроаскорбінової кислоти може незворотно трансформуватися до 2,3-дикетогулонової кислоти.

Також [49] ми дослідили динаміку накопичення H_2O_2 в цих системах за присутності еритроцитів. У позаклітинному середовищі за присутності AscH - Cu^{2+} , ми реєстрували наявність H_2O_2 продовж усього часу експерименту, протей ого рівень був набагато нижчим, ніж у середовищі без клітин.

Таким чином, середовище $\text{Cu}^{2+} - \text{AscH}$ було використано для створення фізіологічного окисного навантаження на еритроцити. Інкубування клітин продовж 5-ти годин приводило до стану гіпоксії.

Активність цитоплазматичної NADPH-метгемоглобінредуктази еритроцитів, що інкубуються в середовищі $\text{Cu}^{2+} - \text{AscH}$ (рис. 3.7) зростає протягом перших 60 хв експерименту. Протягом наступної години активність NADPH-метгемоглобінредуктази в 2-2,5 рази перевищує рівень контролю, після чого активність ферменту знижується, проте залишається вищою за рівень контролю. Зниження активності може відбуватися через конкуренцію NADPH-метгемоглобінредуктази з глутатіонредуктазою і NADPH-оксидазою [5] за кофермент NADPH, у зв'язку з тим, що АОС зазнає значного навантаження за умов гіпоксії і певному окисному навантаженні.

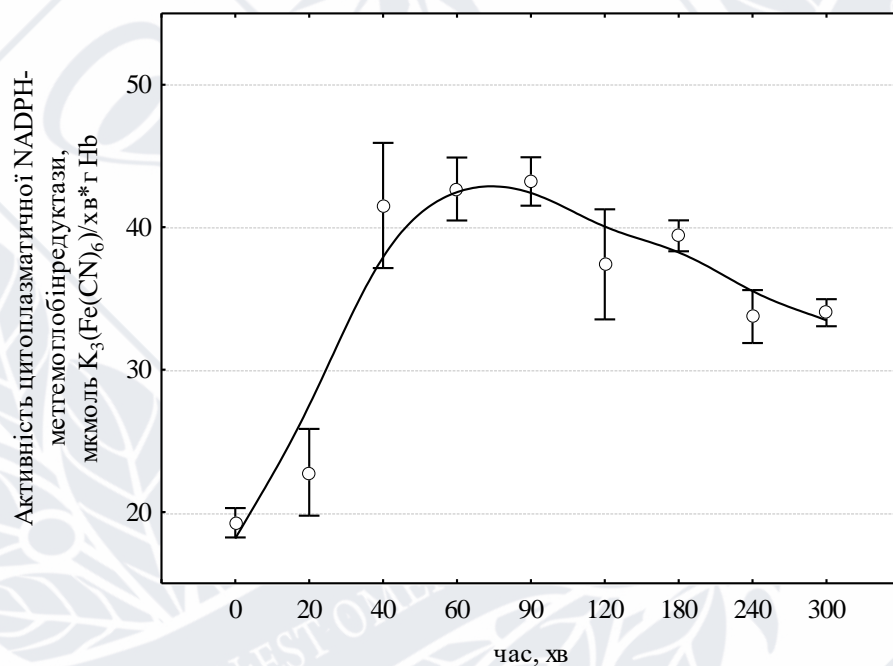


Рис. 3.7. Зміна активності цитоплазматичної NADPH-метгемоглобінредуктази еритроцитів, що інкубуються в середовищах $\text{Cu}^{2+} - \text{AscH}$.

Активність цитоплазматичної NADH-метгемоглобінредуктази еритроцитів, інкубованих в середовищі $\text{Cu}^{2+} - \text{AscH}$ (рис. 3.8) протягом перших 90 хв незначно перевищувала рівень контролю, після 120 хв експерименту

активність ферменту збільшувалася більш швидко і на 35% перевищувала рівень контролю.

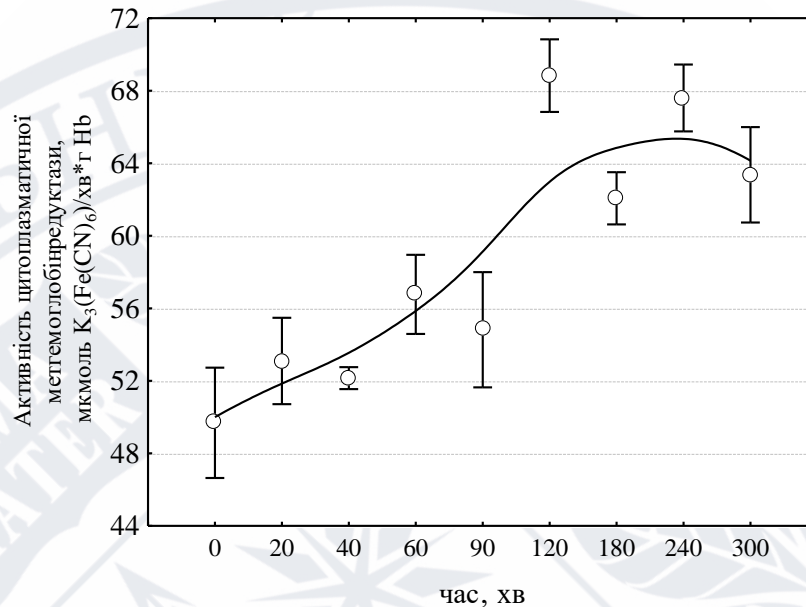


Рис. 3.8. Зміна активності цитоплазматичної NADH-метгемоглобінредуктази еритроцитів, що інкубуються в середовищах Cu^{2+} – AscH.

Бачимо, що прогнозуємий характер активізації NADPH-залежної (флавін) і NADH-залежної (cytb5) метгемоглобінредуктаз отриманий при моделюванні співпадає з експериментальними даними. В еритроцитах за умов інкубації в середовищі, що містить Cu^{2+} – AscH спочатку активізується NADPH-залежна метгемоглобінредуктаза, і тільки після двох годин інкубації і розвитку гіпоксії почала зростати активність NADH-залежної метгемоглобінредуктази.

Таким чином, розроблена модель задовільно відтворює характер процесів за умов гіпоксії і окисного навантаження, і може бути використана для аналізу інших процесів, зокрема недостатності метгемоглобінредуктази і розвитку метгемоглобінемій.

ВИСНОВКИ

1. Розроблена математична модель метаболізму еритроцитів включає гліколітичний та пентозофосфатний шляхи, а також процеси взаємодії білка смуги 3 з гемоглобіном та гліколітичними ферментами. Перемикання взаємодії між білком смуги 3, гемоглобіном та трьома гліколітичними ферментами, викликане гіпоксією, моделюється з використання індивідуальних констант асоціації окремих компонентів з білком смуги 3.

2. Показано, що модель задовільно відтворює стан гіпоксії і результати моделювання співпадають з літературними даними.

3. За допомогою математичного моделювання досліджена робота двох метгемоглобінредуктазних систем. Показано, що за умов нормоксії активна NADPH-залежна флавінредуктаза і при незначному зниженні кисню саме вона швидко активізується і відповідає за відновлення метгемоглобіну. Цитохром-*b5*-редуктаза активізується тільки за умов гіпоксії і аноксії, коли рівень PO_2 стає меншим за 60 мм.

4. Оцінені величини потоків через метгемоглобінредуктазні системи, рівень метаболітів, таких як окси-, дезокси-, метгемоглобіни, окислених і відновлених форм FMN та *cytb5*.

5. Отримані експериментальні дані дослідження активностей NADP(NAD)H залежних метгемоглобінредуктаз співпадають з результатами моделювання. Таким чином, розроблена модель може бути використана для аналізу інших процесів, зокрема недостатності метгемоглобінредуктаз і розвитку метгемоглобінемій.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Srivastava, S., Alhomida, A. S., Siddiqi, N. J., Puri, S. K., & Pandey, V. C. (2002). Methemoglobin reductase activity and in vitro sensitivity towards oxidant induced methemoglobinemia in swiss mice and beagle dogs erythrocytes. *Molecular and cellular biochemistry*, 232(1-2), 81–85.
2. Otsuka-Yamasaki, Y., Inanami, O., Shino, H., Sato, R., & Yamasaki, M. (2021). Characterization of a novel nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b5 reductase mutation associated with canine hereditary methemoglobinemia. *The Journal of veterinary medical science*, 83(2), 315–321.
3. Jenni, S., Ludwig-Peisker, O., Jagannathan, V., Lapsina, S., Stirn, M., Hofmann-Lehmann, R., Bogdanov, N., Schetle, N., Giger, U., Leeb, T., & Bogdanova, A. (2023). Methemoglobinemia, Increased Deformability and Reduced Membrane Stability of Red Blood Cells in a Cat with a CYB5R3 Splice Defect. *Cells*, 12(7), 991.
4. D'Alessandro, A., Anastasiadi, A. T., Tzounakas, V. L., Nemkov, T., Reisz, J. A., Kriebardis, A. G., Zimring, J. C., Spitalnik, S. L., & Busch, M. P. (2023). Red Blood Cell Metabolism In Vivo and In Vitro. *Metabolites*, 13(7), 793.
5. Kinoshita, A., Nakayama, Y., Kitayama, T., & Tomita, M. (2007). Simulation study of methemoglobin reduction in erythrocytes. Differential contributions of two pathways to tolerance to oxidative stress. *The FEBS journal*, 274(6), 1449–1458.
6. Jensen, B., & Fago, A. (2020). A Novel Possible Role for Met Hemoglobin as Carrier of Hydrogen Sulfide in the Blood. *Antioxidants & redox signaling*, 32(4), 258–265.
7. Kinoshita, A., Tsukada, K., Soga, T., Hishiki, T., Ueno, Y., Nakayama, Y., Tomita, M., & Suematsu, M. (2007). Roles of hemoglobin Allostery in hypoxia-induced metabolic alterations in erythrocytes: simulation and its verification by metabolome analysis. *The Journal of biological chemistry*, 282(14), 10731–10741.

8. Buehler, P. W., & Alayash, A. I. (2005). Redox biology of blood revisited: the role of red blood cells in maintaining circulatory reductive capacity. *Antioxidants & redox signaling*, 7(11-12), 1755–1760.

9. Wang, Y., Zhao, N., Xiong, Y., Zhang, J., Zhao, D., Yin, Y., Song, L., Yin, Y., Wang, J., Luan, X., & Xiong, Y. (2020). Downregulated Recycling Process but Not De Novo Synthesis of Glutathione Limits Antioxidant Capacity of Erythrocytes in Hypoxia. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 7834252.

10. Rogers, S. C., Said, A., Corcuera, D., McLaughlin, D., Kell, P., & Doctor, A. (2009). Hypoxia limits antioxidant capacity in red blood cells by altering glycolytic pathway dominance. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(9), 3159–3170.

11. Топунов А.Ф. Голубева Л.І. (1989). Редуктази, відновленні кисневопереносні гемопротеїди: гемоглобін, міоглобін та леоглобін. *Успіхи біологічної хімії*, т. 30, С. 239–252.

12. Hultquist D.E. Catalysis of methaemoglobin reduction by erythrocyte cytochrome B5 and cytochrome B5 reductase./ D.E. Hultquist, P.G. Passon // *Nat. New Biol.*– 1971.–v. 229.–P. 252–254.

13. Pietrini G. A single mRNA, transcribed from an alternative, erythroid-specific, promoter, codes for two non-myristylated forms of NADH-cytochrome b5 reductase./ G. Pietrini, D. Aggujaro, P. Carrera, J. Malyszko, A.Vitale, N. Borgese // *J. Cell. Biol.*– 1992.–v.117.–P. 975–986.

14. Yubisui T. Purification and properties of soluble NADH-cytochrome b5 reductase of rabbit erythrocytes./ T. Yubisui, M. Takeshita // *J Biochem (Tokyo)* 1982.–v. 91.–P. 1467–1477.

15. Yubisui T. Structural analysis of NADH-cytochrome b5 reductase in relation to hereditary methemoglobinemia./ T. Yubisui, K. Murakami, K. Shirabe, M. Takeshita, S. Zenno, S. Tomatsu, Y. Fukumaki // *Prog. Clin. Biol. Res.*– 1989.–v. 319.–P 107–119; discussion P.120–1.

16. Leroux A. Presence of red cell type NADH-methemoglobin reductase (NADH-diaphorase) in human non erythroid cells/ A. Leroux, J.-C. Kaplan // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*– 1972.– Vol. 49.– P. 945—950.

17. Hultquist D.E. Catalysis of methaemoglobin reduction by erythrocyte cytochrome B5 and cytochrome B5 reductase./ D.E. Hultquist, P.G. Passon // *Nature. New Biol.*– 1971.– Vol. 229.– P. 252—254.

18. Passon P.G. Soluble cytochrome b 5 reductase from human erythrocytes./ P.G. Passon, D.E. Hultquist // *Biochim. et Biophys. Acta.*– 1972.– Vol. 275 (1).– P. 62—73.

19. Mansouri Ali. Methemoglobinemia./Ali Mansouri // *Amer. J. Med. Sci.*– 1985.– Vol. 289.– P. 200—209.

20. Bando S. Structure of human erythrocyte NADH-cytochrome b5 reductase. / S. Bando, T. Takano, T. Yubisui, K. Shirabe, M. Takeshita , A. Nakagawa // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*–2004.– v.60, 11.–P. 1929-34.

21. Gacon G. Interaction between cytochrome b5 and hemoglobin: Involvement of f66 (E10) and p95 (FG2) lysyl residues of hemoglobin/ G. Gacon, D. Lohanlen, D. Labie, J.-C. Kaplan // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*– 1980.– Vol. 77.– P. 1917—1921.

22. Yubisui T. Complete amino acid sequence of NADH-cytochrome b5 reductase purified from human erythrocytes./ T. Yubisui, T. Miyata, S. Iwanaga, M. Tamura, M. Takeshita// *J Biochem (Tokyo).* – 1986. – v.99,2. – P. 407-22

23. Van Iersel A. A. J. NADH-ferrihemoglobin reductase in avian erythrocytes/ A. A. J. Van Iersel, B. J. Blaauboer// *Comp. Biochem. and Physiol., B.*– 1985.– Vol. 81.– P. 1027—1031.

24. Kitajima S. Purification and properties of human erythrocyte membrane NADH-cytochrome b5 reductase/ S. Kitajima, Y. Yasukochi, S.Minakami// *Arch. Biochem. and Biophys.*–1981.– Vol. 210.– P. 330—335.

25. Yubisui T. Reduction of methemoglobin through flavin at the physiological concentration by NADPH-flavin reductase of human erythrocytes. / T. Yubisui, M. Takeshita, Y. Yoneyama // *J. Biochem. (Tokyo).*– 1980.–v. 87.–P. 1715–1720.

26. Scott E. M. The Reduced Pyridine Nucleotide Dehydrogenases of Human Erythrocytes/ E. M. Scott, I. W. Duncan, V. Ekstrand // *J. Biol. Chem.*– 1965.– Vol. 240.– P. 481—485.

27. Sugita Y. Purification of Reduced Pyridine Nucleotide Dehydrogenase from Human Erythrocytes and Methemoglobin Reduction by the Enzyme/ Y. Sugita, S. Nomura, Y. Yoneyama // *J. Biol. Chem.*– 1971.– Vol. 246.– P. 6072— 6078.

28. Möller, M. N., Orrico, F., Villar, S. F., López, A. C., Silva, N., Donzé, M., Thomson, L., & Denicola, A. (2022). Oxidants and Antioxidants in the Redox Biochemistry of Human Red Blood Cells. *ACS omega*, 8(1), 147–168.

29. Kosmachevskaya, O. V., & Topunov, A. F. (2018). Alternate and Additional Functions of Erythrocyte Hemoglobin. *Biochemistry. Biokhimiia*, 83(12), 1575–1593.

30. Arashiki, N., Kimata, N., Manno, S., Mohandas, N., & Takakuwa, Y. (2013). Membrane peroxidation and methemoglobin formation are both necessary for band 3 clustering: mechanistic insights into human erythrocyte senescence. *Biochemistry*, 52(34), 5760–5769.

31. Fenk, S., Melnikova, E. V., Anashkina, A. A., Poluektov, Y. M., Zaripov, P. I., Mitkevich, V. A., Tkachev, Y. V., Kaestner, L., Minetti, G., Mairbäurl, H., Goede, J. S., Makarov, A. A., Petrushanko, I. Y., & Bogdanova, A. (2022). Hemoglobin is an oxygen-dependent glutathione buffer adapting the intracellular reduced glutathione levels to oxygen availability. *Redox biology*, 58, 102535.

32. Abele-Oeschger D., Oeschger R. (1995). Hypoxia-induced autoxidation of haemoglobin of the benthic invertebrates *Arenicola marina* (Polychaeta) and *Astarte borealis* (Bivalvia) and the possible effects of sulfide. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, V. 187. - P. 63-80.

33. Wever R., Oudega B., Van Gelder B. F. (1973). Generation of superoxide radicals during the autoxidation of mammalian oxyhemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 302, 475-478.

34. Holzhütter H. G. (2004). The principle of flux minimization and its application to estimate stationary fluxes in metabolic networks. *European journal of biochemistry*, 271(14), 2905–2922.

35. Nishino, T., Yachie-Kinoshita, A., Hirayama, A., Soga, T., Suematsu, M., & Tomita, M. (2013). Dynamic simulation and metabolome analysis of long-term erythrocyte storage in adenine-guanosine solution. *PLoS One*. 8(8), e71060.

36. Campanella, M. E., Chu, H., & Low, P. S. (2005). Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(7), 2402–2407.

37. Dash, R. K., Korman, B., & Bassingthwaite, J. B. (2016). Simple accurate mathematical models of blood HbO₂ and HbCO₂ dissociation curves at varied physiological conditions: evaluation and comparison with other models. *European journal of applied physiology*, 116(1), 97–113.

38. Low, F. M., Hampton, M. B., Peskin, A. V., & Winterbourn, C. C. (2007). Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte. *Blood*, 109(6), 2611–2617.

39. Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews*, 59(3), 527–605.

40. Sutton, H. C., Roberts, P. B., & Winterbourn, C. C. (1976). The rate of reaction of superoxide radical ion with oxyhaemoglobin and methaemoglobin. *The Biochemical journal*, 155(3), 503–510.

41. Ng, C. F., Schafer, F. Q., Buettner, G. R., & Rodgers, V. G. (2007). The rate of cellular hydrogen peroxide removal shows dependency on GSH: mathematical insight into in vivo H₂O₂ and GPx concentrations. *Free radical research*, 41(11), 1201–1211.

42. Buettner, G. R., Wagner, B. A., & Rodgers, V. G. (2013). Quantitative redox biology: an approach to understand the role of reactive species in defining the cellular redox environment. *Cell biochemistry and biophysics*, 67(2), 477–483.

43. Mendes, P., Hoops, S., Sahle, S., Gauges, R., Dada, J., & Kummer, U. (2009). Computational modeling of biochemical networks using COPASI. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 500, 17–59.

44. Атауллаханов Ф.И., Витвицкий В.М., Жаботинский А.М., Кияткин А.В., Пичугин А.В. (1984). Стационарная зависимость восстановления метгемоглобина и его концентрации в интактных эритроцитах. *Биохимия*, т. 49, №2, С. 193–197.

45. Энциклопедия клинических лабораторных тестов / Под ред. Н.У.Тица, перевод с англ. под ред. Меньшикова.–М.: «Лабинформ».– с. 128.

46. Kosmachevskaya, O. V., Nasybullina, E. I., Topunov, A. F., & Blindar, V. N. (2019). Binding of erythrocyte hemoglobin to the membrane to realize signal-regulatory function (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 55 (2), 83–98.

47. D'Alessandro, A., Nemkov, T., Sun, K., Liu, H., Song, A., Monte, A. A., Subudhi, A. W., Lovering, A. T., Dvorkin, D., Julian, C. G., Kevil, C. G., Kolluru, G. K., Shiva, S., Gladwin, M. T., Xia, Y., Hansen, K. C., & Roach, R. C. (2016). AltitudeOmics: Red Blood Cell Metabolic Adaptation to High Altitude Hypoxia. *Journal of proteome research*, 15(10), 3883–3895.

48. Dotsenko, O. I., Taradina, G. V., & Voronych, M. V. (2018). Enzyme protection systems of erythrocytes in conditions of ascorbate recirculation and oxidative loading. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(4), 584-590.

49. Dotsenko, O. I., Mykutska, I. V., Taradina, G. V., & Boiarska, Z. O. (2020). Potential role of cytoplasmic protein binding to erythrocyte membrane in counteracting oxidative and metabolic stress. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 11(3), 455–462.