

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА

БОЦЮРА ГАЛИНА ІВАНІВНА

Допускається до захисту
завідувач кафедри біофізики і
фізіології,
к.х.н., доцент
Доценко О. І.
« » 2025

МАТЕМАТИЧНА МОДЕЛЬ КОТРАНСПОРТУ ПРОТОН-СУЛЬФАТ В
ЕРИТРОЦИТАХ ЛЮДИНИ
Спеціальність 091 Біологія
Магістерська робота

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

Оцінка: / /
(бал/за шкалою ЄКТС/за національною шкалою)
Голова Е.К.:
(підпис)

Вінниця 2025

Боцюра Г.І. Математична модель котранспорту протон-сульфат в еритроцитах людини. 091 Біологія. Донецький національний університет імені Василя Стуса. Вінниця. 2025.

Еритроцити інкубували в середовищі Na-фосфатного буферу (0.015 М, рН 7.4), що містив 0.15 М NaCl без глюкози. Продовж 3-х годин інкубування тестували здатність клітин до аніонного обміну, кількість поглинутого SO_4^{2-} . Для оцінки аніонного обміну створена математична модель, яка передбачає пошук кінетичних параметрів, з використанням методів пошукової оптимізації.

Отримані результати свідчать, що під впливом осмотичного, метаболічного стресу та гіпоксії уповільнюється робота аніонного обмінника AE1, що відображується у зниженні константи швидкості обміну HCO_3^- / Cl^- , V_{max} обміну $H^+, SO_4^{2-} / Cl^-$. Прогнозоване зниження вмісту SO_4^{2-} -іонів в клітинах підтверджується експериментальними даними. За результатами моделювання, інкубування клітин приводить до активації $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -котранспортера і Na^+ / H^+ – обмінника, і гальмування потоку через K^+, Cl^- -котранспортер.

Botsiura G.I. Mathematical model of proton-sulfate cotransport in human erythrocytes. 091 Biology. Vasyl Stus Donetsk National University. Vinnytsia. 2025.

Erythrocytes were incubated in a medium of Na-phosphate buffer (0.015 M, pH 7.4) containing 0.15 M NaCl without glucose. During 3 hours of incubation the ability of cells to anion exchange, the amount uptake of SO_4^{2-} . To assess anion exchange a mathematical model was created that involves the search for kinetic parameters using search optimization methods.

The results obtained indicate that under the influence of osmotic, metabolic stress and hypoxia, the work of the anion exchanger AE1 slows down, which is reflected in a decrease in the exchange rate constant HCO_3^- / Cl^- , V_{max} , $H^+, SO_4^{2-} / Cl^-$ exchange. The predicted decrease in the content of SO_4^{2-} -ions in cells is confirmed

by experimental data. According to the modeling results, incubation of cells leads to activation of the $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -cotransporter and Na^+/H^+ -exchanger, and inhibition of the flux through the $K^+, 2Cl^-$ -cotransporter.



ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1. Будова і функції білка смуги 3	7
1.2. Білок смуги 3. Структура та функції	10
1.3. Взаємодія AE1 та гемоглобіну	15
1.4. Вимірювання аніонного обміну $\text{H}^+/\text{SO}_4^{2-}/\text{Cl}^-$ через B3p	17
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	
2.1. Експериментальні методи дослідження	21
2.2. Математична модель та методи моделювання	22
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТУ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	
3.1. Розробка математичної моделі котранспорту протон-сульфат в еритроцитах людини	24
3.2. Апробація моделі	29
3.3. Обговорення результатів дослідження	33
ВИСНОВКИ	38
ЛІТЕРАТУРА	39

ВСТУП

Білок смуги 3 (B3p, AE1) є основним трансмембранним білком, який займає четверть площі поверхні еритроциту (RBC) [1, 2]. Bp3 відповідальний за газообмін, іонний баланс, осмотичні та механічні властивості еритроцитів [3 - 5]. В зв'язку з цим навіть незначні модифікації його регуляторних сайтів призводять до змінення структури і функцій клітин [6]. Білок смуги 3 складається з трьох доменів: трансмембранного домену, що пронизує мембрану та здійснює $\text{HCO}_3^- / \text{Cl}^-$ обмін, короткого С-кінцевого та довгого N-кінцевого цитоплазматичних доменів [2]. С-кінцевий цитоплазматичний домен зв'язує карбоангідазу II, N-кінцевий цитоплазматичний домен зв'язує гліколітичні ферменти, Hb та геміхроми. Обмін Cl^- на HCO_3^- за участю білка AE1 мембрани еритроцита є частиною процесу переносу CO_2 в крові [7]. Існують і інші способи AE1-опосередкованого транспорту, в тому числі аніонної провідності, H^+ / Cl^- і $\text{H}^+ / \text{SO}_4^{2-}$ - котранспорт. Ці потоки набагато повільніші, ніж обмінний потік $\text{HCO}_3^- / \text{Cl}^-$, однак ці потоки являють інтерес, так як розуміння альтернативних видів транспорту потенційно може дати уявлення про нормальний каталітичний механізм AE1 [3, 8]. Таким чином, здатність B3p до аніонного обміну можна оцінити шляхом вимірювання поглинання SO_4^{2-} , яке є повільнішим і його легше виявити порівняно з поглинанням бікарбонату або хлориду [7]. Обмін $\text{SO}_4^{2-} / \text{Cl}^-$ не є електрогенним, оскільки приплив SO_4^{2-} супроводжується котранспортом H^+ [1].

Показано [9], що залежно від природи стресових чинників, швидкість аніонного обміну $\text{H}^+, \text{SO}_4^{2-} / \text{Cl}^-$ може як знижуватися, так і прискорюватися. Зокрема, індукований H_2O_2 окислювальний стрес приводить до зниження константи швидкості поглинання SO_4^{2-} [3], тоді як під дією високого вмісту глюкози аніонний обмін прискорюється [10]. В зв'язку з цим, оцінка функції B3p за допомогою вимірювання поглинання SO_4^{2-} пропонується як інструмент для моніторингу впливу різних факторів на еритроцити [3, 8- 10].

В роботі для аналізу функціональних змін білка смуги 3 еритроцитів за стресових умов пропонується поєднати метод вимірювання позаклітинного рН з розробленою математичною моделлю, що описує транспорт SO_4^{2-} -іонів. Поєднання обчислювальних підходів із наявними експериментальними даними створює потенціал для глибокого розуміння як молекулярних механізмів, так і інтегративної фізіології транспорту аніонів за участю ВЗр.

Мета роботи полягала в дослідженні швидкості аніонного обміну $H^+, SO_4^{2-} / Cl^-$ в еритроцитах, що знаходилися в умовах осмотичного і метаболічного стресу за шляхом математичного моделювання.

Задачі дослідження:

1. Отримання експериментальних залежностей транспорту протонів через AE1 в еритроцитах в сульфатному середовищі.
2. Побудова математичної моделі транспорту протонів в еритроцитах, що знаходяться в сульфатній середовищі.
3. Апробування моделі на експериментальних даних, пошук кінетичних параметрів транспорту протонів методом оптимізації параметрів.
4. Дослідження впливу середовища інкубування, що не містить глюкозу на здатність AE1 до транспортування протонів.

Об'єкт дослідження - еритроцити людини.

Предмет дослідження - дослідження швидкості аніонного обміну $H^+, SO_4^{2-} / Cl^-$ в еритроцитах, що знаходилися в умовах осмотичного і метаболічного стресу за шляхом математичного моделювання.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Будова і функції білка смуги 3

Еритроцитарна мембрана відповідає за антигенний транспорт та механічні властивості. Вона відіграє важливу роль у складній динаміці біології еритроцитів. Мембрана складається з двох доменів: ліпідного бішару та цитоскелету. Ліпідний бішар складається з гідрофільних периферичних білків всередині, гідрофобних інтегральних білків посередині (головним чином смуги 3 та глікофоринів) та зовнішніх гідрофільних білків. Цитоскелет складається зі специфічних периферичних білків, включаючи спектрин, анкірин, актин та смуги 4.1R, 4.2 [11, 12].

При вивченні трансмембранних білків еритроцитів людини за допомогою SDS-поліакриламідного гелю-електрофорезу виділяють близько 15 основних білкових смужок, молекулярна маса яких коливається в межах 15 000-250 000 дальтон. Три з цих білків — спектрин, глікофорин та білок band 3 — становлять більше як 60% (по масі) всіх мембранних білків [13].

Більшість білкових молекул, які взаємодіють з мембраною еритроцитів людини, є периферійними мембранними білками, котрі приєднуються до цитозольної поверхні ліпідного бішару. Найпоширенішим з таких білків є спектрин, довгий, тонкий та гнучкий білок завдовжки приблизно 100 нм, частка якого за масою становить близько 25% маси всіх мембранно-асоційованих білків (близько $2,5 \cdot 10^5$ копій у кожній клітині). Це основний компонент білкової сітки (цитоскелета), яка залягає під мембраною еритроцита і, таким чином, підтримує його структурну цілісність та двовігнуту форму. Якщо цитоскелет дисоціює, вивільняючись з тіні еритроцита, у розчинах з малою іонною силою, мембрана розпадається на маленькі пухирці.

Спектрин є гетеродимером, утвореним двома великими структурно подібними субодиницями. Гетеродимери самозбираються головка-до-головки, формуючи тетрамери, завдовжки 200 нм. Хвостові кінці чотирьох або п'яти

тетраметрів сполучаються в одній точці, приєднуючись до коротких актинових філаментів та зв'язуючись з іншими білками цитоскелета (зокрема і з білком band 4.1), з утворенням "вузлового комплексу". В кінцевому наслідку утворюється гнучка сітка, яка складає основу всієї цитозольної поверхні мембрани (рис. 1.1). Це і є спектриновий цитоскелет, який дає можливість еритроциту витримувати навантаження, які діють на його мембрану при проходженні по вузьких капілярах. Миші та люди з генетичними вадами, що проявляються у дефектах структури спектрину, страждають від анемії, а їх еритроцити мають сферичну форму (замість форми двоввігнутого диска) і є дуже нестабільними; важкість такої анемії зростає пропорційно дефектності.

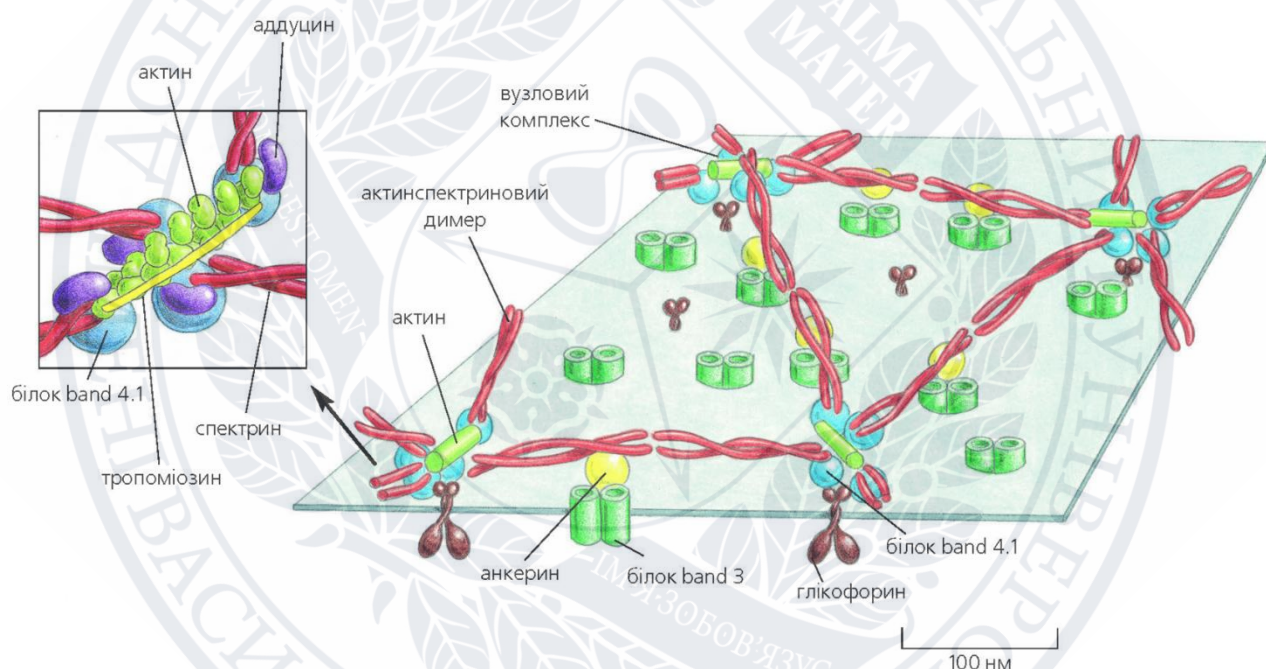


Рис. 1.1. Спектриновий цитоскелет цитозольної частини мембрани людського еритроцита [13].

Білок, який відповідає за зв'язування спектринового цитоскелета з мембраною еритроцитів, був відкритий під час вивчення зв'язування міченого радіоактивним маркером спектрину з еритроцитарними мембранами, очищеними від спектрину та багатьох інших білків. У цих експериментах було показано, що зв'язування спектрину залежить від приєднання великої кількості внутрішньоклітинного білка анкерину, який приєднується як до спектрину, так і

до цитозольного домену трансмембранного білка band3 (рис. 1.1). Зв'язуючи деякі молекули band3 зі спектрином, анкерин приєднує спектринову сітку до мембрани; це також сильно зменшує рухомість молекул band 3 у ліпідному бішарі. Анкірин відіграє вирішальну роль у зв'язку спектрин-актинового кортикального цитоскелету з цитоплазматичними доменами інтегральних мембранних білків. Він утворює місток між молекулами адгезії та іонними каналами та інтегрує структурні та функціональні компоненти мембрани еритроцитів [11].

Спектриновий цитоскелет приєднується до мембрани також за допомогою іншого механізму, який залежить від білка band 4.1. Цей білок, зв'язуючись із спектрином та актином, приєднується і до цитозольних доменів band 3 і глікофорину — іншого важливого білка еритроцитарної мембрани [13].

Глікофорини, також відомі як сіалоглікопротеїни, становлять приблизно 2% від загальної кількості мембранних білків в еритроцитах. Ці білки розташовані в актинових сполучних комплексах, діючи як якорі, що з'єднують цитоскелет з ліпідним бішаром. Аміно-кінці глікофоринів служать місцями зв'язування антигенів груп крові ABO та MN. Внутрішній карбоксильний кінець звернений до цитоплазми та взаємодіє з цитоскелетом [11].

Білок band 3 відіграє важливу роль у забезпеченні функцій еритроцитів. Подібно до глікофорину, Band 3 є трансмембранним білком, проте будучи мультипрохідним, пронизує мембрану у формі щільно згорнутої конформації. Вважають, що його поліпептидний ланцюг (завдовжки близько 930 амінокислотних залишків) перетинає бішар 12 разів. У еритроцитах AE1 повної довжини експресується у вигляді олігомерів (ди- та тетрамерів). Димери взаємодіють із цитозольними ферментами (такими як альдолаза, гліцеральдегіде-3-фосфатдегідрогеназа та карбоангідраза) як на С-, так і на N-кінцеві частини білка, тоді як тетрамери взаємодіють з білком 4.2 і анкірином, прикріплюючи комплекс (і, таким чином, мембрану) до цитоскелету. Взаємодія між AE1 і анкірином (і, таким чином, цитоскелетом) також була показана в клітинах нирок. Це особливо важливо, оскільки деякі мутації в локусі SLC4A1 призводять до

дефекту цієї специфічної взаємодії з цитоскелетом, а потім призводять до порушення форми еритроцитів, що називається спадковим сфероцитозом.

1.2. Білок смуги 3. Структура та функції

Білок смуги 3 (AE1, SLCAE1, band 3) експресується у людини в двох ізоформах, eAE1 (911 амінокислотних залишків), що експресується в еритроцитах, і kAE1 (846 амінокислотних залишків), що експресується на базолатеральних поверхнях. В еритроцитах хребетних аніонний транспортер є одним з основних мембранних білків [1, 2] і виконує велику кількість різноманітних функцій необхідних для існування клітин. Будучи найбільш поширеним білком еритроцитарної мембрани ($1.2 \cdot 10^6$ копій на клітину, приблизно 25% від загальної кількості мембранних білків), він забезпечує різні потреби цих клітин: дихальну роль за допомогою забезпечення транспорту CO_2 , структурну роль за допомогою забезпечення зв'язку плазматичної мембрани та цитоскелету, залучення до цитокінезу та регуляцію об'єму еритроцитів [14]. З приблизно 1.2 мільйонів мономерів AE1, 40% є тетрамерами, сформованими в результаті димеризації за участю цитоплазматичного домену, і стабілізуються завдяки взаємодії з анкіріном. Залежно від кількості димерів, що входять до анкіринового вузлового комплексу (від 1 до 6), на нього припадає від 7 до 40% загальної кількості AE1. 25 - 30% димерів, що залишилися, вільно дифундують в ліпідному шарі [15].

AE1 складається з 14 трансмембранних сегментів (ТМ), організованих у 2 основних домени: N-кінцевий внутрішньоклітинний домен (cdAE1, cdb3) та C-кінцевий мембранний домен (mdAE1). Ці домени можуть бути розділені за допомогою помірної дії протеаз на мембрану тіні еритроциту. Протеазо-чутливі сайти розташовані в регіоні, що слабо захищений, що зв'язує цитоплазматичний домен (кінцеві залишки 1-360) з мембранним доменом (кінцеві залишки 361-911). Захищена частина амінокислотної послідовності мембранного домену SLC4A1 білків починається з Phe379.

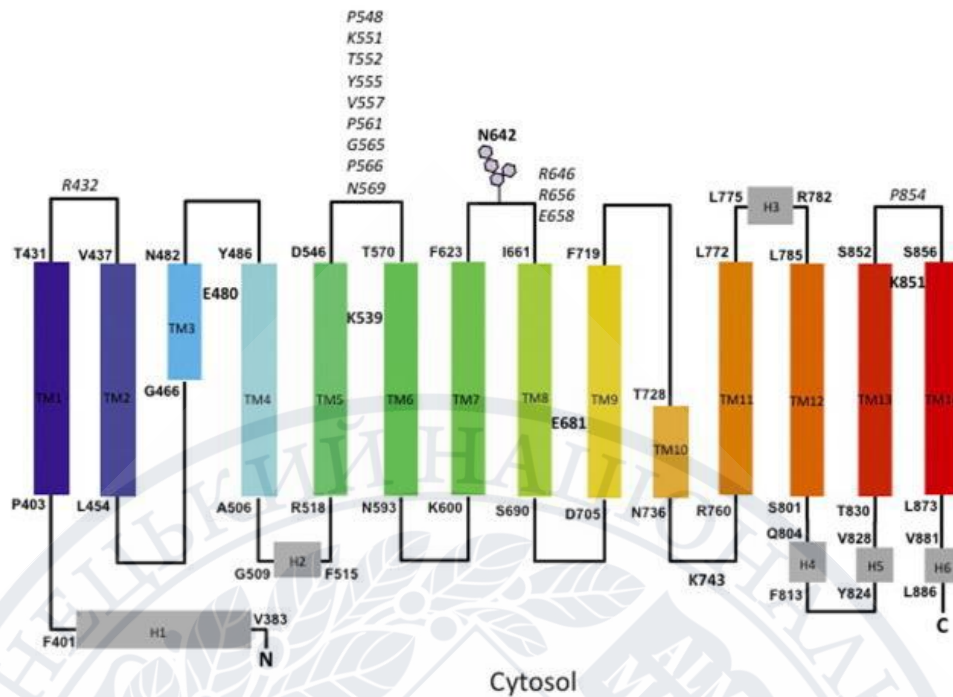


Рис. 1.2. Схема структури білка AE1 зображена спектрально від синього до червоного малюнку. Модифіковано із Reitmeier et al., 2016 [15].

Кожен мономер AE1 організований у два інвертованих повтори (TM1-7 і TM 8-14), що мають однакове укладання і складається з внутрішнього домену (TM1-4 і TM 8-11) та воротного домену (TM5-7 і TM12-14) з каналом для проходження аніонів, розташованим між доменами. Корковий домен містить аніон-зв'язуючий сайт, воротний домен - залишки лізину в TM5 і TM13, які можуть зв'язуватися з H2DIDS, інгібуючи транспортну функцію AE1.

Мембранний домен починається зі спірального сегмента H1, що лежить паралельно внутрішньої поверхні мембрани і закінчується С-кінцевим регіоном, не видимим на кристалічній структурі. Єдиний сайт N-глікозилювання на Asn642 розташований у регіоні між TM7 та TM8, і маркує позаклітинну сторону мембрани. Мембранний домен, відповідальний за транспортну функцію білка AE1, зберігає свою активність без цитоплазматичного домену, при отриманні за допомогою протеолізу або експресії mdAE1 у трансфектованих клітинах. Кристалічна структура ізолюваного цитоплазматичного домену представляє димерну структуру, що складається з взаємодіючого домену та димеризуючого

домену. Мембранний домен білка AE1 поки недостатньо вивчений, однак відомо, що він має димерну структуру [15, 16].

Білок band3 є важливим компонентом щонайменше двох основних мультибілкових комплексів: анкіринових та сполучних мембранних комплексів, які служать місцями вертикальної асоціації між плазматичною мембраною та цитоскелетом на основі спектрину, що лежить в її основі [19]. N-кінцевий домен (1–359 амінокислот) відповідає за асоціацію з цитоскелетом, маючи сайти зв'язування для анкірину, білка 4.2, аддуцину та білка 4.1, а також гліколітичних ферментів та гемоглобіну. Решта С-кінцевого мембранного домену (B3mem; 360–911 амінокислот) має 12–14 трансмембранних спіралей та виконує ключову роль у регуляції газообміну еритроцитів шляхом обміну іонами хлориду та бікарбонату через плазматичну мембрану.

Функції AE1. У людини CO_2 транспортується до легень трьома шляхами: 5-10% розчиняється в плазмі, 5-10% зв'язуються гемоглобіном, решта конвертується в бікарбонат-іони (HCO_3^-) за допомогою еритроцитів [17]. Оскільки розчинність CO_2 у крові досить низька, молекула CO_2 , що дифундує в еритроцит через плазматичну мембрану, конвертується в HCO_3^- за допомогою цитозольного білка – карбоангідрази II. Аніон бікарбонату потім транспортується аніонним транспортером із клітини в обмін на Cl^- [15].

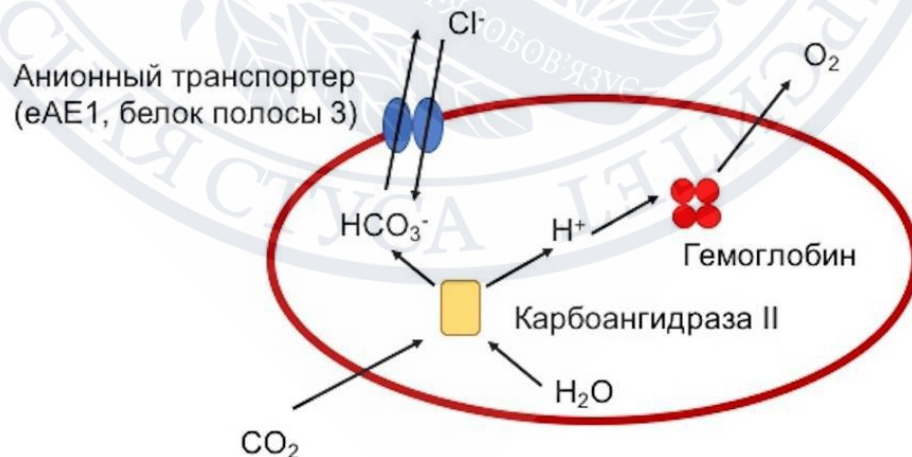


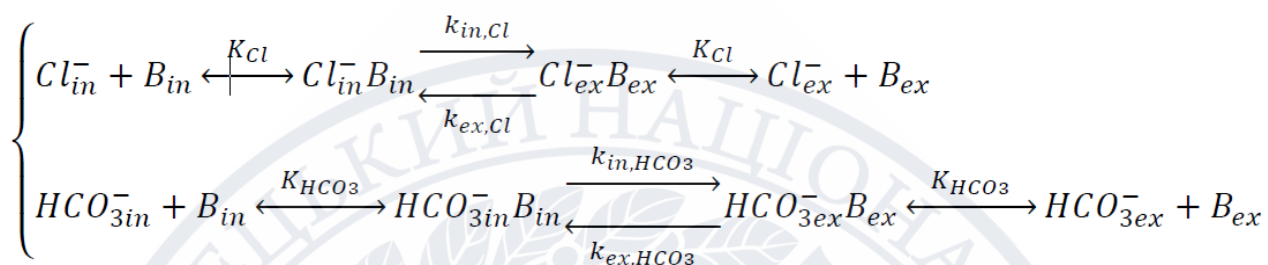
Рис. 1.3. Роль AE1 (білок смуги 3, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обмінник) в еритроцитах.

Описаний процес називається «хлоридний зсув», при ньому знижується внутрішньоклітинна рН, викликаючи конформаційні зміни гемоглобіну, що призводять до випуску кисню (ефект Бору) [18]. В легенях бікарбонат плазми транспортується всередину еритроциту AE1 в обмін на внутрішньоклітинний Cl^- , дегідратується до CO_2 карбоангідразою II і дифундує з еритроциту, щоб бути виведеним легенями [17]. Таким чином, більш ніж 2/3 загального обсягу CO_2 транспортується у вигляді HCO_3^- . AE1 каталізує швидкий обмін $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ зі швидкістю обороту $\sim 5 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ (близько 10^9 пар моновалентних аніонів за секунду) при 37°C [7], тобто всього в 10 разів повільніше звичайного іонного каналу. З метою забезпечення максимального транспорту бікарбонату за допомогою AE1 білок структурно пов'язаний з карбоангідразою II через свій «DADD» повтор цитоплазматичного кінця. Ця зв'язка формує так званий метаболон транспорту бікарбонату, який визначає достатню швидкість транспорту бікарбонату для еритроцитів, що проносяться через капіляри за 0.3-1.0 секунд [20, 21].

Внаслідок низької швидкості переносу іона HCO_3^- [20] через мембрану в порівнянні з дифузією молекул CO_2 і O_2 за допомогою аквапоринів цей процес є лімітуючою стадією обміну CO_2/O_2 . Швидкість переносу аніонів через еритроцитарну мембрану відповідає швидкості потреби організму в кисні.

За допомогою еритроцитів в організмі здійснюється лімітуюча стадія кисневого обміну. Цей етап полягає у процесі виведення вуглекислого газу з еритроциту у вигляді іона HCO_3^- через трансмембранний білок смуги 3. Робота даного білка регулюватиме транспорт аніонів через мембрану еритроциту, оскільки саме у формі аніону HCO_3^- міститься вуглекислий газ усередині еритроциту, який зазнав реакції з карбоангідразою в умовах внутрішньоклітинного рН в діапазоні $7 \div 8$. Механізм перенесення іонів через білок смуги 3 описується системою рівнянь та кінетичним механізмом, який зветься «пінг-понг» механізмом, в якому просування одного з аніонів в один бік супроводжується просуванням іншого аніону в протилежний бік [7]. Ця пінг-понг модель, підтримана багатьма дослідженнями, передбачає існування двох

стабільних конформацій – спрямована назовні та всередину. Перехід між конформаціями здійснюється за допомогою зв'язування аніонів і не відбувається за відсутності зв'язування на одному із сайтів. Обидва сайти зв'язування димера можуть бути одночасно спрямованими назовні або всередину, що передбачає можливість незалежного функціонування обох субодиниць [15].



Cl_{in}^- та Cl_{ex}^- іони хлору на внутрішній та зовнішній стороні мембрани, відповідно; B_{in} і B_{ex} кількість білків смуги 3 орієнтованих всередину та назовні, відповідно; K_{Cl} , K_{HCO_3} , $k_{in,Cl}$, $k_{ex,Cl}$, $k_{in,H}$, k_{ex,HCO_3} відповідні константи Міхаеліса-Ментен.

Аніонний обмін здійснюється трансмембранним доменом mdAE1. Для збереження швидкої швидкості транспорту карбоангідраза II (CAII) зв'язується з С-кінцем AE1 на спеціальному сайті (886LDADD890) для здійснення транспорту орента метаболізму, ефективно перетворюючи CO_2 в HCO_3^- [22, 23]. Передбачається, що AE1 формує вирву з великою водною порою усередині ТМ як СІС канал. Відповідно до цієї моделі, аніони дифундують крізь відкриту пору доти, доки досягають бар'єру проникності. ТМ повтори 5, 8, 9 і 10 залучені в сайт аніонної транслокації, оскільки містять важливі полярні амінокислотні залишки Lys, Arg, His, і Glu які звернені до шляху переміщення іонів. Заміна певних Cys на Ser643 до Ser690 TM8 інгібує аніонний транспорт, що вказує на те, що саме цей регіон формує частину пори для аніонного транспорту.

Відомо, що похідні стилбендисульфонату пригнічують активність аніонного транспортера за допомогою оборотного або незворотного зв'язування з AE1. 4,4'ізотіоціано-2,2'-стилбендисульфонат (DIDS) та його відновлений аналог, H2DIDS, при високих значеннях pH формують поперечний зв'язок (H2DIDS при pH9.5, DIDS при pH 13) між Lys539 і Lys851 [7]. Зв'язаний інгібітор

недоступний для анти-DIDS антитіл. FRET експерименти показали, що інгібітори знаходяться близько один до одного в одному димері на відстані близько 28-46 Å і можуть кооперативно взаємодіяти один з одним, причому перший зв'язаний інгібітор збільшує афінність до іншого. Приєднання інгібітора може стабілізувати мембранний домен AE1 проти термічної денатурації та протеолізу.

AE1 також служить як білковий «якір», зв'язуючи розчинні цитоплазматичні білки та компоненти цитоскелета з мембраною. Спектрин та AE1 взаємодіють через анкірін та білок смуги 4.1. Ці взаємодії з цитоскелетними білками роблять AE1 ключовим білком у збереженні форми клітини та механічної міцності [21]. Цитоскелетні взаємодії AE1 дозволяють еритроциту зазнавати неймовірної напруги зсуву при проходженні крізь капіляри. Також відомо, що cdAE1 надає сайти зв'язування для гемоглобіну, геміхрому та деяких гліколітичних ферментів, таких як алдолаза, фосфофруктокіназа, гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназу (GAPDH), лактат дегідрогеназу та тирозин кіназу [21].

Останнім часом стало відомо, що AE1 також має третю функцію, білок є маркером старіння для постарілих та пошкоджених клітин. Кластеризація AE1 в еритроцитарній мембрані запускає зв'язування антитіл до позаклітинної частини білка, викликаючи елімінацію еритроцитів.

Таким чином, AE1 є найбільш поширеним білком мембрани еритроциту, залученим до регуляції різних процесів: транспорту іонів, цитокінезу, регуляції внутрішньоклітинного рН та обсягу еритроциту, зв'язування гліколітичних ферментів та карбоангідрази II.

1.3. Взаємодія AE1 та гемоглобіну

N-кінцевий цитоплазматичний домен AE1 (cdAE1), як уже було сказано, заякорений на цитоскелет і крім того містить сайти зв'язування гемоглобіну (Hb) і низки гліколітичних ферментів.

Відомо, що тільки Т-форма Hb (дезоксигемоглобін, дезокси-Hb), а не R-форма (лігандований Hb, наприклад, оксигемоглобін, окси-Hb), здатна оборотно

зв'язуватися з AE1 з високою афінністю. Це вказує на можливість регулювання гемоглобіном властивостей еритроциту за допомогою ліганд-залежної взаємодії з AE1. На кінці cdAE1 розташовані негативно заряджені залишки амінокислот, що стереохімічно відповідають позитивно зарядженому сайту зв'язування 2,3-DPG на дезоксигемоглобіні. Ця взаємодія призводить до зниження афінності Hb-O₂ та підвищення фактора Бора. Зв'язування гемоглобіну та cdAE1 звільняє O₂ близько до мембрани, полегшуючи його віддачу у тканинах [24]. Дезокси-Hb зв'язується з 12-23 кінцевими залишками AE1 з афінністю у 8 разів вищою ніж окси-Hb. При цьому дослідження кокристалічної структури дезокси-Hb з N-кінцем AE1 показало, що cdAE1 зв'язується глибоко (18Å) з центральною часом тетрамеру Hb, розташованої проксимально щодо сайтів зв'язування гліколітичних ферментів, білка смуги 41. При оксигенації Hb поря закривається і стає недоступною для зв'язування. Така геометрія вказує на важливу роль комплексу дезокси-Hb-cdAE1 у метаболізмі еритроциту [25, 26].

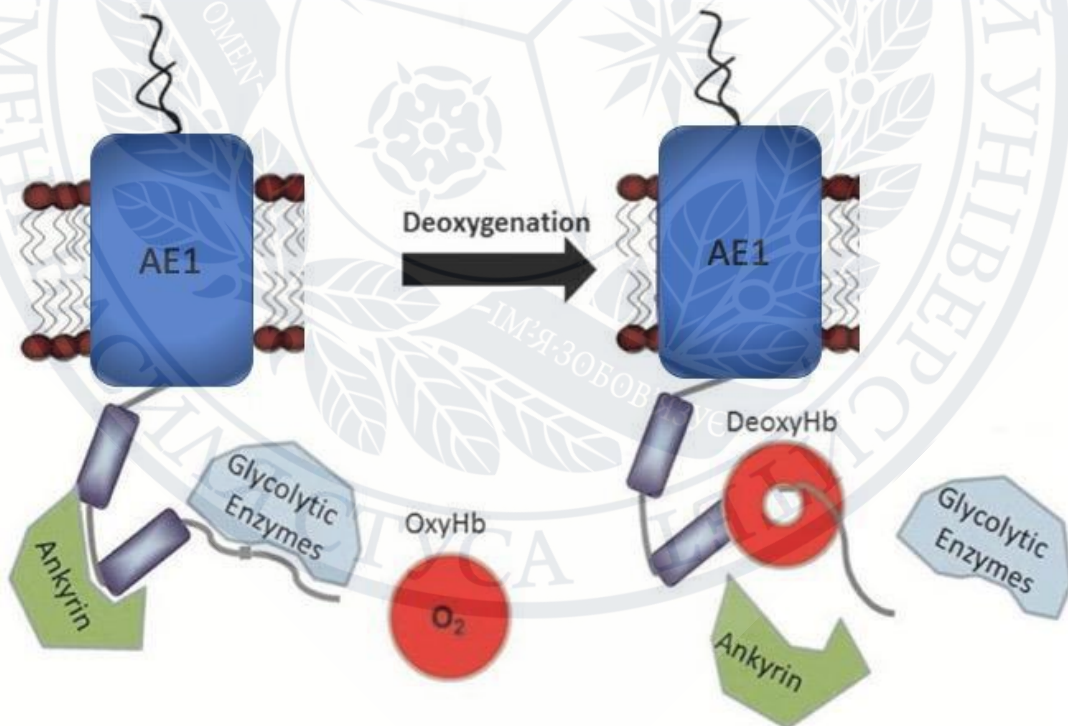


Рис. 1.4. Дезокси-гемоглобін оборотно зв'язується із cdAE1 [26].

Зв'язування дезокси-Нб з cdAE1, ймовірно, змінює конформацію всього аніонного транспортера, витісняючи ряд сигнальних ферментів з 22-24 кінцевих залишків cdAE1 і, в результаті конкуренції між Нб і гліколітичними ферментами через сайт зв'язування на cd AE пентозофосфатними шляхами.

Таким чином, незважаючи на наявні дані про взаємодію cdAE1 та deoxy-Нб, фізіологічна роль даного процесу вивчена не повною мірою. Залишається незрозумілим, чи зміна конформації AE1 впливає на транспортну функцію AE1, у тому числі на можливу взаємодію з RhAG.

1.4. Вимірювання аніонного обміну $\text{H}^+/\text{SO}_4^{2-}/\text{Cl}^-$ через B3p

У фізіологічних умовах обмін $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ можна оцінити, вимірюючи швидкість обміну через плазматичну мембрану, яка насправді настільки швидка, що її нелегко визначити [27]. Тим не менш, активність B3p можна контролювати, визначаючи константу швидкості поглинання SO_4^{2-} , яка повільніша та легше визначається, ніж поглинання HCO_3^- або Cl^- [3, 8, 10]. Хоча обмін поглинання $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ через B3p, безумовно, ближче до фізіології, поглинання SO_4^{2-} було визнано дієвим інструментом для моніторингу гомеостазу еритроцитів в експериментальних умовах, проведених *in vitro ex vivo* [9]. У зв'язку з цим, константу швидкості транспорту SO_4^{2-} можна визначити турбідиметричним методом, спрямованим на кількісну оцінку SO_4^{2-} , інтерналізованої через B3p, як функції часу [3, 8 - 10].

SO_4^{2-} довгий час розглядався як інертний аніон, хоча він необхідний для багатьох біологічних процесів, таких як ріст клітин та організмів, біосинтез та детоксикація шляхом сульфатування багатьох сполук, синтез клітинного матриксу та підтримка плазматичних мембран. Сульфат зазвичай присутній у плазмі крові і його концентрації, оцінені турбідиметричним методом становлять 270 мкМ у людей [20].

Відповідно до цих досліджень було розроблено турбідиметричний метод, який використовується для *in vitro* та *ex vivo* підтвердження здатності до

аніонного обміну через ВЗр за різних експериментальних умов. Зокрема, згідно з авторами [3, 8-10,] та враховуючи, що концентрації SO_4^{2-} , що використовуються в експериментальних умовах вищі, кількість аніона, інтерналізованого еритроцитами та відображаючого функцію ВЗр, може бути ефективно визначена.

$\text{H}^+/\text{SO}_4^{2-}$ котранспорт AE1, як вважають, залежить від протонування конкретного залишку глутамату E681 [28]. Коли E681 протонується, AE1 переходить з нормального транспортера одновалентних аніонів в форму, яка може транспортувати SO_4^{2-} і інші двовалентні аніони (рис. 1.5).

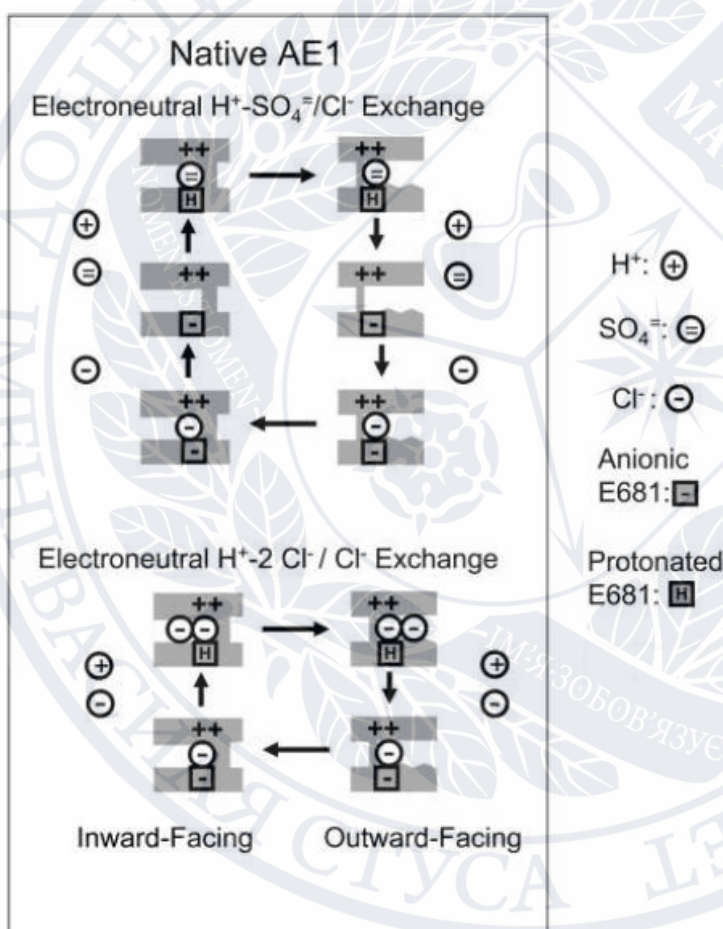


Рис. 1.4. Цикл $\text{Cl}^-/\text{HSO}_4^-$ нормального AE 1 [28].

SO_4^{2-} і H^+ зв'язуються з транспортером в будь-якому порядку. Припускають, що стан транспортера повинний бути електронейтральним, для того, щоб була можливість транслокації як Cl^- так і SO_4^{2-} іонів. Цикл для обміну двох Cl^- і H^+ на Cl^- аналогічний $\text{Cl}^-/\text{HSO}_4^-$ обміну, за винятком того, що два іона

Cl^- замість одного SO_4^{2-} переноситься при низькому рН E681-протоновану формою AE1. Кінцевим результатом є електронеутральний котранспорт $\text{H}^+ + \text{Cl}^-$.

Докази того, що ВЗр демонструє зміни в константі швидкості поглинання SO_4^{2-} після впливу різних стресових чинників на еритроцити людини, вже були продемонстровані. Зокрема, індукований H_2O_2 окислювальний стрес спровокував зниження константи швидкості поглинання SO_4^{2-} [8, 9, 20], тоді як вплив високим вмістом глюкози викликало прискорення аніонного обміну [10]. Вважають, що такий двосторонній вплив на швидкість аніонного обміну залежить від конкретної структури, на яку впливають стресори, і від можливих основних шляхів клітинної відповіді.

Автори [8] показали, що швидкість аніонного обміну через ВЗр може залежати від зміни окисного стану мембранних білків. Попередні дослідження повідомляли про перехресний зв'язок між ВЗр і Нб, що відображає ефективність аніонного обміну [10]. Спорідненість між Нб і ВЗр характеризується специфічним механізмом, де спорідненість deoxyHb до ВЗр вища, ніж спорідненість oxyHb, який є переважною формою Нб у мікроциркуляції крові. Часткова оксигенація гемоглобіну різко збільшує швидкість автоокислення гемоглобіну. Ця подія окислення може пошкодити ВЗр і мембрану еритроцитів. Денатурація гемоглобіну (MetHb) утворює геміхроми, які мають набагато вищу спорідненість до мембрани еритроцитів, таким чином створюючи необоротне перехресне зшивання за участю як ВЗр, так і спектрину. Це зв'язування порушує взаємодію між ВЗр і цитоскелетними білками (анкірином і спектрином) і запускає кластеризацію ВЗр, наслідком чого є часткове пошкодження здатності ВЗр до аніонного обміну.

Велика кількість доказів підтверджує припущення, що окисний стрес індукує посттрансляційні модифікації N-кінця ВЗр, який піддається впливу внутрішньоклітинного середовища [9]. Окислений ВЗр селективно та рясно фосфорилується, що може викликати агрегацію ВЗр, послаблювати взаємодію зі спектрин-актиновим цитоскелетом та знижувати стабільність мембрани. Lun

відповідає за фосфорилування Tyr 359, а Syk відповідає за фосфорилування Tyr 8 та Tyr 21. Крім того, окислення індукує дисульфідне зшивання ВЗр. Димеризація ВЗр здійснюється шляхом утворення дисульфідних містків між двома залишками цистеїну (Cys), розташованими в плечах димеризації двох мономерів. Залишок Cys 201 в одному мономері та залишок Cys 317 парного мономеру можуть легко утворювати міжмолекулярні дисульфідні зв'язки після помірного окисного стресу, що може блокувати зв'язування анкірину. Ймовірно, можна висунути гіпотезу, що ці модифікації можуть викликати конформаційні зміни, які можуть вплинути на ефективність транспорту іонів ВЗр.

Більше того, окисний стрес, індукований тіол-окислювачами, такими як N-етилмалеїмід (NEM) або діамід, погіршував здатність ВЗр стимулювати поглинання SO_4^{2-} в еритроцитах людини. Зниження ефективності аніонного транспорту було пов'язане зі змінами структурного стану ВЗр, спричиненими окисленням мембранних сульфгідрильних груп, що переважно належать ВЗр. Крім того, відомо, що ці агенти викликають зшивання ВЗр, таким чином індукуючи конформаційні зміни, що, у свою чергу, може впливати на кінетику поглинання.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Експериментальні методи дослідження

В експериментах використовували свіжу кров донорів, приблизно однієї вікової групи і однієї статі. Еритроцити відділяли від плазми шляхом центрифугування, відмивали Na-фосфатним буфером (0.015 М, рН 7.4) (буферний розчин 1), що містив 0.15 М NaCl. Лейкоцитарну плівку і супернатант видаляли методом аспірації.

Еритроцити переносили в середовище того ж буферного розчину 1 без глюкози та інкубували продовж 3-х годин при температурі 20°C. Вміст гемоглобіну в досліджуваних суспензіях знаходився на рівні 3 ± 0.18 мг/мл. Подовж експерименту досліджувана система контактувала з повітрям навколишнього середовища.

Дослідження транспорту іонів H^+ в сульфатному середовищі

Кожні 30 хв з експериментальної проби відбирали 2 мл суспензії, рідину вилучали центрифугуванням (1 хв, 3000 об/с). Ретельно видаляли супернатант. До отриманого осаду клітин додавали 2 мл Na_2SO_4 (0,12 М) і реєстрували зміни рН у позаклітинному розчині протягом 15 хв з кроком 1 с [29, 30]. Для реєстрації рН застосовували скляний комбінований електрод ЕСК-10612. Змінення рН реєстрували в автоматичному режимі. Експеримент проводили при температурі 20°C у 5-ти повторях. Отримані експериментальні залежності використовували для математичного моделювання.

Дослідження вмісту сульфат-іонів в еритроцитах при їх інкубуванні в сульфатному середовищі

Це дослідження проводили для оцінки достовірності результатів математичного моделювання.

Кожні 20 хв відбирали 2 мл суспензії, з якої осаджували клітини центрифугуванням. До осаду клітин додавали 2 мл 0.12 М Na_2SO_4 і інкубували 15 хв. Середовище інкубування видаляли центрифугуванням, клітини відмивали

від сульфат-іонів буферним розчином 1. Еритроцити лізували 2 мл H_2O , після чого осаджували білки додаванням 0.5 мл 55% ТХУ і відділяли центрифугуванням. До 1 мл супернатанту додавали 1 мл суміші гліцерол-вода (1:1), по 0.5 мл 4М NaCl та 1М HCl, 0.5 мл 1.23 М $BaCl_2$. Поглинання цієї суспензії вимірювали при 360 нм. Для кількісного оцінювання вмісту сульфат-іонів використовували стандартну калібрувальну криву [31, 32].

2.2. Математична модель та методи моделювання

Модель описує транспортні потоки іонів, які задіяні у зміненні позаклітинного рН продовж 15 хвилин знаходження клітин у сульфатному середовищі. Модель представляє систему звичайних диференціальних рівнянь (ODE). Кожне ODE представляє суму всіх швидкостей змін окремого клітинного компонента на основі точних кінетичних рівнянь. При створенні моделі застосовані методи ідентифікації параметрів, метою яких є оцінка «найкращого» набору значень параметрів, який мінімізує похибку між експериментальними даними та відгуком моделі.

Побудову моделі та всі числові розрахунки виконано з використанням середовища моделювання COPASI 4.42. У модель включено два компартменти, в яких проходять 10 реакцій та іонних потоків за участю 14 метаболітів.

Оцінка набору значень параметрів моделі ставиться як задача пошукової оптимізації. Створена модель дозволяє розрахувати склад зовнішнього та внутрішнього середовища у процесі переміщення іонів. Позаклітинний простір розглядався як добре перемішаний відсік нескінченного розміру, і неперемішані шари навколо клітин не розглядалися.

Пошук параметрів моделі

Пошукова оптимізація параметрів дозволяє підібрати вектор параметрів, що мінімізує розбіжність між модельними прогнозами та експериментом. Такий підхід дозволяє поєднати математичне моделювання з експериментом і отримати більш достовірне уявлення про досліджувані процеси, знайти деякі невідомі параметри моделі чи визначити їх змінення у часі.

Пошукову оптимізацію проводили з використанням експериментальних даних, представлених у вигляді часових залежностей позаклітинної рН із 900 точок. При дослідженні впливу умов інкубування на функціональність АЕ1, мінімізацію цільової функції проводили по 12 параметрах моделі ($CO_2(0)_{in}$, $HCO_3^-(0)_{in}$, $k_{HCO_3^-/Cl^-}$, $k_{K,Cl}$, $k_{K,Na,2Cl}$, $V_{Na/H}$, K_{Na^+} , $V_{max H^+,SO_4^{2-}}$, K_{mH^+} , $K_{mSO_4^{2-}}$, k_a , K_c).

Цільова функція має вигляд:

$$O(p) = \sum_j \sum_k \left(pH_{k,j} - pH_{k,j}(p) \right)^2,$$

де $pH_{k,j}$ – експериментальна величина позаклітинного рН при вимірюванні j в експерименті k і відповідне розрахункове значення $pH_{k,j}(p)$, де p - вектор оцінюваних параметрів при моделюванні.

В роботі пошук параметрів виконаний з застосуванням методу Еволюційного програмування, що реалізується у COPASI. Результатом пошукової оптимізації є набір кінетичних параметрів моделі.

При рішенні системи рівнянь з параметрами, знайденими в ході пошукової оптимізації, отримано кінетичні залежності концентрацій іонів та потоків відповідних процесів моделі.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТУ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Розробка математичної моделі котранспорту протон-сульфат в еритроцитах людини

Процеси, залучені до моделі, представлені у таблиці 1 і на рис. 3.1.

Таблиця 3.1. Реакції, що беруть участь у моделі (Тип стрілки $\rightarrow$ або $\leftrightarrow$ вказує, чи вважається реакція незворотною чи оборотною в аналізі)

N	Реакції	Ферменти
<i>Середовище інкубування</i>		
1	$CO_2_out + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^-_out + H^+_out$	
<i>Клітини</i>		
<i>Цикл Якобсо-Стюарта</i>		
2	$CO_2_in + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^-_in + H^+_in$	CA
3	$CO_2_in \rightleftharpoons CO_2_out$	Транспорт
4	$HCO_3^-_out + Cl^-_in \rightleftharpoons HCO_3^-_in + Cl^-_out$	AE1 транспорт
<i>SO_4^{2-}, H^+ котранспорт</i>		
5	$H^+_out + SO_4^{2-}_out + Cl^-_in \rightarrow H^+_in + SO_4^{2-}_in + Cl^-_out$	AE1 транспорт
<i>Транспорт іонів</i>		
<i>Електронейтральний транспорт</i>		
6	$K^+_out + Cl^-_out \leftrightarrow K^+_in + Cl^-_in$	KCl котранспорт (KCC)
7	$K^+_out + Na^+_out + 2Cl^-_out \leftrightarrow K^+_in + Na^+_in + Cl^-_in$	NaK2Cl котранспорт (NKCC1)
8	$Na^+_out + H^+_in \leftrightarrow Na^+_in + H^+_out$	Na/H обмін (NE1)
<i>Hb-буферна система</i>		
9	$Hb + H^+ \leftrightarrow HHb$	
10	$Hb + CO_2 \leftrightarrow carbHb + H^+$	

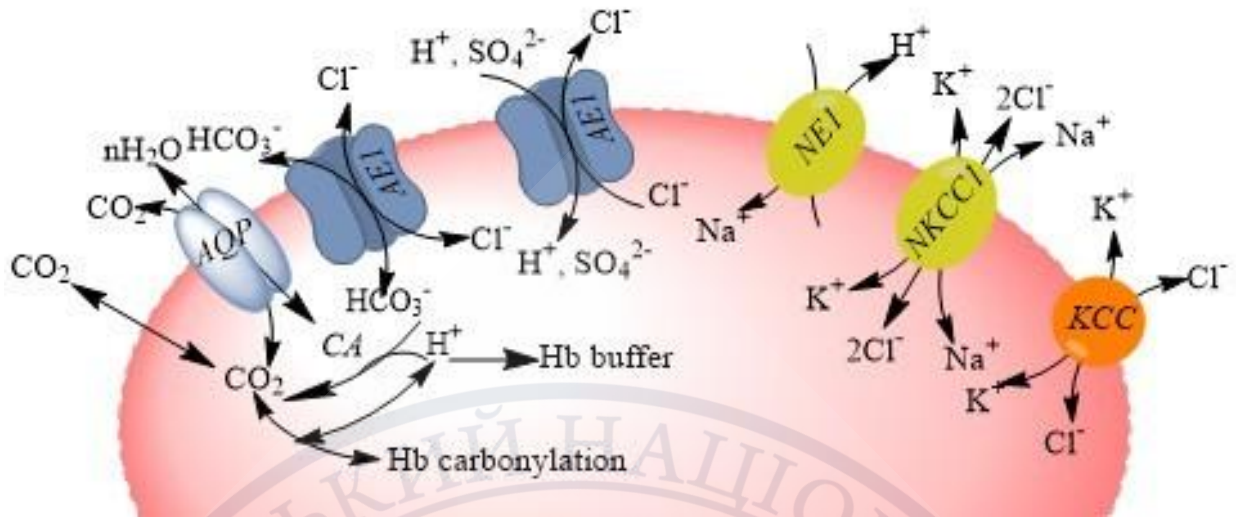


Рис. 3.1. Схема шляхів іонного транспорту еритроцитів людини, що використовуються в моделі. Градієнтні шляхи транспорту включають AE1 (білок аніонного обміну 1, смуга 3), NKCC1 (Na^+ , K^+ , 2Cl^- котранспортер 1); KCC (K^+ , Cl^- котранспортер), NHE1 (натрій/ H^+ -обмінник). Мембранні канали - аквапорини (AQP1), CA - карбоангідраза.

Компоненти моделі

Вуглекислий газ. Вміст клітинного CO_2 складається з утворення або споживання CO_2 через а) внутрішньоклітинні та позаклітинні реакції гідратації-дегідратації, б) обмін CO_2 з середовищем інкубування і в) реакції CO_2 з гемоглобіном.

а) гідратація CO_2 відбувається за реакцією:



У позаклітинному середовищі CO_2 гідратується неферментативно, в клітинах за участю ферменту карбонільної ангідрази (CA). Кінетику процесу гідратації описували рівнянням [33-35]:

$$v = a \cdot \left(k_u \cdot \text{CO}_2 - \frac{k_v}{K} \text{H}^+ \cdot \text{HCO}_3^- \right) \quad (1),$$

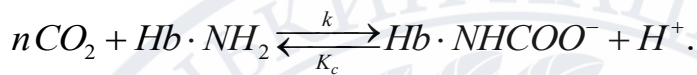
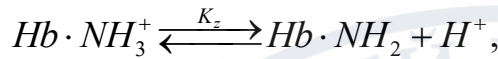
де a – параметр, що визначає рівень активації процесу гідратації за участю CA. $k_u = 0.137 \text{ c}^{-1}$, $k_v = 57.5 \text{ c}^{-1}$, $K = 0.35 \text{ mM}$, $a = 1$ для неферментативного процесу, $a = 3.89 \cdot 10^6$ для внутрішньоклітинної реакції, що каталізується CA (встановлено в процесі моделювання).

б) дифузію CO_2 описували зворотнім процесом $CO_2_in \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} CO_2_out$, як у роботі [34-36]. Швидкість дифузії описували рівнянням:

$$v = k_1 \cdot CO_{2in} - k_2 \cdot CO_{2out},$$

де $k_1 = k_2 = 5.471 \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ (встановлено в ході моделювання).

в) зв'язування CO_2 з окси-, дезоксигемоглобіном описували реакцією:



Так як гемоглобін не вводився в модель як метаболіт, швидкість реакції описували модифікованим рівнянням

$$v = k \cdot \left(\frac{2 \cdot CO_{2in}}{4} \cdot (z_0 + z_1 + z_2) \right) \quad (2),$$

де z_0, z_1, z_2 були описані так як у [35]:

$$z_0 = \frac{1}{\left(CO_{2in} + \frac{H_{in}^+}{K_{c,oxy}} + \frac{H_{in}^{+2}}{K_{c,oxy} \cdot K_{z,oxy}} \right)} \quad (3),$$

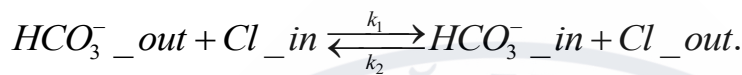
$$z_1 = \frac{1}{\left(CO_{2in} + \frac{H_{in}^+}{K_{c,\alpha_deoxy}} + \frac{H_{in}^{+2}}{K_{c,\alpha_deoxy} \cdot K_{z,\alpha_deoxy}} \right)} \quad (4),$$

$$z_2 = \frac{1}{\left(CO_{2in} + \frac{H_{in}^+}{K_{c,\beta_deoxy}} + \frac{H_{in}^{+2}}{K_{c,\beta_deoxy} \cdot K_{z,\beta_deoxy}} \right)} \quad (5),$$

де K_z і K_c – відповідні константи рівноваги, а k – константа швидкості прямої реакції карбонілювання. Зв'язування CO_2 з α - та β -ланцюгами дезоксигемоглобіну в присутності 2,3-DPG описували з $n = 2$, $pK_z(\alpha) = 7.32$, $pK_z(\beta) = 6.35$ та $pK_c(\alpha) = 5.04$, $pK_c(\beta) = 4.39$. Зв'язування CO_2 з α -ланцюгами оксигемоглобіну описували з $n = 2$, $pK_z = 6.72$ та $pK_c = 5.58$ [35]. Значення умовної константи швидкості $k = 3.61 \cdot 10^4 \text{ c}^{-1}$ (встановлено за результатами моделювання). Величина цієї константи залежить від співвідношення між oxy - та $deoxyHb$ в клітинах.

Гідрокарбанат - іон. Масовий баланс іонів HCO_3^- в кожному компартменті визначається швидкістю реакції гідратації-дегідратації, каталізованої відповідним чином, і потоком HCO_3^- через мембрану еритроцитів.

Транспортування HCO_3^- через переносник AE1 описували зворотнім процесом



Обмін HCO_3^- на Cl^- описаний в роботі у термінах пасивної дифузії за електрохімічним градієнтом [34]:

$$v = \left(k_1 \cdot [HCO_3^-]_{out} - \frac{k_2 \cdot (1 + 10^{pH_{in} - pKa})}{1 + \frac{10^{pH_{in} - pKa}}{r}} [HCO_3^-]_{in} \right) \quad (6),$$

$$k_1 = k_2 = 0.5 \text{ s}^{-1}, r - \text{співвідношення Донана } r = \frac{[HCO_3^-]_{in}}{[HCO_3^-]_{out}} = 0.69, pKa = 6.3$$

(Ka – константа дисоціації вугільної кислоти по першому ступеню).

Транспорт іонів. В мембрані еритроциту існує кілька видів каналів та переносників, які здійснюють пасивний транспорт іонів. Це $Na^+, K^+, 2Cl^-$ – , K^+, Cl^- – котранспортери, Na^+ / H^+ – обмінник.

K^+, Cl^- – , та $Na^+, K^+, 2Cl^-$ – котранспорт описували як в роботах [37, 38]:

$$v_{K^+, Cl^-} = k_{K, Cl} \cdot (K_{out}^+ \cdot Cl_{out}^- - K_{in}^+ \cdot Cl_{in}^-), \quad (7),$$

$k_{K, Cl}$ – константа швидкості транспорту, $k_{K, Cl} = 25.39 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

$$v_{K^+, Na^+, 2Cl^-} = k_{K, Na, 2Cl} \cdot (K_{out}^+ \cdot Na_{out}^+ \cdot Cl_{out}^{-2} - K_{in}^+ \cdot Na_{in}^+ \cdot Cl_{in}^{-2}), \quad (8),$$

$k_{K, Na, 2Cl}$ – константа швидкості транспорту, $k = 28.4 \text{ M}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$.

Значення параметрів моделі було знайдено шляхом пошукової оптимізації з використанням експериментальних даних змінення позаклітинного pH, отриманих для свіжевиділених еритроцитів розміщених у сульфатному середовищі (0.12 M Na_2SO_4). Для цього використано 30 зразків крові донорів.

Швидкість транспортування через Na^+ / H^+ – обмінник описували кінетичними рівняннями, відповідно до роботи [39]:

$$v_{Na/H} = \frac{V}{\left(1 + \frac{K_{dis}}{H_{in}^+}\right)^n} \cdot \frac{N_{out} \cdot H_{in} - N_{in} \cdot H_{out}}{(1 + N_{out} + H_{out}) \cdot (N_{in} + H_{in}) + (1 + N_{in} + H_{in}) \cdot (N_{out} + H_{out})}, \quad (9),$$

де $V = 0.324 M / s$, $n = 2.5$.

N , H – Na^+ / K_{Na} , H^+ / K_H (концентрації Na^+ та H^+ , поділені на їхні відповідні константи дисоціації), K_{dis} – константа дисоціації для зв'язування H^+ в сайті алостеричної модифікації ($K_{dis} = 1.41 \cdot 10^{-7}$), n – коефіцієнт Хілла. $K_{Na} = 0.012$, $K_H = 4.467 \cdot 10^{-9}$. Значення K_{Na} , K_H також було знайдено шляхом пошукової оптимізації з використанням експериментальних даних.

H^+ , SO_4^{2-} транспортування

Транспортування описували кінетикою Міхаеліса-Ментен для бісубстратного процесу. Відсутність SO_4^{2-} в еритроциті гарантує, що внутрішньоклітинний вміст SO_4^{2-} по суті є показником поглинання аніонів [31] (Galtieri et al., 2002).

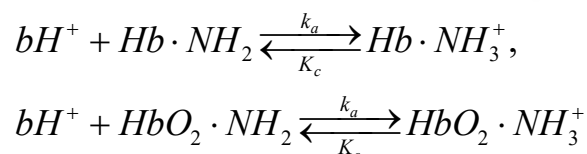
$$v = \frac{V_{max} \cdot [H^+] \cdot [SO_4^{2-}]}{\left(K_{mH^+} + [H^+]\right) \cdot \left(K_{mSO_4^{2-}} + [SO_4^{2-}]\right)}, \quad (10),$$

де: V_{max} – максимальна швидкість H^+ , SO_4^{2-} транспортування ($V_{max} = 14.6 mM / s$), $K_{mH^+} = 1.46 mM$, $K_{mSO_4^{2-}} = 4.16 mM$.

Іони гідрогену. Зміни H^+ у клітинах відбуваються за рахунок гідратації-дегідратації CO_2 , дії гемоглобінового буферу, утворенням карбамату, оксигенації-дезоксигенації гемоглобіну та за участю транспортних процесів, описаних вище.

Буферні клітинні реакції

буферизація протонів гемоглобіном відбувається за реакціями:



Швидкість процесу описували: $\nu = k_a \cdot [H^+]_{in}^b - K_c$ (11),

де k_a - умовна константа протонування, $k_a = 7.5 \cdot 10^3 \text{ c}^{-1}$, K_c - умовне значення константи дисоціації ($K_c = 3.17 \cdot 10^{-5}$, $b = 1$).). Числові значення цих параметрів також залежать від співвідношення між оху- та deохуHb в клітинах.

3.2. Апробація моделі

На рис. 3.2 представлені експериментальні залежності зміни рН суспензії еритроцитів в сульфатному середовищі ($0.12 \text{ M Na}_2\text{SO}_4$), що не містить буферних компонентів і іонів Cl^- . При цьому відбувається двофазна зміна рН зовнішнього середовища.

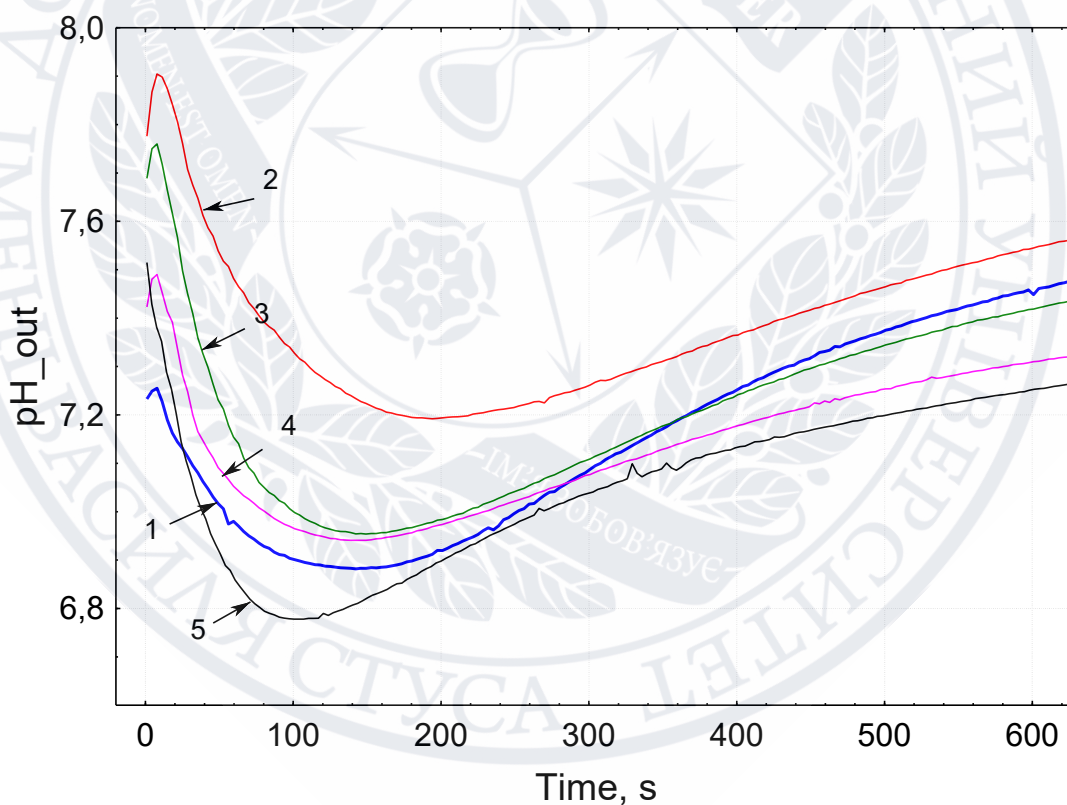


Рис. 3.2. Експериментальні залежності змінення рН розчину $0.12 \text{ M Na}_2\text{SO}_4$, після його додавання до осаду еритроцитів. Час інкубування клітин у буферному розчині 1: 1 – 0, 2 – 30, 3 – 60, 4 – 120, 5 – 180 хв.

На рис. 3.3 - 3.6 та у таблиці 3.2 представлені результати моделювання.

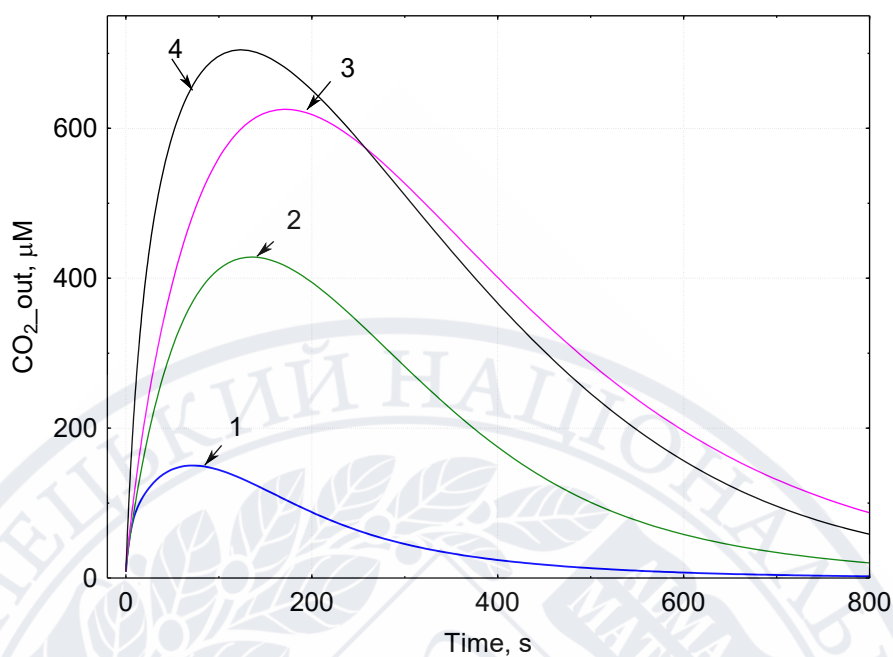


Рис. 3.3. Зміна вмісту CO_2 у позаклітинному середовищі, що містить сульфат. Залежності отримані в ході математичного моделювання. Час інкубування клітин у буферному розчині 1: 1 – 0, 2 – 60, 3 – 120, 4 – 180 хв.

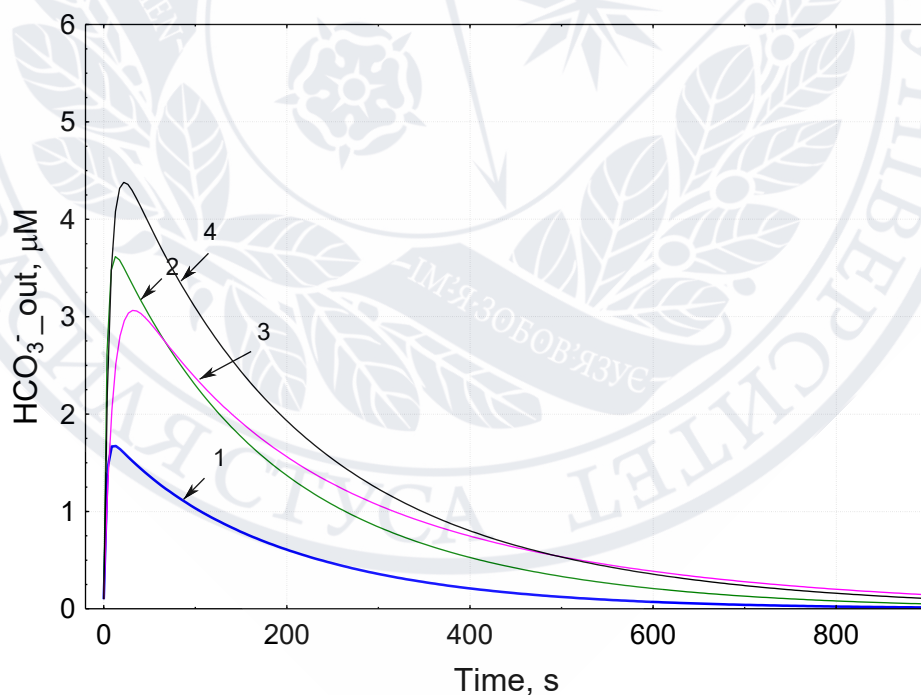


Рис. 3.4. Зміна вмісту HCO_3^- у позаклітинному середовищі, що містить сульфат. Залежності отримані в ході математичного моделювання. Час інкубування клітин у буферному розчині 1: 1 – 0, 2 – 60, 3 – 120, 4 – 180 хв.

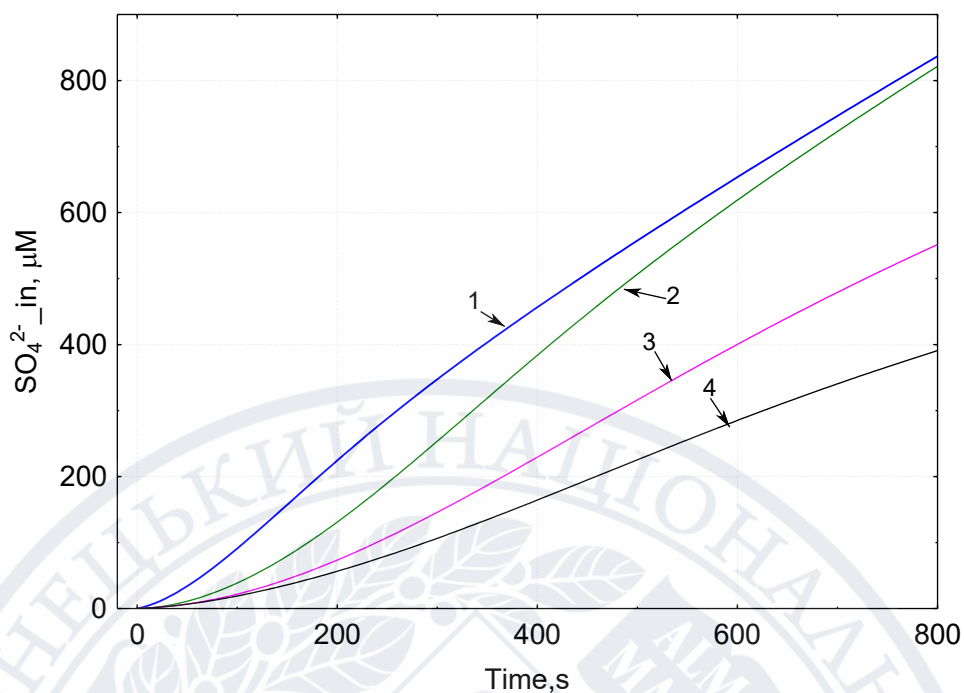


Рис. 3.5. Потік H^+ , SO_4^{2-} через ВрЗ (а) та зміна вмісту SO_4^{2-} в клітинах при перенесенні їх з середовища інкубування в сульфатне середовище. Залежності отримані в ході математичного моделювання. Час інкубування клітин у буферному розчині 1: 1 – 0, 2 – 60, 3 – 120, 4 – 180 хв.

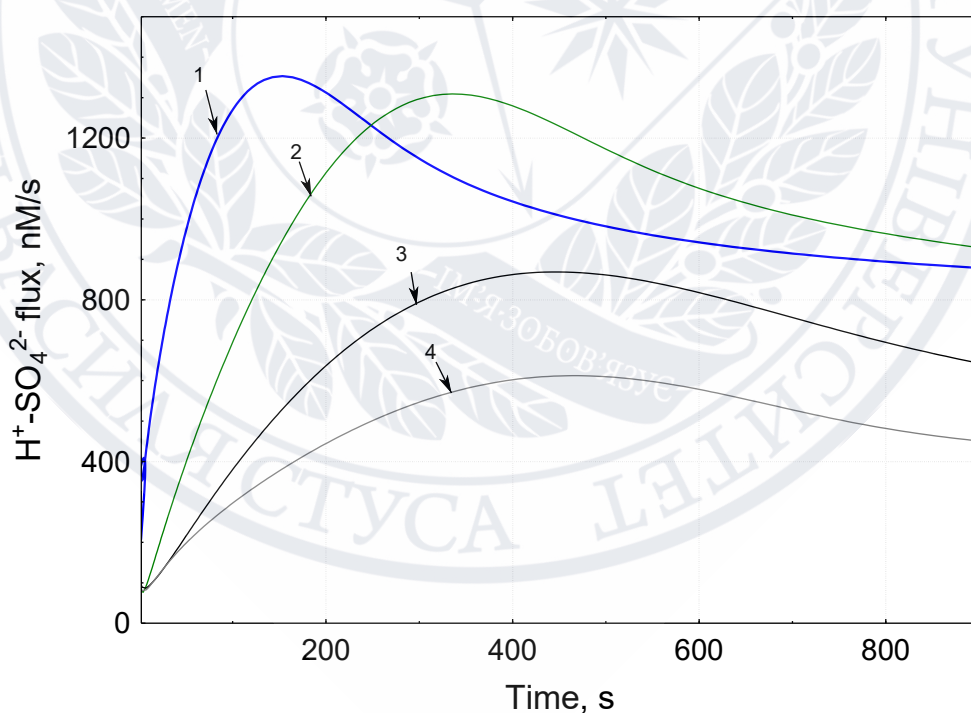


Рис. 3.6. Потік H^+ , SO_4^{2-} через ВрЗ (а) та зміна вмісту SO_4^{2-} в клітинах при перенесенні їх з середовища інкубування в сульфатне середовище. Залежності отримані в ході математичного моделювання. Час інкубування клітин у буферному розчині 1: 1 – 0, 2 – 60, 3 – 120, 4 – 180 хв.

Таблиця 3.2. Параметри математичної моделі, отримані в ході пошукової оптимізації

Time, min	$V_{\max}$, mM/s H^+, SO_4^{2-} – cotransport	k_{H^+/HCO_3^-} exchange, s ⁻¹	V_{Na^+/H^+} , mM/s	$k_{K^+/Na^+/2Cl^-}$ cotransport, M ⁻³ ·s ⁻¹	k_{K^+/Cl^-} cotransport, mM ⁻² ·s ⁻¹
0	14.65±5.54	0.49±0.12	55.46±5.18	28.4±5.18	25.39±6.15
30	10.91±2.05	*0.21±0.17	51.77±6.16	5.09±1.16	18.60±2.82
60	10.56±2.63	*0.19±0.15	*148.9±12.8	21.2±2.8	*13.05±5.75
90	*3.51±1.64	*0.21±0.13	*141.6±9.01	*43.4±9.01	*10.08±3.49
120	*2.56±1.23	*0.06±0.013	*233.4±14.5	*251.1±14.5	*10.50±6.07
150	*4.23±1.49	*0.06±0.065	*488.2±20.1	*228.2±20.1	*11.82±2.46
180	*2.49±0.81	*0.09±0.03	*509.9±19.1	*218.9±19.1	*11.04±3.92

*– зміни достовірні у порівнянні з початковим станом

Експериментальна залежність накопичення SO_4^{2-} – іонів в еритроцитах, після їх переміщення із середовища інкубування в розчин Na_2SO_4 показано на рис. 3.7. Час інкубування еритроцитів у сульфатному середовищі співпадав з часом вимірювання транспорту H^+, SO_4^{2-} . Видно, що інкубування клітин у буферному розчині без глюкози достовірно знижує здатність клітин накопичувати сульфат (до інкубування вміст SO_4^{2-} становив $917.5 \pm 117.7 \mu M$, через три години інкубування – $674.7 \pm 53.7 \mu M$. Отримані експериментальні дані співпадають з результатами моделювання.

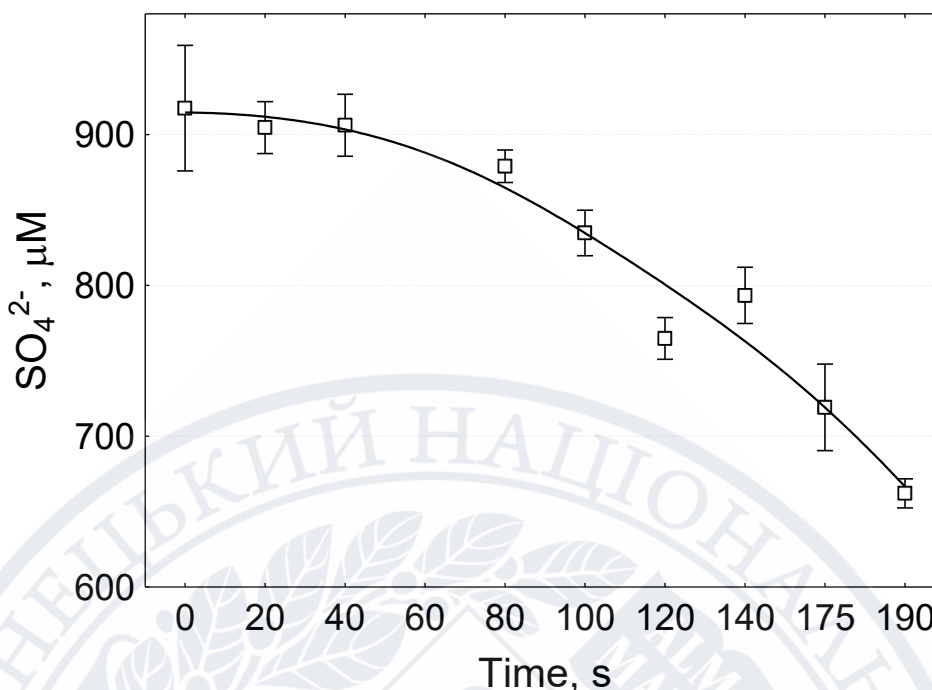


Рис. 3.7. Накопичення SO_4^{2-} іонів в еритроцитах, які інкубували у буферному розчині 1. Кожна точка представлена як $x \pm m$ для $n = 5$.

3.3. Обговорення результатів дослідження

Інкубування еритроцитів в середовищі без глюкози проводить до метаболічних порушень і швидкого виснаження клітин за АТФ. Вплив сольового розчину (буферний розчин 1) на еритроцити був нами досліджений у роботі [22, 40]. Було встановлено, що за цих умов інкубування клітини втрачають іони K^+ і Cl^- і збільшують вміст іонів Na^+ , наслідком чого є зменшення об'єму клітин.

Це ж середовище інкубування використовується для дослідження роботи Вр3.

Відповідно до результатів моделювання (рис. 3.3) додавання Na_2SO_4 до суспензії еритроцитів супроводжується виходом вуглекислого газу в позаклітинне середовище з наступною гідратацією з утворенням HCO_3^- і H^+ . Результати моделювання свідчать, що потік сульфату не відтермінований у часі, тому надходження H^+ до клітин стимулює відтік CO_2 . Фізіологічно Вр3 забезпечує врівноважування внутрішніх та зовнішніх аніонів, таких як Cl^- та

HCO_3^- , які розподіляються відповідно до трансмембранного потенціалу. Аніони транспортуються за механізмом пінг-понгу, де лише завантажений сайт транспорту може пройти через мембрану [41]. Як було показано [41], конформери ВЗр розподілені асиметрично, причому близько 90% транспортних сайтів звернені всередину. Низькі зовнішні концентрації Cl^- можуть рекрутувати сайт транспорту ВЗр до зовнішнього розчину [41]. Оскільки за нормальних умов 90% сайтів транспорту звернені до цитоплазми, рекрутинг зовнішніх конформерів охоплюватиме майже всі білки ВЗр. Цим пояснюється різке підвищення HCO_3^- у позаклітинному середовищі у перші секунди після розміщення клітин у розчині Na_2SO_4 (рис. 3.4), наслідком чого є створення рушійної сили для чистого припливу HCO_3^- в обмін на Cl^- [7]. Знижений CO_2_out створює рушійну силу для дифузійного витікання CO_2 .

Далі відбувається переважно обмін HCO_3^- , H^+ , SO_4^{2-} в обмін на внутрішньоклітинний Cl^- . Позаклітинна рН знижується (рис. 3.2), тому що швидкість гідратації перевищує швидкість котранспорту H^+ , SO_4^{2-} .

Моделльні розрахунки свідчать, що потік SO_4^{2-} -іонів в клітину має двофазний характер (рис. 3.6). Потік CO_2 з клітини дозволяє збільшити кількість H^+ в позаклітинному середовищі, що стимулює потік сульфату (рис. 3.5). У підвищення вмісту H^+ в позаклітинному середовищі дає внесок і Na^+ / H^+ обмінник, активність якого підвищується на порядок під кінець інкубування клітин (таблиця 3.2).

Внутрішньо- та позаклітинна активність HCO_3^- зв'язана з відповідною активністю H^+ через реакції гідратації/дегідратації між HCO_3^- і вуглекислим газом. Ця реакція каталізуються ферментом карбоангідразою у внутрішньоклітинному компартменті [42], та протікає з некаталізованою швидкістю у позаклітинному компартменті, що робить позаклітинні реакції обмежувальними для кислотної рівноваги відносно мембрани еритроцитів [(Nikinmaa, 2003). По мірі наближення до рівноваги

$CO_2 + H_2O \xrightleftharpoons[k_v]{k_u} H_2CO_3 \xrightleftharpoons{K} H^+ + HCO_3^-$ у позаклітинному середовищі умовою

якої є $[CO_2] = \frac{k_v \cdot [H^+] \cdot [HCO_3^-]}{K \cdot k_u}$, знижується вміст H^+ . Таким чином стає

зрозумілим, що підйом рН у позаклітинному середовищі обумовлений не збільшенням потоку SO_4^{2-} в клітину [29], а зниженням потоків HCO_3^- і CO_2 в результаті наближення до рівноваги.

Зміни, які відбулися в клітинах при інкубуванні у буферному розчині відображаються значеннями параметрів моделі, знайденими в ході пошукової оптимізації. Пошукова оптимізація параметрів моделі показує зниження константи швидкості обміну HCO_3^- / Cl^- , $V_{\max}$ обміну $H^+, SO_4^{2-} / Cl^-$ в еритроцитах з часом інкубування (таблиця 3.2). При цьому K_{mH^+} та $K_{mSO_4^{2-}}$ достовірно не змінювались. Модель показує, що збільшення часу інкубування клітин у буферному розчині без глюкози приводить до зниження швидкості аніонного обміну ВЗр наслідком чого є зниження вмісту SO_4^{2-} -іонів в клітинах. Результати моделювання підтверджуються експериментальними даними накопичення SO_4^{2-} -іонів (рис. 3.7).

Найбільш ймовірним кандидатом на роль перемикача метаболізму та транспорту іонів в еритроцитах ссавців при гіпоксії вважається мембранозв'язаний гемоглобін [25, 44]. Зв'язування deoxyHb з cdAE1, ймовірно, знижує активність еритроцитарного аніонного обмінника [45], хоча прямих доказів поки немає. Припускають, що зв'язування deoxyHb з AE1 може гальмувати кластеризацію AE1, що індукується окисленими формами гемоглобіну.

За результатами моделювання константа швидкості обміну HCO_3^- / Cl^- через 30 хв інкубування в умовах експерменту знижується в два рази, а після 120 хв – в 5-8 раз. Поряд з цим, у додатково проведених дослідженнях [46] фіксували суттєве зниження -SH-груп у білковій фракції, підвищення вмісту metHb та FerrylHb у мембранозв'язаному гемоглобіні. Як було показано [47], утворення дисульфідних зв'язків послаблює дефосфорилування та сприяє

фосфорилуванню ряду кислих амінокислот В3р Syk та Lyn тирозинкіназами. Як наслідок зменшується зв'язування В3р з якірними білками [48], підвищується рухливість, що приводить до агрегації В3р.

Часткова оксигенація гемоглобіну різко збільшує швидкість автоокислення гемоглобіну [40, 47], з утворенням окислених форм гемоглобіну, геміхромів та феррилгемоглобіну (FerryHb). Ці форми гемоглобіну мають набагато вищу спорідненість до мембрани еритроцитів створюючи необоротне перехресне зшивання за участю як В3р, так і спектрину [48]. Це зв'язування порушує взаємодію між В3р і цитоскелетними білками (анкірином і спектрином) і запускає кластеризацію В3р [6, 25, 47].

За результатами моделювання, інкубування клітин приводить до активації $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -котранспортера і Na^+ / H^+ – обмінника, і гальмування потоку через K^+, Cl^- -котранспортер (таблиця 3.2).

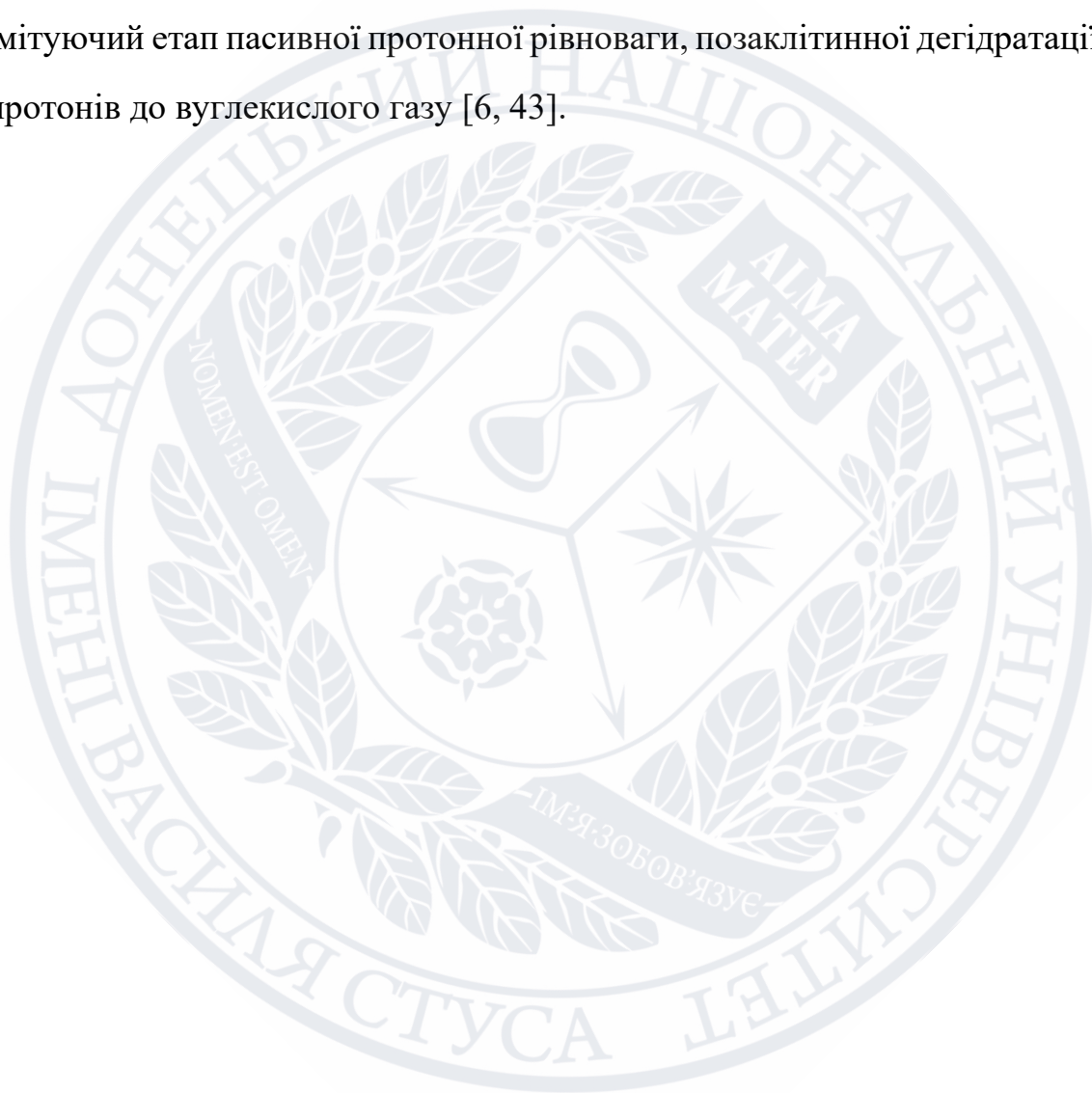
Відомо, що котранспортери $Na^+, K^+, 2Cl^-$, K^+, Cl^- та Na^+ / H^+ – обмінник є O_2 -залежними [49]. В еритроцитах людини цей котранспорт в основному неактивний в насичених киснем клітинах, але активується в деоксигенованих еритроцитах [44, 45, 49]. Експериментально доведено [49], що deoxyHb зв'язується з цитоплазматичним доменом В3р і витісняє кіназу WNK1 з її док-сайту на смузі 3. Заміщена кіназа WNK1 активує OSR1, який, у свою чергу, фосфорилує та активує $Na^+, K^+, 2Cl^-$ – котранспортер. Оскільки вплив O_2 на котранспорт KCl прямо протилежний його впливу на котранспорт $Na^+, K^+, 2Cl^-$, а сайти фосфорилування на K^+, Cl^- – і $Na^+, K^+, 2Cl^-$ – котранспортерах є гомологічними, автори [49] припускають, що саме заміщення deoxyHb WNK1 може бути відповідальним за гальмування/активацію цих котранспортерів.

У більшості вивчених випадків активність обміну Na^+ / H^+ підвищується з деоксигенацією, незалежно від основного стимулу, що викликає збільшення потоків [43].

За результатами математичного моделювання інкубування еритроцитів в досліджених умовах приводить до підвищення активності Na^+ / H^+ – обмінника,

особливо після 2-ї години інкубування. В експериментальних умовах для цих клітин спостерігається різке зниження позаклітинного рН (рис. 3.2), що обумовлено вкладом саме цього переносника.

Обмін Na^+ / H^+ викликає чистий приплив Na^+ і відтік H^+ , витісняючи H^+ з електрохімічної рівноваги протягом перших хвилин активації. Чиста екскреція протонів відбувається до тих пір, поки швидкість обміну Na^+ / H^+ є вищою за лімітуючий етап пасивної протонної рівноваги, позаклітинної дегідратації HCO_3^- і протонів до вуглекислого газу [6, 43].



ВИСНОВКИ

1. Створена математична модель дозволяє зрозуміти не тільки молекулярний механізм обміну $H^+, SO_4^{2-} / Cl^-$, але й дослідити зміни транспортування йонів в еритроцитах в умовах зовнішніх впливів. Дані реєстрації змінення рН суспензії еритроцитів в сульфатному середовищі, що не містить буферних компонентів і йонів Cl^- використовуються для пошукової оптимізації параметрів моделі.

2. Застосований підхід дозволив встановити, що в еритроцитах під дією осмотичного, метаболічного стресу та гіпоксії уповільнюється робота аніонного обмінника AE1, що відображується у зниженні констант швидкостей обміну HCO_3^- / Cl^- , V_{max} обміну $H^+, SO_4^{2-} / Cl^-$.

3. Модель прогнозує зниження вмісту SO_4^{2-} -іонів в клітинах, що підтверджується експериментальними даними.

4. За результатами моделювання, інкубування клітин приводить до активації $Na^+, K^+, 2Cl^-$ -котранспортера і Na^+ / H^+ – обмінника, і гальмування потоку через K^+, Cl^- -котранспортер.

5. Експериментальні дослідження складу мембранозв'язаного гемоглобіну показують, що комплекс deoxyHb-B3p є тригером процесів, що адаптує еритроцити до змінених умов, зокрема гіпоксії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Jennings, M. L. (2021). Cell physiology and molecular mechanism of anion transport by erythrocyte band 3/AE1. *American journal of physiology. Cell physiology*, 321(6), C1028 – C1059.
2. Su, C. C., Zhang, Z., Lyu, M., Cui, M., & Yu, E. W. (2024). Cryo-EM structures of the human band 3 transporter indicate a transport mechanism involving the coupled movement of chloride and bicarbonate ions. *PLoS biology*, 22(8), e3002719.
3. Morabito, R., Romano, O., La Spada, G., & Marino, A. (2016). H₂O₂-Induced Oxidative Stress Affects SO₄⁼ Transport in Human Erythrocytes. *PloS one*, 11(1), e0146485.
4. Sae-Lee, W., McCafferty, C. L., Verbeke, E. J., Havugimana, P. C., Papoulas, O., McWhite, C. D., Houser, J. R., Vanuytsel, K., Murphy, G. J., Drew, K., Emili, A., Taylor, D. W., & Marcotte, E. M. (2022). The protein organization of a red blood cell. *Cell reports*, 40(3), 111103.
5. Jin, X., Zhang, Y., Wang, D., Zhang, X., Li, Y., Wang, D., Liang, Y., Wang, J., Zheng, L., Song, H., Zhu, X., Liang, J., Ma, J., Gao, J., Tong, J., & Shi, L. (2024). Metabolite and protein shifts in mature erythrocyte under hypoxia. *iScience*, 27(4), 109315.
6. Barshtein, G., Livshits, L., Gural, A., Arbell, D., Barkan, R., Pajic-Lijakovic, I., & Yedgar, S. (2024). Hemoglobin Binding to the Red Blood Cell (RBC) Membrane Is Associated with Decreased Cell Deformability. *International journal of molecular sciences*, 25(11), 5814.
7. Jennings, M. L. (2013). Transport of H₂S and HS⁻ across the human red blood cell membrane: rapid H₂S diffusion and AE1-mediated Cl⁻/HS⁻ exchange. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 305(9), C941–C950.
8. Remigante, A., Spinelli, S., Trichilo, V., Loddo, S., Sarikas, A., Pusch, M., Dossena, S., Marino, A., & Morabito, R. (2022). d-Galactose induced early aging in human erythrocytes: Role of band 3 protein. *Journal of cellular physiology*, 237(2), 1586 –1596.

9. Remigante, A., Spinelli, S., Pusch, M., Sarikas, A., Morabito, R., Marino, A., & Dossena, S. (2022). Role of SLC4 and SLC26 solute carriers during oxidative stress. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 235(1), e13796.
10. Morabito, R., Remigante, A., Spinelli, S., Vitale, G., Trichilo, V., Loddo, S., & Marino, A. (2020). High glucose concentrations affect band 3 protein in human erythrocytes. *Antioxidants (Basel)*, 9(5), 365.
11. Vani, R., Ananthakrishna Anusha, B., Magdaline Christina, R., Kavin, P., Mohammed, O., Inchara, S., ... Srinath Sindhu, H. (2024). Band 3 Protein: A Critical Component of Erythrocyte. *IntechOpen*.
12. de Oliveira S, Saldanha C. An overview about erythrocyte membrane. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2010;44:63-74.
13. Альбертс Б., Джонсон А., Левіс. та ін. (2018). Молекулярна біологія клітини. Переклад з англійської. Львів: Видавничий дім «Наутілус». – 1536 с.
14. Barneaud-Rocca, D., Etchebest, C., & Guizouarn, H. (2013). Structural model of the anion exchanger 1 (SLC4A1) and identification of transmembrane segments forming the transport site. *The Journal of biological chemistry*, 288(37), 26372–26384.
15. Reithmeier, R. A., Casey, J. R., Kalli, A. C., Sansom, M. S., Alguel, Y., & Iwata, S. (2016). Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context. *Biochimica et biophysica acta*, 1858(7 Pt A), 1507–1532.
16. Bai, X., Moraes, T. F., & Reithmeier, R. A. F. (2017). Structural biology of solute carrier (SLC) membrane transport proteins. *Molecular membrane biology*, 34(1-2), 1–32.
17. Frumence E., Genetet S., Ripoche P., Iolascon A., Andolfo I., Le Van Kim C., Colin Y., Mouro-Chanteloup I., Lopez C. (2013) Rapid Cl⁻/HCO₃⁻ exchange kinetics of AE1 in HEK293 cells and hereditary stomatocytosis red blood cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. V. 305. № 6. P.C654 - 662.

18. Malte, H., & Lykkeboe, G. (2018). The Bohr/Haldane effect: a model-based uncovering of the full extent of its impact on O₂ delivery to and CO₂ removal from tissues. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985), 125(3), 916–922.
19. Satchwell, T. J., Hawley, B. R., Bell, A. J., Ribeiro, M. L., & Toye, A. M. (2015). The cytoskeletal binding domain of band 3 is required for multiprotein complex formation and retention during erythropoiesis. *Haematologica*, 100(1), 133–142.
20. Remigante, A., Morabito, R., & Marino, A. (2021). Band 3 protein function and oxidative stress in erythrocytes. *Journal of cellular physiology*, 236(9), 6225–6234.
21. Occhipinti, R., & Boron, W. F. (2019). Role of Carbonic Anhydrases and Inhibitors in Acid-Base Physiology: Insights from Mathematical Modeling. *International journal of molecular sciences*, 20(15), 3841.
22. Vince J. W., Carlsson U., Reithmeier R. A. Localization of the Cl⁻/HCO₃⁻ anion exchanger binding site to the amino-terminal region of carbonic anhydrase II. / *Biochemistry*. 2000. V. 39. № 44. P. 13344 - 9.
23. Vince J. W., Reithmeier R. A. Identification of the carbonic anhydrase II binding site in the Cl⁻/HCO₃⁻ anion exchanger AE1. / *Biochemistry*. 2000. V. 39. № 18. P. 5527 - 33.
24. Jensen F. B. Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport. *Acta Physiol Scand*. 2004. V. 182. № 3. P. 215 - 27.
25. Welbourn, E. M., Wilson, M. T., Yusof, A., Metodiev, M. V., & Cooper, C. E. (2017). The mechanism of formation, structure and physiological relevance of covalent hemoglobin attachment to the erythrocyte membrane. *Free radical biology & medicine*, 103, 95–106.
26. Sega M. F., Chu H., Christian J. A., Low P. S. Fluorescence assay of the interaction between hemoglobin and the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3. *Blood Cells Mol Dis*. 2015. V. 55. № 3. P. 266 - 71.
27. Frumence, E., Genetet, S., Ripoche, P., Iolascon, A., Andolfo, I., Le Van Kim, C., Colin, Y., Mouro-Chanteloup, I., & Lopez, C. (2013). Rapid Cl⁻/HCO₃⁻

exchange kinetics of AE1 in HEK293 cells and hereditary stomatocytosis red blood cells. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 305(6), C654–C662.

28. Jennings M. L. (2005). Evidence for a second binding/transport site for chloride in erythrocyte anion transporter AE1 modified at glutamate 681. *Biophysical journal*, 88(4), 2681–2691.

29. Nipot, E. (2012). Effect of butanol and hexanol on the anion transport in ram and hen red blood cells. *Visnyk of Lviv University. Biological series*, 58, 246 – 250.

30. Ramazanov, V. V. (2011). Efficiency of combine cryopreservatives containing glycerol or 1,2-prohfnediol during freezing of erythrocytes. *Problems of cryobiology*, 21(2), 125 – 136.

31. Galtieri, A., Tellone, E., Romano, L., Misiti, F., Bellocco, E., Ficarra, S., Russo, A., Di Rosa, D., Castagnola, M., Giardina, B., & Messana, I. (2002). Band-3 protein function in human erythrocytes: effect of oxygenation-deoxygenation. *Biochimica et biophysica acta*, 1564(1), 214–218.

32. Tellone, E., Ficarra, S., Scatena, R., Giardina, B., Kotyk, A., Russo, A., Colucci, D., Bellocco, E., Lagana', G., & Galtieri, A. (2008). Influence of gemfibrozil on sulfate transport in human erythrocytes during the oxygenation-deoxygenation cycle. *Physiological research*, 57(4), 621–629.

33. Bidani, A., Crandall, E. D., & Forster, R. E. (1978). Analysis of postcapillary pH changes in blood in vivo after gas exchange. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology*, 44(5), 770–781.

34. Dotsenko, O. I. (2022). The whole-cell kinetic metabolic model of the pH regulation mechanisms in human erythrocytes. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 13(3), 272-280.

35. Geers, C., & Gros, G. (2000). Carbon dioxide transport and carbonic anhydrase in blood and muscle. *Physiological Re-views*, 80(2), 681–715. doi: 10.1152/physrev.2000.80.2.681.

36. Michenkova, M., Taki, S., Blosser, M. C., Hwang, H. J., Kowatz, T., Moss, F. J., Occhipinti, R., Qin, X., Sen, S., Shinn, E., Wang, D., Zeise, B. S., Zhao, P.,

Malmstadt, N., Vahedi-Faridi, A., Tajkhorshid, E., & Boron, W.F. (2021). Carbon dioxide transport across membranes. *Interface Focus*. 11(2), 20200090.

37. Lew V. L. (2023). The circulatory dynamics of human red blood cell homeostasis: Oxy-deoxy and PIEZO1-triggered changes. *Biophysical journal*, 122(3), 484–495.

38. Yurinskaya, V. E., Moshkov, A. V., Marakhova, I. I., & Vereninov, A. A. (2023). Unidirectional fluxes of monovalent ions in human erythrocytes compared with lymphoid U937 cells: Transient processes after stopping the sodium pump and in response to osmotic challenge. *PloS one*, 18(5), e0285185.

39. Yamaguchi, M., Steward, M. C., Smallbone, K., Sohma, Y., Yamamoto, A., Ko, S. B., Kondo, T., & Ishiguro, H. (2017). Bicarbonate-rich fluid secretion predicted by a computational model of guinea-pig pancreatic duct epithelium. *The Journal of physiology*, 595(6), 1947–1972.

40. Dotsenko O.I., & Taradina G.V. (2024). Ion homeostasis in the regulation of intracellular pH and volume of human erythrocytes. *Biophysical Bulletin*, 51:7–25.

41. Gimsa, J. (1995). Red-Cell Echinocytogenesis Is Correlated to the Recruitment of External Band-3 Conformations. *Bioelectrochemistry Bioenerg.*, 38, 99–103.

42. Al-Samir, S., Papadopoulos, S., Scheibe, R. J., Meißner, J. D., Cartron, J. P., Sly, W. S., Alper, S. L., Gros, G., & Endeward, V. (2013). Activity and distribution of intracellular carbonic anhydrase II and their effects on the transport activity of anion exchanger AE1/SLC4A1. *The Journal of Physiology*, 591(20), 4963–4982.

43. Nikinmaa, M. (2003). Gas transport. In: Bernhardt, I., Ellory, J.C. (eds). *Red cell membrane transport in health and disease*. Berlin, Germany: Springer, Berlin, Heidelberg. p. 489–509.

44. 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.

45. Barvitenko, N. N., Adragna, N. C., & Weber, R. E. (2005). Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional

significance. Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, 15(1-4), 1–18.

46. Dotsenko, O. (2025). Kinetic modelling of sulfate ion transport through band 3 protein of erythrocytes. Biol. Stud., 2025, 19(4), 21–36.

47. Yang, Q., Chen, D., Li, C., Liu, R., & Wang, X. (2024). Mechanism of hypoxia-induced damage to the mechanical property in human erythrocytes-band 3 phosphorylation and sulfhydryl oxidation of membrane proteins. Frontiers in Physiology, 15, 1399154.

48. Ferru, E, Giger, K, Pantaleo, A, Campanella, E, Grey, J, Ritchie, K, Vono, R, Turrini, F, & Low P.S. (2011) Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine phosphorylation of erythrocyte band 3. Blood. 117(22). 5998-6006.

49. Zheng, S., Krump, N. A., McKenna, M. M., Li, Y. H., Hannemann, A., Garrett, L. J., Gibson, J. S., Bodine, D. M., & Low, P. S. (2019). Regulation of erythrocyte $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransport by an oxygen-switched kinase cascade. The Journal of biological chemistry, 294(7), 2519–2528.