

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА

РАКУТІНА АЛІНА СЕРГІЇВНА

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

Доценко О. І.
« » _____ 2024__

ДОСЛІДЖЕННЯ ТІОЛ-ДИСУЛЬФІДНОГО ОБМІНУ В
ЕРИТРОЦИТАХ ЛЮДИНИ В УМОВАХ ГІПОКСІЇ

Спеціальність 091 Біологія

Магістерська робота

Науковий керівник:
Доценко О.І. завідувач кафедри
біофізики.....,
к.х.н., доцент

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

Голова Е.К.: _____
(підпис)

Вінниця 2024

Ракутіна А. С. Дослідження тіол-дисульфідного обміну в еритроцитах людини в умовах гіпоксії. 091 Біологія. Донецький національний університет імені Василя Стуса. Вінниця. 2024.

Експериментально досліджено вміст відновленого глутатіону і SH-груп білків еритроцитів в умов окисного і метаболічного стресу та гіпоксії. Показано, що вміст цих показників суттєво залежить від наявності і кількості глюкози в середовищі інкубування. Створена математична метаболічна модель, яка відтворює роботу системи тіол-дисульфідного обміну в еритроцитах і деглутатіонування. Модель створена в програмі COPASI та складається з 70 диференціальних рівнянь. Стан гіпоксії моделювали шляхом змінення величини парціального тиску кисню. Показано, що результати моделювання відтворюють експериментальні дані, отримані за умов відсутності окисного і метаболічного стресу.

Rakutina A.S. Study of thiol-disulfide exchange in human erythrocytes under hypoxia conditions. 091 Biology. Vasyly' Stus Donetsk National University. Vinnytsia. 2024.

The content of reduced glutathione and SH-groups of erythrocyte proteins under conditions of oxidative and metabolic stress and hypoxia was experimentally investigated. It is shown that the content of these indicators significantly depends on the presence and amount of glucose in the incubation medium. A mathematical metabolic model was created that reproduces the work of the system of thiol-disulfide exchange in erythrocytes and deglutination. The model was created in the COPASI program and consists of 70 differential equations. The state of hypoxia was simulated by changing the value of the partial pressure of oxygen. It is shown that the simulation results reproduce the experimental data obtained in the absence of oxidative and metabolic stress.

Зміст

СПИСОК ОСНОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Система антиоксидантного захисту і тіол-дисульфідний обмін в еритроцитах	7
1.1.1. Супероксиддисмутаза і каталаза	7
1.1.2. Пероксиредоксини	10
1.1.3. Тіоредоксин та тіоредоксинредуктаза	12
1.1.4. Глутатіонпероксидаза	12
1.1.5. Глутатіонредуктаза і глутаредоксини	14
1.6. Глутатіон	15
1.2. Глутатіонілювання як механізм захисту та регуляції клітинних білків	17
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	
2.1. Дизайн експериментальних досліджень	20
2.2. Методики дослідження, використані у роботі	22
2.3. Розробка метаболічної моделі, що включає тіол-дисульфідний обмін	26
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТУ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	
3.1. Генерація H_2O_2 у модельних системах $Cu^{2+} - AscH$	28
3.2. Дослідження впливу гіпоксії на окисного навантаження на показники тіол-дисульфідного обміну	34
3.3. Розробка математичної моделі метаболізму еритроцитів	34
3.4. Аналіз результатів моделювання	39
ВИСНОВКИ	43
СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	43
ДОДАТОК	

СПИСОК ОСНОВНИХ СКОРОЧЕНЬ:

GAPDH	Гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
oxyHbSSG	Глутатіонільований оксигемоглобін
deoxyHbSSG	Глутатіонільований дезоксигемоглобін
GR	Глутатіонредуктаза (Glutathione Reductase)
Grx	Глутаредоксин (Glutaredoxin)
GrxSS, Grx_ox	Глутаредоксин дисульфід
GrxSSG	Глутаредоксин змішаний дисульфід
Grx(SH) ₂ ,	Глутаредоксин відновлений
Grx_red	
GSH	Глутатіон відновлений
GSSG	Глутатіон окислений
GPx	Глутатіонпероксидаза
deoxyHb	Дезоксигемоглобін
CAT	Каталаза
SOD	Супероксиддисмутаза
metHb	Метгемоглобін
oxyHb	Оксигемоглобін
Trx	Тіоредоксин
TrxR	Тіоредоксинредуктаза
Prx	Пероксиредоксин

ВСТУП

Еритроцити транспортують кисень до тканин організму за допомогою гемоглобіну, концентрація якого в клітинах дуже висока — приблизно 5,5 мМ. Еритроцити мають обмежений запас білків, так як не можуть їх синтезувати і постійно піддаються впливу різних стресових факторів. Отже, добре функціонуюча система антиоксидантного захисту має вирішальне значення для цього типу клітин. Значну частину системи антиоксидантного захисту становить глутатіон – основний низькомолекулярний тіол еритроцитів, який захищає білки від необоротного окислення. Концентрація відновленого глутатіону близька до концентрації гемоглобіну. Мілімолярні концентрації відновленого глутатіону (GSH) роблять значний внесок у систему антиоксидантного захисту разом із супероксиддисмутазою, каталазою та пероксиредоксинами [1, 2]. GSH детоксифікує окислювачі, віддаючи електрони під час переходу в окислений стан (GSSG). Глутатіон також утворює змішані дисульфіди з білковими цистеїнами, захищаючи їх від необоротного окислення [3] і подовжуючи тривалість життя циркулюючих еритроцитів [1]. Крім того, S-глутатіонілювання регуляторних тіолів у гемоглобіні та трансмембранних білках змінює клітинну реологію, стабільність мембрани та O_2 -транспортні властивості еритроцитів [1, 4].

Зміни доступності O_2 в мікро- та макросередовищі пов'язані з гострими локальними або системними змінами в окисно-відновному стані. У еритроцитах мишей, щурів і людини було показано гостре дозозалежне підвищення рівнів еритроцитарного GSH у відповідь на деоксигенацію [1, 5, 6].

Відомо, що гемоглобін може утворювати нековалентний комплекс з GSH [1]. Було показано, що гемоглобін в оксиформі зв'язує чотири молекули GSH, тоді як дезоксиформа зв'язує лише дві молекули GSH, очевидно, пояснюючи підвищення рівня глутатіону під час гіпоксії як в еритроцитах людини на висоті, так і в ізольованих еритроцитах в умовах гіпоксії [1, 5]. Таким чином, гемоглобін може діяти як депо для GSH, вивільняючи його в гіпоксичне середовище, що, ймовірно, відіграє значну роль у посиленні антиоксидантного захисту

еритроцитів, захищаючи клітини від активних форм кисню, що виробляються мітохондріями в периферичних тканинах, чутливих до різких змін кисню. рівні [1].

Крім того, глутатіонілування виконує не тільки захист тіолових груп гемоглобіну від необоротного окислення, але і регуляторну функцію, значно (у 6 разів) підвищуючи спорідненість гемоглобіну до кисню [7].

Проте, багато аспектів функціонування тіол-дисульфідного обміну в еритроцитах у стані гіпоксії залишається нез'ясованим.

Мета роботи: дослідити особливості процесів тіол-дисульфідного обміну в еритроцитах в умовах гіпоксії, окисного навантаження та метабічного стресу в експериментах *in vivo* та *in silico*.

Задачі дослідження:

1. Експериментально дослідити вміст відновленого глутатіону, -SH-груп білкової фракції за різних умов інкубування еритроцитів;
2. Модифікувати математичну метабічну модель еритроцитів, долучивши до реакцій тіол-дисульфідного обміну процеси глутатіонування і деглутатіонування гемоглобіну та реакції за участю глутанільованих форм гемоглобіну;
3. Дані моделювання *in silico* порівняти з експериментальними даними.

Предмет дослідження: тіол-дисульфідний обмін в еритроцитах за різних умов інкубування і гіпоксії.

Об'єкт дослідження: еритроцит людини

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

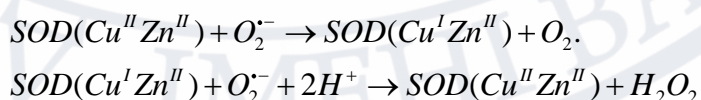
1.1. Система антиоксидантного захисту і тіол-дисульфідний обмін в еритроцитах

Еритроцити містять кілька антиоксидантних систем, які дозволяють йому справлятися з великим окислювальним стресом. До них відносяться системи з низькою молекулярною масою, що беруть участь у захисті цитозольних білків і ліпідів мембран, а також ферментативні системи, які можуть реагувати та відновлювати переважно водорозчинні окислювачі.

1.1.1. Супероксиддисмутаза і каталаза

Супероксиддисмутази (SODs, EC 1.15.1.1) є ферментами, які каталізують дисмутацію або диспропорціонування двох молекул $O_2^{\cdot-}$ до O_2 і H_2O_2 [8]. Ця реакція відбувається спонтанно ($k = 2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$), однак ці ферменти прискорюють її на 4 порядки величини ($2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$). Враховуючи відносно високу кількість СОД та реакційну здатність, обмежену дифузією, реакція, що каталізується ферментами, є основним механізмом дисмутації $O_2^{\cdot-}$ в аеробних організмах.

Еритроцити містять Cu/Zn SOD1, який є відповідальним принаймні 95% вмісту Cu, яка присутня у концентрації приблизно 4 мкМ [9]. SOD1 є гомодимерним білком 32 кДа, у якому кожен мономер містить у своїй структурі іон Cu^{II} та Zn^{II} [10]. Каталітичним металом є Cu^{II} , тоді як Zn^{II} відіграє досить непрямую роль у каталізі, оскільки він стабілізує структуру активного центру та регулює його окисно-відновний потенціал [11]. Під час каталізу іон Cu^{II} оборотно відновлюється та окислюється у двох послідовних реакціях з $O_2^{\cdot-}$:



У стані спокою Cu^{II} зв'язує атом кисню молекули води і з'єднується з іоном Zn^{II} за допомогою залишку гістидину (His63). Перший $O_2^{\cdot-}$ рухається по каналу позитивно зарядженого активного центру, щоб зв'язати Cu^{II} і витіснити

молекулу води. Потім зв'язаний $O_2^{\bullet-}$ відновлює Cu^{II} до Cu^I , що призводить до утворення O_2 , втрати координаційного зв'язку $Cu-His61$ і протонування $His63$. Другий $O_2^{\bullet-}$ зв'язується з Cu^I і окислює його до Cu^{II} , при цьому отримує два протони, що надходять від $His63$ і розчинника і утворює H_2O_2 . Коли H_2O_2 залишає активний центр, координаційний зв'язок $Cu-His63$ відновлюється, і фермент повертається до стану спокою [8].

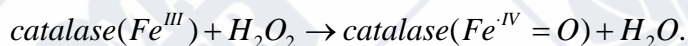
Активність SOD1 корелює з фізіологією еритроцитів, захищаючи білки еритроцитів від $O_2^{\bullet-}$ -опосередкованого пошкодження. Дослідження мишачих еритроцитів без SOD1 показали раннє збільшення їх розміру та зменшення тривалості життя (на 60% від контрольних мишей), що зрештою призводить до анемії. Крім того, ці еритроцити демонстрували високі рівні оксидантів і metHb, вміст яких корелював з віком клітин. Крім того, SOD1-дефіцитні еритроцити виявляли зв'язані імуноглобуліни, а в клубочках цих мишей були виявлені відкладення імунних комплексів, що є характерною ознакою аутоімунної патології. Було доведено, що всі ці ефекти значно зменшуються трансгенною експресією SOD1. Еритроцити мишей з нокаутом SOD1 також демонстрували високі рівні окисленої карбоангідрази 2 (CA2), що призводить до її протеасомної деградації та порушення роботи еритроцитів. Крім того, накопичення окисленої CA2 змінює активність протеасом і порушує гомеостаз білка в еритроцитах.

В еритроцитах людини SOD1 може бути посттрансляційно фосфорильована та/або глутатіонільована поблизу поверхні розділу димерів. Зокрема, глутатіонільовання Cys111 порушує межу розділу димерів і дає мономери SOD1, які є значно менш активними [8].

Загалом, SOD1 відіграє основну роль у антиоксидантній системі еритроцитів, оскільки він інактивує $O_2^{\bullet-}$, який безперервно виробляється в реакціях аутоокиснення оксиHb. Хоча активність SOD1 запобігає утворенню більш потужних окислювачів, таких як пероксинітрит, в цій реакції утворюється H_2O_2 , який може додатково окислювати клітинні компоненти та/або виробляти HO^{\bullet} . Таким чином, SOD1 повинен діяти узгоджено з системами відновлення H_2O_2 , щоб завершити свою антиоксидантну функцію.

Каталаза еритроцитів людини (ЕС 1.11.1.6) міститься в концентрації 11–12 мкМ (концентрація субодиниці) і належить до групи монофункціональних каталаз. Це тетрамерний фермент, що складається з чотирьох ідентичних субодиниць по 59,7 кДа, і кожна субодиниця містить гемову групу, залізо(III) порфірин IX і міцно зв'язану молекулу NADPH [8].

Розпад H_2O_2 відбувається в два етапи. На першому етапі H_2O_2 окислює гемове залізо (Fe^{III}) з утворенням проміжної сполуки I, π -порфіринового катіонного радикалу, що містить Fe^{IV} (каталаза $Fe^{IV}=O$):



Константа швидкості для цього кроку на субодиницю становить $k = 0,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$. Один із протонів молекули H_2O_2 переноситься з одного кінця на інший через залишок гістидину в активному центрі, що поляризує та розриває зв'язок O–O у H_2O_2 . На наступному етапі ($k = 1,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ на субодиницю) друга молекула H_2O_2 діє як відновник, утворюючи воду та O_2 і повертаючи фермент у стан спокою Fe^{III} :



На відміну від інших ферментів неможливо наситити каталазу H_2O_2 , її кінетика відповідає реакції першого порядку за концентрацією H_2O_2 .

Окислювальна та відновна здатність під час нормального каталітичного циклу каталази визначається H_2O_2 , тому НАДФН не є важливим для каталітичної активності. Було висунуто декілька гіпотез щодо ролі НАДФН у каталазі, головна з яких полягає в тому, що він захищає фермент від інактивації H_2O_2 шляхом запобігання утворенню сполуки II.

1.1.2. Пероксиредоксини

Пероксиредоксини (Prx, EC 1.11.1.15) є пероксидазами, які відновлюють H_2O_2 та інші гідропероксиди (ROOH), використовуючи високореактивні залишки цистеїну. В еритроцитах є три ізоформи Prx, а саме Prx1, Prx2 і Prx6 [8]. Серед них Prx2 є найбільш поширеною в еритроцитах з концентрацією 240–410 мкМ [12].

Prx2 належить до класу Prx1 сімейства Prx, також відомого як типовий двоцистеїновий Prx. Ці Prx є гомодимерами (44 кДа), розташованими за принципом «голова до хвоста», які далі утворюють гомодекамери тороїдної форми (220 кДа) (Рисунок 1.1).

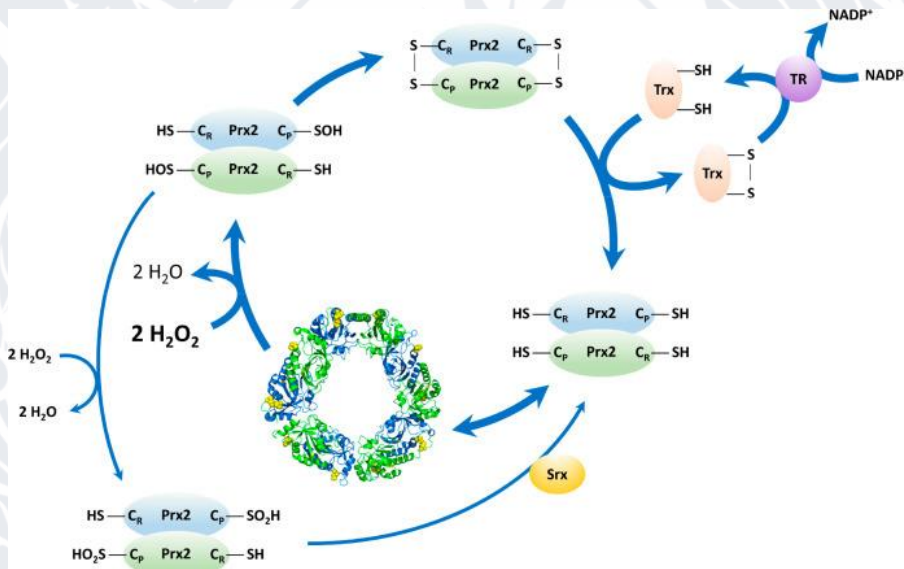


Рис. 1.1. Активність пероксиредоксину [8].

Дімеризація необхідна для повного згортання активного центру, оскільки кожен мономер має дві половини активного центру: амінокінцеву (N-ter) головку та карбоксикінцевий (C-ter) хвіст. Під час каталізу пероксидний цистеїн (CP) N-ter активного центру реагує з H_2O_2 з утворенням сульфенової кислоти на CP (CPSOH) (рис. 1.1.). Потім CPSOH реагує з C-термінальним активним центром, відокремлюючи цистеїн (CR) із сусідньої субодиниці, утворюючи міжмолекулярний дисульфідний зв'язок, який пізніше відновлюється системою тіоредоксин/тіоредоксинредуктази (Trx/TR) на за рахунок НАДФН. Іноді CPSOH

може реагувати далі з H_2O_2 з утворенням сульфїнової (CPSO_2) або сульфонової кислоти (CPSO_3), яка оборотно або необоротно інактивує фермент [13].

Prx2 CP може реагувати як з H_2O_2 , так і з пероксинїтритом надзвичайно швидко, з константами швидкості 1×10^8 і $1,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ відповідно [14]. Тим не менш, каталїтичний цикл Prx2 значно затримується через утворення дисульфїду CP--CR ($0,3 \text{ s}^{-1}$), що робить фермент схильним до гіперокислення, що призводить до накопичення CPSO_2 та/або CPSO_3 . Prx2 в еритроцитах присутній переважно у відновленому стані, і для накопичення окисленого Prx2 потрібні сильні окислювальні впливи [8].

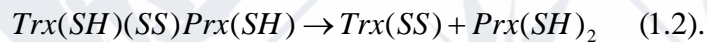
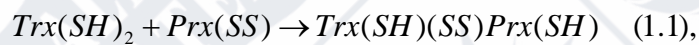
Prx2 бере участь у різних аспектах фізіології еритроцитів. Висока концентрація Prx2 необхідна для еритропоезу, особливо в еритробластах, діючи як антиоксидант, коли синтез гемоглобіну досягає свого піку та обробляються великі кількості гему та залїза. Відсутність Prx2 на цїй стадїї приводить до порушення еритропоезу та токсичності залїза.

Prx2 спеціально захищає гемоглобїн від окислення і є фундаментальним для стабілізації його структури. Мишачї моделї без Prx2 демонструють підвищене окислення Нб, преципітацію тілець Хайнца та гемолїтичну анемію, незважаючи на наявність інтактної каталази та функціональності GPx [15]. Також було показано, що декамерний стан Prx2 необхідний для запобігання H_2O_2 -індукованої агрегації Нб.

Невелика частина пулу Prx2 еритроцитів розташована в клітинній мембрані, де вона була зв'язана з цитоплазматичним доменом аніонного транспортного білка смуги 3, спектрином і каналом Gardos. Хоча функція Prx2 в еритроцитах мембрани все ще незрозумїла, збільшення зв'язаного з мембраною Prx2 є маркером окислення еритроцитів і стресу [16].

1.1.3. Тіоредоксин та тіоредоксинредуктаза

Тіоредоксин (Trx) є невеликим мономерним білком (12 кДа), який має характерну послідовність активного центру Cys-Gly-Pro-Cys. N-кінцевий Cys атакує дисульфід білка-мішені, утворюючи тимчасовий змішаний дисульфід (рівняння 1.1), який потім відновлюється С-кінцевим Cys в активному центрі Trx з утворенням внутрішньомолекулярного дисульфіду в Trx і тіолу білка (рівняння 1.2) [17]. Еритроцити містять Trx1, який бере участь в антиоксидантному захисті, діючи як донор електронів для кількох ферментів, включаючи Prx2, і відновлюється Trx-редуктазою (TR).



Тіоредоксинредуктаза (TR, EC 1.8.1.9) є гомодимерним флавопротеїном, що містить селеноцистеїн. Еритроцити містять TR1, кожна субодиниця якої містить домени зв'язування FAD і NADPH. Димер розташований головою до хвоста. Електрони переносяться від NADPH до FAD, потім до N-кінцевого редокс-активного дитіолу, потім до С-кінцевого селенілсульфіду іншої субодиниці і, нарешті, до дисульфідного субстрату [8].

Субстратами TR є Trx, глутаредоксини та інші. Хоча нижча активність TR в еритроцитах людини нижча у порівнянні з іншими клітинами, цього достатньо, щоб підтримувати Prx2 у відновленому стані. Припускають, що система TR/Trx зв'язана з системою глутатіонредуктаза/глутатіон (GR/GSH). Наприклад, коли активність TR знижується, Trx може бути відновлений за допомогою Grx/GSH, а коли активність GR знижується, TR може відновити GSSG до GSH [18].

1.1.4. Глутатіонпероксидаза

Глутатіонпероксидаза (EC 1.11.1.9) є частиною тіолзалежних антиоксидантних систем еритроцитів. Вона каталізує відновлення гідропероксидів за допомогою процесу, який включає глутатіон (GSH), глутатіонредуктазу (GR) і NADPH. У ссавців виявлено вісім різних глутатіонпероксидаз (GPx1–GPx8), причому GPx1 є переважаючою в

еритроцитах у кількості 1,5 мкМ [8, 10]. Також присутня GPx4, хоча її кількість у 20 разів менша. Обидві ізоформи є селеноферментами, з активним центром, що складається з каталітичної тетради, утвореної залишком селеноцистеїну разом із глутаміном, триптофаном і аспарагіном. Однак вони відрізняються своїм олігомерним станом і своїми субстратами. GPx1 є гомотетрамером і швидше реагує з H₂O₂ та іншими невеликими органічними гідропероксидами, тоді як GPx4 є мономером і швидше реагує з більшими та складнішими молекулами, такими як фосфоліпіди та гідропероксиди холестерину, навіть коли вони зв'язані з поверхнею мембрани [19].

Каталітичний цикл GPx базується на механізмі пінг-понгу і може бути розділений на дві напівреакції, окислювальну та відновну фази [20]. Під час окисної фази гідропероксид відновлюється в результаті реакції з активним центром ферменту, тоді як його селеноцистеїновий залишок окислюється до селенової кислоти ($k_1 \text{H}_2\text{O}_2 = 4,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$, $k_1 \text{t-BuOOH} = 4,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$) (1.3). У відновній напівреакції, фермент регенерується в два наступних етапи. Перша молекула GSH зв'язується з ферментом через селеносульфідний зв'язок (1.4), який потім розривається другим GSH, утворюючи дисульфід глутатіону (GSSG) і відновлену форму ферменту (1.5).



Хоча GPx1 має високу специфічність для GSH, це не стосується всіх ізоформ GPx, оскільки спостерігалася поступова втрата субстратної специфічності. GPx4 може використовувати інші білкові тіоли та навіть тіольні групи у своїй структурі як донори електронів.

Еритроцити мишей з нокаутом GPx1 показали підвищену сприйнятливість клітин до лізису органічними пероксидами, такими як гідропероксид трет-бутилу та гідропероксид кумолу. У цих випадках окислювальне пошкодження часто спостерігалася на рівні мембрани з появою окислених тіолів. Було також

повідомлено, що GPx1 може транслокуватися на мембрану еритроцитів в умовах окисного стресу раніше Prx2 або каталази [21].

1.1.5. Глутатіонредуктаза і глутаредоксини

Глутатіонредуктаза (GR, EC 1.6.4.2) є флавоензимом, який каталізує рециркуляцію GSSG назад у GSH за рахунок NADPH. При гомодимерній структурі обидві субодиниці GR з'єднані через дисульфідний зв'язок. Кожен з них можна розділити на чотири домени та представити сайти зв'язування NADPH, FAD та GSSG. Домен FAD містить окислювально-відновний дисульфід, який бере участь у відновленні GSSG [8].

GR здійснює перетворення за механізмом ring-pong з циклом, який можна розділити на дві напівреакції, окислювальну та відновну. На початку NADPH зв'язується з ферментом і відновлює флавін, який, у свою чергу, створює комплекс перенесення заряду з одним із цистеїнів активного центру (Cys63), розриваючи попередній дисульфідний зв'язок. NADP⁺ вивільняється і замінюється новою молекулою NADPH. Далі GSSG утворює змішаний дисульфід з ферментом, і після його відновлення утворюється дві молекули GSH разом із регенерацією окисленого ферменту.

В еритроцитах GR знаходиться переважно у відновленій формі, оскільки концентрація NADPH у п'ять разів перевищує K_m для ферменту. Це дозволяє GR постійно підтримувати рівні GSH у мілімолярному діапазоні, а також зберігати баланс NADPH і пули NADP⁺ у пентозофосфатному шляху.

Глутаредоксини (Grx, EC 1.20.4.1) є цистеїнзалежними ферментами, які каталізують як утворення, так і відновлення змішаних дисульфідів між білковими тіолами та GSH [8]. Їх можна класифікувати на дві групи: дитіольні та монотіольні. Перша група - це двоцистеїнові оксидоредуктази, які отримують свої відновні еквіваленти з GSH або TR. З іншого боку, монотіоловий Grx не має оксидоредуктазної активності та має лише один активний центр цистеїну, який

він використовує поряд із GSH для збирання та перенесення залізо-сірчаних кластерів ([Fe-S]) до білків [22].

У зрілих еритроцитах виявлено два Grx, Grx1 і Grx3, і їх діапазон концентрацій становить 4–8 мкМ і 0,6–0,8 мкМ відповідно [12]. Grx1 — це двоцистеїновий Grx, який може відновлювати як білкові дисульфіди, так і білкові-GSH змішані дисульфіди (деглютаціонілювання). У першому випадку амінокінцевий (N-тер) активний центр цистеїну атакує дисульфід білка з утворенням змішаного дисульфїду між Grx і білком. Потім С-кінцевий цистеїн утворює внутрішньомолекулярний дисульфідний зв'язок із N-тер-цистеїном, що дає відновлений білок. Пізніше окислений Grx відновлюється двома молекулами GSH, щоб відновити дітіоловий фермент і утворити GSSG, який зрештою буде відновлений до GSH за рахунок GR і NADPH.

У разі деглютаціонілювання фермент демонструє класичний ring-pong каталіз, коли спочатку N-тер-цистеїн реагує з глутатіонільованим білком або низькомолекулярним тіолом, утворюючи глутатіонільований Grx і відновлений білок. Потім GSH відновлює змішаний дисульфід Grx-GSH з утворенням відновленого Grx і GSSG, який пізніше відновлюється GR і NADPH [23].

В еритроцитах Grx1 відповідає за деглютаціонілювання Hb, фосфофруктокінази та відновлення низькомолекулярних дисульфідів. Глутатіонілювання Cys93 β -ланцюга Hb вважається захисним механізмом від окислення, але воно може порушити взаємодію між субодинаціями α і β , що впливає на зв'язування O_2 і гема. Крім того, було показано, що Grx1 відновлює піруваткіназу та відновлює тіольні групи білків у мембрані еритроцитів [2]. Grx1 також відповідає за відновлення дегідроаскорбату до аскорбату (вітаміну C), який діє як відновник у еритроцитах [24].

1.6. Глутатіон

Глутатіон (GSH), трипептид γ -глутамілцистеїнілглїцин (Рисунок 1.2), вважається основним внутрішньоклітинним антиоксидантом з низькою молекулярною масою, але також є ключовим чинником окисно-відновної передачі сигналів і метаболізму ксенобіотиків і одним із найважливіших способів зниження енергії в клітині [25]. В еритроцитах внутрішньоклітинна концентрація GSH є відносно високою (0,4–3 мМ), а нормальне фізіологічне співвідношення GSH/GSSG перевищує десять [26].

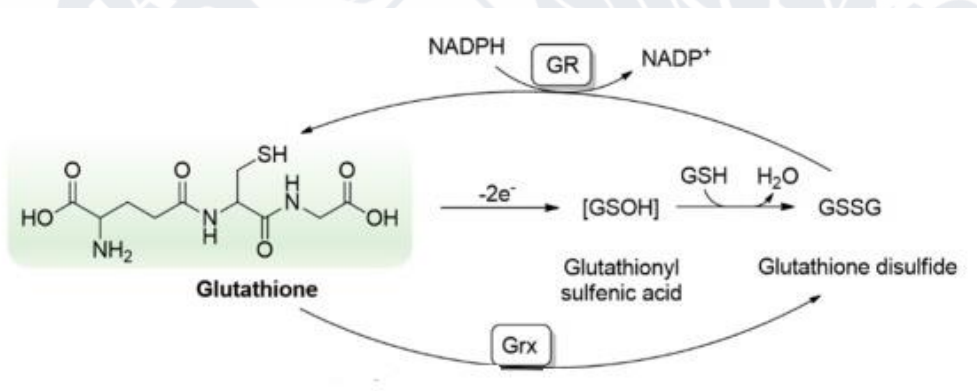


Рис. 1.2. Будова і використання глутатіону. Модифіковано з [8].

Біосинтез GSH відбувається в цитозолі жорстко регульованим способом. Ключовими детермінантами синтезу GSH є наявність попередника амінокислоти сірки, цистеїну, і активність ферменту, що обмежує швидкість, глутаматцистеїнілази (GCL, EC 6.3.2.2). GCL — це гетеродимер, що складається з каталітичної (GCLC) і модифікуючої (GCLM) субодиниць. Холофермент регулюється оборотним фосфорилуванням білка та піридиндинуклеотидфосфатзалежною алостерією. Глутатіонсинтетаза (GS, EC 6.3.2.3), другий фермент у синтезі GSH, каталізує конденсацію γ -глутамілцистеїну та гліцину з утворенням GSH. Обидва ферменти залежать від виробництва АТФ шляхом гліколізу в RBC.

Цистеїн для синтезу GSH поглинається з плазми шляхом полегшеної дифузії (L-транспортна система) та вторинного активного транспорту (транспортер аланін-серин-цистеїн, Asc-1) еритроцитами. Печінка та нирки

відіграють фундаментальну роль, забезпечуючи GSH як попередник цистеїну для міжорганного обміну. Печінковий GSH транспортується в кров і швидко розкладається до цистеїну в кровообігу ферментами, пов'язаними з плазматичною мембраною, γ -глутамілтранспептидазою (γ -GT) і дипептидазами нирок та інших органів.

Значний відсоток GSH виробляється *de novo* щоденно еритроцитами, щоб компенсувати активний експорт GSSG і кон'югатів GSH. Отруєння чадним газом, а також окислювачі, такі як пероксинітрит, сприяють вивільненню як GSH, так і GSSG з еритроцитів.

1.2. Глутатіонілювання як механізм захисту та регуляції клітинних білків

Глутатіон також здатний ковалентно зв'язуватися з тіоловими групами білків, що призводить до глутатіонілювання, тобто до утворення SS-містка між молекулою глутатіону та молекулою білка. S-глутатіонілювання може здійснюватися за допомогою різних механізмів [28], одним із яких є тіол-дисульфідний обмін між тіоловими групами білка та GSSG. Під час окисного стресу частина відновленого глутатіону витрачається на нейтралізацію активних радикалів, що призводить до зниження рівня GSH і підвищення рівня GSSG, що індукує глутатіонування білків. Таким чином, глутатіонілювання захищає тіольні групи білків від необоротного окислення.

Тіол-дисульфідний обмін між глутатіоном і цистеїнами клітинних білків є одним з важливих механізмів редокс-регуляції останніх. Динаміка глутатіонілювання/деглутатіонілювання детермінована редокс-статусом клітини, який безпосередньо залежить від співвідношення GSH/GSSG [27].

Глутатіонілювання може впливати на активність редокс-чутливих білків двома способами. Безпосередньо, якщо глутатіонілюванню піддаються цистеїни в активному сайті ферменту, або побічно, якщо модифікація зачіпає залишки, розташовані за межами активного сайту. У другому випадку глутатіонілювання

індукує конформаційні зміни у структурі білкової глобули, які відбиваються на функціональній активності. Кон'югація глутатіону з білками може відбуватися як спонтанно, так і за участю спеціалізованих ферментів - глутатіон-S-трансфераз, особливо Р-ізоформ (GSTP). Оборотноість S-глутатіонілювання забезпечує глутаредоксинова система.

Маркером окислювального стресу еритроцитів вважається глутатіонілювання гемоглобіну [5]. Крім фізіологічних реакцій на окислювальний стрес, глутатіонілювання виникає при різних патологічних станах, таких як цукровий діабет, хронічна ниркова недостатність, залізодефіцитна анемія, гіперліпідемія, атаксія Фрідрейха, атеросклероз і хронічна ниркова недостатність. Окрім окислювального стресу глутатіонілювання також може бути викликане виснаженням енергетичних ресурсів еритроцитів, яке відбувається під час гіпоглікемії [5]. Глутатіонілювання виконує не тільки захисну функцію, захищаючи тіолові групи гемоглобіну від необоротного окислення, але і регуляторну функцію, значно (у 6 разів) підвищуючи спорідненість гемоглобіну до кисню. Щоб пояснити це явище, були зроблені спроби виявити структурні зміни, викликані глутатіонілюванням. В одному з перших досліджень за допомогою ЯМР було показано, що внутрішньосубодиничний сольовий місток і міжсубодиничний водневий зв'язок на межі розділу між $\alpha\beta$ -димерами, які присутні в дезоксиформі, дисоціюють під час глутатіонілювання. Подібний ефект, що спостерігається при переході від дезоксиформи до оксиформи гемоглобіну, свідчить про конформаційний зсув дезоксигемоглобіну до оксигемоглобіноподібної конформації.

Нв здатний ковалентно або нековалентно взаємодіяти з GSH, і що конформаційний перехід від окси-Нв до дезокси-Нв може призвести до вивільнення GSH з його сайту(ів) зв'язування [1].

Вважається, що саме залишки цистеїну α -104, β -112 і β -93 окси- і дезоксигемоглобіну задіяні в процесах глутатіонування. Аналіз кристалічних структур глутатіонілюваного гемоглобіну показав, що тільки тіольна група β Cys93 може зміщуватися назовні при деоксигенації, тоді як положення інших

тіолів залишається незмінним при переході від окси- до дезоксистану. Це свідчить про те, що тільки глутатіон, зв'язаний з βCys93 , може бути доступним для деглутатіонування при деоксигенації. Автори [1] вважають, що саме в цьому стані глутатіонільований βCys93 може бути доступним для глутаредоксину 1, що здійснює деглутатіонування. Показано, що тіольна група αCys104 недоступна для S-глутатіонілування. Проте βCys112 доступний як для глутатіонування так і для деглутатіонування незалежно від оксигенації гемоглобіну.

Показано, що Оху-Нб зв'язує чотири молекули GSH, тоді як дезокси-Нб може зв'язувати лише дві з них. Афінність дезокси-Нб до GSH ($K_d = 17 \text{ мкМ}$) є нижчою, ніж афінність окси-Нб ($K_d = 2 \text{ мкМ}$), і ентропійний компонент переважав у профілі енергії зв'язку.

Моделювання *in silico* було використано для ідентифікації амінокислотних залишків, залучених до нековалентного докінгу GSH до Нб. В оху-Нб виявлено дві пари «кишень», кожна з яких зв'язує одну молекулу GSH. Перша пара сайтів зв'язування розташована на межі розділу між двома β -глобінами, а друга пара сайтів з дещо нижчою спорідненістю розташована між двома α -глобінами, обидві пари сайтів розташовані всередині центральної порожнини [1]. Після дезоксигенації та трансформації з окси-Нб в дезокси-Нб «кишені» з двома GSH між двома ланцюгами β -глобіну відкриваються, дозволяючи вивільнити дві молекули GSH із місць стикування 1 і 2.

Центральна порожнина Нб містить сайт зв'язування 2,3-бісфосфогліцерату (BPG), який зв'язується на межі β - β глобіну. Значення K_d для взаємодії GSH з деоксигенованим Нб були нечутливими до присутності BPG, що свідчить про доступність сайтів зв'язування GSH для GSH у комплексі дезокси-Нб:BPG. Не існує конкуренції між GSH і BPG за зв'язування з Нб. У сукупності ці результати вказують на те, що центральна порожнина окси-Нб містить сайт зв'язування GSH. Останній перестає існувати при переході окси-дезокси-Нб, тоді як нове місце зв'язування для BPD утворюється в центральній порожнині дезокси-Нб.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Дизайн експериментальних досліджень

В роботі використовували:

- суспензію еритроцитів у буферному розчині;
- NaCl (М 58,14), чда;
- калій фосфорнокислий однозаміщений KH_2PO_4 (М 136,09), ч, «Китай»;
- натрій фосфорнокислий двозаміщений, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (М 358,14), фарм;
- натрій фосфорнокислий 1-заміщений, NaH_2PO_4 (М 119,98), чда, «Німеччина»;
- аскорбінову кислоту (М 176,13), фарм;
- глюкозу, фарм;
- купрум сульфат, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (М 249,68);
- трихлороцтову кислоту (ТХУ), Cl_3CCOOH (М 163,39), CLARIANT, Німеччина;
- 5,5'-дітіо-біс (2-нітро-бензойну кислоту) (М 396,36), «ЛОБА, Австрія»;
- L-глутатіон відновлений, $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$, (М 307,303), «Німеччина»;
- ДДС (додecilсульфат натрію), фірма «Fisher Scientific Co» США;
- сорбіт, $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ (М 182,18), MERCK, Германия;
- ксиленоловий оранжевий, $\text{C}_{31}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{Na}_4\text{O}_{13}\text{S}$ (М 760,6), чда;
- амоній-ферум (II) сірчаноокислий, 6-водний (сіль Мора) $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (М 392,12), ч (М 392,12);
- сульфатна кислота, H_2SO_4 , осч, (М 98,08).
- набір реактивів для визначення концентрації гемоглобіну в крові;

Склад розчинів, що використовуються в роботі:

Буферні розчини:

1. Буферний розчин 1: Na-фосфатний буфер (0,01 моль, рН 7,4), що містить 0,15 моль NaCl. Використовується в якості середовища для відокремлених від плазми еритроцитів;

2. 0,01 М Na-K-фосфатний буфер (рН 7,4). Використовується для лізису еритроцитів;

3. 0,3 М фосфат Na (рН 9,0), для приготування 26,86 г (Na_2HPO_4) · 12H₂O розчиняли в 250 мл води.

4. 0,3 М фосфат Na (рН 9,0), що містить 5% ДДС;

Робочі розчини:

1. аскорбінова кислота (AscH), 1,5 ммоль/л. Наважку AscH розчиняли в середовищі Na-фосфатного буферу складу 1;

2. розчин купрум (II) сульфату, 40 мкмоль/л. Наважку CuSO_4 розчиняли в середовищі Na-фосфатного буфера складу 1;

3. Розчини для визначення вмісту глутатіону, -SH груп білкової фракції.

3.1. Розчин 5,5'-дітіо-біс-(2-нітро-бензойної) кислоти (ДТНБ) 4 г/л приготований на 96% етанолі;

3.2. Осаджувальний розчин. Для його приготування 19,6 мл 85% ортофосфорної кислоти, 2г ЕДТА, 50 г NaCl розчиняли в колбі об'ємом 500 мл і доводили до мітки дістильованою водою;

3.3. Розчин глутатіону відновленого (GSH), 8,13 мкМ;

3.4. Розчин GSH і таурину: розчинення 0,0175 р GSH і 0,034 м таурину в 50 мл 0,05 М трис-HCl буфера, рН 8,5;

3.5. розчин H₂O₂ 0,01878 М (концентрація встановлена шляхом титрування розчином KMnO_4 точної концентрації);

3.6. 45% розчин ТХУ: розведення 45 мл ТХУ на 100 м дістильованої води; -фосфатного буфера состава 1;

4. Розчини для визначення позаклітинного та внутрішньоклітинного вмісту H₂O₂:

4.1. FOX-реактив: в 1 л 25 мМ H₂SO₄ розчиняли 100 мкМ ксиленолового оранжевого, 250 мкмоль солі Мора і 100 ммоль сорбіту [29].

4.2. Розчин H₂O₂, 0,143 мМ, для побудови калібрувальної залежності. Концентрацію вихідного розчину H₂O₂ встановлювали шляхом титрування калію перманганатом в кислому середовищі.

Постановка експерименту.

В експериментах використовували свіжовідібрану кров практично здорових донорів однієї статі та приблизно одного віку. Еритроцити тричі відмивали шляхом центрифугування з Na-фосфатним буфером (0.01 моль, рН 7.4), що містив 0.15 моль NaCl (буферний розчин 1).

Отриману пасту еритроцитів використовували для приготування суспензії з вмістом гемоглобіну 30-32 мг/мл. У першому варіанті дослідження буферний розчин не містив глюкозу. У другому варіанті до буферного розчину додавали глюкозу у концентрації, що відповідала кількості еритроцитів у суспензії. Кількість введеної глюкози складала 0,2, 0,7, 2,0 та 4 мМ на 10^{12} еритроцитів/л.

0,25 мл приготованої суспензії еритроцитів вводили у окисне середовище наступного складу: аскорбінова кислота (AscH) $1 \cdot 10^{-4}$ М, Cu^{2+} $-5 \cdot 10^{-6}$ М, Na-фосфатний буфер (0.015 М, 0.15 М NaCl, рН 7,4) [30, 31]. Кількість еритроцитів в середовищі інкубування відповідав вмісту гемоглобіну 3,0-3,2 мг/мл. Клітини інкубували протягом 5-ти годин при 20°C. Через певні часові інтервали проби відмивали центрифугуванням Na-фосфатним буфером (рН 7,4), після чого еритроцити ресуспендували в вихідному об'ємі цього ж буферу.

Для подальших досліджень використовували гемолізат еритроцитів, відмитих від окисного середовища.

2.2. Методики дослідження, використані у роботі

Лізис осаджених еритроцитів проводили з використанням 0,01 М Na-K-фосфатний буфер (рН 7,4), який додавали до 0,5 мл загального об'єму розчину. Отриманий гемолізат розподіляли таким чином: 0,1 мл використовували для визначення загальної кількості -SH груп, 0,35 мл – для визначення глутатіону (GSH) і H_2O_2 .

Принцип методу визначення глутатіону і загальної кількості -SH груп заснований на взаємодії -SH груп з ДТНБК (5,5'-дитіо-біс-1-нітробензойною кислотою) з утворенням забарвленого в жовтий колір аніону 2-нітро-5-

тіобензоату. Утворення аніону 2-нітро-5-тіобензоату жовтого кольору в ході даної реакції реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 412 нм [32].

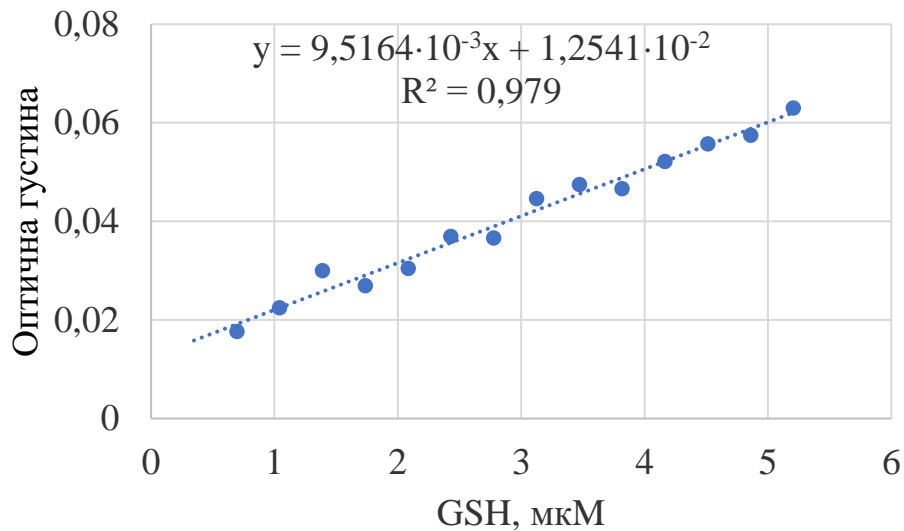
Для **визначення вмісту відновленого глутатіону** до гемолізату додавали 2,5 мл розчину 3.2 для осадження білка. Проби ретельно перемішували, витримували 20 хв при кімнатній температурі, після цього центрифугували 10 хвилин. В надосадовій рідині визначали вміст глутатіону (для цього відбирали 1,3 мл надосадової рідини, додавали 1,7 мл 0,3 М натрій фосфатного буфера і 0,05 мл реактиву Елмана (ДТНБК)). Оптичну густину розчину вимірювали через 1 годину при довжині хвилі 412 нм в кюветі з товщиною шару 1,0 см. В контрольну пробу замість надосадової рідини вносили осаджуючий розчин, розведений дистильованою водою у співвідношенні 2:5. Забарвлення контрольної проби вимірювали при той же довжині хвилі.

Вміст GSH в еритроцитах розраховували за допомогою калібрувальних кривих, побудованих за точно відомих концентрацій відновленого глутатіону, і виражали в мкМ на мг гемоглобіну (Hb) у зразку. Стандартні розчини готували згідно з таблицею (табл. 2.1). Калібрувальна крива показана на рис. 2.1.

Визначення вмісту SH-груп в білках еритроцитів. Осад, отриманий після осадження білків гемолізату, двічі відмивали холодною дистильованою водою з наступним центрифугуванням. Надосадову рідину ретельно видаляли. До отриманого осаду додавали 1 мл 0,3 М Na_2HPO_4 , рН 8,8, що містить 5% ДДС і інкубували при 37°C на водяному термостаті до повного розчинення. В отриманому розчині визначали вміст SH-груп, для цього до 0,2 мл отриманого розчину додавали 3 мл 0,3 М Na_2HPO_4 і 0,05 мл реактиву Елмана. Оптичну густину проб вимірювали на спектрофотометрі при 412 нм проти розчину 0,3 М Na_2HPO_4 . Вміст SH-груп еритроцитарних білків в мкМ на мг гемоглобіну (Hb) в пробі, розраховували з використанням калібрувальних залежності, наведеної вище (рис. 2.1.)

Таблиця 2.1. Склад стандартних розчинів GSH для побудови калібрувальної залежності. Концентрація вихідного розчину відновленого глутатіону 8,13 мкМ. Об'єм реактиву Елмана в пробі 0,05 мл.

№ п/п	Об'єм розчину відновленого глутатіону (GSH), мл	Об'єм Na ₂ HPO ₄ 0,3 М, мл	Концентрація глутатіону в точці, мкМ
1	0,025	2,975	0,0678
2	0,05	2,95	0,1356
3	0,1	2,9	0,2712
4	0,2	2,8	0,5420
5	0,3	2,7	0,8135
6	0,4	2,6	1,0847
7	0,5	2,5	1,3559
8	0,6	2,4	1,6271
9	0,7	2,3	1,8982
10	0,8	2,2	2,1694
11	0,9	2,1	2,4406
12	1	2	2,7118
13	1,1	1,9	2,9829
14	1,2	1,8	3,2541
15	1,3	1,7	3,5253
16	1,4	1,6	3,7965
17	1,5	1,5	4,06765



До

Рис. 2.1. Калібрувальна залежність для визначення GSH і -SH груп.

Кількість H_2O_2 визначали за допомогою FOX–реактиву [29]. Вміст H_2O_2 у позаклітинному середовищі визначали за допомогою FOX–реактиву, після осадження клітин шляхом центрифугування. Вміст H_2O_2 у клітинах визначали після лізису осаджених клітин у 0,5 мл холодної води і наступного осадження білків ТХУ [33, 34].

Статистичний аналіз даних.

Всі експерименти повторювали тричі. Експериментальні дані аналізували за допомогою програми Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Експериментальні дані представляли у вигляді $x \pm \text{SD}$ (x –середнє значення, SD – середньо-квадратичне відхилення).

На рисунках експериментальні точки з'єднані регресійною залежністю отриманою з використанням Distance Weighted Least Squares function, $p=0.25$. Для аналізу і візуалізації експериментальних даних і виявлення взаємозв'язків між досліджуваними параметрами використовували тривимірні графіки розсіювання. На основі масиву вихідних точок були побудовані поверхні з використанням методу оберненої зваженої відстані.

2.3. Розробка метаболічної моделі, що включає тіол-дисульфідний обмін

В основі моделі, що розроблялася, лежить модель центрального вуглецевого метаболізму еритроцитів Holzhütter [35], що знаходиться в базі Biomodel database. Дана модель складається з 38 диференціальних рівнянь, що описують зміни метаболітів двох основних метаболічних шляхів: гліколізу і пентозофосфатного шляху. Усі рівняння побудовані на основі точної кінетики цих процесів. У роботі [36] ця модель була доповнена процесами, що задіяні в генеруванні і інактивації активних форм кисню, зокрема перекису водню.

У роботі ми моделюємо роботу тіол-дисульфідної системи, до якої залучені процеси за участю пероксиредоксину (Prx), тіоредоксину (Trx) і тіоредоксинредуктази (TrxR) та глутаредоксину. Модель включає процеси за участю глутатіонпероксидази (GPx), і основних ферментів антиоксидантного захисту – супероксиддисмутази і каталази. Враховуючи дані роботи по глутатіонуванню і деглутатіонуванню гемоглобіну [1], ми намагаємося залучити ці процеси до моделі і описати їх математично.

Перелік реакцій та ферментів, залучених до моделі, наведено в таблиці 1. (Додатки). Перелік метаболітів, їх типи та початкові концентрації наведено в таблиці 2. (Додатки). У таблиці 3 (Додаток) наведено відповідні значення параметрів моделі, включаючи кінетичні параметри та початкові концентрації гемоглобіну та інших компонентів, що використовуються в моделі. Створення математичної моделі та усі розрахунки за моделлю здійснювали у програмі COPASI [37]. Математичні методи, використані в роботі:

1. Розрахунок стаціонарних концентрацій і потоків реакцій.

Концепція стаціонарних станів важлива для моделювання динамічних систем. Стаціонарні стани (інші терміни — стійкі стани або фіксовані точки) визначаються тим, що значення всіх змінних стану залишаються постійними в часі. У стаціонарному стані усі похідні за часом $dC_i / dt (i = 1, \dots, n)$ перетворюються на нуль. Для визначення стаціонарних значень змінних праві

частини диференціальних рівнянь прирівнюють до нуля і отримують систему алгебраїчних рівнянь, рішенням якої є стаціонарні значення змінних $\bar{c}_1, \bar{c}_2, \bar{c}_3 \dots \bar{c}_n$:

$$\begin{aligned} f_1(\bar{c}_1, \bar{c}_2 \dots \bar{c}_n) &= 0; \\ \dots & \\ f_n(\bar{c}_1, \bar{c}_2 \dots \bar{c}_n) &= 0 \end{aligned}$$

Якщо стаціонарний стан існує, то для цього стану можна застосувати режим "Parameter Scan"

2. Сканування параметрів.

Для того, щоб визначити, як певні параметри впливають на функціонування системи, COPASI пропонує процедуру "Parameter Scan", яка забезпечує гнучку схему зміни величин параметрів, пов'язаних з моделюванням, [37]. Ця процедура задіяна в роботі для дослідження чутливості потоків реакцій моделі і метаболітів моделі до величини парціального тиску кисню (PO_2), що забезпечує різні умови постачання кисню (нормоксію чи гіпоксію) і різний рівень оксигенації еритроцитів.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТУ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Генерація H_2O_2 у модельних системах Cu^{2+} – AscH

З метою створення постійного утворення активних форм кисню в середовищі інкубування була використана система Cu^{2+} – AscH. На рис. 3.1. показана динаміка накопичення H_2O_2 в цій системі продовж 5-ти годин. Еритроцити на цьому етапі не додавали у середовище інкубування. Бачимо, що вміст H_2O_2 збільшується протягом часу і досягає $43,6 \pm 0,87$ мкМ через 5 годин від початку реакції (рис. 3.1).

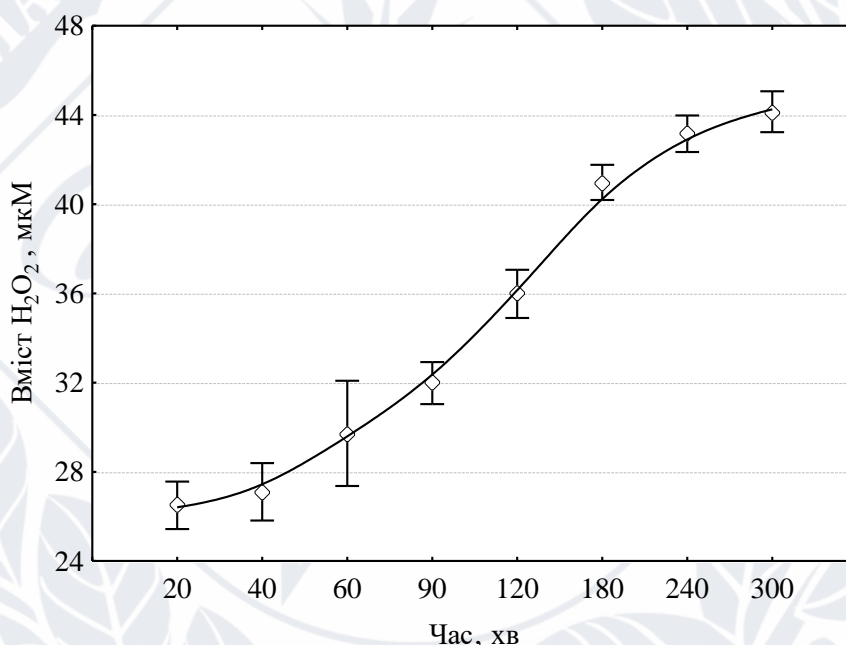


Рис. 3.1. Динаміка накопичення H_2O_2 у системі аскорбінова кислота– Cu^{2+} .

На другому етапі дослідження в середовище інкубування, що містило аскорбінову кислоту та Cu^{2+} вносили еритроцити. На рис. 3.2 показано змінення H_2O_2 в еритроцитах (b) та позаклітинному середовищі продовж 5 годин інкубування. На рис. 3.2 наведений вміст H_2O_2 у мкМ у позаклітинному середовищі. Порівняння вмісту H_2O_2 у розчинах без клітин і з клітинами свідчать про те, що еритроцити здатні ефективно нейтралізувати позаклітинний перекис водню. Присутність глюкози у максимальній концентрації (8 мМ) у середовищі

інкубування сприяла продукуванню H_2O_2 . На це вказує поступове збільшення H_2O_2 в середовищі інкубування (вміст H_2O_2 по закінченню часу інкубування досягає $10,9 \pm 1,06$ мкМ). На рисунку 3.2., б показані зміни цитоплазматичного H_2O_2 (наведені величини відносно початкового рівня у клітинах до розміщення їх у окисному середовищі). За відсутності глюкози в середовищі інкубування в еритроцитах поступово накопичувався H_2O_2 (рис. 3.2, б). Додавання глюкози у позаклітинне середовище у кількості 0,5 та 2 мМ знижувало кількість H_2O_2 як у позаклітинному середовищі так і цитозолі клітин. Присутність глюкози у кількості 4 і 8 мМ сприяло збільшенню перекису водню у позаклітинному середовищі, але за цих умов інкубування H_2O_2 не накопичувалось у клітинах, і навіть у деякі проміжки часу його рівень у цитозолі ставав нижче початкового рівня.

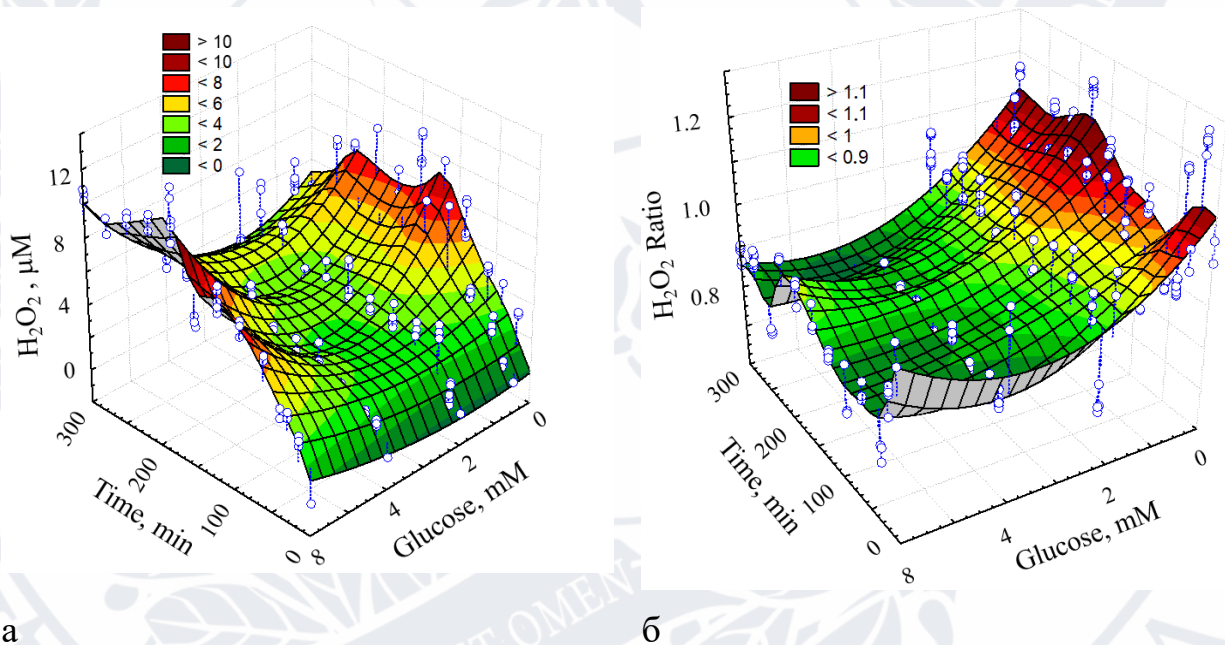


Рис. 3.2. Вміст H_2O_2 у позаклітинному середовищі (а) і цитозолі клітини (б) залежно від часу інкубування клітин і навантаження за глюкозою.

Отримані результати свідчать, що в присутності еритроцитів максимальна концентрація H_2O_2 досягає $10,9 \pm 1,06$ мкМ у оточуючому середовищу тільки за присутності глюкози у кількості 8 мМ. Очевидно, що мембранозв'язана каталаза повністю здатна інактивувати позаклітинний H_2O_2 , до цих процесів також

залучаються глутатіонпероксидаза (GPx) та пероксиредоксин (Prx2), які також знаходяться у мембранозв'язаному стані [38]. Показано [31], що бар'єр проникності клітин для H_2O_2 відповідає за швидкість розкладання перекису водню. Щільна упаковка молекул каталази в умовах насичення сприяє ефективному надходженню H_2O_2 в активну ділянку, де вона споживається зі швидкістю $3,5 \cdot 10^7 \text{ м}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. За даними роботи [31] не встановлено кореляційних зв'язків між цитоплазматичним і позаклітинним вмістом H_2O_2 , що свідчить про утворення внутрішньоклітинного H_2O_2 за рахунок клітинних метаболічних процесів, а не за рахунок надходження зовні.

Таким чином ми показали, що окислювальна система $\text{Cu}^{2+} - \text{AscH}$ може бути використана як модельна прооксидантна система і ініціювати процеси вільнорадикального окиснення як в розчині (позаклітинному середовищі), так і в клітині. Наявність глюкози в середовищі інкубування забезпечує потреби основних метаболічних шляхів, тому клітинних відновників виробляється достатньо для подолання окисного стресу. Процеси утворення активних форм кисню (АФК) в еритроцитах до кінця не вивчені; однак відомо, що аутоокислення гемоглобіну призводить до утворення супероксид-аніону. Наявні на сьогодні в літературі дані про вплив дефіциту глюкози на стан еритроцитів в організмі [43] та ізольованих еритроцитів є дещо суперечливими, тому питання про вплив виснаження за глюкозою на окисно-відновний статус ізольованих еритроцитів і окисно-відновні модифікації гемоглобіну залишається відкритим.

Також ми вважаємо, що інкубування еритроцитів продовж 5 годин приводить до розвитку стану гіпоксії.

3.2. Дослідження впливу гіпоксії на окисного навантаження на показники тіол-дисульфідного обміну

На рис. 3.3 – 3.5 показані результати дослідження вмісту глутатіону і -SH-груп білкової фракції.

На рис. 3.3 наведені змінення вмісту глутатіону (а) і -SH-груп білкової фракції (б) в еритроцитах, при їх інкубуванні в середовищі без глюкози. Ми бачимо, що через 90 хв інкубування відбувається різке збільшення вмісту глутатіону і -SH-груп, після попереднього їх зниження. Ми вважаємо, що збільшення вмісту показників, що досліджуються, зв'язано з процесами деглутатіонування гемоглобіну.

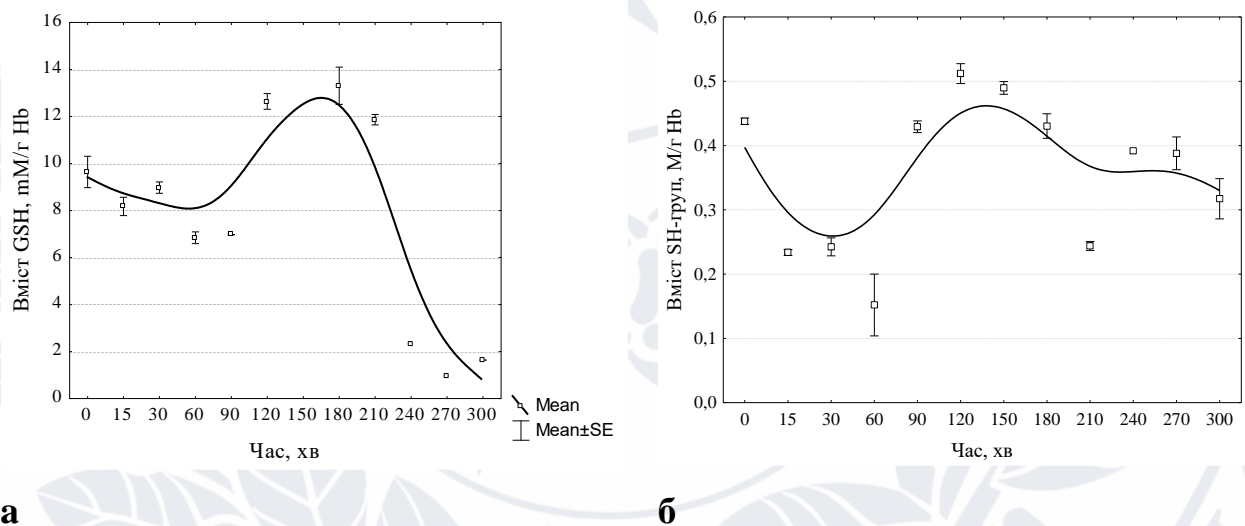


Рис. 3.3. Змінення вмісту глутатіону (а) і -SH-груп білкової фракції (б) в еритроцитах, при їх інкубуванні в середовищі без глюкози.

На рис. 3.4 а, б наведені зміни вмісту глутатіону (а) і -SH-груп білкової фракції (б) в еритроцитах, при їх інкубуванні в середовищі Cu^{2+} – AscH , що містило глюкозу у кількості 0,2 і 0,7 мМ.

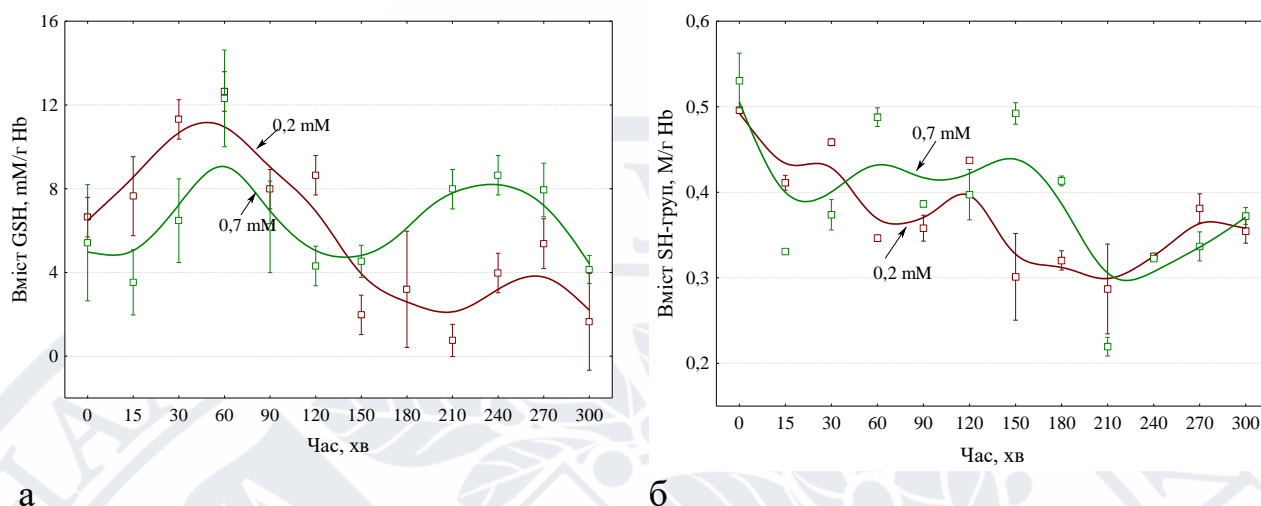


Рис. 3.4. Вміст глутатіону (а) і -SH-груп білкової фракції (б) в еритроцитах, при їх інкубуванні в середовищі Cu^{2+} – AscH , що містило глюкозу у кількості 0,2 і 0,7 мМ.

У випадку присутності глюкози у кількості 0,2 і 0,7 мМ підйом вмісту глутатіону спостерігали раніше, через 60 хв інкубування. За цих умов експерименту ми бачимо два максимуми на залежності вмісту глутатіону від часу інкубування. Відомо [1, 5, 27, 28, 39], що деглутатіонування гемоглобіну ініціюється станом гіпоксії. Проте, перший максимум може бути зв'язаний з певними додатковими механізмами, спрямованими на стабілізацію у умовах окисного стресу.

На рис. 3.5, а, б показані зміни вмісту глутатіону (а) і -SH-груп білкової фракції (б) в еритроцитах, при їх інкубуванні в середовищі Cu^{2+} – AscH , що містило глюкозу у кількості 2 і 4 мМ.

Бачимо, що за наявності глюкози підвищення вмісту GSH та -SH-груп білкової фракції відбувається тільки після 3-х годин інкубування, що зв'язано з наявністю стану гіпоксії. За цих умов інкубування еритроцити не відчують окисного стресу (рис. 3.2., б) з боку середовища інкубування, завдяки наявності АТФ як енергетичного ресурсу і NADPH як субстрату для глутатіонредуктази (фермент, що відновлює окислену форму глутатіону).

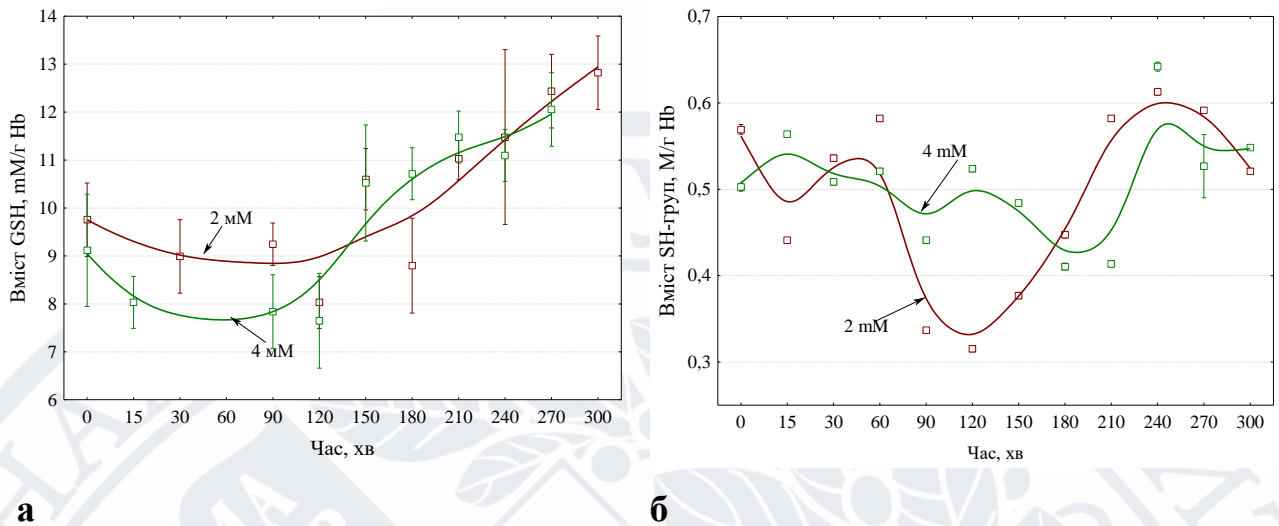


Рис. 3.5. Вміст глутатіону (а) і -SH-груп білкової фракції (б) в еритроцитах, при їх інкубуванні в середовищі Cu^{2+} – AscH , що містило глюкозу у кількості 2 і 4 мМ.

У еритроцитах рівень GSH може зберігатися завдяки процесам біосинтезу *de novo*, транспорту GSH з позаклітинного простору через плазматичну мембрану, а також відновленню з окисленої форми за допомогою глутатіонредуктази. Середовище інкубування не містило амінокислот і глутатіону, тому перші два шляхи не підтримувалися. Отже, підтримка більш високого рівня GSH в еритроцитах, що інкубували у середовищі з глюкозою, може залежати виключно від глутатіонредуктази, наявності NADPH і деглутатіонування. Активність глутатіонредуктази сильно залежить від наявності NADPH, а рівень NADPH може знижуватися при окислювальному стресі. Також при окисному стресі активність глутатіонредуктази може знижуватися за рахунок окиснення SH-груп ферменту. Таким чином, деглутатіонування, що ініціюється гіпоксією ми спостерігаємо в експериментах, коли в середовищі глюкоза знаходиться в достатній кількості.

Також ми бачимо, що підвищення глутатіону відбувається достатньо різко, явно за принципом усе або нічого. Це вказує на наявність певних механізмів що запускають процеси деглутатіонування.

3.3. Розробка математичної моделі метаболізму еритроцитів

Модель складається з 70 диференціальних, побудованих на основі точної кінетики хімічних рівнянь, залучених до моделі.

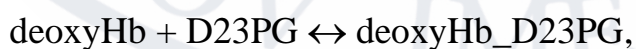
Схема мережі, закладена в основу моделі показана на рис. 3.6. Усі реакції можна об'єднати і блоки, що відповідають за основні метаболічні процеси.

Перші чотири блоки – шлях Емдена-Мейєргофа (реакції 1 – 15, табл.1, Додаток) та пентозофосфатний шлях (реакції 14 -23, табл.1, Додаток). Від основного гліколітичного шляху Емдена-Мейєргофа, основною задачею якого є синтез АТФ, відгалужуються два критичні функціональні шляхи: шунт Рапопорта–Люберінга, який генерує 2,3-дифосфогліцерат (2,3BPG), і пентозофосфатний шлях (гексозомонофосфатний шунт), який генерує рибозофосфат і, що важливо, відновлений нікотинаміаденіндинуклеотидфосфат (НАДФН).

Цей блок також включає дві реакції, що є частиною циклу нуклеотидного метаболізму (реакції 23, 24), та реакції, що підтримують функціональність еритроцитів (реакції 25 -38, табл.1, Додаток). Ці процеси змодельовані з використанням моделі Holzhütter [35], що знаходиться у базі Biomodels (<https://www.ebi.ac.uk/biomodels/>).

Наступний метаболічний цикл включає реакції за участю гемоглобіну. Так як основною метою було моделювання стану гіпоксії, а гемоглобін є основним сенсором кисню, то саме ці процеси є зв'язуючою ланкою між киснем і тіол-дисульфідним обміном та окисно-відновними процесами.

Реакції за участю гемоглобіну (реакції 39-49, табл.1, Додаток) були змодельовані з використанням робіт [36] та [44]. До цього блоку нами були додані реакції взаємодії окси і дезоксигемоглобіну з 2,3BPG:



та оксигенації глутатіонільованого гемоглобіну:



2,3BPG є критичним алостеричним модулятором гемоглобіну, який сприяє вивільненню кисню з гемоглобіну для протидії гіпоксії, а зв'язування кисню з глутатіонільованим гемоглобіном в декілька раз вище у порівнянні з дезоксигемоглобіном.

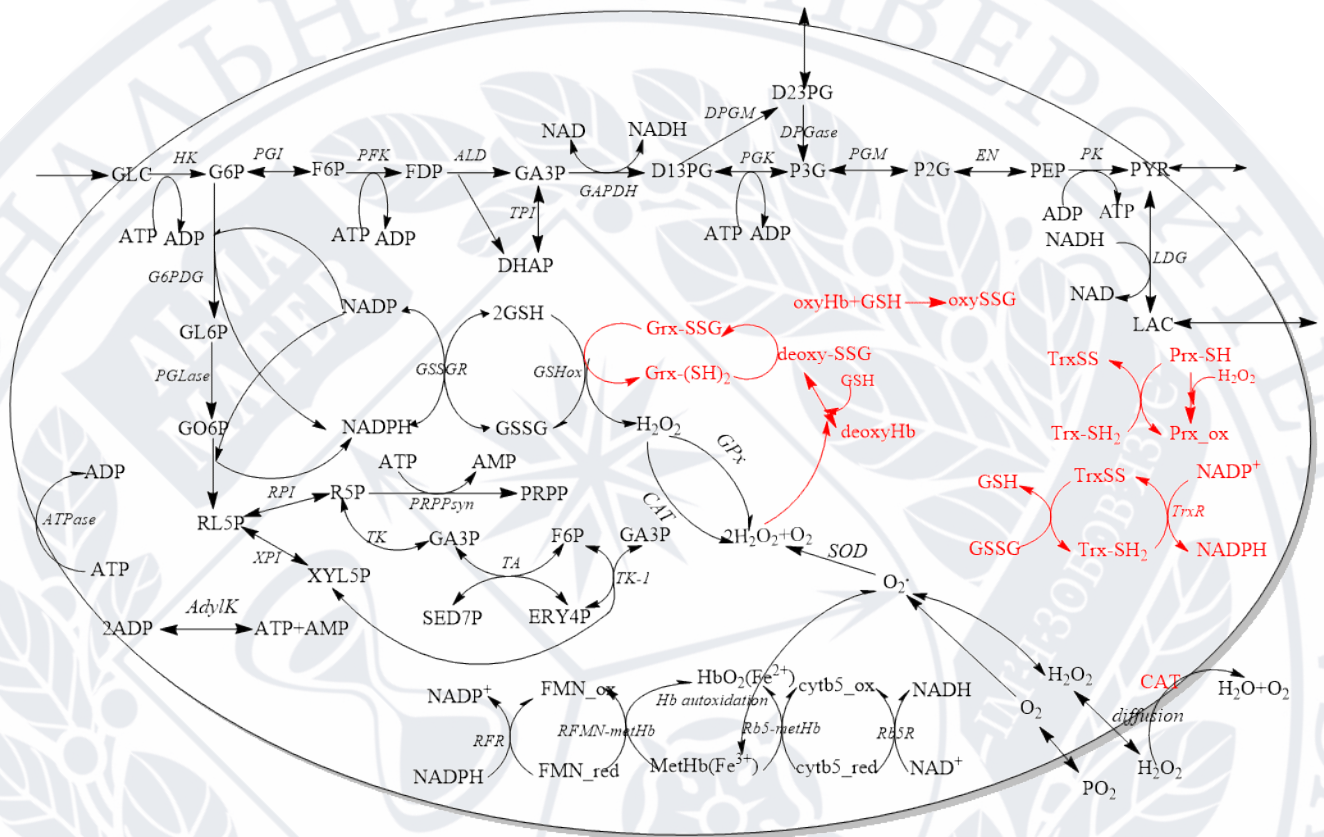


Рис. 3.6. Схематичне представлення процесів, включених в модель метаболізму еритроцитів. GLC- глюкоза; G6P- глюкозо-6-фосфат; F6P - фруктозо-6-фосфат; FDP - фруктозо-1,6-дифосфат; DHAP - дигідроксиацетон фосфат; GA3P - гліцеральдегід-3-фосфат; GL6P - глюконолактон-6-фосфат; GO6P - глюконат-6-фосфат; R5P - рибулозо-5-фосфат; R5P - рибозо-5- фосфат; X5P - ксилозо-5-фосфат; S7P - седогептулозо-7-фосфат; E4P - еритрозо-4-фосфат; PYR - піруват; LAC – лактат; cyt5- 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.

Найпоширеніший мембранний білок еритроцитів, білок смуги 3 (або, що еквівалентно, аніонообмінник 1 — AE1) має дуже кислий N-кінцевий цитозольний домен, який може служити інгібуючим місцем стикування для гліколітичних ферментів при високому насиченні киснем; навпаки, при низькому насиченні киснем дезоксигемоглобін витискає гліколітичні ферменти, з мембрани посилюючи гліколіз, щоб стимулювати виробництво АТФ і 2,3ВРГ у умовах гіпоксії [6, 30, 31]. Як відомо, тривалий непом'якшений окислювальний стрес, наприклад, під час зберігання еритроцитів у холодильнику в умовах банку крові, сприяє протеолізу N-кінця смуги 3, викликаному протеолітичними або активними формами кисню (АФК), що в кінцевому підсумку спричиняє втрату цієї залежної від кисню метаболічної модуляції еритроцитів. шляху [46].

Ці процеси, що безпосередньо залежать від вмісту кисню, представлені у моделі реакціями 62- 67 (табл.1, Додаток).

Антиоксидантні процеси представлені двома блоками: реакціями, що безпосередньо утилізують ендogenous перекис водню та реакціями за участю глутатіону, що залучається до процесів тіол-дисульфідного обміну.

Перший блок включає реакції елімінації H_2O_2 ферментами каталазою і супероксиддисмутазою та глутатіонпероксидазою (GPx). Супероксиддисмутаза каталізує процес дисмутації O_2^- , з утворенням екзогенного H_2O_2 , який потім відновлюється каталазою до води і екзогенного кисню. В еритроцитах каталазна і супероксиддисмутазна активність перерозподіляється між мембранозв'язаною і цитоплазматичною фракціями цих ферментів [31]. Цей шлях елімінації описаний попередньо в роботі [36] і використаний без змін.

GPx використовує GSH для відновлення перекису водню, переводячи відновлений глутатіон в окислену форму (GSSG). Дисульфід глутатіону згодом відновлюється за допомогою глутатіонрезуктази (GR) і NADPH. У моделі ця активність описана для цитоплазматичної фракції цих ферментів.

В цій моделі ми змінюємо кінетичний опис цього процесу. Кінетичне рівняння, що використано в моделі має наступний вигляд:

$$v_{GPx} = \frac{V_{\max} \cdot A \cdot B}{(K_{mA} + A) \cdot (K_{mB} + B) \cdot \left(1 + \frac{A}{Ki}\right)},$$

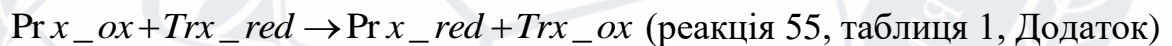
Де: A- H_2O_2 , B – GSH, V_{\max} – 5mM/h, K_{mA} - 0,02 mM, K_{mB} - 0,001 mM, Ki - $1 \cdot 10^6$ mM (константа гальмування активності глутатіонпероксидази H_2O_2).

Третій шлях видалення H_2O_2 представляє спільну роботу білків і ферментів, таких як пероксиредоксин (Prx), тіоредоксин (Trx), тіоредоксинредуктаза (TrxR) і NADPH. Вважали, що загальний вміст цитозольного Prx1 в еритроцитах складає 0,37·mM [41], а цитозольного Trx1 - 0,5 мкМ [42]. Цитозольні фракції цих білків представлені відновленою та окисленою формами.

Наступні реакції і їх кінетика були використані в моделі:



$$v \cdot = k \cdot [H_2O_2_in] \cdot [Prx_red], \text{ k- константа швидкості реакції.}$$



$$v \cdot = k \cdot [Prx_ox] \cdot [Trx_red], \text{ k- константа швидкості реакції.}$$



$$v \cdot = k \cdot [GSSG] \cdot [Trx_red], \text{ k- константа швидкості реакції.}$$

$Trx_ox + NADPH \rightarrow Trx_red + NADP^+ + H^+$ (реакція 57, таблиця 1, Додаток).

$$v_{TrxR} = \frac{V_{\max} [Trx_ox] \cdot [NADPH]}{(K_{mTrx} + [Trx_ox]) \cdot (K_{mNADPH} + [NADPH])}.$$

Процес глутатіонування гемоглобіну представлений реакціями (59-60 таблиця 1, Додаток):



Вважали, що глутатіонування ініціюється перекисом водню (окисненням). Причиною підвищення рівня глутатіонілювання вважають окислювальний стрес, який розвивається при патологічних станах [43]. За оксидативного стресу

підвищується ступінь глутатіонілування не лише гемоглобіну, а й ключових мембранних білків, а також білків клітинного цитоскелета (спектрину та анкірину), що впливає на реологічні властивості еритроцитів. Незважаючи на те, окислювальний стрес є однією з найпоширеніших причин глутатіонілування білків, яке захищає тіолові групи білків від необоротного окиснення та в деяких випадках змінює їх функціонування [43].

В роботі кінетику процесів глутатіонування окси- і дезоксигемоглобіну описували рівнянням:

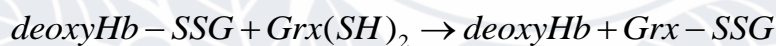
$$v \cdot = k_1 \cdot A \cdot B \cdot \left(1 + \frac{C}{Ka}\right) - k_2 \cdot D,$$

де k_1, k_2 – константи зв'язування і дисоціації глутатіону з окси- і дезоксигемоглобіном, взяті з [1], Ka – константа активації глутатіонування H_2O_2 , A, B – окси- і дезоксигемоглобін відповідно у мМ, C – H_2O_2 у мМ, D – глутатіонільована форма гемоглобіну, мМ.

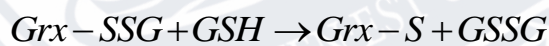
Глутатіонільована форма дезоксигемоглобіну має підвищену здатність до зв'язування кисню і це було враховано у моделі:



Вважали, що деглутатіонілування дезоксигемоглобіну відбувається за участю глутаредоксину [1], який потім відновлюється за участю глутатіону:



$$v \cdot = k \cdot [Grx(SH)_2] \cdot [deoxyHb - SSG]$$



$$v \cdot = k \cdot [Grx - SSG] \cdot [GSH]$$

3.4. Аналіз результатів моделювання

Однією з переваг моделі є можливість пропонувати кількісні оцінки внутрішньоклітинних метаболітів і потоків реакцій, залежно від умов функціонування дослідної системи. Стан гіпоксії моделювали шляхом змінення величини парціального тиску кисню.

Відтворити поведінку системи шляхом моделювання вдалося тільки у випадку концентрацій глюкози 2 мМ та 4 мМ. Тому далі результати моделювання будуть проаналізовані тільки за цих умов.

Глюкоза є основним джерелом енергії для еритроцитів, тому виснаження за глюкозою включає певні механізми, спрямовані на виживання клітин. Метаболічний стрес, викликаний нестачею глюкози, призводить до зниження рівня АТФ і глутатіону, який, в умовах відсутності окисного стресу, індукує глутатіонілування гемоглобіну. Завдяки тому, що глутатіонілування гемоглобіну змінює його спорідненість до кисню [43], цей процес може істотно змінювати функціональну активність еритроцитів. На тлі зниження АТФ також порушується робота транспортерів іонів, що призводить до збільшення внутрішньоклітинної концентрації Na^+ та об'єму еритроцитів. Метаболічний стрес підвищує ступінь глутатіонування білків еритроцитів, що може впливати на функціонування не лише гемоглобіну, а й інших компонентів цих клітин, зокрема транспорт іонів. За відсутності глюкози в середовищі відбувається інгібування глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (G6PD), яка є основним ферментом пентозофосфатного шляху, під час якого NADP^+ відновлюється до NADPH. Відомо, що зниження активності G6PD внаслідок мутацій або додавання інгібітора призводить до підвищення чутливості еритроцитів до окисативного стресу і, як наслідок, до посилення їх гемолізу. Це один із механізмів патогенезу гемолітичної анемії. Окисний стрес і гіпоксія додає свої механізми регуляції клітинного метаболізму. Відтворити ці механізми поки не вдалося.

На рис. 3.7. показаний вміст окисненого і відновленого глутатіону в клітинах залежно від вмісту кисню за результатами моделювання.

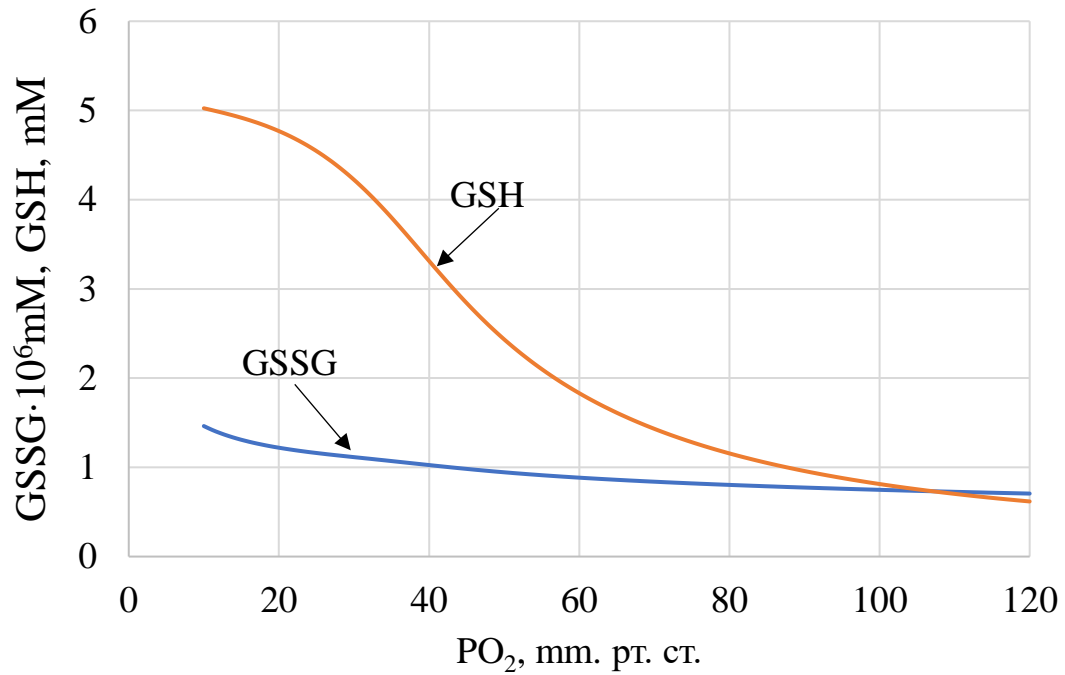


Рис. 3.7. Вміст окисненого (GSSG) і відновленого (GSH) глутатіону в клітинах залежно від вмісту кисню (PO₂).

Ми показуємо, що у стані гіпоксії за рахунок деглутатіонування кількість відновленого глутатіону зростає в декілька раз по відношенню до початкової концентрації GSH у клітині. Це дає можливість знизити окисні процеси у клітині (зокрема знизити вміст перекису водню) і набагато знизити рівень окисленої форми глутатіону. Отримані результати моделювання співпадають з експериментальними даними роботи і літературними даними.

На рис. 3.8 показані потоки через ферменти, що задіяні в реакціях відновлення глутатіону. Бачимо, що за наявності глюкози, глутатіонредуктаза не відповідальна за відновлення GSH у стані гіпоксії, а збільшення вмісту глутатіону забезпечує реакція деглутатіонування і тіоредоксинредуктаза, що відповідає за відновлення тіоредоксину. Тіоредоксин неферментативно відновлює глутатіон.

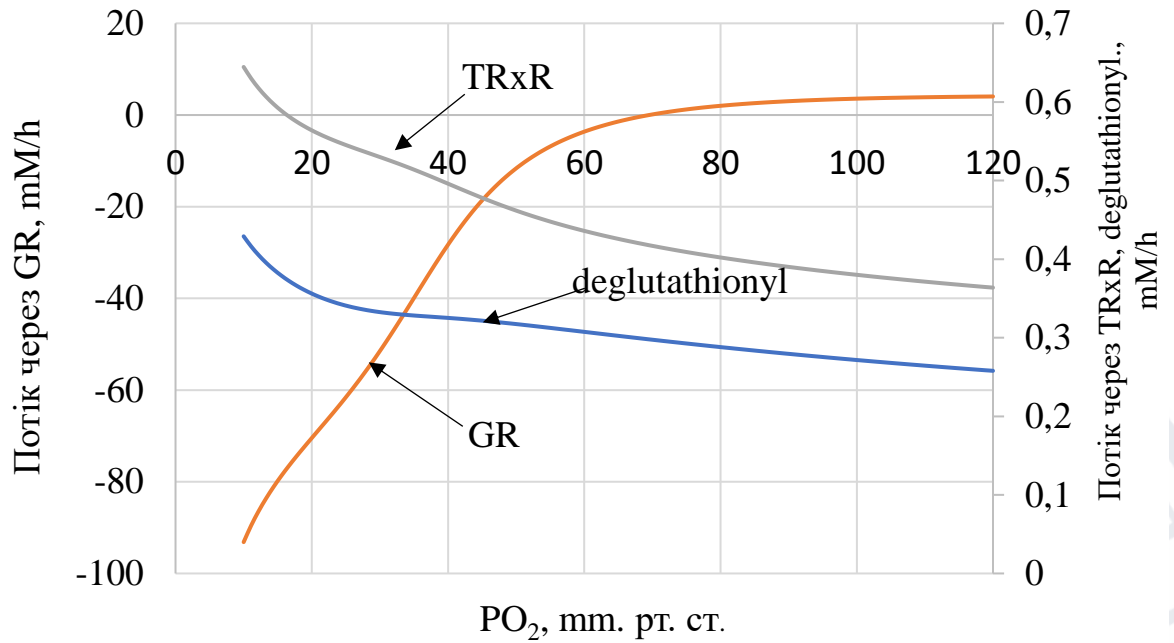


Рис. 3.8. Потоки через глутатіонредуктазу (GR), тіоредоксинредуктазу (TRxR) і реакцію деглутатіонування залежно від вмісту кисню.

На рис. 3.9 наведений вміст глутатіонільованих форм гемоглобіну залежно від вмісту кисню. Бачимо, що за умов гіпоксії вміст глутатіонільованого оксигемоглобіну суттєво знижується, що вказує на процеси деглутатіонування при гіпоксії.

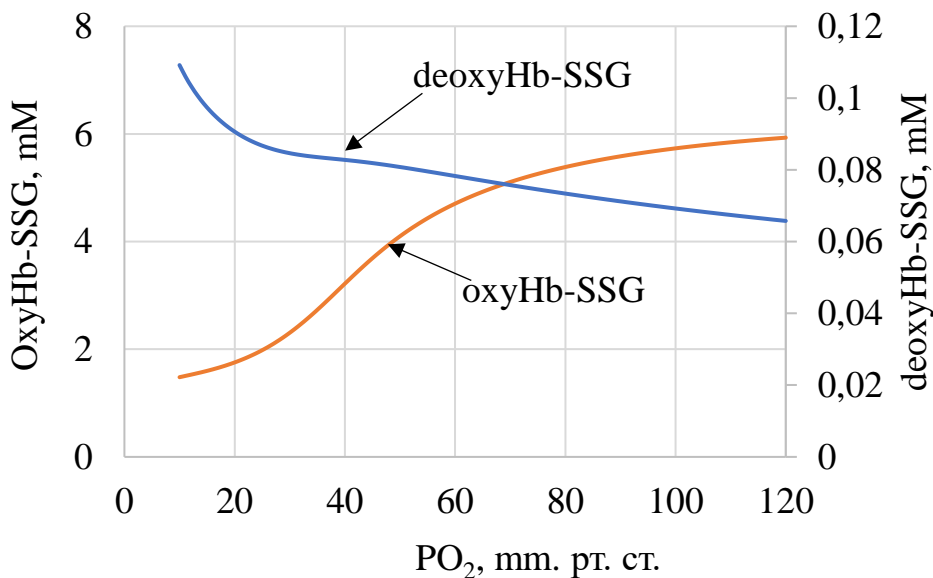


Рис. 3.9. Вміст глутатіонільованих форм гемоглобіну залежно від вмісту кисню за результатами моделювання.

NADPH стимулює численні антиоксидантні процеси в еритроцитах [46]: (i) він необхідний для відновлення окисленого глутатіону глутатіонредуктазами; (ii) він прямо чи опосередковано підживлює глутатіонпероксидазу, каталазу, пероксиредоксини, глутаредоксини, систему тіоредоксинредуктази, аскорбат-токоферольну вісь. NAD(P)H-залежні метгемоглобінредуктази також важливі для перетворення (аутоокисненого) тривалентного заліза гемоглобіну назад у двовалентний стан.

Тому, ми аналізуємо вміст цього метаболіту при гіпоксії в умовах відсутності метаболічного стресу. На рис. 3.10 наведені зміни вмісту NADPH в клітинах за результатами моделювання.

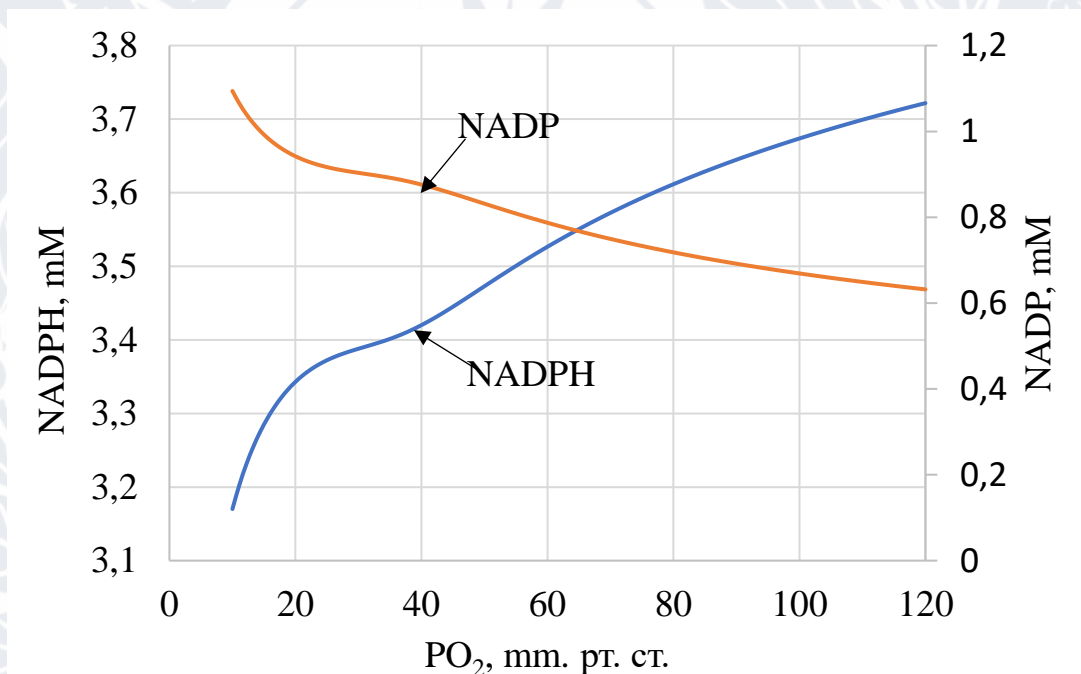


Рис. 3.10. Вміст NADPH (мМ) в клітинах за результатами моделювання.

Отримані результати свідчать, що вміст NADPH дуже сильно знижується у відповідь на гіпоксію, незважаючи на відсутність метаболічного стресу.

ВИСНОВКИ

1. Експериментальні дослідження вмісту відновленого глутатіону і SH-груп білків еритроцитів показало, що вміст цих показників суттєво залежить від наявності і кількості глюкози в середовищі інкубування. Показано, що процеси деглутатіонування гемоглобіну керуються складними механізмами.
2. Показано, що за умов наявності глюкози (2 та 4 мМ) та роботи систем антиоксидантного захисту в еритроцитах якісно елімінуються активні форми кисню, зокрема перекис водню. За цих умов глутатіонування ініціюється гіпоксією.
3. Створена математична метаболічна модель, яка відтворює роботу системи тіол-дисульфідного обміну в еритроцитах і деглутатіонування. Модель створена в програмі COPASI та складається з 70 диференціальних рівнянь. Стан гіпоксії моделювали шляхом змінення величини парціального тиску кисню.
4. Показано, що результати моделювання відтворюють експериментальні дані, отримані за умов відсутності окисного і метаболічного стресу. Відтворити поведінку системи шляхом моделювання за наявності окисного і метаболічного стресу не вдалося.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. 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.
2. van Zwieten R, Verhoeven AJ, Roos D. Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells. *Free Radic Biol Med*. 2014 Feb;67:377-86. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.022.
3. Xiong, Y., Uys, J. D., Tew, K. D., & Townsend, D. M. (2011). S-glutathionylation: from molecular mechanisms to health outcomes. *Antioxidants & redox signaling*, 15(1), 233–270.
4. Giustarini D., Dalle-Donne I., Milzani A., Braconi D., Santucci A., & Rossi R. (2019). Membrane skeletal protein S-glutathionylation in human red blood cells as index of oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 32, 1096–1102.
5. Anashkina, A. A., Kaluzhny, D. N., Parshina, E. Y., Maksimov, G. V., Mitkevich, V. A., Makarov, A. A., & Petrushanko, I. Y. (2023). Changes in Hemoglobin Properties in Complex with Glutathione and after Glutathionylation. *International journal of molecular sciences*, 24(17), 13557.
6. 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.
7. Zaripov, P. I., Kuleshova, Y. D., Poluektov, Y. M., Sidorenko, S. V., Kvan, O. K., Maksimov, G. V., Mitkevich, V. A., Makarov, A. A., & Petrushanko, I. Y. (2023). *Molekuliarnaia biologii*, 57(6), 1188–1198.
8. 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.

9. Gleitzmann J.; Raab A.; Schulze D.; Wätzig H.; Feldmann J.; Swart C. (2016). Accurate and Precise Quantification of Cu,Zn-SOD in Human Red Blood Cells Using Species-Specific Double and Triple IDMS. *J. Anal. At. Spectrom.*, 31 (9), 1922–1928.
10. Eleutherio E. C. A.; Silva Magalhães R. S.; de Araújo Brasil A.; Monteiro Neto J. R.; de Holanda Paranhos L. SOD1, More than Just an Antioxidant. *Arch. Biochem. Biophys.* 2021, 697, 108701.
11. Nedd S.; Redler R. L.; Proctor E. A.; Dokholyan N. V.; Alexandrova A. N. Cu,Zn-Superoxide Dismutase without Zn Is Folded but Catalytically Inactive. *J. Mol. Biol.* 2014, 426 (24), 4112–4124.
12. Bryk A. H.; Wiśniewski J. R. Quantitative Analysis of Human Red Blood Cell Proteome. *J. Proteome Res.* 2017, 16 (8), 2752–2761.
13. Hofmann B.; Hecht H.-J.; Flohé L. Peroxiredoxins. *Biol. Chem.* 2002, 383 (3–4), 347–364.
14. Wood Z. A.; Poole L. B.; Hantgan R. R.; Karplus P. A. Dimers to Doughnuts: Redox-Sensitive Oligomerization of 2-Cysteine Peroxiredoxins. *Biochemistry* 2002, 41 (17), 5493.
15. Han Y.-H.; Kim S.-U.; Kwon T.-H.; Lee D.-S.; Ha H.-L.; Park D.-S.; Woo E.-J.; Lee S.-H.; Kim J.-M.; Chae H.-B.; Lee S. Y.; Kim B. Y.; Yoon D. Y.; Rhee S. G.; Fibach E.; Yu D.-Y. Peroxiredoxin II Is Essential for Preventing Hemolytic Anemia from Oxidative Stress through Maintaining Hemoglobin Stability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012, 426 (3), 427–432.
16. Rinalducci S.; D'Amici G. M.; Blasi B.; Vaglio S.; Grazzini G.; Zolla L. Peroxiredoxin-2 as a Candidate Biomarker to Test Oxidative Stress Levels of Stored Red Blood Cells under Blood Bank Conditions. *Transfusion* 2011, 51 (7), 1439–1449.
17. Zhong L.; Arnér E. S. J.; Holmgren A. Structure and Mechanism of Mammalian Thioredoxin Reductase: The Active Site Is a Redox-Active Selenolthiol/Selenenylsulfide Formed from the Conserved Cysteine-Selenocysteine Sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000, 97 (11), 5854–5859.
18. Lu J.; Holmgren A. The Thioredoxin Antioxidant System. *Free Radical Biol. Med.* 2014, 66, 75–87.

19. Weaver K. & Skouta R. (2022). The Selenoprotein Glutathione Peroxidase 4: From Molecular Mechanisms to Novel Therapeutic Opportunities. *Biomedicines*, 10 (4), 891.
20. Deponce M. Glutathione Catalysis and the Reaction Mechanisms of Glutathione-Dependent Enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, 1830 (5), 3217–3266.
21. Stolwijk J. M.; Stefely J. A.; Veling M. T.; van't Erve T. J.; Wagner B. A.; Raife T. J.; Buettner G. R. Red Blood Cells Contain Enzymatically Active GPx4 Whose Abundance Anticorrelates with Hemolysis during Blood Bank Storage. *Redox Biol.* 2021, 46, 102073.
22. Gallogly M. M.; Starke D. W.; Mieryl J. J. Mechanistic and Kinetic Details of Catalysis of Thiol-Disulfide Exchange by Glutaredoxins and Potential Mechanisms of Regulation. *Antioxid Redox Signal* 2009, 11 (5), 1059–1081.
23. Lillig C. H.; Berndt C. Glutaredoxins in Thiol/Disulfide Exchange. *Antioxid Redox Signal* 2013, 18 (13), 1654–1665.
24. Haunhorst P.; Hanschmann E.-M.; Bräutigam L.; Stehling O.; Hoffmann B.; Mühlenhoff U.; Lill R.; Berndt C.; Lillig C. H. Crucial Function of Vertebrate Glutaredoxin 3 (PICOT) in Iron Homeostasis and Hemoglobin Maturation. *Mol. Biol. Cell* 2013, 24 (12), 1895–1903.
25. Amen F.; Machin A.; Touriño C.; Rodríguez I.; Denicola A.; Thomson L. N-Acetylcysteine Improves the Quality of Red Blood Cells Stored for Transfusion. *Arch. Biochem. Biophys.* 2017, 621, 31–37.
26. van 't Erve T. J.; Wagner B. A.; Ryckman K. K.; Raife T. J.; Buettner G. R. The Concentration of Glutathione in Human Erythrocytes Is a Heritable Trait. *Free Radic Biol. Med.* 2013, 65, 742–749.
27. Lu S.C. Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med.* 2009. Vol. 30, № 1–2. P. 42–5
28. Oppong D., Schiff W., Shivamadhu M.C., Ahn Y.-H. Chemistry and Biology of Enzymes in Protein Glutathionylation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2023;75:102326.

29. Peimian OU, Wolff S.P. Erythrocyte catalase inactivation (H_2O_2 production) by ascorbic acid and glucose in the presence of aminotriazole: role of transition metals and relevance to diabetes // *Biochem. J.*- 1994.- 303.- P. 935-940.

30. 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.

31. 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.

32. Разыграев А. В., Арутюнян А. В. (2006). Определение глутатионпероксидазной активности в сыворотке крови человека с использованием пероксида водорода и 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной) кислоты. *Клинич. лаб. Диагностика*, 6, С. 13–16.

33. Wolff, S. P. (1994). [18] Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Oxygen Radicals in Biological Systems Part C*, 182–189.

34. Bou, R., Codony, R., Tres, A., Decker, E. A., & Guardiola, F. (2008). Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation–xylenol orange method: A review of the factors that influence the method's performance. *Analytical Biochemistry*, 377(1), 1–15.

35. Holzhütter H.G. The principle of flux minimization and its application to estimate stationary fluxes in metabolic networks/ H.G. Holzhütter // *Eur. J. Biochem.*– 2004.–v. 271.– P. 2905–2922.

36. Olga Dotsenko. In silico modeling of the redox metabolism in human erythrocytes. // *EUREKA: Life Sciences.* - 2016. - N 1. - P. 39-46.

37. 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.

38. Melo, D., Rocha, S., Coimbra, S., & Santos Silva, A. (2019). Interplay between Erythrocyte Peroxidases and Membrane. In A. Tombak, (Ed.). Erythrocyte. IntechOpen, London, UK.

39. Kuleshova, I. D., Zaripov, P. I., Poluektov, Y. M., Anashkina, A. A., Kaluzhny, D. N., Parshina, E. Y., Maksimov, G. V., Mitkevich, V. A., Makarov, A. A., & Petrushanko, I. Y. (2023). Changes in Hemoglobin Properties in Complex with Glutathione and after Glutathionylation. *International journal of molecular sciences*, 24(17), 13557.

40. Kemp M. Go YM. Jones DP. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. // *Free Radic Biol Med*. 2008. 44. P.921–937.

41. Benfeitás R. M. V. The physiological role of peroxiredoxin 2 in human erythrocytes: a kinetic analysis. - *Teses de mestrado*, 2011.- 173 c.

42. Watson WH. Yang X. Choi YE. Jones DP. Kehrer JP. (2004). Thioredoxin and its role in toxicology. *Toxicol Sci*, 78, P. 3–14.

43. Zaripov, P. I., Kuleshova, Y. D., Poluektov, Y. M., Sidorenko, S. V., Kvan, O. K., Maksimov, G. V., Mitkevich, V. A., Makarov, A. A., & Petrushanko, I. Y. (2023). *Molekuliarnaia biologii*, 57(6), 1188–1198.

44. 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.

45. 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.

46. 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.

ДОДАТОК



Таблиця 1. Основні реакції, включені в модель, і ферменти, що відповідають їм

Реакція	Фермент/Характеристика	
1. Шлях Ембдена-Мейергоффа (Гліколіз)		
1. $\text{Glc}_{\text{out}} \leftrightarrow \text{Glc}_{\text{in}}$	Транспорт глюкози	Glucose_tr
2. $\text{Glc}_{\text{in}} + \text{MgATP} \rightarrow \text{G6P} + \text{MgADP} \{ \text{Mg} \}, \{ \text{D23PG} \}, \{ \text{MgGri23P2} \}$	Гексокіназа	HK
3. $\text{G6P} \leftrightarrow \text{F6P}$	Глюкозофосфат ізомераза	PGI
4. $\text{F6P} + \text{MgATP} \rightarrow \text{FDP} + \text{MgADP} \{ \text{ATP} \}, \{ \text{Mg} \}, \{ \text{AMP} \}, \{ \text{MgAMP} \}$	Фосфофруктокіназа	PFK
5. $\text{FDP} \leftrightarrow \text{GA3P} + \text{DHAP}$	Альдолаза	ALD
6. $\text{DHAP} \leftrightarrow \text{GA3P}$	Тріозофосфатізомераза	TPI
7. $\text{GA3P} + \text{Pi} + \text{NAD}^+ \leftrightarrow \text{D13PG} + \text{NADH}$	Гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа	GAPDH
8. $\text{D13PG} + \text{MgADP} \leftrightarrow \text{P3G} + \text{MgATP}$	Фосфогліцераткіназа	PGK
9. $\text{P3G} \leftrightarrow \text{P2G} \{ \text{MgGri23P2} \}$	Фосфогліцератмутаза	PGM
10. $\text{P2G} \leftrightarrow \text{PEP}$	Енолаза	EN
11. $\text{PEP} + \text{MgADP} \rightarrow \text{PYR} + \text{MgATP} \{ \text{ATP} \}, \{ \text{F6P} \}$	Піруваткіназа	PK
12. $\text{PYR} + \text{NADH} \rightarrow \text{LAC} + \text{NAD}^+$	Лактатдегідрогеназа	LDG
13. $\text{PYR} + \text{NADPH} \rightarrow \text{LAC} + \text{NADP}$	Лактатдегідрогеназа	LDG
2. 2,3-Діфосфогліцератний шунт		
14. $\text{D13PG} \rightarrow \text{D23PG}$	Діфосфогліцератмутаза	DPGM
15. $\text{D23PG} \rightarrow \text{P3G} + \text{Pi}$	Діфосфогліцератфосфатаза	DPGase
3. Пентозофосфатний шлях		
16. $\text{G6P} + \text{NADP} \rightarrow \text{GL6P} + \text{NADPH} \{ \text{ATP} \}, \{ \text{MgATP} \}, \{ \text{D23PG} \}, \{ \text{MgGri23P2} \}$	Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа	G6PDH
17. $\text{GL6P} + \text{NADP} \rightarrow \text{RL5P} + \text{NADPH} \{ \text{ATP} \}, \{ \text{MgATP} \}, \{ \text{D23PG} \}, \{ \text{MgGri23P2} \}$	Фосфоглюконатдегідрогеназа	GL6PDH

Реакція	Фермент/Характеристика	
18. RL5P \leftrightarrow XYL5P	Фосфорibuлозо епімераза	XPI
19. RL5P \leftrightarrow R5P	Рибозофосфат ізомераза	RPI
20. XYL5P + R5P \leftrightarrow SED7P + GA3P	Транскетолаза 1	TK 1
21. SED7P + GA3P \leftrightarrow F6P + ERY4P	Трансальдолаза	TA
22. XYL5P + ERY4P \leftrightarrow F6P + GA3P	Транскетолаза 2	TK 2
4. Нуклеотидний метаболізм		
23. R5P + MgATP \rightarrow PRPP + MgAMP	Фосфорибозилпірофо сфат синтаза	PRPPsyn
24. MgATP + AMP \leftrightarrow MgADP + ADP	Аденілаткіназа	AdylK
5. Клітинні функції		
25. MgATP \rightarrow Pi + MgADP	АТФ-аза	ATPase
26. GSSG + NADPH \leftrightarrow 2GSH + NADP	Глутатіонредук таза	GSSG-R
27. 2GSH + O ₂ _in \rightarrow GSSG + H ₂ O ₂	Аутоокислення глутатіона	GSH_ox
28. Pi_out \leftrightarrow Pi_in	Обмін фосфата	Pi_ex
29. LAC_out \leftrightarrow LAC_in	Обмін лактата	LAC_ex
30. PYR_out \leftrightarrow PYR_in	Обмін пірувата	PYR_ex
31. MgATP \leftrightarrow Mg + ATP	Дисоціація MgATP	
32. MgADP \leftrightarrow Mg + ADP	Дисоціація MgADP	
33. MgAMP \leftrightarrow Mg + AMP	Дисоціація MgAMP	
34. MgGri23P2 \leftrightarrow Mg + D23PG	Дисоціація Gri23P2	Mg
35. Protein1-NADPH \leftrightarrow Protein1 + NADPH		
36. Protein1-NADP \leftrightarrow Protein1 + NADP		
37. Protein2-NADPH \leftrightarrow Protein1 + NADPH		
38. Protein2-NADP \leftrightarrow Protein1 + NADP		
6. Реакції за участю гемоглобіну		

Реакція	Фермент/Характеристика	
39. $O_{2_out} \rightleftharpoons O_{2_in}$	Дифузія O_2	
40. $O_{2_in} + Hb \rightleftharpoons HbO_2$	Утворення і дисоціація оксигемоглобіну	
41. $deoxyHbSSG + O_{2_in} \rightleftharpoons oxyHbSSG$	Оксигенація гутатіонільованого гемоглобіну	
42. $HbO_2 \rightarrow MetHb + O_2\cdot$	Аутоокислення гемоглобіну	
43. $Hb + O_2 \rightarrow MetHb + H_2O_2$	Окислення гемоглобіну	Hb_ox
44. $MetHb + FMNred \rightarrow Hb + FMNox$	Неферментативний процес	
45. $FMNox + NADPH \rightarrow FMNred + NADP$	Флавінметгемоглобін редуктаза	RFMN-metHb
46. $MetHb + cytb5red \rightarrow Hb + cytb5ox$	Неферментативний процес	
47. $cytb5ox + NADH \rightarrow cytb5red + NAD^+$	Цитохром-б5-метгемоглобін редуктаза	Rb5-metHb
48. $deoxyHb + D23PG \rightarrow deoxyHb_D23PG$		
49. $oxyHb + D23PG \rightarrow deoxyHb_D23PG + O_{2_in}$		
7. Метаболізм ендogenous H_2O_2		
50. $H_2O_{2_out} \rightleftharpoons H_2O_{2_in}$	Дифузія H_2O_2	
51. $2O_2\cdot + 2H^+ \rightarrow H_2O_{2_in}$	Супероксиддисмутаза	SOD
52. $2GSH + H_2O_{2_in} \rightarrow GSSG + H_2O$	Глутатіонпероксидаза	GPx
53. $2H_2O_{2_in} \rightarrow O_2 + 2H_2O$	Каталаза	Cat
8. Метаболізм Глутатіону та тіол-дисульфідний обмін		
54. $H_2O_2 + Prx_red \rightarrow H_2O + Prx_ox$	Пероксиредоксин	Prx
55. $Prx_ox + Trx_red \rightarrow Prx_red + Trx_ox$	Тіоредоксин	Trx

Реакція	Фермент/Характеристика	
56. $GSSG + Trx_{red} \rightarrow 2GSH + Trx_{ox}$	Тіоредоксин	Trx
57. $Trx_{ox} + NADPH \rightarrow Trx_{red} + NADP^+ + H^+$	Тіоредоксинредуктаза	TrR
58. $OxyHb + GSH \rightarrow OxyHbSSG; H_2O_2_{in}$	Глутатіонілювання	
59. $deOxyHb + GSH \rightarrow deOxyHbSSG; H_2O_2_{in}$	Глутатіонілювання	
60. $deOxyHbSSG + Grx_{red} \rightarrow deOxyHb + Grx_{ox}$	Деглутатіонування дезоксиHb	Grx
61. $Grx_{ox} + GSH \rightarrow GSSG + Grx_{red}$	Глутаредоксин	Grx
9. Взаємодія з білком смуги 3 і мембраною		
62. $Band3 + ALD = Band3_ALD$		
63. $Band3 + GAPDG = Band3_GAPDG$		
64. $Band3 + PFK = Band3_PFK$		
65. $Band3 + LDG = Band3_LDG$		
66. $Band3 + deoxyHb = Band3_deoxyHb$		
67. $Band3 + oxyHb = Band3_oxyHb$		
68. $2H_2O_2_{out} \rightarrow O_2 + 2H_2O$	Каталаза	Cat_m