

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А.Н. БАХА

На правах рукописи

Насыбуллина Эльвира Ильгизовна

ДЕЙСТВИЕ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА И КАРБОНИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
НА ГЕМОГЛОБИН

Специальность 03.01.04. Биохимия

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук
Топунов А.Ф.

Москва 2017

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Гемоглобины: разнообразие и функции	10
1.1.1. Классификация гемоглобинов	10
1.1.2. Гемоглобины как кислородзависимые регуляторы метаболизма оксида азота	11
1.1.3. Мембраносвязанный гемоглобин эритроцитов	17
1.1.3.1. Физиологическая роль мембраносвязанного гемоглобина	17
1.1.3.2. Потенциальное использование мембраносвязанного гемоглобина в клинико-биохимической диагностике	24
1.2. Карбонильный стресс в биологических системах	26
1.2.1. Понятие карбонильного стресса	26
1.2.2. Способы защиты от карбонильного стресса	30
1.2.3. Методические подходы, применяемые для изучения карбонильного стресса	32
1.2.4. Карбонильный стресс в эритроцитах	34
1.2.4.1. Пути возникновения карбонильного стресса в эритроцитах	34
1.2.4.2. Роль гемоглобина в развитии последствий карбонильного стресса	38
1.3. Адсорбционный механизм регуляции клеточного метаболизма	39
1.4. Компьютерные экспертные системы в медицинской диагностике	43
1.4.1. Понятие об экспертной системе	43
1.4.2. Методы анализа данных в экспертных системах	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	47
2.1. МАТЕРИАЛЫ	47
2.2. МЕТОДЫ	48
2.2.1. Определение концентрации гемоглобина и его разных форм	48
2.2.2. Эксперименты с суспензией эритроцитов	49
2.2.3. Реакционная система для изучения нитрозилирования гемопротеидов	50
2.2.4. Реакционная система для изучения влияния доноров NO и метилглиоксаля на переход гемоглобина в связанное с мембранами состояние	50
2.2.5. Получение гликированного гемоглобина	51
2.2.6. Определение флуоресцирующих продуктов неферментативного гликирования гемоглобина	51
2.2.7. Восстановление дифенилтетразолий бромида	51

2.2.8. Распад нитрозоглутатиона	51
2.2.9. Определение SH-групп в низкомолекулярных и белковых тиолах	52
2.2.10. Определение пероксинитрита.....	52
2.2.11. Измерение антиоксидантной активности ДНКЖ	52
2.2.12. Регистрация спектров оптического поглощения	53
2.2.13. Регистрация спектров ЭПР	53
2.2.14. SDS-электрофорез в ПААГ	53
2.2.15. Методы статистического анализа данных для построения экспертной системы	54
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	56
3.1. Влияние метаболитов оксида азота на реакцию неферментативного гликирования (реакцию Майяра).....	56
3.1.1. Ингибирование образования флуоресцирующих продуктов неферментативного гликирования донорами оксида азота.....	56
3.1.2. Образование динитрозильных комплексов железа с продуктами модификации гемоглобина и карнозина метилглиоксалем	60
3.2. Нитрозилирование и нитрование гемоглобина в условиях, моделирующих реакцию Майяра	68
3.2.1. Взаимодействие нитрозоглутатиона с гемоглобином в присутствии метилглиоксала	68
3.2.2. Образование нитригемоглобина в системе, содержащей метилглиоксаль	79
3.3. Переход гемоглобина из растворимого в мембраносвязанное состояние в условиях различных видов стресса.....	86
3.3.1. Разработка методики определения мембраносвязанного гемоглобина	86
3.3.2. Взаимосвязь между уровнем мембраносвязанного гемоглобина и устойчивостью эритроцитов.....	90
3.3.3. Стабилизирующее действие глутатионовых ДНКЖ на эритроциты	97
3.3.4. Влияние метаболитов оксида азота на переход гемоглобина в мембраносвязанное состояние в условиях карбонильного стресса	102
3.4. Создание компьютерной экспертной системы для диагностики анемий	115
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	121
ВЫВОДЫ.....	123
БЛАГОДАРНОСТИ.....	124
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	125

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ — аденозинтрифосфат

CDB3 — (англ. *Cytoplasmic Domain of Band 3 protein*) цитоплазматический домен белка полосы 3

oxyHb — оксигенированный гемоглобин

deoxyHb — восстановленный гемоглобин

metHb — окисленный гемоглобин

Hb-[Fe^{II}-NO] — нитрозилированный по железу гемовой группы гемоглобин (нитрозилгемоглобин)

SNO-Hb — нитрозилированный по SH-группам гемоглобин (нитрозогемоглобин)

MBHb — мембраносвязанный гемоглобин

NO₂-Hb — нитригемоглобин

Hb-[Fe^{IV}=O] — оксоферрильная форма гемоглобина

MG — метилглиоксаль

NO — оксид азота

CysNO — N-ацетил-L-цистеин-NO (нитрозоцистеин)

GSNO — нитрозоглютатион

PAPA/NO и DETA/NO — синтетические доноры оксида азота (NO)

ДНКЖ-GS — ДНКЖ с глутатионовыми лигандами

ДНКЖ-PO₄ — ДНКЖ с фосфатными лигандами

ДНКЖ-карнозин — ДНКЖ с карнозиновыми лигандами

АКС — активные карбонильные соединения

АФК — активные формы кислорода

АФА — активные формы азота

КПГ (AGEs — *Advanced Glycation End products*) — конечные продукты гликирования

ПОЛ — перекисное окисление липидов

СОД — супероксиддисмутаза

pO₂ — парциальное давление кислорода

sO₂ — парциальное давление кислорода внутри клетки, степень насыщения Hb кислородом

ДНАР — дигидроксиацетонфосфат

G3P — глицеральдегид-3-фосфат

СППР — система поддержки принятия решений

ЭПР — электронный парамагнитный резонанс

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

При метаболических нарушениях, приводящих к гипергликемии и кетонемии, в организме человека и животных накапливаются активные карбонильные соединения и конечные продукты гликирования аминокислот и белков [Kalapos, 2008a; Allaman et al., 2015]. Влияние этих соединений на физиологическую активность оксида азота (NO) является основной причиной нарушения вазодилатации при диабете [Turkseven et al., 2014; Alomar et al., 2016]. Важным фактором, влияющим на функционирование NO в сердечно-сосудистой системе, является гемоглобин (Hb). Гемоглобин может участвовать в образовании и в элиминации NO [Gardner, 2012; Tejero, Gladwin, 2014], а также выступать в качестве переносчика NO в форме нитрозотиолов [Zhang et al., 2016; Космачевская, Топунов, 2009] или динитрозильных комплексов негемового железа [Тимошин с соавт., 2007; Timoshin et al., 2007; Shumaev et al., 2008a,b; Ванин, 2015].

Особенности метаболизма эритроцитов увеличивают вероятность сочетания окислительного, нитрозативного и карбонильного стрессов. В энергетическом отношении эритроциты зависимы от потребления глюкозы, которая метаболизируется в реакциях гликолиза и пентозофосфатного шунта. Интермедиаты этих реакций — триозофосфаты являются основным источником активного дикарбонильного соединения — метилглиоксаля (MG) [Richard, 1993; Allaman et al., 2015]. В результате спонтанного автоокисления Hb в эритроцитах постоянно образуется супероксид-анион ($O_2^{\bullet-}$). Этот процесс может усиливаться в условиях гипоксии, когда возрастает дезоксигенация Hb и конформационное R-T равновесие сдвигается в сторону T-формы, более склонной к автоокислению [Bonaventura et al., 2013]. При этом дезоксиHb, восстанавливая нитриты и нитросоединения, может продуцировать NO. Одновременное образование в эритроцитах $O_2^{\bullet-}$ и NO, а также наличие восстановленного железа в составе гемовой группы и железа, высвободившегося при окислительной дегградации Hb, создают предпосылки для развития окислительного и нитрозативного стрессов. В этих условиях образуются нитрозотиолы и динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), связанные с гемоглобином, и низкомолекулярные, связанные с глутатионом [Shumaev et al., 2008]. К тому же, длительный период жизни гемоглобина повышает вероятность образования связанных с Hb конечных продуктов гликирования [Nathan et al., 2007]. Изменения структуры, заряда и конформации белка вследствие гликирования аминокислотных остатков благоприятствуют связыванию Hb с компонентами мембран и цитоскелета [Громов с соавт., 1988; Токтамысова, Биржанова, 1991; Datta et al., 2008], а также образованию

агрегатов из денатурированных и сшитых молекул Hb (телец Гейнца) [Webster, 1949]. Повышенное количество мембраносвязанного Hb может быть связано со многими болезнями системы крови, вызванными нарушениями в системе антиоксидантной защиты и действием различных ксенобиотиков [Shaklai, Ranney, 1978; Shaklai, Sharma, 1981; Sharma, Premachandra, 1991].

Роль доноров NO при карбонильном стрессе неоднозначна. С одной стороны, NO может непосредственно взаимодействовать с продуктами неферментативного гликирования и предотвращать их дальнейшие превращения, с другой стороны, метаболиты NO могут участвовать в генерации свободнорадикальных интермедиатов. Поэтому представлялось актуальным изучение влияния оксида азота на процессы неферментативного гликирования и функционирование гемоглобина в условиях карбонильного стресса.

Цель и задачи исследования

Целью работы было изучение образования редокс-активных интермедиатов реакции неферментативного гликирования в присутствии метаболитов и доноров оксида азота и их действия на гемоглобин.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Изучить влияние метаболитов оксида азота на протекание реакции неферментативного гликирования (реакция Майяра) и образование в ходе этой реакции редокс-активных соединений.
- 2) Изучить влияние интермедиатов реакции Майяра на окислительную модификацию гемоглобина и его присоединение к компонентам мембраны.
- 3) Разработать методику определения мембраносвязанного гемоглобина в эритроцитах.
- 4) Изучить влияние метаболитов оксида азота на образование мембраносвязанного гемоглобина в эритроцитах, обработанных метилглиоксалем.
- 5) Разработать компьютерную экспертную систему для диагностики анемий и гемоглобинопатий различного генеза с использованием данных о мембраносвязанном гемоглобине.

Научная новизна работы

В системе, моделирующей карбонильный стресс, впервые было показано увеличение выхода свободнорадикальных интермедиатов под действием нитрозотиолов. Эти редокс-активные соединения вызывали нитрозилирование гемоглобина и нитрование винильной группы порфирина, а также присоединение гемоглобина к компонентам мембраны. Было установлено, что продукты взаимодействия метилглиоксала с аминокислотными остатками гемоглобина и карнозина могут быть лигандами

динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ). До настоящего исследования в научной литературе отсутствовали факты, описывающие способность оснований Шиффа участвовать в формировании ДНКЖ. Образование подобных комплексов может быть одной из причин ингибирования реакции неферментативного гликирования метаболитами оксида азота.

Впервые было предложено рассматривать уровень связанного с мембранами гемоглобина (МВНб) в качестве дополнительного критерия оценки функционального состояния эритроцитов при хронической эндогенной интоксикации.

Научно-практическая значимость работы

В настоящее время рассматривается возможность использования показателя реактивности эритроцитов в качестве индикатора стрессового состояния или адаптационной реакции организма. Мы предлагаем производить оценку реактивности эритроцитов по содержанию МВНб. Уровень МВНб в крови также можно использовать в клинической диагностике в качестве дополнительного биохимического показателя выраженности интоксикационного синдрома. Разработанная в рамках данной работы методика спектрофотометрической оценки доли МВНб в эритроцитах может быть полезна для этих целей. Предложенная пилотная версия компьютерной экспертной системы, учитывающая данные о МВНб, может послужить основой для создания диагностического комплекса, направленного на повышение оперативности и точности при постановке диагноза в сфере заболеваний системы крови.

Выявленное цитопротекторное действие физиологических доз глутатионовых ДНКЖ может служить предпосылкой для применения этих метаболитов NO в качестве стабилизаторов эритроцитов при проведении фотодинамической терапии и при консервировании донорской крови. Использование этих комплексов может изменить характеристики зависимости «доза-ответ» эритроцитов, а также увеличить зону стабилизации.

Полученные в работе ДНКЖ с карнозиновыми лигандами можно рассматривать как потенциально новый класс фармакологических препаратов, функциональные группы которого обладают синергетическим терапевтическим действием и позволяют корректировать метаболизм оксида азота и эффективно защищать клетки сердечно-сосудистой системы и нервной ткани при окислительном и нитрозативном стрессах.

Положения диссертации, выносимые на защиту.

1. Установлено, что физиологические метаболиты оксида азота ингибируют реакцию неферментативного гликирования аминокислотных остатков гемоглобина и карнозина, индуцированную метилглиоксалем. Показано образование динитрозильных

комплексов железа с продуктами модификации гемоглобина и карнозина метилглиоксалем. Формирование ДНКЖ является одним из механизмов антигликирующего действия метаболитов оксида азота.

2. Нитрозоглутатион при карбонильном стрессе стимулирует образование редокс-активных соединений, которые могут быть нитрозилирующими и нитрующими агентами и вызывать окислительную модификацию метгемоглобина и его связывание с мембранами эритроцита.

3. Установлен диапазон нормальных значений для мембраносвязанного гемоглобина: 3,3% – 4,9%. Среди обследованных онкологических больных, которым была назначена химиотерапия, несоответствие норме уровня МВНб наблюдалось у 61%, в то время как в контрольной группе эта величина составляла 36%.

4. Разработана пилотная версия компьютерной экспертной системы для диагностики анемий у онкобольных, учитывающая данные о содержании мембраносвязанного гемоглобина.

Личный вклад диссертанта. Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов.

Связь с государственными программами. Работа выполнена в рамках государственной темы «Влияние активных метаболитов оксида азота и редокс-активных интермедиатов карбонильного стресса на функционирование гемоглобинов» (№ государственной регистрации 01201351362) и была поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты 12-04-01809, 13-04-00967, 14-04-01710), Российским гуманитарным научным фондом (грант 15-36-01024) и Федеральной целевой программой «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (Госконтракт № П808).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 11 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на XIX и XXIII международных конференциях «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Ялта-Гурзуф, Крым, 2011, 2015); V международной научной конференции «Химия, структура и функция биомолекул» (Минск, Белоруссия, 2014); IV Международной молодежной научной школе-конференции «Современные проблемы физики и технологий» (Москва, 2015); Научной сессии НИЯУ МИФИ-2015» (Москва, 2015); III межрегиональной научно-практической конференции «Диагностика и

лечение анемий в XXI веке» (Рязань, 2015). Работа была представлена на межлабораторном семинаре Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» 26 декабря 2016 г.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Гемоглобины: разнообразие и функции

1.1.1. Классификация гемоглобинов

Гемоглобины (Hb) — очень древние белки, обнаруженные у представителей всех царств живой природы, где они выполняют самые разнообразные функции: восстанавливают нитриты, органические и неорганические перекиси, улавливают малые количества O₂, NO и CO, сигнализируя клетке об их присутствии в окружающей среде, а также связывают и транспортируют эти газы. За последние два десятилетия семейство гемоглобиновых белков пополнилось различными молекулярными вариантами. В настоящее время совокупность белков гемоглобинового типа образует суперсемейство, в котором выделяют следующие разновидности гемоглобинов: цитоглобины (Cygb – cytoglobin), нейроглобины (Ngb – neuroglobin), симбиотические гемоглобины (Sgb – symbiotic Hb), несимбиотические гемоглобины (Nsgb – nonsymbiotic Hb), однодоменные гемоглобины (SDgb – single domain Hb), протоглобины (Pgb – protoglobin), «усеченные» гемоглобины (Trgb – truncated hemoglobin), флавогемоглобины (Fgb – flavo hemoglobin) и двойные глобиновые сенсоры (GCS – globin-coupled sensor) [Космачевская, Топунов, 2009]. Недавно был описан совершенно новый белок — андроглобин, который пока не отнесен ни к одной из известных групп гемоглобинов.

Несмотря на разнообразие структур и функций белков гемоглобинового типа, можно попытаться дать определение этому суперсемейству белков. К гемоглобинам принято относить белки, содержащие в качестве простетической группы Fe-протопорфирин IX (гем) и состоящие из пяти или восьми α -спиралей, обозначаемых буквами А-Н, с инвариантным гистидином в позиции F8, являющимся проксимальным лигандом гема. Гем, как правило, присоединен к глобиновой части нековалентно. По так называемой рациональной классификации белков, в основу которой положен «мотив укладки» белковой цепи [Финкельштейн, Птицын, 2002], гемоглобины относят к двум архитектурным типам: «2/2 спиральный сэндвич» и «3/3 спиральный сэндвич», что означает: две или три α -спирали в верхнем слое, расположенные над двумя или тремя α -спиралями в нижнем слое. Представленная в таблице (табл.1) классификация гемоглобинов основана не только на топологии вторичной структуры, но и на гомологии аминокислотных последовательностей различных групп гемоглобинов. В пределах глобинового суперсемейства выделяют три семейства (или линии). Первую линию составляют Fgb, химерные белки (~400 аминокислотных остатков), и родственные им SDgb, которые обладают канонической α -спиральной укладкой миоглобинового типа (3/3 спиральный сэндвич) с гемовой группой, окруженной спиралями А, В, С и Е с одной

стороны и спиралями F, G и H с другой [Bolognesi et al., 1997; Lecomte et al., 2005]. Вторую линию составляют GCS, химерные белки — регуляторы генов (300 ÷ 700 а.о.), состоящие из N-концевого глобинового домена и C-концевого киназного домена [Chain, 2000; Zhang, Phillips, 2003] и родственные однодоменные Pgb [Hou et al., 2001; Freitas et al., 2005]. Третья линия включает так называемые «усеченные» гемоглобины (Trgb) — 2/2 α -спиральные однодоменные белки с очень короткой или отсутствующей А-спиралью, сокращенной СЕ областью, F-спиралью в виде петли и спиралями DC, E, G и H, окружающими гемовую группу [Lecomte et al., 2005; Vuletich, Lecomte, 2006].

Табл. 1. Классификация гемоглобинов [Vinogradov, Moens, 2008].

3/3 Fgb		3/3GCS			2/2Hb		
Fgb	SDgb	GCS	SDSgb	Pgb	I	II	III

1.1.2. Гемоглобины как кислородзависимые регуляторы метаболизма оксида азота

Долгое время считалось, что главным свойством белков гемоглобинового типа является способность переносить кислород и участвовать в процессе дыхания. По этой причине гемоглобин получил название «дыхательный пигмент». К настоящему времени накоплено достаточное количество экспериментальных фактов, свидетельствующих о том, что способность обратимо связывать кислород не для всех гемоглобинов является основной функцией. Обнаружение белков гемоглобинового типа у представителей всех царств живой природы заставило переосмыслить эволюцию и функции этих белков.

Первой установленной для гемоглобинов была кислородпереносящая и кислородзапасящая функция. Оксид азота рассматривали как ещё одно химическое вещество, способное прочно связываться с гемовой группой [Иржак, 1975]. И только после того, как стало известно, что NO является сигнальной молекулой, регулирующей деятельность сердечно-сосудистой, нервной и иммунной систем [Hill et al., 2010], началось тщательное исследование реакций взаимодействия Hb с NO. Уже нет сомнений, что взаимодействие с оксидом азота (NO) — это первичная и всеобщая функция всех известных гемоглобинов, а обратимо связывают кислород далеко не все представители этого суперсемейства [Tejero, Gladwin, 2014].

Функции оксид азота в биологической системе разнообразны. С одной стороны, NO регулирует важные физиологические процессы, а с другой, NO и его метаболиты могут инактивировать структурные белки, ферменты и нуклеиновые кислоты. Оксид азота является физиологически активной молекулой благодаря способности образовывать

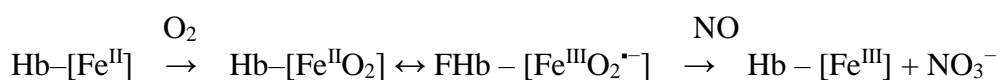
нитрозильные комплексы с гемовым и негемовым железом и осуществлять реакцию нитрозилирования и, возможно, нитрования (через интермедиаты — NO₂ и ONOO⁻). Эти реакции неспецифичны и могут затрагивать не только молекулы-мишени, но и другие органические вещества. Поэтому помимо систем, производящих NO, необходимы механизмы, регулирующие его концентрацию, которая не должна выходить за пределы физиологической нормы. Существует точка зрения, что молекула NO возникла на заре эволюции живых систем в реакциях восстановления нитритов в электронтранспортных цепях [Shiva, 2013]. Поэтому оксид азота уже тогда мог быть естественным промежуточным метаболитом подобно супероксид-анион радикалу (O₂^{-•}). Поскольку для борьбы с супероксидным анион-радикалом в биологических системах существуют специализированные ферменты (супероксиддисмутаза и каталаза), то, по аналогии, должны существовать и биохимические системы нейтрализации NO. И такие системы были обнаружены. У прокариот и низших эукариот — это флавогемоглобины (Fgb) [Gardner, 2005], в растениях — несимбиотические гемоглобины (Nsgb) [Perazzolli et al., 2004], у животных — нейро- и цитоглобины (Ngb, Cygb) [Gardner, 2010]. Детоксикацию NO также могут осуществлять миоглобин и эритроцитарный гемоглобин [Gardner, 2005].

В то время, когда гемоглобины были впервые обнаружены у бактерий и дрожжей, исследователи не предполагали, что эти белки эволюционно связаны с метаболизмом оксида азота. Хотя уже было известно о пероксидазных и нитритредуктазных свойствах гемоглобинподобных белков, эти реакции не связывали с гемовой простетической группой и не рассматривали как физиологически значимые. И только открытие «новых» гемоглобинов с гексакоординированным железом гема и аномально высоким сродством к кислороду (для эритроцитарного Hb P₅₀O₂=26 торр, для Mb P₅₀O₂=2-3 торр, для Ngb P₅₀O₂=7,5 торр, для Cygb P₅₀O₂=0,7-1,8 торр) [Tejero, Gladwin, 2014], заставило посмотреть на эти белки по-новому.

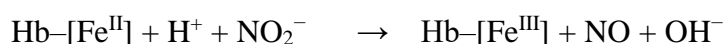
В настоящее время о гемоглобинах в первую очередь говорят, как о «NO-реактивных белках». Именно поэтому один из томов “Methods in Enzymology” за 2008 г был назван «Globins and Other Nitric Oxide-Reactive Proteins».

По своей способности взаимодействовать с NO гемоглобины являются уникальными белками. Описаны следующие реакции, катализируемые гемоглобинами:

- 1) NO-диоксигеназная реакция (NOD-реакция):



- 2) Нитритредуктазная реакция:



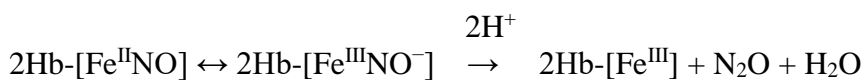
3) Нитритангидразная реакция:



4) Изомеризация пероксинитрита в нитрат:



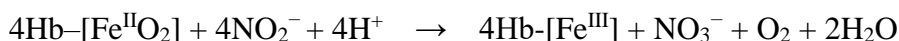
5) Денитрозилазная реакция:



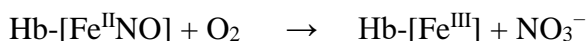
6) Восстановительное нитрозилирование:



7) Окисление нитрита:



8) Окислительное денитрозилирование:



NOD-реакция (реакция 1) является наиболее распространенной в природе реакцией гемовой группы глобинов с NO, а для некоторых гемоглобинов, например, для Fgb, эта реакция является основной функцией белка [Gardner, 2005]. Благодаря NOD-реакции внеклеточного Hb снижается концентрация NO в кровеносном русле и, как следствие, происходит вазоконстрикция и тромбообразование.

Следующей по значимости является нитритредуктазная реакция (реакция 2). Общеизвестно значение этой реакции для поддержания необходимого уровня NO в кровотоке в условиях гипоксии. Скорость нитритредуктазной реакции линейно зависит от концентрации протонов в среде, что указывает на участие в реакции азотистой кислоты (HNO₂) и не NO₂⁻ [Doyle et al., 1981]. Конечными продуктами является Hb-[Fe^{III}] и Hb-[Fe^{II}NO], образуемые в соотношении 1:1 [Huang et al., 2005]. В анаэробной среде реакция восстановления нитритов deoxyHb описывается сигмоидной кривой, которая указывает на наличие аллостерического механизма. Образующийся в ходе реакции Hb-[Fe^{II}NO] смещает R—T равновесие в сторону более каталитически активного (в 50 раз) R-конформера [Huang et al., 2005]. Согласно расчетам, максимальный выход NO имеет место в условиях, когда гемоглобин наполовину насыщен кислородом [Helms, Kim-Shapiro, 2013]. Реакция окисления нитрита дезоксигемоглобином (реакция 7) представляет интерес с токсикологических позиций, поскольку протекает в крови при нитратно-нитритных интоксикациях. Несмотря на длительную историю изучения, механизм этой реакции до конца не ясен. Ясно только, что это многоэтапный процесс, сопровождающийся образованием промежуточных продуктов: H₂O₂ и NO₂ [Keszler et al., 2008]. Как видно из представленных выше реакций, гемоглобины взаимодействуют с NO и его метаболитами

во всех окислительно-восстановительных состояниях, что является косвенным подтверждением эволюционной связи гемоглобинов с метаболизмом оксида азота.

Гемоглобины также образуют различные комплексы с NO: с участием железа гемовой группы — нитрозилHb (гем-[Fe^{II}NO]), с участием SH-группы Cys-β93 — нитрозоHb (SNO-Hb) [Jia et al., 1996; Doctor et al., 2005] и динитрозильные комплексы железа — Hb-ДНКЖ [Тимошин с соавт., 2007; Timoshin et al., 2007; Shumaev et al., 2008a,b].

Многообразие способов взаимодействия гемоглобинов с NO и его метаболитами служит для поддержания баланса NO и O₂ в живых системах. Благодаря способности гемоглобинов формировать гемовые комплексы с NO при наномолярных концентрациях лиганда и с O₂ при миллимолярных концентрациях, становится возможным регулирование концентрации оксида азота в зависимости от концентрации кислорода. Помимо NOD-реакции, в настоящее время в регулировании соотношения [NO]/[O₂] в кровотоке уделяется большое внимание нитритредуктазной реакции гемоглобинов. Несмотря на то, что константа скорости восстановления нитритов дезоксигемоглобином низкая, существует точка зрения, что эта реакция может быть дополнительным путем образования NO у млекопитающих в условиях гипоксии, когда ингибируется деятельность NO-синтаз [Huang et al., 2005; Gladwin et al., 2006; Shiva, 2013]. Концепция нитритзависимой вазодилатации в настоящее время признается многими исследователями, хотя ключевая роль эритроцитарного Hb в этом процессе до сих пор оспаривается. Время реакции охуHb и деохуHb с NO исчисляется микросекундами (диффузионно контролируемые константы ($k \sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [Gardner, 2005], в то время как восстановление NO₂⁻ дезоксигемоглобином длится от минут до часов ($k \sim 5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Из этого следует, что большая часть образующегося из нитритов NO будет немедленно окислена оксигемоглобином или прочно связана с гемовым железом деохуHb. По этой причине физиологическое значение нитритредуктазной реакции, катализируемой деохуHb, ставится под сомнение. В работе [Helms, Kim-Shapiro, 2013] предпринята попытка разрешить этот парадокс. Следует, однако, отметить, что вазорелаксирующее действие нитритов сохраняется в условиях отсутствия эритроцитов [Dalsgaard et al., 2007]. Поэтому наиболее вероятно образование NO при участии иных нитритредуктазных систем (ксантинооксидазы, ферментов дыхательной цепи), а роль гемоглобина заключается в регулировании направления метаболических потоков оксида азота в зависимости от кислородного статуса клетки [Shiva, 2013; Tejero, Gladwin, 2014]. Предложенная в 1996 г. Stamler'ом гипотеза об участии cysβ93 в регуляции сосудистого тонуса (SNO-Hb – гипотеза) [Jia et al., 1996; Stamler, 2004; Stamler et al., 2008] хорошо дополнила концепцию

нитритзависимой вазодилатации. Суть этой гипотезы заключается в том, что механизмы, регулирующие аллостерическое связывание кислорода в молекуле гемоглобина, одновременно регулируют высвобождение оксида азота из нитрозоHb (SNO-Hb) (рис. 2).

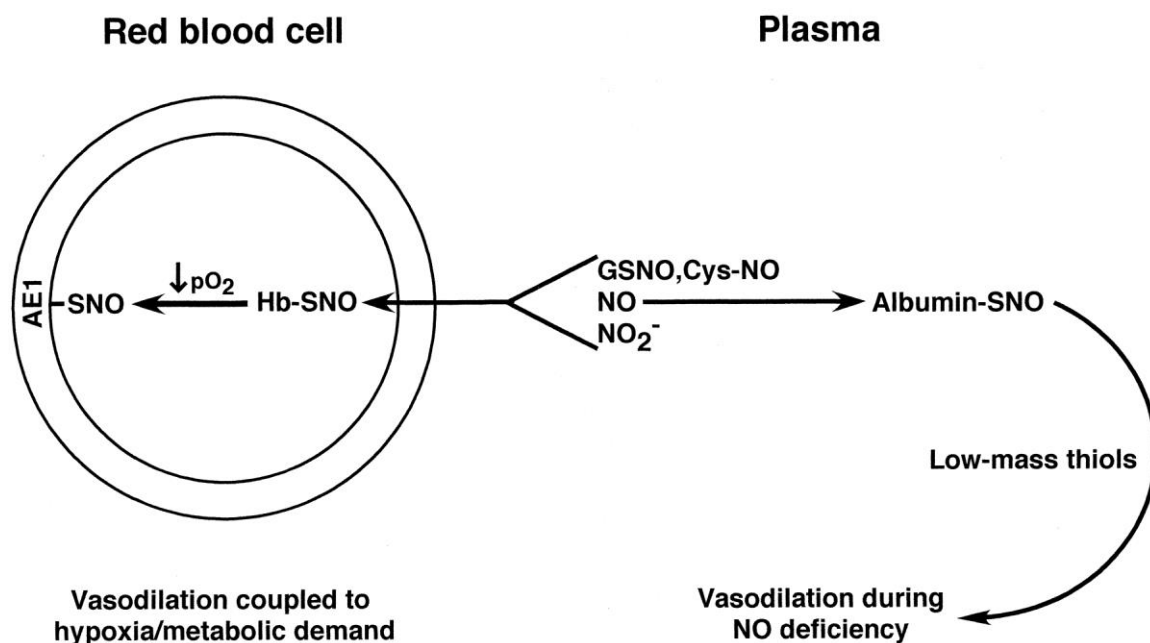


Рис. 1. Механизм вазодилатации с участием эритроцитарного Hb-SNO в условиях гипоксии (и повышенного метаболического спроса) и RSNO плазмы в условиях дефицита NO. AE1 (белок полосы 3) – анионо-обменник. Рисунок взят из статьи [Stamler, 2004].

Восстановление нитритов гемоглобином также протекает по механизму аллостерического автокатализа (R-state autocatalysis) [Huang et al., 2005]. Если ранее считалось, что аллостерический механизм способствует более эффективному осуществлению гемоглобином кислородтранспортной функции, то сейчас обсуждается возможность влияния степени насыщения субъединиц кислородом на скорость нитритредуктазной и SNO-синтазной реакций (рис. 2) [Doctor et al., 2005].

В отличие от нитритредуктазной реакции, скорость NO-диоксигеназной реакции для T- и R-конформеров одинакова (табл. 2), что свидетельствует о независимости этого процесса от кооперативного взаимодействия субъединиц, и подтверждает универсальность диоксигеназной функции, которая присуща и мономерным, и тетрамерным формам гемоглобинов.

Табл. 2. Зависимость константы скорости окисления оксида азота охуНб в разных конформационных состояниях [Cantu-Medellin et al., 2011].

	P₅₀ (мм Hg)	Коэффициент Хилла	K_{oxNO} (мкМ⁻¹с⁻¹)
Hb	27,37±1,57	2,84±0,081	18,3±1,8
Hb(T)	41,16±3,05	1,01±0,015	18,7±2,3
Hb(R)	1,84±0,78	0,69±0,11	17,5±5,5

Сравнение констант скоростей реакций окисления мономерными оксигенированными гемоглобинами (Fgb, Nsgb, Ngb) NO до нитрата и реакции супероксид-анион радикала с NO показывает, что скорость элиминации NO сравнима со скоростью образования пероксинитрита. Обе реакции являются диффузионно-контролируемыми. Этот факт подтверждает точку зрения, что древние Hb были эффективными специализированными системами детоксикации NO, и лишь впоследствии, с появлением аэробного дыхания, когда возникла необходимость повысить растворимость кислорода в биологических жидкостях, свойство Hb связывать кислород было эволюционно адаптировано для осуществления его запасаения и транспорта. Нельзя исключить, что гемоглобины осуществляют не только биотрансформацию NO, но также участвуют в его стабилизации и транспорте за счёт SH-групп цистеина и гемовой группы [Jia et al., 1996; Doctor et al., 2005]. Некоторые новые гемоглобины могут осуществлять доставку NO в комплексе с гемовой группой, подобно белкам нитрофоринам, обнаруженным в слюне кровососущих насекомых *Rhodnius prolixus* [Knipp, He, 2011]. Для того, чтобы транспорт NO был возможен, его связь с гемом должна быть лабильной, т.е. должны существовать механизмы регулирования сродства Hb к NO. Вероятно, в этом процессе задействованы дистальный гистидин и поверхностные SH-группы, которые «реагируют» на градиент протонов или восстановительных эквивалентов [Hamdane et al., 2003].

Гемоглобины в мет-, дезокси- и окси- формах взаимодействуют с NO и его основными метаболитами (NO₂⁻ и ONOO⁻) и способны связывать NO разными способами, что говорит об их первичной эволюционной специализации, направленной на модуляцию активности NO посредством регулирования концентрации и биодоступности его метаболитов. Хорошим примером регулирования концентрации NO в зависимости от концентрации O₂ являются Nsgb, которые осуществляют детоксикацию NO двумя способами — по диоксигеназному и нитроксилазному пути [Perazzolli et al., 2004]. Какой механизм будет преобладать, зависит от баланса концентраций NO и O₂ в системе. В

биологии газообразные молекулы оксида азота и кислорода, постоянно взаимодействуют, образуя широкий спектр метаболитов, находящихся в динамическом равновесии. А гемоглобины стоят на страже этого равновесия.

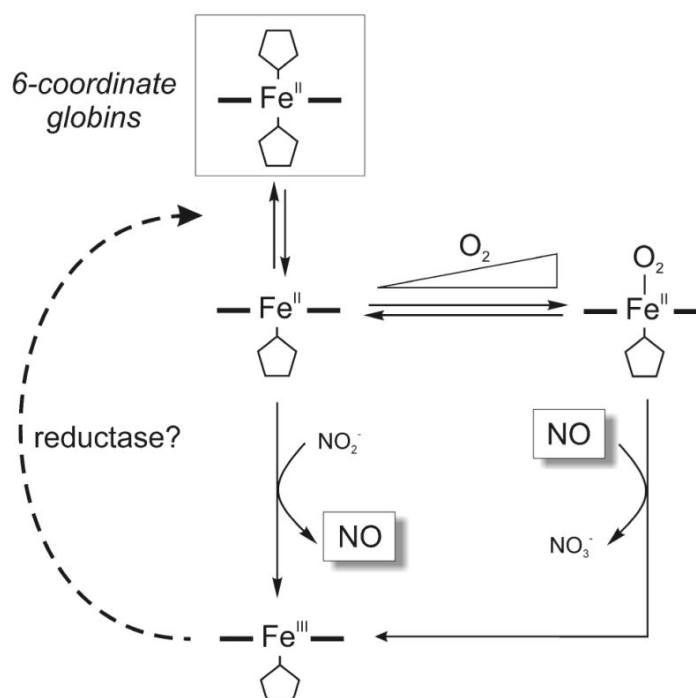


Рис. 2. Участие гемоглобина в образовании и элиминации оксида азота в зависимости от парциального давления кислорода в среде. Окисленный гемоглобин может быть восстановлен до исходной формы (деоxуHb) с помощью мет-Hb-редуктазы или других восстановительных агентов. В гексакоординированных гемоглобинах возврат к восстановленной форме определяется связыванием железа гема с дистальным гистидином боковой цепи. Рисунок взят из статьи [Tejero, Gladwin, 2014].

1.1.3. Мембраносвязанный гемоглобин эритроцитов

1.1.3.1. Физиологическая роль мембраносвязанного гемоглобина

К настоящему времени семейство гемоглобиновых белков пополнили новые представители, некоторые из которых существуют в связанной с мембранами форме. Это гемоглобины бактерий *Vitreoscilla sp.* [Ramandeep et al., 2001] и флавогемоглобин *Escherichia coli* [Bonamore et al., 2003; Di Giulio, Bonamore, 2008], а также гексакоординированные гемоглобины рыб и земноводных, содержащие области миристоилирования и пальмитилирования, необходимые для встраивания в мембрану [Blank et al., 2011; Ertas et al., 2011]. Перечисленные гемоглобины являются частью внутриклеточной кислород-чувствительной сигнальной системы. Обсуждается возможность участия этих гемоглобинов в защите липидов клеточной мембраны и

терминальных оксидаз от повреждения активными формами кислорода (АФК) и азота (АФА) [Di Giulio, Bonamore, 2008].

Еще до открытия гемоглобинов с заданной мембранной локализацией, был установлен факт связывания эритроцитарного Hb с мембранами при попытке получить тени эритроцитов гипотоническим лизисом. Первое упоминание о содержании Hb в эритроцитарных мембранах можно найти в работах Anderson'a и Turner'a [Anderson, Turner, 1959; 1960], которые показали, что отмытые мембраны эритроцитов содержат около 3% Hb. Затем Fung и Eisinger [Fung, 1981; Eisinger et al., 1982] в своих исследованиях подтвердили факт взаимодействия Hb с мембранами эритроцитов в физиологических условиях. По данным Токтамысовой и Биржановой, доля ассоциированного с мембранами Hb в нативных эритроцитах в зависимости от ряда факторов может изменяться в диапазоне от 7 до 10% [Токтамысова, Биржанова, 1990], согласно другим данным от 1,1 до 5,2% [Nash, Meiselman, 1983]. Количественное содержание гемоглобина в мембранах эритроцитов, измеренное с помощью двумерного электрофореза, составляет $17,40 \pm 0,74$ мкг на 1 мг общего белка мембран и является наименьшим, по сравнению с количественным содержанием остальных мембранных белков [Громов с соавт., 1988]. Различия в содержании MBHb объясняется использованием различных методических подходов для определения Hb в мембранах.

Взаимодействовать с мембранами Hb может разными способами: электростатическое связывание deoxyHb по цитоплазматическому домену анионтранспортного белка полосы 3 (CDB3 – Cytoplasmic Domain of Band 3 protein) (рис. 2) [Shaklai et al., 1977; Fung, 1981; Eisinger et al., 1982; Sega et al., 2012], ковалентная пришивка к мембранным компонентам дисульфидными связями [Chan, Desforges, 1974], адсорбция к мембранным липидам с помощью гидрофобных взаимодействий [Sharma, Premachandra, 1991]. Также Hb может связываться с другими белками цитоскелета: спектрином и гликофорином [Shaklai, 1977; Datta, 2008]. Связывание Hb с мембраной может быть обратимым и необратимым. С применением флуоресцентных зондов было показано, что Hb обратимо связывается с CDB3 с высоким сродством за счет электростатических взаимодействий [Shaklai et al., 1981; Demehin et al., 2002]. Необратимым является ковалентное связывание Hb с компонентами мембраны вследствие действия различных окислительных агентов, вызывающих образование свободных радикалов и оксоферрильных форм гемоглобина, инициирующих процессы перекисного окисления липидов [Shaklai, Ranney, 1978; Kumar, Bandyopadhyay, 2005; Kriebardis et al., 2007]. Согласно содержащимся в литературе данным, доля необратимо связанного Hb возрастает при различных формах гемоглобинопатий, как наследственных (серповидно-

клеточная анемия, талассемии) [Searsh, Luthra, 1983; Scott et al., 1993], так и индуцированных окислительными агентами (H_2O_2 , t-BOOH, HOCl, NO_2 , NO_2^-) [Sullivan, Stern, 1984; Zavodnik et al., 1999; Кленова, 2002; Кленова, Языкова, 2004; Nagababu et al., 2010].

Обратимый характер связывания Hb с мембранами служит указанием на возможную физиологическую значимость этого процесса. Данные последних лет показывают, что связывание гемоглобина с мембранными компонентами имеет множественное биологическое значение. Это и регуляция метаболизма глюкозы и свойств цитоскелета в зависимости от концентрации кислорода, и формирование сигнала об окислительном повреждении или старении эритроцита, а также участие в сигнальном пути гипоксической вазодилатации. Перечисленные функции гемоглобин реализует при участии CDB3. По некоторым данным, обратимое связывание Hb с мембранами может быть адаптивной реакцией, направленной на стабилизацию липидного бислоя мембран [Knutton et al., 1970; Комиссарчук с соавт., 1977] и/или регуляцию его упруго-механических свойств [Шперлинг с соавт., 2004]. Примембранным белковым слоям в настоящее время приписывают ряд функций: участие в процессах транспорта веществ, в иммунологическом поведении клеток, их адгезивных свойствах, контактном ингибировании и т.д.

Роль MBHb в регуляции метаболизма глюкозы

Согласно имеющимся данным, гемоглобин в дезоксигенированном или частично дезоксигенированном состоянии обладает высоким сродством к CDB3 [Chu et al., 2008; Cao et al., 2009; Sega et al., 2012]. Увеличение доли deoxyHb в условиях гипоксии приводит к вытеснению ферментов гликолиза с сайта связывания с CDB3 и переходу их в растворимое активное состояние (рис. 3) [Chu, Low, 2006; Chu et al., 2008].

Таким образом, связывание deoxyHb с CDB3 переключает метаболизм с пентозофосфатного пути на гликолитический в ответ на изменение кислородного статуса клетки [Low et al., 1993; Messana et al., 1996; Weber et al., 2004]. С одной стороны, это способствует возрастанию уровня внутриклеточного АТФ, а с другой, уменьшает поток глюкозы, поступающей в пентозофосфатный путь, в котором образуется NADPH, необходимый для восстановления антиоксидантных ферментов. Таким образом, связывание deoxyHb с CDB3 может приводить к сдвигам в метаболическом статусе эритроцита в ответ на изменение кислородного статуса клетки. Поскольку CDB3 является центром организации мембраны эритроцитов и регулятором ионного гомеостаза, то даже незначительные изменения в связывании с CDB3 приводят к изменению морфо-биохимических свойств клеток.

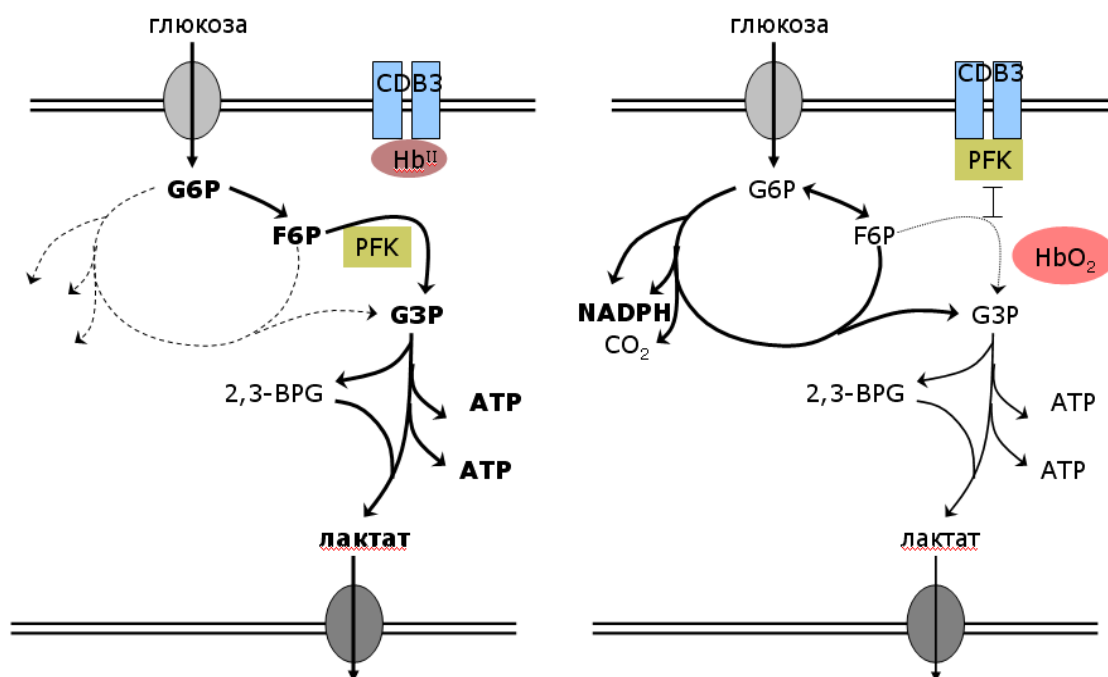


Рис. 3. Регуляция углеводного метаболизма через обратимое связывание с белком полосы 3 (CDB3) [Castagnola et al., 2010]. Обозначения: G6P – глюкозо-6-фосфат, F6P – фруктозо-6-фосфат, G3P – глицеральдегид-3-фосфат, 2,3-BPG – 2,3-дифосфоглицерат, PFK – фосфофруктокиназа.

Роль МВНб в регуляции капиллярного кровотока

Помимо основной функции, связанной с доставкой кислорода к клеткам тканей, эритроциты участвуют в регуляции капиллярного кровотока (локального внутрисосудистого давления). Локальный кровоток является фактором, определяющим регуляцию метаболизма тканей. Описаны три возможных механизма вовлечения эритроцитов в регуляцию тонуса сосудов. Это аллостерически-регулируемое высвобождение NO с участием SH-групп β -субъединицы Hb (гипотеза SNO-Hb) [Jia et al., 1996; Stamler et al., 2008], восстановление нитрит-ионов deoxyHb (гипотеза нитритной вазодилатации) [Huang et al., 2005; Gladwin et al., 2006; Shiva, 2013] и стимуляция синтеза NO эндотелиоцитами эритроцитарным ATP (гипотеза высвобождения ATP) [Sprague et al., 2007; Ellsworth et al., 2009; Ramdani, Langsley, 2014]. Каждый из перечисленных механизмов реализуется в условиях сниженного парциального давления кислорода (pO_2). Ниже мы рассмотрим роль гемоглобина в пуриnergической сигнальной системе. Bergfeld и Forrester обнаружили, что в условиях гипоксии происходит выброс ATP из эритроцитов [Bergfeld, Forrester, 1992]. Непосредственным датчиком, реагирующим на изменение pO_2 в эритроците, является молекула Hb, степень насыщения которой кислородом (sO_2) является функцией концентрацией кислорода в клетке. Хорошо известно, что связывание O_2 гемоглобином осуществляется по аллостерическому механизму и сопровождается

конформационными изменениями молекулы белка [Hill, 1910], которые модулируют активность SH-групп, нитритредуктазную активность, а также сродство к CDB3. Суть механизма вазодилатации с помощью эритроцитарного АТФ заключается в том, что в зависимости от изменения sO_2 изменяется деформируемость и форма эритроцитов в капиллярах, что оказывает влияние на количество экспортируемой из клеток в просвет сосуда АТФ. АТФ связывается с P2Y-пуриnergическими рецепторами на поверхности эндотелиальных клеток, активирует синтез NO и других сосудорасширяющих факторов, тем самым способствуя увеличению скорости капиллярного кровотока и эффективности доставки O_2 к тканям. Ключевым компонентом молекулярного механизма этого сигнального пути является гемоглобин [Jagger et al., 2001]. Конформационные изменения в молекуле Hb при деоксигенации индуцируют связывание с deoxyHb с CDB3, что приводит к активации гетеротримерного G-белка. Активированный G-белок, как известно, увеличивает активность аденилатциклазы, благодаря чему возрастает уровень внутриклеточного cAMP, который модулирует активность фосфодиэстеразы 3B и активирует протеинкиназу PKA [Olearczyk et al., 2004]. В конечном итоге это приводит к активации регулятора трансмембранной проводимости (CFTR) и высвобождению АТФ, предположительно, через паннексиновые каналы [Sprague et al., 2001]. Протеинкиназа PKA также фосфорилирует белки цитоскелета, отвечающие за упруго-механические свойства клетки [Fischer et al., 2003].

Наряду с гипоксией выброс АТФ из эритроцитов может быть вызван их механической деформацией при прохождении через капилляры, закислением среды и избыточным количеством CO_2 в крови [Лунева с соавт., 2015]. Механизм высвобождения АТФ до сих пор не понятен. Обнаружено, что выброс АТФ из эритроцитов человека увеличивается в присутствии нитритов, проникающих аналогов cAMP, активаторов cAMP-опосредованной сигнальной системы (адреналин, изопротеренол, простаглицлин PGI_2 , форсколинб папаверин) и диметилсульфоксида [Лунева с соавт., 2015]. Существует точка зрения, что наряду с трансмембранным переносом увеличение внеклеточной концентрации АТФ может быть результатом гибели одиночных эритроцитов [Sikora et al., 2014; Лунева с соавт., 2015; Luneva et al., 2016]. Согласно этой концепции внутрисосудистый гемолиз преимущественно старых клеток может быть физиологически оправдан в условиях гипоксии и при длительной физической нагрузке.

Учитывая способность гемоглобина активно участвовать в элиминации, образовании и транспорте NO и АТФ, была сформулирована гипотеза, что эритроцит является не только переносчиком кислорода, но и регулятором его доставки к тканям в условиях гипоксии. В настоящее время в научную практику введен термин

«эритрокринная функция», обозначающий роль эритроцитов в метаболизме сигнальных метаболитов (рис. 4).

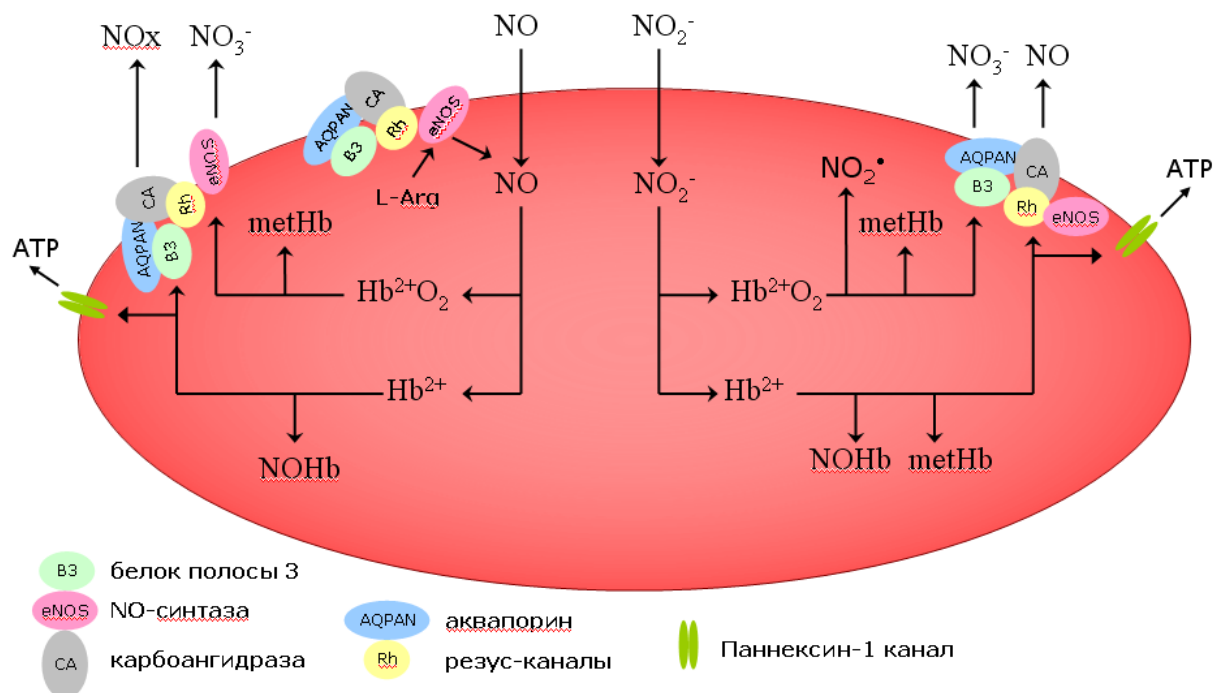


Рис. 4. Взаимодействие оксида азота с гемоглобином в эритроците: роль метаболона в реализации эритрокринной функции.

Ферментативные функции MBHb

Гемоглобин — не единственный белок, взаимодействующий с клеточной мембраной. В научной литературе содержится немало примеров ферментов, которые могут существовать в растворимой и связанной с мембранами формах, обладающих разными каталитическими и регуляторными характеристиками [Luskey, 2008]. Это так называемый адсорбционный механизм регуляции ферментативной активности. Например, процессы адсорбции/десорбции могут регулировать активность ферментов гликолиза [Kurganov, 1985]. Поскольку гемоглобин помимо способности к связыванию газов обладает рядом ферментативных активностей (пероксидазная, нитритредуктазная, NO-диоксигеназная и др.), то можно предположить, что связывание Hb с мембранами переключает его функцию с транспортной на каталитическую. Так в работе [Salhany, 2008] было показано, что деокуHb, связанный с CDB3, может восстанавливать нитрит-ионы и, таким образом, быть источником NO. Показано, что MBHb по сравнению с цитозольным гемоглобином имеет более высокое сродство к O₂, более низкий коэффициент Хилла (1,5±0,08 против 2,5±0,1) и гораздо более высокую пероксидазную активность (0,917±0,038 мкмоль/с на 1 мг белка против 0,378± 0,028) [Tsuneshige et al.,

1987; Вальовка с соавт., 1998]. Для бактериальных гемоглобинов, локализованных на границе раздела липид-цитозоль, установлена ферментативная активность, направленная на окисление NO (NOD-каталитический цикл, рис. 2) и/или восстановление алкилгидропероксидов [Bonamore et al., 2003].

Интересно, что ферменты, восстанавливающие гемоглобин (мет-Нб-редуктазы), тоже могут быть двух видов, растворимыми и мембраносвязанными [Топунов, Голубева, 1989], причем их соотношение различно в эритроцитах разных животных. Как правило, растворимая редуктаза является NADH-, а мембраносвязанная — NADPH-зависимой.

Участие МВНб в патологических процессах

С одной стороны, переход Нб из растворимого в мембраносвязанное состояние может быть адаптивной реакцией, направленной на регуляцию энергетического метаболизма и упруго-механических свойств мембраны. С другой, повышение уровня МВНб может быть следствием патологических изменений самих молекул Нб и/или белков мембран, индуцируемых АФК. Сами по себе продукты деградации гемоглобина (гем и двухвалентное железо) могут быть источником АФК [Kriebardis et al., 2007; Nagababu et al., 2010; Dutra, Bozza, 2014]. Индуцировать свободнорадикальное окисление способны продукты окисления Нб (феррилНб и оксоферрилНб) и продукты окислительной денатурации Нб (гемихромы) [Kumar, Bandyopadhyay, 2005; Miyazawa et al., 1996; Лунева с соавт., 2005; Rifkind, Nagababu, 2013; Dutra, Bozza, 2014]. Последние могут прочно связываться с липидным бислоем и служить центрами генерации АФК. Поскольку примембранная область практически не доступна действию цитозольных антиоксидантных ферментов, преципитация Нб к мембране эритроцитов может только усилить процесс липопероксидации и спровоцировать гемолиз. Несмотря на многочисленные исследования свойств и функций МВНб, до сих пор нет полного понимания биологического смысла перехода Нб в мембраносвязанное состояние.

Как следует из вышесказанного, эритроцитарный гемоглобин помимо газотранспортной функции выполняет и функцию формирования и передачи метаболической информации, являясь компонентом редокс-сети, которая объединяет в единую систему субклеточный, клеточный и тканевый уровни организации живой материи с целью формирования адаптивного ответа на изменение окружающей среды [Jones, Sies, 2015].

В таблице 3 обобщены имеющиеся в литературе сведения о физиологических и патологических эффектах, обусловленных переходом гемоглобина в связанное с мембранами состояние.

Табл. 3. Физиологические и патологические эффекты, обусловленные переходом гемоглобина в ассоциированное с мембранами состояние

Физиологические эффекты (обратимое связывание)	Патологические эффекты (необратимое связывание)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Регуляция углеводного метаболизма (deoxyHb) ▪ Передача NO-группы на мембранные белки (SNO-Hb) ▪ Восстановление metHb ▪ Нитритредуктазная реакция (deoxyHb) ▪ Алкилгидропероксидазная реакция (deoxyHb) ▪ Экспорт сигнальной АТФ (deoxyHb) ▪ Поддержание структурной целостности мембран и морфологии эритроцитов ▪ Участие в регуляции тонуса сосудов ▪ Формирование сигнала старения 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Образование $O_2^{\cdot-}$ в примембранной области, индукция перекисного окисления липидов и воспалительного ответа ▪ Нарушение структуры и функции мембран и цитоскелета ▪ Нарушение регуляции углеводного метаболизма ▪ Нарушение сигнальной функции АТФ

1.1.3.2. Потенциальное использование мембраносвязанного гемоглобина в клинико-биохимической диагностике

Многие заболевания сопровождаются повышением уровня реакционноспособных метаболитов в плазме крови [Salman, Ashraf, 2013; Giacco et al., 2010; Ward, McLeish, 2004; Mukhopadhyay et al., 2008], что приводит к развитию синдрома эндогенной интоксикации. Эндогенная интоксикация характерна для пациентов, получающих химиотерапию, при различных инфекционных и онкологических заболеваниях. Оценка выраженности интоксикационного синдрома необходима для правильной его коррекции. Нарушение гомеостаза, связанное с эндотоксикозом, в первую очередь затрагивает функциональное состояние системы крови. Именно по этой причине для оценки синдрома эндогенной интоксикации в клинической практике используют различные показатели крови: уровень патологических иммунных комплексов, спленоцитотоксический показатель, повышение молекул средней массы, сорбционную способность альбумина, липопротеинов, эритроцитов, флуоресцентное зондирование различных компонентов

крови и др. Наиболее распространено в клинической практике использование иммунологических критериев эндотоксикоза.

Можно полагать, что эритроциты являются высокочувствительными датчиками метаболического состояния системы крови, способными воспринимать и аккумулировать повреждения, поскольку время их жизни составляет 120 ± 20 дней. Липиды, белки цитоскелета и гемоглобин, образуя единую систему, выполняют информационную функцию и участвуют в цепи передачи сигнала к клеткам иммунной системы и эндотелия. Наиболее удобными индикаторами, отражающими функциональное состояние эритроцита, являются показатели, связанные с гемоглобином. Например, стандартный клинический анализ крови включает такие показатели как концентрация гемоглобина, гематокрит, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроците. При необходимости проводят измерение metHb и HbA_{1c}, коррелирующих с уровнем метгемоглобинемии и гликемии.

В качестве дополнительного биохимического показателя можно использовать уровень МВНб. В литературе содержится крайне мало сведений о возможностях использования данных о МВНб в практической медицине. В заявке на патент [Пивоваров с соавт, 2008] предлагается использовать данные о содержании МВНб для расчета коэффициента, характеризующего устойчивость эритроцитов к ишемии. Показано, что при сердечно-сосудистых патологиях наблюдается изменение морфо-биохимических свойств эритроцитов и, как следствие, изменение эффективности переноса кислорода и развитие гипоксии. Сдвиги в морфо-биохимических свойствах эритроцитов не всегда имеют патологическую направленность и могут отражать компенсаторные процессы, поддерживающие структурную целостность клетки. Мы полагаем, что уровень МВНб может быть тем критерием, который позволит идентифицировать характер изменений, или, другими словами, отделить адаптацию от патологии. Мы свели в таблицу 4 данные, взятые из работы [Пивоваров с соавт, 2008], о содержании МВНб у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) с различной тяжестью стенокардии напряжения. Видно, что чем выше тяжесть заболевания, тем выше уровень МВНб. Также существенны различия в изменении содержания МВНб после функциональной нагрузки. У доноров происходит снижение МВНб, а у больных, наоборот, повышение. Эритроциты здоровых доноров в ответ на нагрузку развивают комплекс адаптационных процессов, о чем свидетельствует $[МВНб]=0,9\%$, в то время как у больных ИБС нагрузка вызывает усиление патологических процессов. Возможные причины таких различий, а также то, как уровень МВНб может соотноситься с состоянием нормы и патологии, мы описали при обсуждении полученных результатов в разделе 3.3.2.

Табл. 4. Содержание МВНб у больных ИБС с различной тяжестью (функциональным классом) стенокардии напряжения в сравнении со здоровым донором

	Содержание МВНб, %	
	До нагрузки	После нагрузки
Донор (практически здоров)	3,6	0,9
Больной В. (II функциональный класс, стенокардия напряжения)	8,2	10,9
Больной М. (III функциональный класс стенокардии напряжения)	10,0	14,3
Больной В. (после проведения комплекса лечебных мероприятий)	8,4	9,3
Больной М. (после проведения комплекса лечебных мероприятий)	8,1	9,8

Таким образом, МВНб можно рассматривать как универсальный неспецифический показатель адаптационных процессов эритроцитов, а также воздействия токсинов и окислителей на мембрану и внутриклеточные белки. Оценка уровня МВНб может быть полезна для ранней диагностики и лечения многих патологических процессов.

1.2. Карбонильный стресс в биологических системах

1.2.1. Понятие карбонильного стресса

Начиная с 1990-х годов в научной литературе появился термин «карбонильный стресс». Под карбонильным стрессом подразумевают возникновение дисбаланса между образованием активных карбонильных соединений (АКС) и их удалением. К активным карбонильным соединениям относят альдегиды и кетоны, которые содержат электрофильный углерод карбонильной группы, способный вступать в реакцию с нуклеофильным азотом аминогруппы аминокислот и пептидов с образованием N-замещенных гликозиламинов (оснований Шиффа), которые подвергаются перегруппировке Амадори с образованием кетозаминов [Rabbani, Thornalley, 2012]. На более поздних стадиях реакции продукты Амадори подвергаются множественной дегидратации, образуя желто-коричневые продукты, получившие название конечных продуктов гликирования (КПГ, AGEs — Advanced Glycation End products). КПГ представляют группу химических соединений различного строения, включая производные пиррола, пиразина, имидазола и фурана. В научной литературе также можно встретить термин «glycation stress», обозначающий весь спектр последствий избыточного образования АКС [Ichihashi et al., 2011].

Взаимодействие между карбонильными и аминосоединениями получило название реакции Майяра (Maillard reaction). В литературе также можно встретить название «сахароаминная реакция». Louis Camille Maillard — французский биохимик и врач, в 1912-1916 гг. опубликовал несколько статей по химии взаимодействия восстанавливающих сахаров с аминокислотами и вошел в историю науки как первооткрыватель сахароаминной реакции [Maillard, 1912]. На протяжении достаточно длительного периода реакция Майяра была предметом интереса пищевой химии, поскольку температурная обработка продуктов питания ускоряет взаимодействие между сахарами и аминами. В результате этой реакции приготовленная пища приобретает цвет, вкус и аромат. Однако Майяр смотрел на сахароаминную реакцию не как пищевой химик, а как биохимик. Дело в том, что эта реакция протекает в широком диапазоне условий, в том числе в физиологических. Французский ученый, изучая химию сахароаминных взаимодействий, предполагал, что эти процессы могут протекать и в организме человека. Этой точки зрения придерживались и наши соотечественники биохимики С.П. Костычев и его сотрудница В.А. Бриллиант-Лерман, которые при добавлении глюкозы и сахарозы к дрожжевому автолизату обнаружили образование новых азотистых соединений, окрашивающих раствор в темно-бурый цвет. Коричневые пигменты были идентифицированы как продукты сахароаминной реакции, протекающей неферментативно в дрожжевых автолизатах [Костычев, Бриллиант, 1916]. В статье, опубликованной в Известиях Императорской академии наук в 1916 г. С.П. Костычев и В.А. Бриллиант-Лерман писали: *«Таким образом, аминокислоты реагируют с сахаром даже без вмешательства ферментов.(...) При современном состоянии науки было бы, конечно, совершенно произвольным отрицание за такими свободно происходящими реакциями физиологического значения, особенно если принять во внимание, что условия необходимые для осуществления реакции между сахаром и аминокислотами, легко могут иметь место в протоплазме живых клеток, так как там вполне возможны концентрации участвующих в реакции веществ.»*

Несмотря на эти прозорливые предположения, сделанные около 100 лет назад, на протяжении полувека реакция Майяра оставалась предметом изучения пищевой химии. Впервые на возможность протекания неферментативных реакций в биологических системах указал иранский ученый Rahbar [Rahbar, 1968]. Этому исследователю удалось из крови больных сахарным диабетом выделить фракцию необычного гемоглобина ("abnormal fast-moving hemoglobin band"), который оказался аддуктом белка с молекулой глюкозы. В результате связывания глюкозы с N-концевым остатком валина β -субъединиц

HbA₁ и последующей перегруппировки в 1-дезоксигидрокси-1-N-валил-фруктозу образуется фракция гликированного гемоглобина, обозначаемая как HbA_{1c} [Rahbar, 2005].

Обнаружение HbA_{1c} открыло целое направление, связанное с изучением реакции Майяра в биологических системах, и инициировало поиск продуктов гликирования биомолекул в других тканях и жидкостях. В 2009 г. комитет, созданный Американской Диабетической Ассоциацией, рекомендовал использовать уровень HbA_{1c} в качестве биомолекулярного маркера для диагностики сахарного диабета. Гликированный гемоглобин оказался очень надежным и полезным диагностическим показателем, поскольку каждое 1%-ное увеличение уровня HbA_{1c} коррелирует с увеличением риска развития сердечно-сосудистых заболеваний на 15-18% [Saleh, 2015]. Гемоглобин не случайно стал первым объектом, неферментативное гликирование которого было показано в живых системах при физиологических условиях. Дело в том, что Hb — долгоживущий белок, время его нахождения в эритроците около 120±20 дней, и этого времени вполне достаточно для того, чтобы глюкоза прореагировала с аминогруппой концевого валина и образовала стабильный комплекс. Количество HbA_{1c} отражает уровень глюкозы в крови за период 4-6 недель [Rahbar, 1968; Gopalkrishnapillai et al., 2003], в то время как обычный анализ глюкозы в крови показывает ее концентрацию на момент измерения, которая может быть никак не связана с состоянием гипергликемии.

Глюкоза не случайно была отобрана в процессе эволюции среди многих моносахаридов на роль основного метаболического топлива. Как было показано в специально проведенных исследованиях, глюкоза наименее реакционноспособна по сравнению с другими альдогексозами, что объясняется стабильностью ее кольцевой структуры, обеспечиваемой экваториальной ориентацией гидроксильных групп [Bunn, Higgins, 1981]. Именно благодаря меньшей склонности глюкозы к переходу в открытую химически активную карбонильную форму (табл. 5), стало возможным сосуществование высоких концентраций глюкозы с белками с минимальным риском возникновения необратимой ковалентной модификации.

Табл. 5. Константы скорости реакции моносахаридов с гемоглобином [Bunn, Higgins, 1981].

Моносахарид	K ₁ (×10 ⁻³ мМоль ⁻¹ ч ⁻¹)	Карбонильная форма, %
D-глюкоза	0,6	0,002
D-манноза	3,2	0,005
D-галактоза	2,8	0,02
D-рибоза	10,0	0,05
D-фруктоза	4,5	0,7

Работа Rahbar'a положила начало целой серии исследований. Неферментативно гликированные белки и КППГ были обнаружены в различных тканях и биологических жидкостях. В биологических образцах было идентифицировано более 20 активных альдегидов и кетонов, основными из которых являются глиоксаль, метилглиоксаль, 3-деоксиглюкозон, малоновый диальдегид [Давыдов, Божков, 2003]. Глиоксаль и метилглиоксаль (MG) представляют собой α,β -дикарбонильные соединения, гликирующая активность которых в 20000 раз превосходит активность глюкозы или фруктозы [Thornalley, 2005]. Токсичное действие MG обусловлено его способностью вступать в реакции с amino- и SH-группами аминокислотных остатков белков, формируя ковалентно связанные КППГ: карбоксиэтиллизин (CEL – N^ε(carboxyethyl)lysine), карбоксиметиллизин (CML – N^ε(carboxymethyl)lysine), имидазолы, аргпиримидины и кросс-сшитые димеры лизина с метилглиоксалем (MOLD – methylglyoxal-derived lysine dimmers) [Thornalley, 2005; Rabbani, Thornalley, 2012]. Такие модификации являются необратимыми и приводят к изменению структуры, заряда, конформации и в конечном итоге к биохимической дисфункции белка [Thornalley, 2008]. На рисунке 5 в качестве примера приведены структурные формулы основных КППГ, образуемых в результате реакции лизина с метилглиоксалем. Концентрация MG в клетках и тканях может достигать до 0,1-2,0 мкМ [Thornalley et al., 1990]

Для борьбы с нежелательными реакциями неферментативного гликирования в клетке существуют специальные ферментные системы, поддерживающие концентрацию α -кетоальдегидов на очень низком уровне (глиоксалазная система — GloI и GloII). Если происходит дисбаланс между образованием и обезвреживанием активных альдегидов, клетка испытывает «карбонильный стресс». Это понятие было введено Waynes'ом в 1991 г. [Waynes, 1991]. Позже классики в области исследования карбонильного стресса, английские ученые Rabbani и Thornalley ввели термин «дикарбонильный стресс», тем самым подчеркивая, что именно α -кетоальдегиды являются основными физиологическими предшественниками КППГ [Thornalley, 2005; Rabbani, Thornalley, 2012].



Рис. 5. Конечные продукты гликирования остатков лизина.

Неферментативное гликирование является важным фактором развития хронических патологий инсулин-независимых тканей (эритроциты, нейроны, хрусталик, базальные мембраны артерий, межклеточные ткани кожи), подверженных высоким концентрациям глюкозы. Например, хорошо известны явления ускоренного развития катаракты, амилоидоза и атеросклероза при сахарном диабете [Saleh, 2015]. Все эти долгосрочные осложнения являются следствием протекающих в клетках и тканях неферментативных реакций между метилглиоксалем и нуклеофильными группами биомолекул. Для иллюстрации существующей взаимосвязи между уровнем глюкозы в крови и количеством метилглиоксаля в табл. 6 приведены данные из статьи [Biswas, Kumar, 2012].

Табл. 6. Некоторые биохимические показатели при нормогликемии и гипергликемии [Biswas, Kumar, 2012].

Параметр	Контрольная группа (n=40)	Пациенты (n=46)
Возраст	41,5±1,5	42,2±1,8
Инсулин (Units/л)	5,3±1,1	23±0,5
Концентрация глюкозы в крови (мг/л)	74,0±12,0	275,4±10,8
Метилглиоксаль (мкмоль/л)	51,9±4,5	89,64±6,8

1.2.2. Способы защиты от карбонильного стресса

Можно выделить три стратегии, обеспечивающие защиту от реакций неферментативного гликирования в живых организмах: 1) профилактика, 2) снижение реакционной способности реагентов, 3) репарация повреждений.

I. Профилактика.

- a) Снижение концентрации α,β -дикарбониллов в клетке за счет действия ферментативных систем: GloI/GloII [Thornalley, 1990], альдегидо- и кеторедуктазы [Vander Jagt et al., 1992; Barski et al., 2008], бетаин альдегиддегидрогеназы [Vander Jagt, Hundsaker, 2003];
- b) Связывание α,β -дикарбониллов с нуклеофильными соединениями (свободными аминокислотами, пептидами, полиаминами) [Burcham et al., 2008];
- c) Преобразование реакционноспособных сахаров в инертные производные (сахароза, трегалоза) [O'Brien, 1996];

- d) Организация ферментов гликолиза в метаболон, что снижает вероятность высвобождения интермедиатов (глицеральдегид-3-фосфата и дигидроксиацетонфосфата) — субстратный ченнелинг [Kurganov, Lyubarev, 1988];
- e) Переход на менее безопасные метаболические пути катаболизма углеводов (пентозофосфатный путь) [Romano, Conway, 1996]
- f) Образование в ходе эволюции биологических макромолекул, устойчивых к неферментативному гликированию;
- g) Снижение окислительного стресса за счет действия антиоксидантов

II. Снижение реакционной способности карбониллов или аминов.

- a) Ацетилирование концевых аминогрупп белков [Soppa, 2010];
- b) Закисление цитоплазмы (калиевые каналы) [Ozyamak et al., 2011];

III. Репарация повреждений

- a) Ремонт макромолекул, модифицированных карбонильными соединениями (реакции дегликирования и трансгликирования [Ramamurthy et al., 2003; Szwegold, 2005], амадориазы [Monnier, Wu, 2003], фруктозамин-3-киназы [Škrha et al., 2014];
- b) Избирательная деградация поврежденных макромолекул (протеасомная система, гликолипидазы (glycolipidase) [Katz et al., 2010].

Перечисленные стратегии защиты в большинстве случаев дополняют друг друга, но наиболее важным антигликирующим механизмом для всех живых организмов является ферментная глиоксалазная система GloI/GloII. Эта система присутствует в цитозоле клеток всех типов тканей, в том числе и в эритроцитах в количестве ~ 0,2 мкг/мг (GloI) [Larsen et al., 1985; Thornalley et al., 1989]. Подавление функционирования этой системы в результате старения [Kuhla et al., 2007] и действия окислительного стресса приводит к увеличению степени гликирования биомолекул и повреждению тканей. В некоторых случаях (рак и микробные инфекции) целесообразно использование фармакологических ингибиторов GloI для целенаправленного повышения концентрации α -кетоальдегидов до цитотоксического уровня [Thornalley, 1996; Geng et al., 2014]. Подобная терапия основывается на том, что быстро пролиферирующие клетки и малярийный плазмодий характеризуются гликолитическим фенотипом [Ramdani, Langsley, 2014], а, следовательно, и высокой скоростью образования MG. На стадии разработки находятся фармакологические ингибиторы GloI, в качестве действующих веществ которых рассматриваются S-(N-арил-N-гидроксикарбамоил) [More, Vince, 2009], 18- β -глицирретиновая кислота и ее производное карбеноксолон [Zhang et al., 2015], биофлаваноид байкалеин [Zhang et al., 2016], производные S-(N-бромфенил-N-гидроксикарбамоил)глутатиона [Sang et al., 2015], бензофенон и его аналоги [Mihai et al.,

2015]. Также предлагается возможность комбинированной терапии: введение препаратов MG в сочетании с фармакологическими ингибиторами Glo1.

1.2.3. Методические подходы, применяемые для изучения карбонильного стресса

Объекты. Наиболее удобной и часто используемой моделью для изучения биологического действия α -кетоальдегидов являются различные клеточные культуры млекопитающих. Однако наиболее предпочтительными являются животные модели: нематоды, мыши, крысы. Использование лабораторных животных позволяет получать данные, имеющие не только фундаментальное научное, но и клиническое значение.

Подходы. Существует несколько методических подходов для создания условий, имитирующих карбонильный стресс в живых организмах: 1) экзогенное введение α -кетоальдегидов, 2) получение мутантов по глиоксалазе I (GloI), 3) активация внутриклеточного образования MG. Перечисленные способы применимы для моделирования карбонильного стресса как у лабораторных животных, так и в бактериальных популяциях. При первом способе клетки инкубируют с MG или глюкозой в миллимолярных концентрациях, существенно превышающих физиологический уровень (микромолярные концентрации) MG в клетке, что делает некорректным перенос результатов с модели в реальные условия. Как правило, для моделирования условий нормогликемии концентрация глюкозы равна 5 мМ, а для гипергликемии 30-50 мМ. Однако такой способ создания условий, характерных для карбонильного стресса, является наиболее простым и поэтому наиболее часто применяемым в экспериментальной практике. Можно указать на еще один недостаток такого подхода. Длительная инкубация клеток с высокими концентрациями глюкозы может приводить к метаболическим нарушениям. Например, инкубация эритроцитов с высокими концентрациями глюкозы сопровождается усилением перекисного окисления липидов, снижением активности глутатион S-трансферазы и глутатион-редуктазы [Viskupicova et al., 2015].

В оправдание данного подхода можно привести два довода. Во-первых, лишь небольшая доза экзогенных дикарбониллов проникает в клетки и, во-вторых, согласно оценкам некоторых исследователей, локальные концентрации α,β -дикарбониллов в клетке могут достигать до миллимолярных значений. В случае работы с бактериальными культурами экзогенное введение дикарбониллов может соответствовать условиям накопления MG в среде культивирования, наблюдаемым в некоторых случаях [Космачевская, Топунов, 2010; Космачевская с соавт., 2015]. При втором экспериментальном подходе индуцируют накопление α -кетоальдегидов, нарушая

антигликирующую защиту. Самый сложный и самый интересный способ моделирования карбонильного стресса — это активация путей, производящих α,β -дикарбонилы.

В живых организмах известны следующие пути образования α,β -дикарбонилы:

- 1) Спонтанная деградация оснований Шиффа [Hayashi, Namiki, 1980];
- 2) Окислительная деградация глюкозы [Thornalley et al., 1984];
- 3) Фрагментация триозофосфатов [Phillips, Thornalley, 1993];
- 4) Метаболизм ацетона [Casazza et al., 1984] и треонина [Ray, Ray, 1985];
- 5) Перекисное окисление липидов [Loidl-Stahlhofen, Spittler, 1994];
- 6) Распад фруктозо-3-фосфата [Richard, 1993].

Для всех организмов основным путем генерации MG является гликолиз [Thornalley, 1993; 1998]. На рисунке 6 представлены в виде схемы пути, приводящие к образованию и элиминации MG.

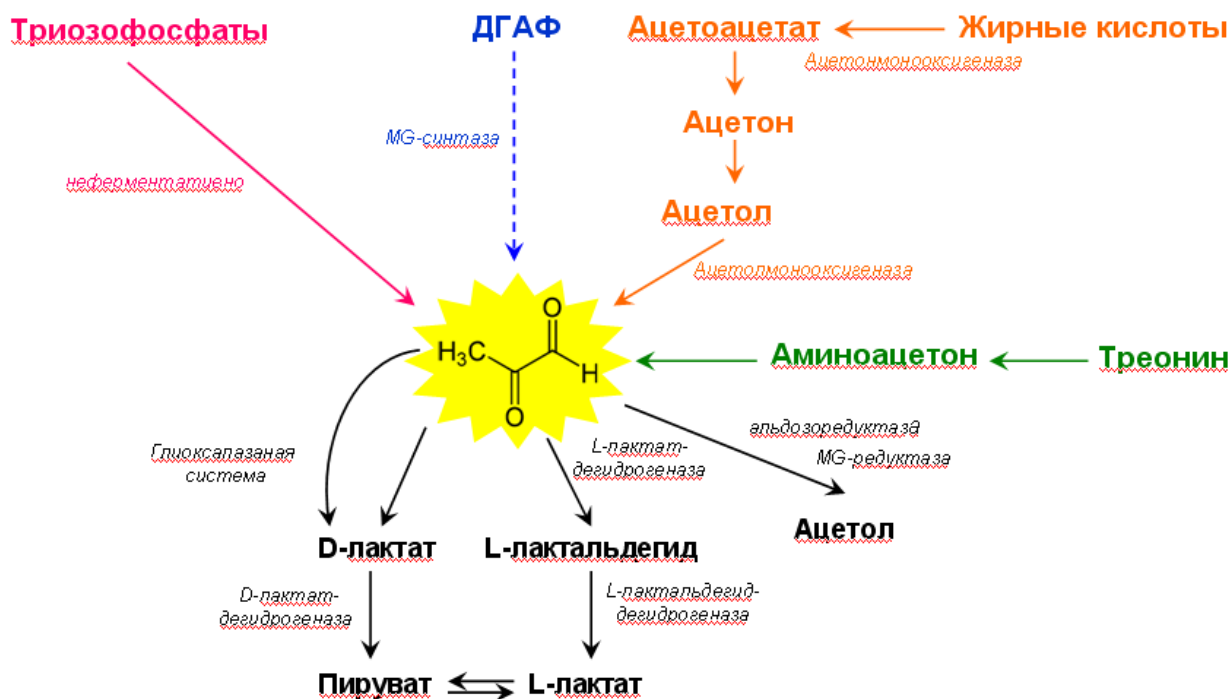


Рис. 6. Основные пути образования и катаболизма метилглиоксаля в живых организмах. Ферментативный путь образования MG из дигидроксиацетонфосфата (ДГАФ) существует только у прокариот.

Концентрации. Оказываемое на клетки действие метилглиоксаля во многом определяется его концентрацией [Semchyshyn, 2014]. В высоких концентрациях MG индуцирует повреждения биомолекул и гиперактивацию внутриклеточных сигнальных путей, а в низких концентрациях может функционировать как сигнальная молекула,

модулирующая различные аспекты поведения клетки. Влияние MG на различные внутриклеточные системы эукариотических клеток, включая и центральные сигнальные пути, подробно рассмотрены в обзорной статье [Космачевская с соавт., 2017]. Разнонаправленное действие MG можно объяснить с позиций концепции гормезиса или двухфазной реакции клетки на возрастающий стимул, описанной школой Д.Н. Насонова [Насонов, 1962; Александров, 1985].

1.2.4. Карбонильный стресс в эритроцитах

1.2.4.1. Пути возникновения карбонильного стресса в эритроцитах

Можно выделить два основных пути возникновения карбонильного стресса в эритроцитах. Первый обусловлен повышенной концентрацией глюкозы или кетоновых тел в плазме крови — экзогенный путь, второй с нарушениями в регуляции гликолиза — эндогенный путь. Остальные факторы, вызывающие карбонильный стресс, в эритроцитах вносят незначительный вклад и являются достаточно редкими событиями (рис. 7). Такими нечастыми событиями являются инфицирование малярийным плазмодием, гликолитические энзимопатии, мутации GLUT1.

В ряде исследований было показано, что в плазме крови больных сахарным диабетом первого и второго типа повышены уровни триглицеридов, метилглиоксаля и АФК [Thornalley et al., 1989; McLellan et al., 1994; Biswas, Kumar, 2012]. Эксперименты с отмытыми эритроцитами позволили установить, что внутриклеточная концентрация MG находится в прямой зависимости от величины потока глюкозы, метаболизирующейся в гликолитическом пути [Thornalley, 1988]. В диапазоне концентраций глюкозы 5-100 мМ было зарегистрировано дозозависимое увеличение концентрации *S-D*-лактоилглутатиона и MG [Thornalley, 1988]. MG плазмы может оказывать токсичное действие несколькими способами: модифицируя белки и липопротеины, генерируя АФК и воздействуя на мембраны эритроцитов и эндотелиоцитов. Перечисленные эффекты MG в комплексе способствуют развитию артериальной гипертензии, атеросклероза, гемолитической анемии, окклюзии сосудов и местной ишемии [Berlanga et al., 2005; Jia, Wu, 2007]. Ингибирование антикоагулирующего фактора атитромбина III метилглиоксалем вызывает формирование фенотипа гиперкоагуляции [Jacobson et al., 2014].

Особенности метаболизма эритроцитов таковы, что всю необходимую для жизнеобеспечения энергию клетка получает только из глюкозы, которая метаболизируется в реакциях гликолиза и пентозофосфатного пути. Интермедиаты катаболизма глюкозы (глицеральдегид-3-фосфат и дигидроксиацетонфосфат) служат основным источником MG [Phillips, Thornalley, 1993; Thornalley, 2005].

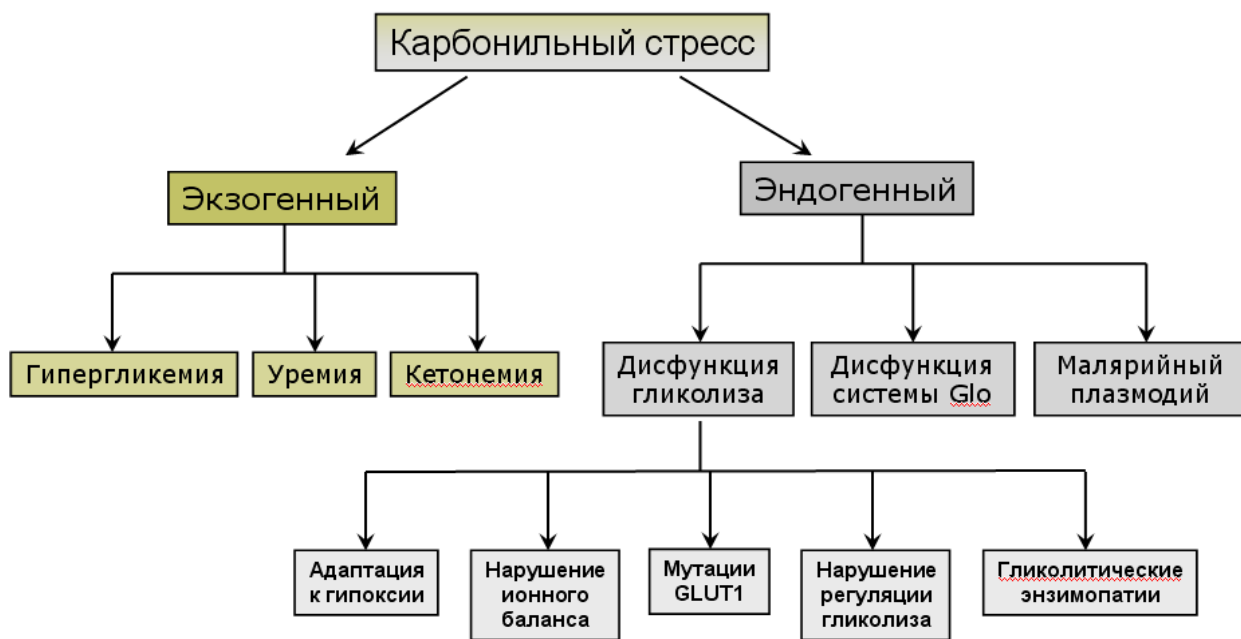


Рис. 7. Пути возникновения карбонильного стресса в эритроцитах. Обозначения на схеме: GLUT1 – глюкозный транспортер глюкозы, Glo – глиоксалазная система.

Эритроциты имеют высокую вероятность развития карбонильного стресса по нескольким причинам. Необходимая для гликолиза глюкоза поступает в эритроциты инсулиннезависимым способом с помощью облегченной диффузии через глюкозный транспортер GLUT1. Это означает, что концентрация глюкозы внутри эритроцита напрямую зависит от концентрации глюкозы в плазме. Поэтому эритроциты одними из первых «ощущают» гипергликемию. Сочетание внутри эритроцита высоких концентраций глюкозы, кислорода и ионов железа благоприятствует образованию АКС. Несмотря на то, что эритроцитарная клетка наделена мощной антиоксидантной ферментной системой, а также глиоксалазной системой [Thornalley et al., 1989], существует большая вероятность развития карбонильного и окислительного стрессов, которые, как известно, взаимно усиливают друг друга [Desai, Wu, 2008; Kalapos, 2008b; Шумаев с соавт., 2009]. Основным фактором, способствующим развитию окислительного и карбонильного стрессов, является повреждение антиоксидантных ферментов и ключевых ферментов гликолиза активными формами кислорода и активными карбонильными соединениями [Constantin et al., 2005]. Например, неферментативное гликирование супероксиддисмутазы приводит к инактивации фермента [Taniguchi et al., 1989; Fujii et al., 1996], а окисление и/или нитрозилирование SH-групп в активном центре глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы делает невозможным связывание субстрата

[Mohr et al., 1994]. Вследствие этих спонтанных посттрансляционных модификаций ферментов происходит накопление АФК и триозофосфатов, которые являются основным источником MG в клетке.

Наибольший вклад в пул эндогенного MG вносит реакция неферментативного гидролиза фосфатной группы от триозофосфатов: дигидроксиацетонфосфата (DHAP) и глицеральдегид-3-фосфата (G3P) [Phillips, Thornalley, 1993; Thornalley, 2005]. Поэтому любое нарушение в метаболизме триозофосфатов будет влиять на образование MG. В превращении триозофосфатов задействованы два фермента гликолиза: триозофосфатизомераза, регулирующая взаимопревращение DHAP и G3P, и глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, окисляющая G3P до фосфоглицериновой кислоты. Нарушения в синтезе и в функционировании этих ферментов неизбежно приведут к избыточному образованию MG. В эритроцитах, содержащих мутантную триозофосфатизомеразу, количество DHAP в 20-40 раз превышает уровень DHAP по сравнению с контрольным вариантом [Orosz et al., 2000]. Многие гликолитические энзимопатии клинически проявляются в виде хронических гемолитических анемий [Orosz et al., 2006]. И не последнюю роль в формировании патологических последствий играют активные альдегиды и индуцируемые ими АФК. В эксперименте *in vitro* было показано, что инкубация эритроцитов с MG приводит к дестабилизации мембраны, что сопровождается лизисом клеток [Biswas, Kumar, 2012].

Между образованием АКС и АФК существует тесная взаимосвязь. В настоящее время АКС рассматривают в качестве маркеров окислительного стресса и старения в эритроцитах [Li et al., 2010]. Наибольшую опасность АФК и АКС представляют для липидов и белков мембран, которые плохо защищены супероксиддисмутазой, а также для гемоглобина, на долю которого приходится около 98% массы белков цитоплазмы эритроцитов [Breitling-Utzmann et al., 2001]. Повреждение этих основных компонентов клетки сказывается на упруго-механических свойствах мембраны, которые определяют функциональные свойства эритроцита [Iwata et al., 2004; Shin et al., 2007; Singh, Shin, 2009]. Высокие концентрации АКС в плазме положительно коррелируют с уровнем карбонилирования мембранных белков эритроцита [Li et al., 2010] и являются фактором риска развития артериальной гипертензии [Chen et al., 2011]. Немаловажную роль в сопряжении процессов гликирования с процессами образования АФК играют содержащиеся в эритроцитах ионы железа, свободные и в составе гемовых и негемовых комплексов [Kumar, Vandyopadhyay, 2005].

Первичными мишенями действия токсичных агентов плазмы являются мембранные структуры эритроцита: липидный бислой, рецепторы, ионные каналы,

транспортеры, ферменты. При исследовании больных сахарным диабетом была установлена отрицательная корреляция между уровнем HbA_{1c} и активностью Na⁺/K⁺-АТФазы эритроцитов, что, вероятно, связано с гликированием мембранных белков в условиях гипергликемии [Nirala et al., 2012].

Помимо взаимодействия с эритроцитами MG вступает в реакции неферментативного гликирования с белками, ферментами и факторами плазмы, нарушая или полностью ингибируя их функции. Метилглиоксаль ингибирует активность антикоагулирующего фактора — антитромбина III, формируя ковалентные аддукты с Arg393 [Jacobson et al., 2014]. Это способствует формированию фенотипа гиперкоагуляции при развитии диабетической гипергликемии. Повышенные уровни MG в плазме вызывают воспалительную реакцию через повышенную экспрессию молекул адгезии, способствующих взаимодействию лейкоцитов с эндотелием. Показано, что MG посредством индукции образования АФК вызывает активацию SGK1 (SGK1 – serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1) [Qadri et al., 2014]. SGK1 регулирует многие эндотелиальные ионные каналы, включая Na⁺/H⁺-ионообменник.

Описанные выше патологические эффекты, вызванные действием метилглиоксаля на эритроциты, обобщены и систематизированы в виде схемы (рис. 8).



Рис. 8. Патологические эффекты, вызванные действием метилглиоксаля на эритроциты. Обозначения на схеме: GLUT1 – глюкозный транспортер тип 1, ПОЛ – перекисное окисление липидов, MBHb – мембраносвязанный гемоглобин, SOD – супероксиддисмутаза, Kat – каталаза.

1.2.4.2. Роль гемоглобина в развитии последствий карбонильного стресса

Одним из последствий сахарного диабета является возникновение микроангиопатий, развивающихся вследствие поражения эндотелиальных клеток и эритроцитов. Сегодня можно встретить множество публикаций, указывающих на измененные упруго-механические свойства эритроцитов больных сахарным диабетом. У таких эритроцитов повышена вязкость и жесткость мембраны [Shin et al., 2007; Singh, Shin, 2009]. В ряде модельных систем *in vitro* было показано, что наблюдаемые нарушения свойств эритроцитов вызваны действием АКС на мембранные компоненты [Iwata et al., 2004]. Повреждение мембран негативно сказывается на их механических свойствах и целостности, в результате чего повышается вероятность гемолиза и выхода гемоглобина в кровеносное русло. Оказывать влияние на эритроцитарную мембрану могут как факторы плазмы (АКС, активные формы кислорода и азота), так и сам гемоглобин. Известно, что в эритроцитах Hb находится в растворимой и мембраносвязанной формах, соотношение между которыми меняется в зависимости от состояния молекул гемоглобина и мембран (смотри раздел 1.1.3.). Обратимое связывание Hb с мембраной носит адаптационный характер и является инструментом настройки свойств мембраны и углеводного метаболизма при изменении условий функционирования, например, при изменении pO_2 [Stefanovic et al., 2013; Rifkind, Enika, 2013]. В случае действия различных окислителей может происходить ковалентная пришивка Hb к мембранным компонентам. Это дестабилизирует мембрану и приводит к выходу Hb в плазму. Однако помимо химических факторов на связывание Hb с мембраной влияет четвертичная структура самой молекулы Hb, которая изменяется в результате модификации метилглиоксалем. Структурные нарушения сопровождаются дестабилизацией макромолекулы Hb, утратой кооперативного эффекта, уменьшением резистентности по отношению к действию различных окислителей, результатом чего является концентрирование Hb в примембранной области, образование белковых агрегатов (тельца Гейнца), высвобождение гема и связывание его с мембраной.

Было установлено, что HbA_{1c} в значительно меньшей степени связывается с мембранами эритроцитов [Bryszewska, 1988] и имеет в 10 раз более высокое сродство к кислороду [Marschner, Rietbrock, 1994], чем нормальный гемоглобин (HbA₀). Результатом окислительных посттрансляционных модификаций биологически важных молекул может быть сниженная гемолитическая устойчивость клеток, деформируемость и проходимость по узким капиллярам.

Установлено, что патологически измененные эритроциты обнаруживают склонность к агрегации, апоптозу и гемолизу [Antonelou et al., 2010; Doctor et al., 2012]. Гемолиз эритроцита и выход гемоглобина в сосудистое русло — крайне нежелательное явление, приводящее к ряду физиологических нарушений в сердечно-сосудистой системе. Можно выделить три механизма токсического действия гемоглобина. Первый связан с развитием вазоконстрикции в результате окисления оксида азота до нитрата в реакции с оксигемоглобином (NOD-реакция). Второй — с образованием активных радикальных продуктов: супероксидного анион-радикала, пероксинитрита и феррил- и оксоферрилHb, которые инициируют окисление липопротеинов плазмы. В основе третьего механизма лежат реакции свободного гема, который индуцирует образование активных форм кислорода и медиаторов воспаления через активацию транскрипционного фактора NF- κ B в эндотелиальных клетках [Belcher et al., 2014], а также активирует макрофаги и нейтрофилы [Dutra, Bozza, 2014; Schaer et al., 2013]. В совокупности все эти явления приводят к нарушению реологических свойств крови и окклюзии сосудов [Koltai et al., 2006; Buehler, Agnillo, 2010; Schaer et al., 2013]. В связи с этим представляется актуальным изучение механизмов стабилизации эритроцитов и поиск веществ, снижающих степень гемолиза при функционировании клеток в условиях карбонильного и окислительного стрессов.

1.3. Адсорбционный механизм регуляции клеточного метаболизма

Для сохранения своего гомеостаза живой организм должен обладать специальной сигнальной системой, информирующей о состоянии внутренних систем и окружающей среды. Ответная реакция живой системы на внешнее воздействие складывается из неспецифической и специфической компоненты. Неспецифическая реакция является тем фоном, на котором разворачивается специфический ответ [Гаркави с соавт., 1979]. Неспецифическая реакция обеспечивается иерархически более низкими, а, следовательно, и эволюционно более древними, регуляторными механизмами. Одним из таких механизмов является обратимый переход белков из растворимого в мембраносвязанное состояние. Это так называемый адсорбционный механизм регуляции [Kurganov, 1985]. Обратимая адсорбция ферментов позволяет регулировать их каталитическую активность и стабильность. Идея о том, что обратимое связывание ферментов с субклеточными структурами имеет регуляторное значение, была впервые высказана А.И. Опариним [Oparin et al., 1933]. Как правило, связывание с мембранами ферментов приводит к снижению их активности и находится в прямой зависимости от энергетического заряда клетки: высокий уровень в условиях низкой концентрации АТФ и наоборот. Вероятно, это

позволяет клетке снизить расход энергии на постоянно действующие катализаторы. Существует точка зрения, что процесс сорбции-десорбции белков обладает высокой чувствительностью к низкоинтенсивным воздействиям. Благодаря этому физико-химическому процессу клетка может в течение нескольких секунд изменить метаболизм за счет ранее сорбированных ферментов. В то время как для реализации ответа через изменение экспрессии генов необходимо гораздо больше времени (рис. 10).

Вполне естественно возникает вопрос, а что является пусковым механизмом внезапного перехода белков из связанного в свободное состояние. Согласно существующим представлениям, таким триггером являются конформационные изменения мембран и белков, что отражается на сорбирующей способности мембран и сорбционных свойствах белков. В настоящее время доказано существование взаимосвязи между конформацией белка и редокс состоянием его SH-групп [Chung et al., 2013]. Тиоловые группы являются наиболее активными группами белков, способными в мягких физиологических условиях вступать в разнообразные химические реакции (окисления, нитрозилирования, гликирования, алкилирования, тиолирования и др.) [Chung et al., 2013]. Многие из этих реакций обратимы и поэтому имеют исключительное значение для физиологии клетки. Кроме того, тиолдисульфидное равновесие чрезвычайно чувствительно к действию различных по природе факторов (химических, физических и биологических). Вполне вероятно, что чувствительность живых систем к слабым и сверхслабым воздействиям объясняется высокой лабильностью SH-групп входящих в их состав биомолекул. Во многом именно с химическими превращениями тиоловых групп связано разнонаправленное действие редокс-активных соединений на клетки. Редокс-активные соединения (активные формы кислорода, азота и активные карбонильные соединения) в зависимости от концентрации и химических свойств могут быть блокаторами и сенситизаторами реактивности SH-групп, таким образом модулируя чувствительность клетки к внешним воздействиям. Например, образование дисульфидных связей, а также комплексов с ионами тяжелых металлов, снижает чувствительность клетки, окисление до тиолят-аниона ($R-S^-$) или сульфеновой кислоты ($R-SOH$), наоборот, повышает.

Данная диссертационная работа посвящена изучению модификации гемоглобина при совместном действии активных форм кислорода, азота и активных карбонильных соединений. Все эти редокс-активные соединения объединяет одно свойство — способность взаимодействовать с SH-группами белков. По масштабности оказываемого на метаболизм влияния посттрансляционную модификацию SH-групп приравнивают к фосфорилированию белков. Любое воздействие на клетку сводится к изменению

стационарных концентраций акцепторов, которые нарушают донорно-акцепторное равновесие и индуцируют фазовый сдвиги в состоянии белков и мембран. Основными акцепторами в клетке является альдегидная или кетонная группы. Как написал Сент-Дьердьи: «...если кетоальдегиды и играют какую-то роль в регуляции, то, по всей вероятности, эту роль выполняет метилглиоксаль» [Сент-Дьердьи, 1971]. Поскольку любое нарушение гомеостаза приводит к изменению распределения белков между связанным и свободным состояниями, то по уровню связанных с мембранами белков можно судить о физиологическом состоянии клетки.

Эритроциты млекопитающих, лишенные ядра, являются удобной моделью для изучения адсорбционного механизма регуляции. Связывание Нв с цитоплазматическим доменом белка полосы 3 способствует переходу ферментов гликолиза в цитозоль и росту их активности. В результате этого повышается энергетический заряд клетки. Параметры энергетического обмена определяют метаболическую стратегию клетки, а в случае одноклеточных организмов и жизненную стратегию. Несмотря на то, что зрелый эритроцит лишен транскрипционного и трансляционного аппаратов, в нем имеются механизмы настройки функционального состояния в зависимости от внешних условий, реализующиеся за счет адсорбционного механизма.

Приспособление к изменениям условий внешней среды — это фундаментальное биологическое свойство всех живых организмов. Выделяют две альтернативные стратегии биохимической адаптации: активную, сопровождающуюся увеличением синтеза АТФ и активацией энергозависимых процессов, и пассивную, сопровождающуюся уменьшением напряженности метаболических систем и усилением антиоксидантной защиты. В эритроците выбор стратегии биохимической адаптации сводится к проблеме перераспределения ресурсов между альтернативными метаболическими путями — гликолизом и пентозофосфатным путем. Гликолиз поставляет клетке энергию в виде АТФ, необходимую для поддержания ионного гомеостаза, а пентозофосфатный путь обеспечивает восстановительными эквивалентами ферменты антиоксидантной защиты. На основании анализа данных литературы мы высказываем рабочую гипотезу, согласно которой перераспределение Нв из растворимого в мембраносвязанное состояние переключает метаболизм из высоко- в низкоэнергетическое состояние, и таким образом повышает неспецифическую резистентность за счет реализации пассивной адаптационной стратегии. С помощью схемы, представленной на рис. 9, мы проиллюстрировали способность Нв выступать в роли метаболического «реостата», регулирующего чувствительность и устойчивость эритроцита.

Завершить вышесказанное хотелось бы другими словами Сент-Дьердьи: «В основе живой природы лежит относительно небольшое число фундаментальных принципов, мудро приспособленных для самых разнообразных целей» [Сент-Дьердьи, 1971]. Одним из таких принципов является переход белков из растворимого в мембраносвязанное состояние. Как было показано школой А.И. Опарина, адсорбционный механизм регуляции активности ферментов работает и в гелеподобных структурах (коацерватах), что является свидетельством эволюционной древности данной «системы быстрого реагирования».

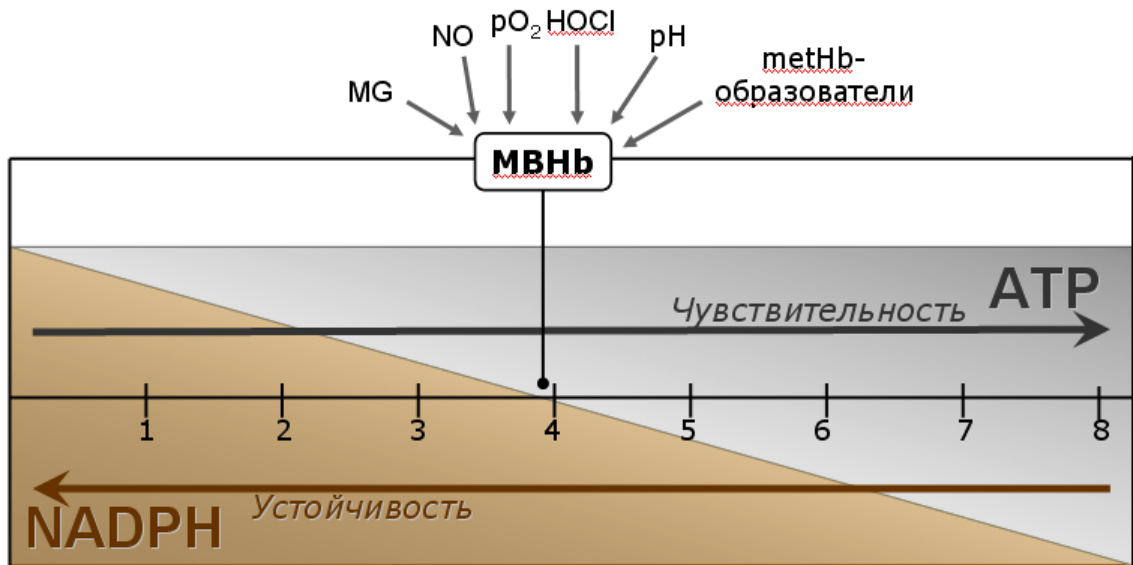


Рис. 9. Равновесие $Hb \leftrightarrow MbHb$ является метаболическим «реостатом», регулирующим чувствительность и устойчивость эритроцита.

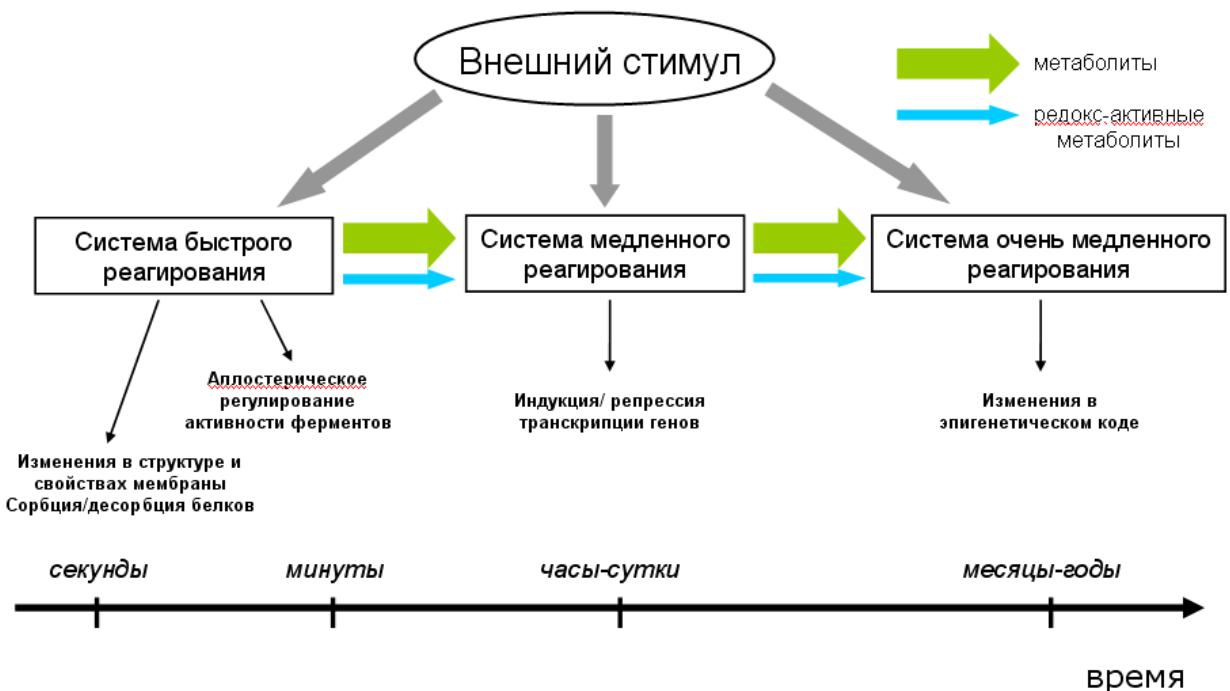


Рис. 10. Развертывание адапционных ответов в клетке по времени.

1.4. Компьютерные экспертные системы в медицинской диагностике

1.4.1. Понятие об экспертной системе

Экспертная система — (ЭС, англ. *expert system*) — компьютерная система, способная частично заменить специалиста-эксперта в разрешении проблемной ситуации. Современные ЭС начали разрабатываться исследователями искусственного интеллекта в 1970-х годах, а в 1980-х получили коммерческое подкрепление. Предтечами экспертных систем можно считать механические устройства — так называемые «интеллектуальные машины», созданные в 1832 году С.Н. Корсаковым [Корсаков, 2009], позволявшие находить решения по заданным условиям, например, определять наиболее подходящие лекарства по наблюдаемым у пациента симптомам заболевания.

Междисциплинарные исследования — способ организации исследовательской деятельности, предусматривающий взаимодействие в изучении одного и того же объекта представителей различных дисциплин. Внимание к междисциплинарным исследованиям и даже выделение их в специальный тип исследовательской деятельности относится ко второй половине XX века. [URL: <http://iph.ras.ru/elib/1836.html>]. На рис. 11. представлена диаграмма, показывающая пересечение областей наук, формирующих междисциплинарную область, в рамках которой осуществляется построение диагностической экспертной системы. Желтый сегмент (1) обозначает фундаментальные исследования; зеленый круг представляет медицинский аспект; фиолетовая область (3) представляет информационные технологии. На стыке этих трех областей родилось новое мультидисциплинарное направление «Система поддержки принятия решений в медицинской диагностике».



Рис. 11. Пересечение областей наук, формирующих междисциплинарную область, в рамках которой осуществляется построение диагностической экспертной системы.

В нашей стране разработкой диагностических систем для медицины с применением современных информационных технологий на протяжении 16 лет занимается кафедра НИЯУ МИФИ «Компьютерные медицинские системы» (зав. кафедрой проф. В.Г. Никитаев). На базе этой кафедры совместно с клинической больницей № 83 (КБ-83) Федерального Управления «Медбиоэкстрем» при Минздраве РФ были созданы: диагностические компьютерные системы обработки изображений АТЛАНТ, автоматизированные рабочие места врачей, локальная вычислительная сеть в КБ-83 и в МИФИ. В настоящее время введен в действие телемедицинский комплекс онкологической экспресс-диагностики, обеспечивающий дистанционные консультации между КБ-83 и РОНЦ РАМН по гистологическим препаратам с использованием волоконно-оптического канала связи (передаются диагностические изображения, текстовые документы и речевые комментарии, включая вопросно-ответный диалог врачей). Это позволило проводить срочные консультации для определения типа опухолей (доброкачественные или злокачественные) во время хирургических операций [Бердникович и др., 2011; Никитаев и др., 2006; Блиндарь и др., 2011]. Научным коллективом под руководством В.Г. Никитаева также были разработаны компьютерный офтальмологический комплекс «Атлант-retina» [URL: <http://www.comesy.ru/science/6.html>]; компьютерная система для гематологической диагностики «Атлант-гемо» [Никитаев с соавт, 2006]; компьютерные экспертные комплексы гистологической, цитологической и гематологической диагностики. [URL: <http://www.kaf46.mephi.ru/science.html>]. Эта работа в 2013 г. была отмечена Премией Правительства РФ.

Частью компьютерных медицинских систем являются базы данных, которые могут выглядеть в виде атласов и справочников на различных электронных носителях. Наиболее известные справочные базы данных: Embase, Genbank, Phytomed. Достоинство электронных атласов состоит в накоплении знаний специалиста, простота в использовании и бюджетность. К недостаткам следует отнести пассивную форму представления знаний и отсутствие аппарата анализа данных.

Экспертные же системы построены по принципу активного взаимодействия с пользователем, содержат структурированные знания специалистов в предметной области и правила поддержки принятия решений. Задача исследования неизвестного случая заболевания с применением экспертной системы сводится к задаче отнесения неизвестного объекта к одному из заданных классов. Цель ЭС - обеспечение помощи исследователю (врачу) на основании имеющихся данных в этой системе к одному из предложенных классов.

К широко известным зарубежным медицинским экспертным системам относится диагностическая система MYCIN, предназначенная для диагностики и наблюдения за состоянием больного при менингите и бактериальных инфекциях. Первая версия была разработана в 1970-х гг. в Стенфордском Университете (США). В настоящее время эта система ставит диагноз на уровне врача-специалиста. В ней имеется расширенная база знаний, поэтому она может применяться в смежных областях медицины [Бердникович и др., 2011].

Разработка компьютерных систем в настоящее время является приоритетной для многих медицинских учреждений. В США существуют системы, которые занимаются диагностикой на уровне врача-эксперта, такие системы могут служить хорошим подспорьем для молодых врачей-интернов. [Waghlikar et al., 2013; Gardner, 2004].

Компьютерные экспертные системы могут быть использованы для диагностики различных заболеваний системы крови — это анемии различного генеза и гемоглобинопатии.

1.4.2. Методы анализа данных в экспертных системах

Для построения экспертной системы применяются следующие методы статистического анализа данных: метод построения эталонов, метод потенциальных функций, метод ближайшего соседа, метод k ближайших соседей. Описание методов дано в учебном пособии [Никитаев с соавт., 2006], здесь мы лишь приводим сравнительный анализ методов.

Метод эталонов среди перечисленных является самым быстрым в процессе анализа, относительно прост в реализации, но плохо чувствителен к случайным выбросам (случаи отличия значений от среднестатистических). Отчасти этот недостаток нивелируется в реализованной системе путем использования простого классификатора Байеса — эталоны классов по обучающей выборке находятся для каждого признака в отдельности, после чего при анализе значения каждого из признаков сравнивается с эталонными, на основании этого данный конкретный признак считается указывающим на принадлежность к классу, расстояние до эталона которого является минимальным, и по сумме признаков рассчитывается процентная вероятность того или иного заболевания.

Метод потенциальных функций значительно сложнее в плане физической реализации и показывает неоднозначные результаты — в зависимости от особенностей конкретных заболеваний одни из них могут распознаваться со значительно большей точностью, чем другие. В целом можно сказать, что данный метод крайне чувствителен к

неоднородности распознаваемых классов и при большом разбросе значений внутри класса становится неэффективным.

Метод ближайшего соседа и метод k ближайших соседей показывают достаточно сходные результаты, в целом точность данных методов в определенных случаях оказывается наивысшей, однако стоит учитывать неспособность распознавать случаи, значительно отличающиеся от имеющихся в обучающей выборке (данный недостаток в определенной мере свойственен всем методам классификации), и долгое время анализа каждого случая (в сравнении с методом эталонов, разница во времени анализа может достигать двух порядков).

Таким образом, каждый из рассмотренных методов имеет определенные достоинства и недостатки. Вероятно, для повышения точности и достоверности проводимого системой анализа имеет смысл реализовать более одного метода классификации, и проводить окончательную постановку диагноза основываясь на их суммарных результатах. Также стоит провести статистическое сравнение точности всех перечисленных методов на выборке реальных случаев для окончательного заключения об их эффективности.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. МАТЕРИАЛЫ

В работе были использованы следующие реактивы: метгемоглобин из эритроцитов быка, метмиоглобин из скелетных мышц лошади, супероксиддисмутаза из корней хрена (15 тыс. ед), каталаза из печени быка, *L*-лизин, метилглиоксаль, пиридин, карнозин, гистидин, имидазол, HEPES, MTT (2,5-дифенил тетразолий бромид), *N*-ацетил-*L*-цистеин-NO, дигидрородамин 123, DETA/NO, HOCl — Sigma (USA); NaNO₂, DMSO, K₃[Fe(CN)₆] — Sigma-Aldrich (USA); ThioGlo1 — Calbiochem (USA); *L*-глутатион — AppliChem (Германия); PAPA NONOate (3-(2-гидрокси-2-нитрозо-1-пропилгидраино)-1-пропанамин), соль Ангели (Na₂N₂O₃) — Cayman Chemicals (USA); FeSO₄ — Fluka (Switzerland); *D*-глюкоза, NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, Na₂HPO₄, KCN, трис-HCl — Химмед (Россия). Все реактивы имеют высокую степень чистоты.

Синтез метаболитов NO. Нитрозоглутатион и нитрозоцистеин синтезировали путем смешения эквимольных количеств глутатиона или *N*-ацетил-*L*-цистеина и NaNO₂ непосредственно перед внесением в среду инкубации. Концентрацию образовавшихся нитрозотиолов определяли по поглощению при $\lambda=335$ нм, используя молярный коэффициент экстинкции, равный 774 M⁻¹cm⁻¹. Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с различными лигандами (фосфат, глутатион, цистеин) синтезировали по ранее разработанной методике [Shumaev et al., 2008b]. Синтез ДНКЖ с тиоловыми лигандами проводили в HEPES-буфере (pH ~ 8,0), добавляя FeSO₄ к раствору *S*-нитрозотиола, затем доводили pH до 7,0 и добавляли тиолы. ДНКЖ с карнозиновыми лигандами получали путем последовательного смешивания следующих компонентов: 65 мкл 0,1 М HEPES (pH 7,5), 50 мкл 0,5 М раствора карнозина, 5 мкл 8% раствора метилглиоксаля, 5 мкл 20 мМ FeSO₄ и 5 мкл 100 мМ Соли Ангели. Гемоглобиновые и альбуминовые ДНКЖ получали добавлением фосфатных ДНКЖ к раствору белков в фосфатном буфере в молярном соотношении Нб : ДНКЖ = 1 : 2,4. Концентрацию ДНКЖ рассчитывали по двойному интегралу сигнала ЭПР этих комплексов, используя в качестве стандарта спиновую метку 4-гидрокси-ТЕМРО.

2.2. МЕТОДЫ

2.2.1. Определение концентрации гемоглобина и его разных форм

Общий гемоглобин определяли цианидным методом или пиридингемохромным методом Риггса в нашей модификации [Космачевская, Топунов, 2007]. Суть цианидного метода заключается в том, что все формы гемоглобина преобразуются в одну форму - цианметгемоглобин. В 1 мл крови, разбавленной в 250 раз 0,1 М К-фосфатным буфером (рН 7,4), измеряли оптическую плотность (A_1) при 630 нм. Затем в кювету с исследуемым раствором добавляли 20 мкл 20% раствора KCN и через 3 минуты снимали показания оптической плотности (A_2) при 630 нм. После этого в кювету вносили несколько кристаллов $K_3[Fe(CN)_6]$, перемешивали и через 3 минуты измеряли оптическую плотность (A_3) раствора при 540 нм. Для определения концентрации общего гемоглобина использовали зависимость: Hb (г/л) = $A_3 \times 367,7$. Концентрацию метгемоглобина рассчитывали по формуле: $metHb$ (%) = $(A_1 - A_2) \times 1100 / (A_3 \times 3,59)$ [Depositari et al., 1972].

Количество восстановленного гемоглобина определяли по доли оксигенированного гемоглобина ($\epsilon_{576} = 14,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), образующегося в кювете при спектрофотометрическом измерении в присутствии кислорода.

Образование нитрозилгемоглобина ($HbFe-[^I]NO$) регистрировали по увеличению поглощения в области 572 нм (один из максимумов $Hb-[Fe^I]NO$) относительно поглощения при 592 нм (ближайшая изобестическая точка), а также с помощью спектроскопии ЭПР. Процентное содержание $Hb-[Fe^I]NO$ в инкубируемой смеси рассчитывали, принимая за 100 % количество $Hb-[Fe^I]NO$ после добавления донора NO и дитионита натрия. В качестве донора оксида азота использовали S-нитрозоглутатион, PAPA NONOate и DETA/NO.

Образование нитригемоглобина (NO_2-Hb) оценивали по характерной для этой формы полосе поглощения восстановленного гемохромогена при 582 нм в 30% щелочном растворе пиридина [Otsuka et al., 2010].

Мембраносвязанный гемоглобин определяли по разработанному нами методу. Для анализа брали 100 мкл крови, производили отмывку эритроцитов от компонентов плазмы в 1 мл фосфатно-солевого буфера и затем полностью гемолизировали. Тени эритроцитов, содержащие гемоглобин, отделяли центрифугированием при 5000 g в течение 5 мин. К двукратно отмывтым теням добавляли 100 мкл воды и 450 мкл 30% щелочного раствора пиридина. После полного растворения осадка определяли концентрацию связанного с мембранами гемоглобина пиридингемохромным методом. Для этого непосредственно перед измерением раствор Hb в пиридине восстанавливали дитионитом натрия. Измеряли

оптическое поглощение восстановленного пиридингемохромогена при 556 и 539 нм и рассчитывали концентрацию гемопротейдов по формуле $C(\text{мг/мл}) = (A_{556} - A_{539}) \times 3,86$.

2.2.2. Эксперименты с суспензией эритроцитов

В работе использовали эритроциты, полученные из крови крыс линии Wistar и из донорской крови, стабилизированной цитратом натрия. Эритроциты дважды отмывали непосредственно перед опытом от компонентов плазмы пятикратным объемом изотонического раствора в фосфатно-солевом буфере, содержащем 10 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 137 мМ NaCl , 2,7 мМ KCl (рН 7,4) 1 мМ CaCl_2 , 0,5 мМ MgCl_2 , путем двукратного центрифугирования (1200 g, 10 мин, 4 °С.) Отмытые эритроциты использовали для приготовления суспензии с гематокритом 0,2 (содержание гемоглобина 50 ± 3 мг/мл). В качестве среды инкубирования использовали тот же раствор, дополнительно содержащий 5 мМ глюкозы.

Эксперименты с эритроцитами человека (раздел 3.3.3.)

Цитопротекторное действие ДНКЖ с глутатионовыми лигандами (ДНКЖ-GS) (раздел 3.3.3.) изучали в экспериментальной модели, представляющей собой отмытую суспензию эритроцитов, полученных из крови пациентов Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина (РОНЦ РАМН). Гемолиз эритроцитов индуцировали добавлением хлорноватистой кислоты (HOCl/OCl^-) (0,2-4 мМ) к суспензии эритроцитов в фосфатно-солевом буфере с добавлением глюкозы. ДНКЖ-GS и другие редокс-активные вещества (GSH, NaNO_2 , Fe^{2+}) добавляли к суспензии эритроцитов в количестве, эквивалентном 3 мкМ ДНКЖ-GS в инкубируемой смеси. Затем через 6-7 мин добавляли HOCl/OCl^- либо в различных концентрациях (20, 100, 200, 400 мкМ) с целью изучения дозозависимого эффекта, либо в единичной концентрации 400 мкМ для изучения степени ингибирования окислительного гемолиза. Эритроциты инкубировали в течение 20 мин при 37 °С при постоянном медленном перемешивании, затем центрифугировали при 1200 g в течение 10 мин. В супернатанте и в осадке определяли концентрацию гемоглобина как описано в разделе 2.2.1.

Эксперименты с эритроцитами крысы (раздел 3.3.4.)

К 100 мкл суспензии эритроцитов добавляли 10 мМ растворы NaNO_2 , CysNO (N-acetyl-L-cysteine-NO) и GSNO до конечных концентраций 0,8, 2, 3, 4 мМ соответственно. В случае моделирования карбонильного стресса проводили прединкубирование эритроцитов с метилглиоксалем (3 мМ) в течение 20 мин. В качестве контроля использовали суспензию эритроцитов без добавок. Конечный объем эритроцитарной смеси составлял 125 мкл. Эритроциты инкубировали при 37 °С в течение 90 мин при

постоянном медленном перемешивании, затем центрифугировали при 1200 g в течение 10 мин. В супернатанте определяли концентрацию гемоглобина, отражающую степень гемолиза, и содержание метгемоглобина, осадок использовали для оценки количества связанного с мембранами гемоглобина как описано в разделе 2.2.1.

2.2.3. Реакционная система для изучения нитрозилирования гемопротейдов

Реакционная система для изучения нитрозилирования гемопротейдов включала 25 mM К-фосфатный буфер (pH 7,4), 0,3 mM metHb, 20 mM MG, 5 mM GSNO или 5 mM NaNO₂ (pH = 6,9). GSNO и NaNO₂ вносили после 20 мин инкубации Hb с MG. Затем растворы инкубировали при 37 °C. Для получения микроаэрофильных условий в системе раствор Hb во флаконе с плотно прилегающей крышкой с силиконовой прокладкой деаэрирование током аргона в течение 15 мин.

2.2.4. Реакционная система для изучения влияния доноров NO и метилглиоксаля на переход гемоглобина в связанное с мембранами состояние

Материалом исследования служили эритроциты, полученные из стабилизированной цитратом натрия крови крыс. Эритроциты дважды отмывали непосредственно перед опытом от компонентов плазмы пятикратным объемом изотонического буферного раствора (125 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1,2 mM Na₂HPO₄, 50 mM трис-HCl, pH 7,4) в режиме центрифугирования 800 g 10 мин при 4 °C. Отмытые эритроциты использовали для приготовления суспензии с гематокритом 0,2 (содержание гемоглобина 47 ± 2 мг/мл). В качестве среды инкубирования использовали тот же раствор, дополнительно содержащий 5 mM глюкозы. К 100 мкл суспензии добавляли 10 mM растворы одного из доноров оксида азота: NaNO₂, Cys-NO (*N*-ацетил-*L*-цистеин-NO) и GSNO до конечных концентраций 0,8, 2, 3, 4 mM соответственно. В случае моделирования карбонильного стресса проводили прединкубирование суспензии эритроцитов с метилглиоксалем (конечная концентрация 3 mM) в течение 20 мин. В качестве контроля использовали суспензию эритроцитов без добавок. Конечный объем эритроцитарной смеси составлял 125 мкл. Эритроциты инкубировали при 37 °C в течение 90 мин при постоянном медленном перемешивании, затем центрифугировали при 800 g в течение 10 мин. В супернатанте определяли концентрацию гемоглобина, отражающую степень гемолиза, и содержание metHb, осадок использовали для оценки количества прочно связанного MBHb. Для этого эритроциты подвергали полному лизису, осадок ресуспендировали в 1,5 мл 15 mM NaCl и инкубировали 30 мин при 37 °C, затем центрифугировали при 2000 g в течение 10 мин. К осадку добавляли 150 мкл воды и 450

мкл щелочного 30% раствора пиридина, после полного растворения осадка определяли концентрацию связанного с мембранами гемоглобина пиридингемохромным методом, описанным в разделе 2.2.1.

2.2.5. Получение гликированного гемоглобина

Гликированный гемоглобин (раздел 3.1.2.) получали инкубацией метгемоглобина (20 мг/мл) с 4 мМ метилглиоксаль в деаэрированной аргонной среде при 37 °С в течение 20 и 113 ч. Непрореагировавший метилглиоксаль и лабильные аддукты удаляли диализом.

2.2.6. Определение флуоресцирующих продуктов неферментативного гликирования гемоглобина

Накопление флуоресцирующих продуктов неферментативного гликирования гемоглобина (пентозидины и аргпиримидины) оценивали по автофлуоресценции аддуктов в области 385-395 нм, при длине волны возбуждения 320 нм на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301 PC (Япония). Концентрация Hb в кювете составляла 2,25 мкМ в 25 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,4). Реакционная смесь содержала metHb и MG или комбинацию MG с GSNO или NaNO₂

2.2.7. Восстановление дифенилтетразолий бромида

Скорость восстановления дифенилтетразолий бромида (МТТ) продуктами реакции неферментативного гликирования регистрировали при 565 нм в системе, содержащей 0,1 М К,Na-фосфатный буфер (рН 8,5), 0,625 мМ МТТ, 40 мМ L-лизина, 40 мМ MG, 3,2 мМ GSNO или 3,5 мМ DETA/NO. Концентрацию восстановленного МТТ рассчитывали, используя коэффициент миллимолярной экстинкции $\epsilon_{565}=4 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$. Значения начальных скоростей восстановления МТТ представлены как среднее арифметическое результатов трех экспериментов.

2.2.8. Распад нитрозоглутатиона

Распад нитрозоглутатиона в системе, содержащей метилглиоксаль и лизин, регистрировали при изменении максимума поглощения при 545 нм дифференциального спектра, полученного путем вычитания из суммарного спектра поглощения, образующихся в реакционной смеси аддуктов лизина с метилглиоксалем.

2.2.9. Определение SH-групп в низкомолекулярных и белковых тиолах

Количественную оценку свободных сульфгидрильных групп определяли с помощью тиол-специфичной флуоресцентной метки ThioGlo1. Методика заключается в том, что при добавлении к раствору белка ThioGlo1 образуется флуоресцирующий аддукт с максимумом испускания флуоресценции при 506 нм при длине волны возбуждения 379 нм [Hoff et al., 2013].

С целью изучения взаимодействия цистеина и глутатиона с метилглиоксалем к 50 мкл 7 мМ раствора тиолового соединения в 0,1 М К-фосфатном буфере (pH=7,4) добавляли 50 мкл 7 мМ раствора метилглиоксаля (R-SH : MG = 1 : 1), затем смесь инкубировали при 25 °С в течение 24 мин.

Для анализа восстановленных SH-групп мембранных белков образцы готовили следующим образом: к 50 мкл отмытой суспензии эритроцитов ([Hb] = 47 ± 2 мг/мл) добавляли 450 мкл 0,45% раствора NaCl, инкубировали при 37 °С в течение 60 мин, затем отделяли тени эритроцитов центрифугированием при 3000 g в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в 100 мкл DMSO, на анализ брали 5 мкл, к которым добавляли 5 мкл 0,2 мМ ThioGlo1 в DMSO. В спектрофлуориметрическую кювету к 490 мкл 10 мМ К,Na-фосфатного буфера (pH 7,4) вносили 10 мкл исследуемой смеси и регистрировали флуоресценцию на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301 PC (Япония) при высокой чувствительности, средней скорости сканирования (по обозначениям прибора) и ширине щели возбуждающего и испускающего света 1,5 нм для образцов цистеина и глутатиона и 3 нм для белков мембран эритроцитов.

2.2.10. Определение пероксинитрита

Образование пероксинитрита в системе, моделирующей карбонильный стресс, регистрировали по скорости окисления дигидрорадамина 123 [Crow, 1997] в системе, содержащей 0,1 М К-фосфатный буфер (pH 8,5), 0,5 мМ дигидрорадамина, 3,2 мМ GSNO и/или 40 мМ лизина и 40 мМ метилглиоксаля. Окисление дигидрорадамина до родамина определяли спектрофотометрически при 500 нм ($\epsilon_{500}=78,8 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$).

2.2.11. Измерение антиоксидантной активности ДНКЖ

Антиоксидантную активность ДНКЖ с различными лигандами оценивали по скорости восстановления оксоферрильной формы миоглобина (Mb-[Fe^{IV}=O]). Реакционная смесь включала 90 мМ HEPES (pH 7,5), 100 мкМ metMb из скелетных мышц лошади, 1 мМ H₂O₂. Через 3 мин после полного окисления metMb до Mb-[Fe^{IV}=O] для удаления непрореагировавшей H₂O₂ к реакционной смеси добавляли каталазу (0,2 мг/мл) и

инкубировали еще 4 мин. Регистрировали спектр образовавшегося Mb-[Fe^{IV}=O]. Затем вносили 5 мкл раствора ДНКЖ с фосфатными или карнозиновыми дигандами (4 мМ) или продуктов распада ДНКЖ в концентрациях, эквивалентных их содержанию в комплексах, производили регистрацию спектров с интервалом 1,5 мин в термостатируемой при 37 °С кювете. Расчет скорости восстановления осуществляли по тангенсу угла наклона линейного участка на кривой восстановления Mb-[Fe^{IV}=O] до metMb

2.2.12. Регистрация спектров оптического поглощения

Спектры оптического поглощения регистрировали на UV-VIS спектрофотометре Cary 300 (VarianBio, США) при комнатной температуре в кювете с длиной оптического пути 1 см при скорости сканирования 600 нм/мин. Спектрофотометрические исследования в микроаэрофильных условиях проводили в специальных кюветах с плотно прилегающими крышками с силиконовой прокладкой, через которую осуществлялось деаэрирование раствора током аргона в течение 35-40 мин.

2.2.13. Регистрация спектров ЭПР

Регистрацию спектров ЭПР проводили на спектрометре E-109E (Varian, США) в двух режимах: при комнатной температуре и при температуре жидкого азота. Условия регистрации при комнатной температуре: СВЧ мощность 20 мВт, СВ-частота 9,15 ГГц, амплитуда СВЧ модуляции 0,2 мТл для сигналов органических свободных радикалов или 0,4 мТл для сигналов нитрозилированного Hb. Запись спектров начинали через 1 мин после смешивания реакционных компонентов. Реакционную смесь (120 мкл) вводили в газопроницаемые тефлоновые капилляры PTFE 22 (Zeus Industrial Products, Inc., США). Капилляры помещали в кварцевую трубку, через которую в ходе измерения постоянно продували азот. В качестве стандарта использовали сигнал ЭПР стабильного синтетического свободного радикала — дифенилпикрилгидразина [Шумаев с соавт., 2009].

Условия регистрации при температуре жидкого азота: СВЧ мощность 10 мВт, СВ-частота 9,33 ГГц, амплитуда СВЧ модуляции 0,16 мТл, постоянная времени 0,032. Измерения ЭПР были проведены с использованием кварцевых сосудов Дьюара, содержащих замороженный образец, погруженный в жидкий азот.

2.2.14. SDS-электрофорез в ПААГ

Электрофорез проводили в блоках 10% ПААГ размером 150×150×1 мм по методу Лэммли, используя прибор для вертикального электрофореза серии VE («Хеликон»,

Россия). Реакционная смесь содержала 0,3 мМ Нв быка в 0,01 М К-фосфатном буфере (рН 7,2), 0,02 % NaN_3 , 6 мМ MG и 1,5 мМ GSNO. Инкубацию осуществляли анаэробно при 37°C. К образцам белка добавляли буфер в соотношении 1:1, прогревали в течение 10 мин при 70°C и затем наносили на гель. Буфер для образцов был приготовлен на основе 0,1 М Трис-НСl буфера (рН 6,8) с 4% SDS, 3% дитиотрейтола, 0,2% бромфенолового синего и 20% глицерина. На гель наносили по 10 мкл образца белка. В качестве электродного буфера использовали 0,2 М Трис-глициновый буфер (рН 8,3), содержащий 0,1% SDS.

Электрофорез проводили при 4 °C и следующих параметрах: до входа белков в концентрирующий гель $I=30$ мА, $U=150$ В, в разделяющем геле $I=50$ мА, $U=200$ В. Необходимые параметры электрофореза обеспечивались источником питания «Эльф-4» (Россия). После окончания процесса разделения белков гель фиксировали и окрашивали раствором Кумасси бриллиантового синего R-250.

2.2.15. Методы статистического анализа данных для построения экспертной системы

Для построения экспертной системы использовали метод статистического анализа данных — метод построения эталонов. Эталон — это усредненный по обучающей выборке абстрактный объект; он может не совпадать не только ни с одним объектом обучающей выборки, но и ни с одним объектом генеральной совокупности.

Для каждого класса объектов по обучающей выборке строятся эталон, имеющий определенные значения для набора признаков:

$$\bar{x}^0 = \{x_1^0, x_2^0, \dots, x_N^0\}, \quad \text{где} \quad x_i^0 = \frac{1}{K} \sum_{k=1}^K x_{ik}$$

K – количество объектов данного образа в обучающей выборке,

i – номер признака.

Классификация осуществляется следующим образом. На вход системы поступает объект \bar{x}^* , принадлежность которого к тому или иному классу системе неизвестна. От этого объекта измеряются расстояния до эталонов всех классов, и \bar{x}^* система относит к тому классу, расстояние до эталона которого минимально. Расстояние измеряется в той метрике, которая введена для решения определённой задачи распознавания.

Данный способ оценки был использован для построения экспертной системы как дающий наиболее точные результаты при среднем объеме выборки. При увеличении выборки и добавлении в базу большого количества случаев возможны доработка данного модуля с учетом информативности каждого из признаков для конкретного заболевания, и

выбор метода постановки диагноза (например, помимо метода эталонов, хорошо использовать алгоритм k-соседей), но на данном этапе ввиду небольшого размера выборки добавление данных алгоритмов только ухудшит результаты анализа, так как случайные отклонения отдельных случаев превышают закономерности, соответствующие каждому заболеванию.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных данных проводили на основе расчета средних арифметических и их ошибок. Различия показателей, по сравнению с контролем и между группами определялись методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Представленные значения носят статистически достоверный характер ($p \leq 0,05$).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Влияние метаболитов оксида азота на реакцию неферментативного гликирования (реакцию Майяра)

3.1.1. Ингибирование образования флуоресцирующих продуктов неферментативного гликирования донорами оксида азота

Имеются данные, что интермедиаты реакции Майяра предотвращают нитрозилирование гема, перехватывая NO [Bucala et al., 1991; Asahi et. al., 2000]. По данным Asahi с соавт. NO ингибирует формирование в белках пентозидинов [Asahi et. al., 2000]. Пентозидины являются одними из флуоресцирующих конечных продуктов гликирования, которые образуются при модификации аминокислотных остатков белков карбонильными соединениями, в том числе MG [Asahi et. al., 2000; Yim et. al., 1995; Rahbar, 2005]. Другим флуоресцирующим продуктом гликирования, образующимся при взаимодействии MG с аргинином, является аргпиримидин [Rabbani, Thornalley, 2010]. В условиях нашего эксперимента GSNO ингибировал образование флуоресцирующих продуктов, возникающих в ходе инкубации metHb с MG (рис. 12). Причём этот эффект практически не зависел от содержания кислорода, что указывает на прямое взаимодействие NO или GSNO с интермедиатами реакции Майяра.

Также было показано ингибирующее влияние GSNO на образование белковых межмолекулярных связей, образуемых в процессе реакции неферментативного гликирования. Инкубация metHb с MG в течение семи суток приводила к появлению кросс-сшивок между субъединицами Hb. Присутствие в реакционной смеси GSNO снижало количество агрегированных субъединиц. Этот эффект продемонстрирован с помощью SDS-электрофореза в ПААГ (рис. 13).

Ингибирующее действие метаболитов NO на ход реакции неферментативного гликирования может быть связано с образованием аддуктов оснований Шиффа с оксидом азота (С- и N-нитрозаминов) и нитрозильных комплексов железа. Для проверки этого предположения было исследовано образование флуоресцирующих продуктов в системе, содержащей метилглиоксаль и карнозин. Дипептид карнозин (β -аланил-*L*-гистидин) обладает способностью реагировать с активными карбонильными соединениями (метилглиоксаль, акролеин, 4-гидроксиноненаль и др.), а также продуктами их взаимодействия с белками [Battah et al., 2002; Hipkiss, Brownson, 2000; Aldini et al., 2005; Reddy et al., 2005].

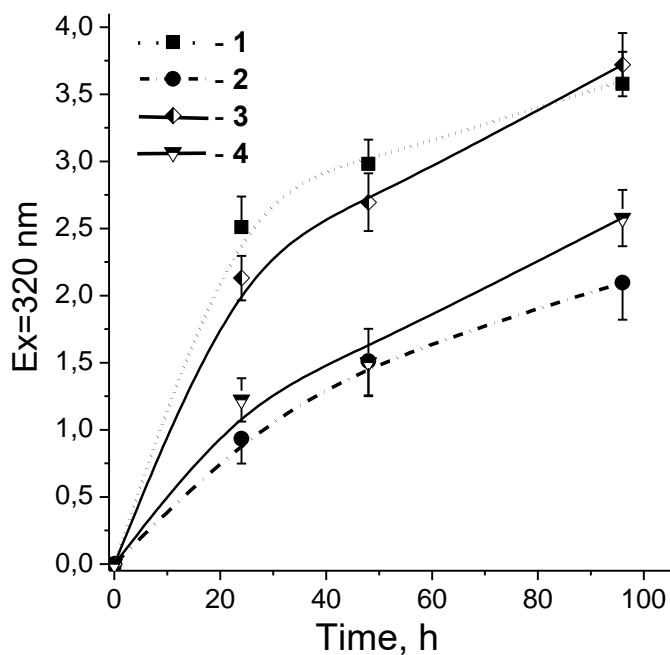


Рис. 12. Кинетика накопления флуоресцирующих продуктов конечного гликирования гемоглобина. Инкубация metHb с MG – (1, 3) или в присутствии комбинации MG и GSNO – (2, 4). Инкубация проводилась в аэробных – (1, 2) или микроаэрофильных условиях – (3, 4). Параметры флуоресценции: $\lambda_{\text{возб}} = 320$ нм, $\lambda_{\text{исп}} = 450$ нм.

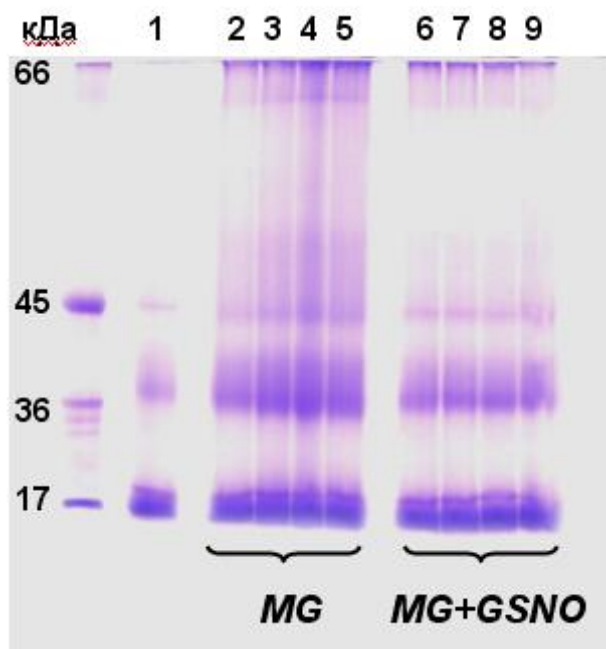


Рис. 13. SDS-электрофорез гемоглобина в 10% ПААГ. Реакционная смесь содержала 0,3 мМ Hb в 0,01 М К-фосфатном буфере (pH 7,2) с 6 мМ MG и 1,5 мМ GSNO. Инкубацию осуществляли анаэробно при 37 °С. Обозначения трэков: 1 – metHb, 2 и 6 – 24 ч инкубации, 3 и 7 – 48 ч инкубации, 4 и 8 – 72 ч инкубации, 5 и 9 – 168 ч инкубации.

Добавление ДНКЖ с фосфатными лигандами (ДНКЖ-PO₄) и соли Ангели (донор нитроксила – HNO/NO⁻) к системе MG-карнозин существенно ингибировало образование флуоресцирующих продуктов реакции (рис. 14, столбцы 4, 5 и 6). Отметим, что в организме нитроксил возникает в результате одноэлектронного восстановления оксида азота [Kemp-Harper, 2011]. Доноры нитроксила в настоящее время также рассматриваются как потенциальные фармакологические агенты [Switzer et al., 2009].

Наибольшее ингибирующее действие наблюдалось в среде, содержащей нитроксил и ионы двухвалентного железа (рис. 14). ДНКЖ-PO₄ в наших экспериментах можно рассматривать как донор Fe-NO группы [Vanin, van Faassen, 2007], которая может переходить на белковые лиганды (цистеин, имидазол), образуя более прочные комплексы.

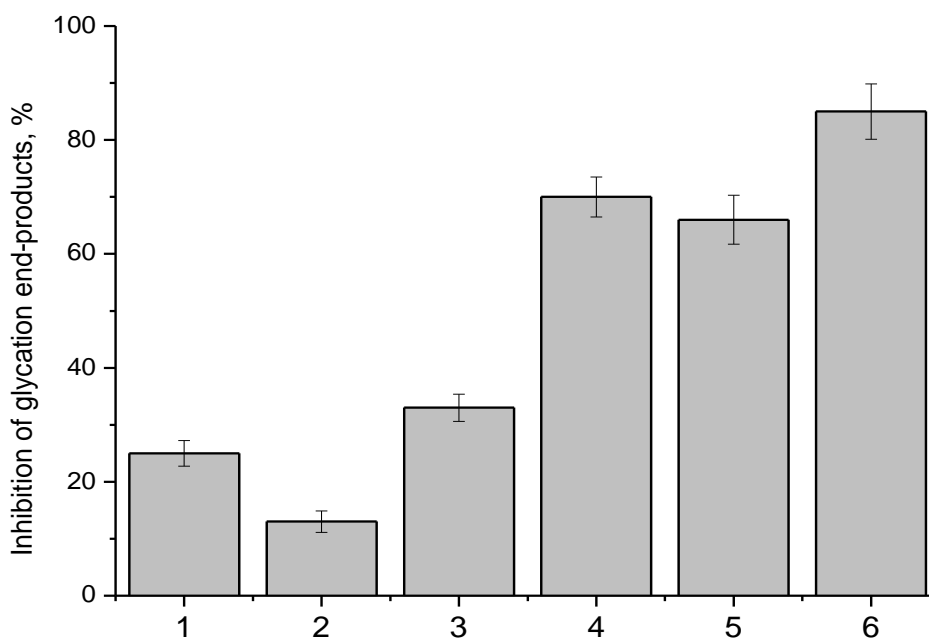


Рис. 14. Влияние доноров NO на образование флуоресцирующих продуктов в реакции метилглиоксаля с карнозином. 0,1 М HEPES (pH 7,6), 2 мМ карнозина, 4 мМ MG, 2 мМ NO-доноров: 1 – PAPA/NO, 2 – NaNO₂, 3 – GSNO, 4 – соль Ангели, 5 – ДНКЖ-PO₄⁻, 6 – соль Ангели + 2,4 мМ FeSO₄. Инкубация при 37 °С в течение 4,5 ч. λ_{возб} = 334 нм, λ_{исп} = 440 нм. За 100% принято количество флуоресцирующих конечных продуктов гликирования в контрольном варианте (без доноров NO).

Предположение, что включение реакционноспособных аминокислотных остатков в состав ДНКЖ препятствует их участию в реакции неферментативного гликирования, мы проверили в экспериментах с цистеином. Есть данные, что тиолы являются наиболее доступными мишенями действия дикарбонильных соединений. Продуктами реакции

цистеина с метилглиоксалем являются тиогемацетали [Lo et. al., 1994; Zeng, Davies, 2005, 2006], которые имеют характерный максимум поглощения в УФ области. На рис. 15 представлены кинетика образования тиогемацеталей. Как видно, тиоловые группы в составе динитрозильных комплексов обнаруживают меньшую активность (рис. 15, кривая 2). На основании этих результатов можно заключить, что связывание белковых тиоловых групп также будет препятствовать их модификации активными карбонильными соединениями. Следует особо отметить, что такое свойство, как лабильность, делает ДНКЖ уникальными лигандами тиоловых групп, модулирующих их реакционную способность. С одной стороны, эти комплексы блокируют SH-группы, защищая их от окислительных модификаций, а с другой, наоборот, повышают их реакционную способность, за счет образования тиолят-аниона ($R-S^-$) при распаде. Способность ДНКЖ защищать SH-группы гемоглобина от окисления была показана в более ранних исследованиях нашей лаборатории [Shumaev et al., 2008b].

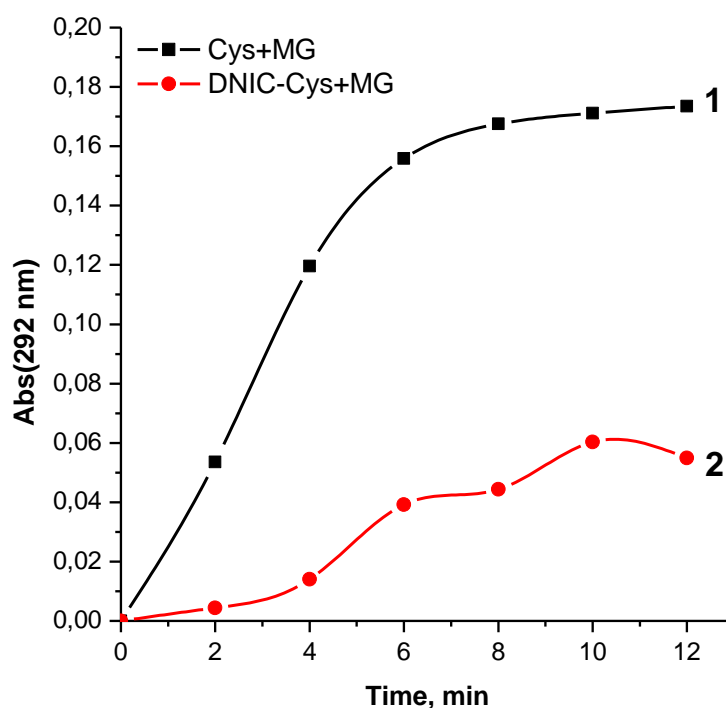


Рис. 15. Кинетика образования тиогемацеталей. Реакционная смесь содержала 0,145 мМ цистеина и 3,33 мМ MG – (1), 0,145 мМ ДНКЖ-Сус и 3,33 мМ MG – (2).

3.1.2. Образование динитрозильных комплексов железа с продуктами модификации гемоглобина и карнозина метилглиоксалем

Образование динитрозильных комплексов железа с гликированным гемоглобином

Одним из возможных механизмов ингибирующего (антигликирующего) действия метаболитов оксида азота может быть включение интермедиатов реакции Майяра в состав динитрозильных комплексов железа (раздел 3.1.1.). Ранее было показано, что введение фосфатных ДНКЖ в реакционную среду, содержащую аминокислоты (лизин или цистеин) и метилглиоксаль, приводит к появлению нового сигнала ЭПР с g -фактором, равным 2,018 [Шумаев с соавт, 2013]. Аналогичный сигнал возникал при добавлении в эту среду ионов Fe^{2+} и синтетических доноров оксида азота. Лигандами для ДНКЖ могут быть основания Шиффа, образующиеся в реакции карбонильных групп метилглиоксаля с α -аминогруппой *L*-лизина. Было высказано предположение, что азот основания Шиффа и карбоксильная группа аминокислоты участвуют в координации ионов железа. Из литературных источников известна способность оснований Шиффа формировать комплексы с металлами переменной валентности [Mohamed et al., 2006; Yousif et al., 2013].

Возможность образования ДНКЖ нового типа, связанных с белками, была нами показана в экспериментах с гемоглобином, модифицированным метилглиоксалем (рис. 16). При гликировании метилглиоксалем аминокислотных остатков гемоглобина образуются лиганды, способные связывать ионы железа и формировать нитрозильные комплексы. С увеличением степени модификации гемоглобина метилглиоксалем спектр ЭПР становится более ассиметричным (рис. 16, спектр 3). Такое изменение формы спектра может быть связано с изменением в лигандной сфере ДНКЖ. В случае альбуминовых ДНКЖ появление максимума с $g \sim 2,05$ происходит в результате замены тиольного лиганда на остаток гистидина белковой цепи, причем железо комплексов образует координационную связь с азотом имидазольного кольца. В наших экспериментах новым лигандом ДНКЖ может быть азот основания Шиффа, которое образуется при неферментативном гликировании гемоглобина метилглиоксалем. Кроме того, метилглиоксаль может модифицировать остаток цистеина 93 β -субъединицы гемоглобина с образованием тиогемацетала. Возникновение аналогичных новых сайтов связывания ДНКЖ было зафиксировано в молекуле миоглобина после его модификации метилглиоксалем.

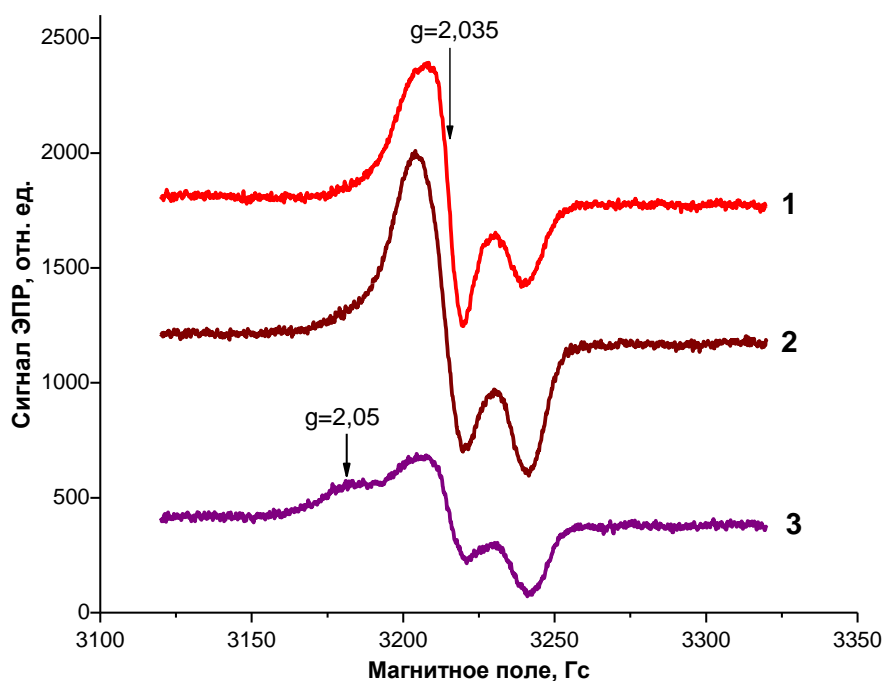


Рис. 16. Спектры ЭПР ДНКЖ, связанных с нативным и модифицированным метилглиоксалем гемоглобином. Модифицированный Нб получали, инкубируя metНб (20 мг/мл) с MG (4 мМ) в течение 20 и 113 ч. Состав реакционной смеси: 1 – нативный Нб + 270 мкМ ДНКЖ- PO_4^- , 2 – модифицированный Нб + 600 мкМ ДНКЖ- PO_4^- , 3 – модифицированный Нб + 600 мкМ ДНКЖ- PO_4^- .

Новый тип динитрозильных комплексов железа с карнозином в качестве лиганда

При добавлении ДНКЖ- PO_4 к раствору карнозина в реакционной смеси образуется синглетный сигнал ЭПР, принадлежащий новому типу динитрозильных комплексов железа (рис. 17 А, спектр 1). Аналогичный сигнал возникал в реакционной смеси, содержащей карнозин, ионы двухвалентного железа и соль Ангели (донор нитроксила — HNO/NO^-) (рис. 18, спектр 2). Сигнал ЭПР карнозиновых ДНКЖ характеризуется g-фактором, равным 2,034, и не имеет выраженной сверхтонкой структуры. В данных экспериментах ДНКЖ с фосфатными лигандами в наших экспериментах можно рассматривать как донор Fe-NO группы [Vanin, van Faassen, 2007]. Однако в присутствии классического донора оксида азота PAPA/NONOate возникают лишь следовые количества карнозиновых ДНКЖ (рис. 17 А, спектры 3, 4). Тем не менее, PAPA/NONOate является эффективным источником NO для других динитрозильных комплексов железа, например,

ДНКЖ с фосфатными лигандами (рис. 17 В, спектр 2). В этих условиях метилглиоксаль не влияет на образование карнозиновых ДНКЖ (рис. 17 А, спектр 2).

В то же время в системе, содержащей HNO/NO^- , ионы Fe^{2+} и избыток карнозина, наблюдается линейный рост концентрации карнозиновых ДНКЖ, причём метилглиоксаль дозозависимо увеличивает скорость (стимулирует) образования комплексов (рис. 19). Так как в этом эксперименте спектр ЭПР карнозиновых ДНКЖ не меняется (рис. 18, спектры 2 и 3), можно предположить, что метилглиоксаль либо не вызывает ковалентную модификацию карнозиновых лигандов ДНКЖ, либо реагирует с химической группой, отдаленной от сайта связывания железа.

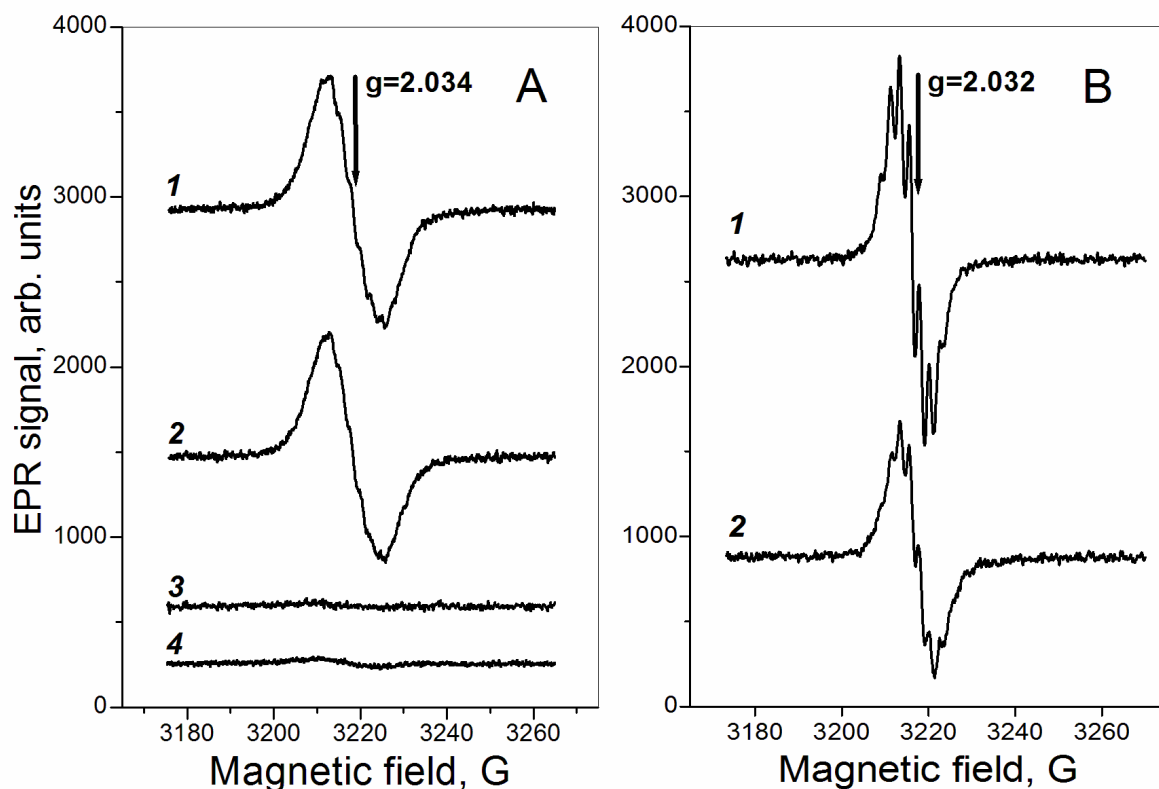


Рис. 17. Образование ДНКЖ, содержащих в качестве лиганда карнозин (А) или фосфат (В) в присутствии донора FeNO-группы и оксида азота. А – ЭПР-спектры, полученные в результате реакции: 1 – 100 мМ карнозина, 4 мМ ДНКЖ с фосфатными лигандами; 2 – тоже что (1) плюс 100 мМ метилглиоксалия; 3 – 100 мМ карнозина, 1 мМ FeSO_4 , 10 мМ PAPA/NONO; 4 – тоже что (3) плюс 100 мМ метилглиоксалия. Все растворы находились в 0,2 М HEPES (pH 7,6). В – реакционная смесь, содержащая К-Na фосфатный буфер (pH 7,6) и 4 мМ ДНКЖ с фосфатными лигандами (1) или 1 мМ FeSO_4 , 10 мМ PAPA/NONO (2). Спектры ЭПР записывали при комнатной температуре (25 °C) после 8 мин инкубации.

Известно, что железо в содержащих имидазол ДНКЖ, связано с атомами азота депротонированного имидазольного кольца [Wang et al., 2005; Tsai et al., 2009]. Кроме

того, в координации ионов железа могут участвовать амино- и карбоксильная группа карнозина. Nobart с соавт. показали, что имидазольные группы гистидина и карнозина стабилизируют аддукты, возникающие в реакции их аминогрупп с гликированными белками [Nobart et al., 2004]. В связи с этим вероятно, что взаимодействие метилглиоксаля с гистидином может влиять на хелатирующие свойства не только аминогруппы, но и близко расположенных карбоксильной и имидазольной групп. В работе [Battah et al., 2002] был идентифицирован один из продуктов реакции метилглиоксаля с карнозином — N-лактоил-карнозин. Этот аддукт образуется в результате присоединения метилглиоксаля к имидазольному кольцу дипептида. Однако подобная модификация карнозинового лиганда должна приводить к изменению ЭПР спектра ДНКЖ.

Предполагают также, что карнозин перехватывает дикарбонильные соединения с образованием димерных продуктов, таких, как перекрестно-сшитые основания Шиффа [Reddy et al., 2005]. Нами показано, что при взаимодействии карнозина и метилглиоксаля образуется продукт с максимумом поглощения при 334 нм (рис. 20), который характерен для азометиновой группы [Yim et al., 1995; Zhou et al., 1999].

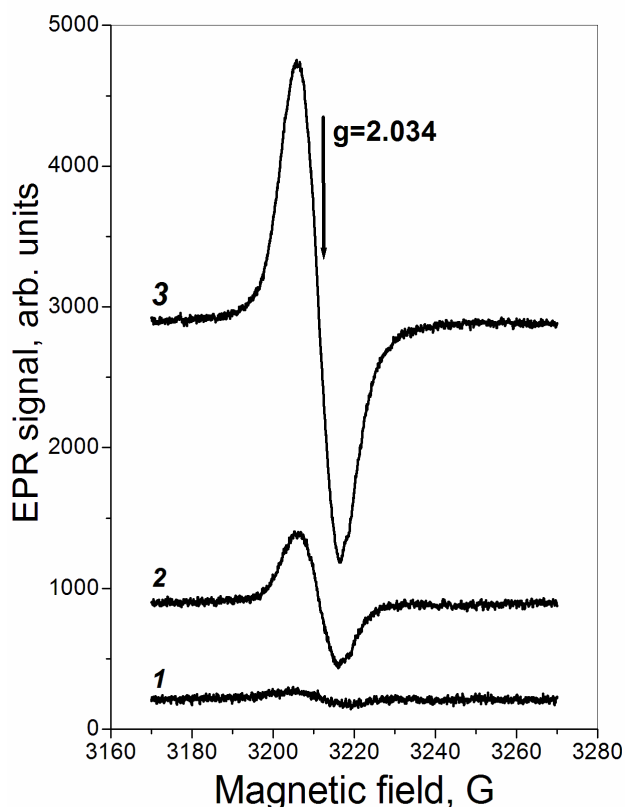


Рис. 18. Образование ДНКЖ с карнозином в качестве лиганда в присутствии соли Ангели. 1 – HEPES (pH 7,6), 1 мМ FeSO₄, 5 мМ соли Ангели; 2 – HEPES (pH 7,6), 100 мМ карнозина, 1 мМ FeSO₄, 5 мМ соли Ангели; 3 – то же, что (2) плюс 250 мМ

метилглиоксала. Спектры ЭПР записывали при комнатной температуре (25 °С) после 8 мин инкубации.

Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что перекрестно-сшитые основания Шиффа, представляющие собой продукт взаимодействия аминокетиминных групп двух молекул карнозина с карбонильными группами метилглиоксала, являются более эффективным лигандом при формировании ДНКЖ, чем индивидуальный карнозин (рис. 21). Действительно, метилглиоксаль не оказывает заметного влияния на образование карнозиновых ДНКЖ в присутствии фосфатных ДНКЖ. В этом случае быстрое формирование связанных с карнозином динитрозильных комплексов железа, по-видимому, обусловлено замещением фосфатных лигандов имидазольной группой дипептида. Более медленный синтез карнозиновых ДНКЖ, происходящий в присутствии HNO/NO^- , но не нейтрального NO , может сопровождаться образованием не детектируемых ЭПР интермедиатов, включающих нитроксильный анион и/или имидазолат-анионы.

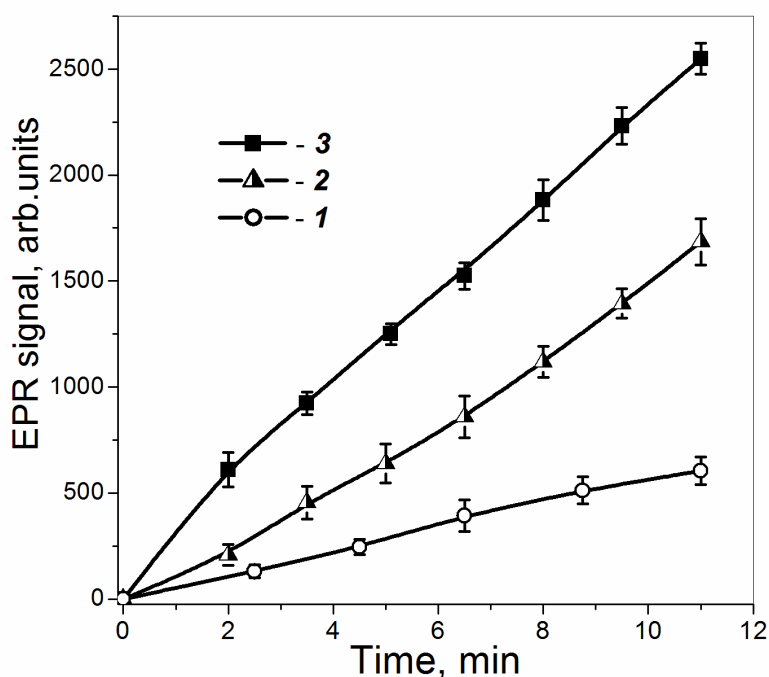


Рис. 19. Влияние метилглиоксала на кинетику образования ДНКЖ с карнозином в качестве лиганда. 1 – HEPES (pH 7,6), 100 мМ карнозина, 1 мМ FeSO_4 , 5 мМ соли Ангели; 2 – то же, что (1) плюс 50 мМ метилглиоксала; 3 – то же, что (1) плюс 100 мМ метилглиоксала.

Необходимо отметить, что в условиях, моделирующих карбонильный стресс и диабетическую гипергликемию, метилглиоксаль вызывает продукцию супероксида и других активных форм кислорода [Yim et al., 1995; Rosca et al., 2005; Kang, 2005; Wu,

2005, Шумаев с соавт., 2009]. Ранее было показано кооперативное антиоксидантное действие тиолсодержащих ДНКЖ и их компонентов [Шумаев с соавт., 2004, 2006; Shumaev et al., 2008b]. Аналогичных свойств можно ожидать и от карнозиновых ДНКЖ, так как и карнозин и оксид азота могут перехватывать свободные радикалы. Поэтому на следующем этапе наших исследований было изучено антиоксидантное действие карнозиновых ДНКЖ в сравнении с их компонентами и продуктами реакции Майяра (рис. 22).

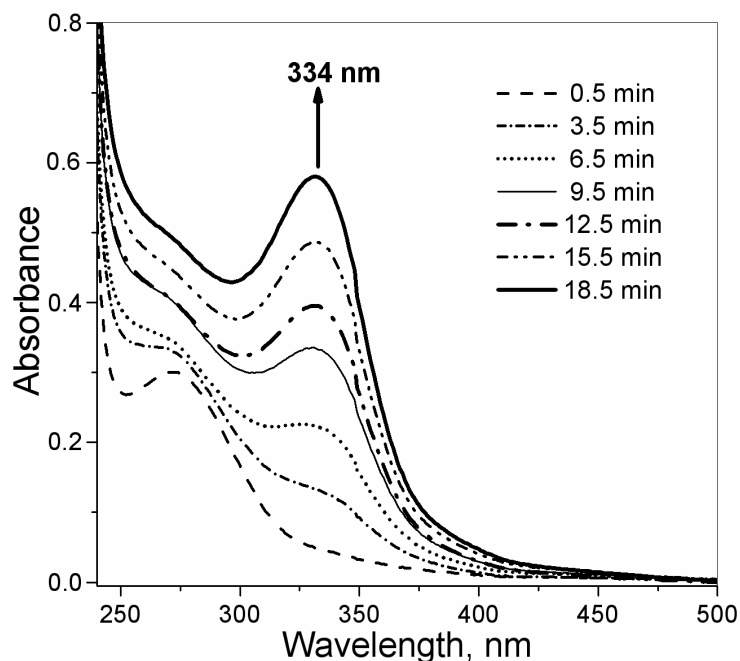


Рис. 20. Кинетика образования продуктов взаимодействия метилглиоксаль и карнозина. Спектры поглощения реакционной среды, содержащей метилглиоксаль (50 мМ) и карнозин (100 мМ) в HEPES буфере (0,2 М) при pH 7,6.

Антиоксидантную активность оценивали по скорости восстановления оксоферрильной формы миоглобина ($\text{Mb}^{\text{IV}}=\text{O}$). Из данных, представленных на рис. 22, видно, что карнозиновые ДНКЖ (рис. 22, столбцы 10 и 11) наряду с фосфатными обладали наибольшей антиоксидантной активностью в данной модельной системе. Антиоксидантное действие карнозиновых ДНКЖ так же, как и других ДНКЖ, отчасти обусловлено их способностью связывать Fe^{2+} . Ионы металлов переменной валентности играют важную роль в модификации и деструкции биополимеров в ходе неферментативного гликирования и гликоокисления [Voziyan et al., 2003; Kang, 2005; Reddy et al., 2005; Goodarzi et al., 2006]. Однако в настоящее время не показана способность карнозина образовывать комплексы с Fe^{2+} и Fe^{3+} [Decker et al., 1992]. С этим фактом, вероятно, связана меньшая эффективность карнозина как антиоксиданта при инициированном ионами железа свободнорадикальном окислении липосом в сравнении с

окислением, инициированным ионами меди, которые эффективно хелатируются карнозином [Baran, 2000; Decker et al., 2000].

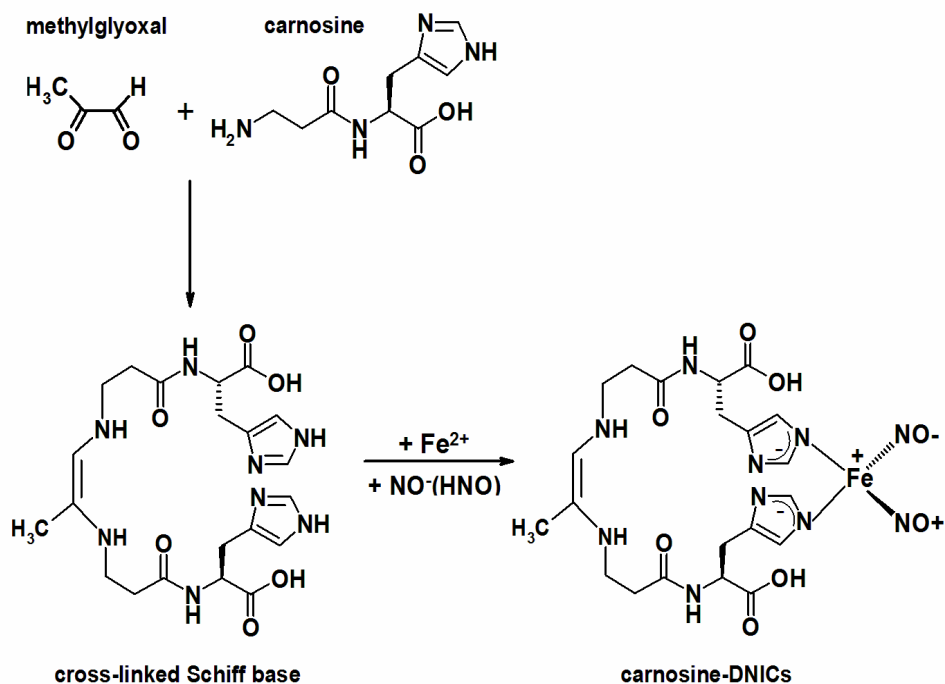


Рис. 21. Схема возможного образования ДНКЖ, связанных с продуктами взаимодействия метилглиоксаля и карнозина.

Антигликирующая активность некоторых соединений также обусловлена их способностью хелатировать ионы редокс-активных металлов [Price et al., 2001; Voziyan et al., 2003]. Поэтому включение ионов железа в карнозиновые ДНКЖ может быть механизмом усиления антиоксидантного и антигликирующего действия карнозина. С этим предположением согласуется эффективное протекторное действие карнозина при нитрозативном стрессе в культуре клеток астроглии [Calabrese et al., 2005; Nicoletti et al., 2007]. Можно предположить, что карнозиновые ДНКЖ играют важную роль в адаптации клеток нервной и мышечной тканей к карбонильному стрессу и окислительному стрессу. Интересно также, что карнозин активирует продукцию оксида азота эндотелиальной NO синтазой [Takahashi, et al., 2009]. С другой стороны, карнозин, связываясь с железом гемовой группы гуанилатциклазы, ингибирует её активацию донорами NO [Северина с соавт., 2000].

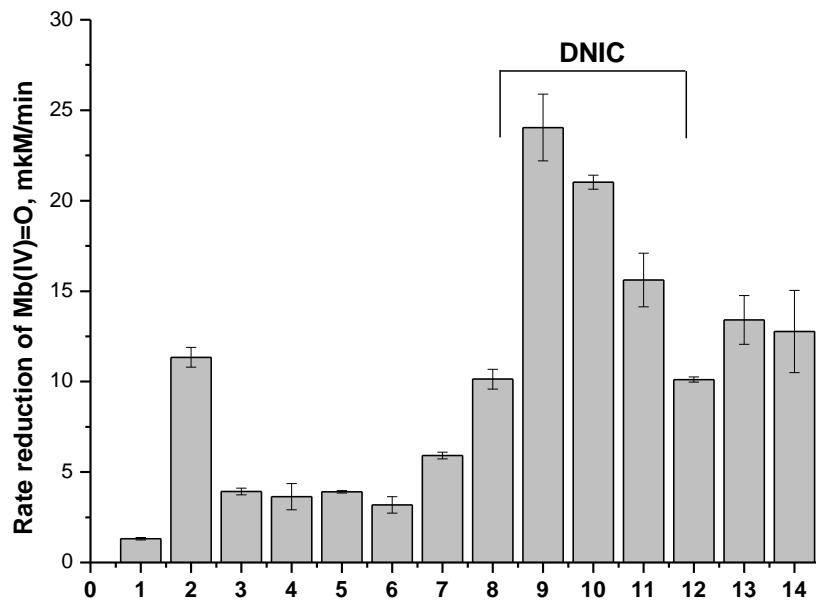
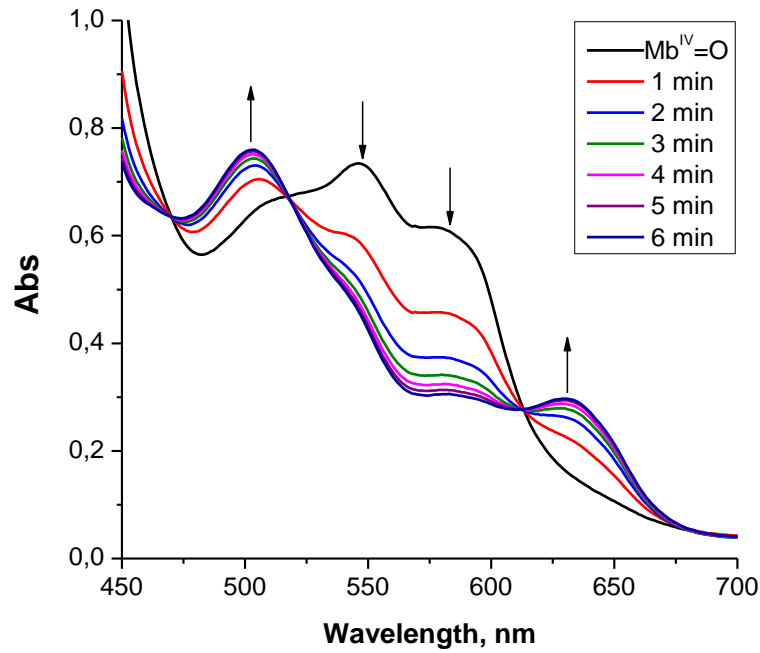


Рис. 22. Спектры поглощения оксоферрильной и частично восстановленного до мет-формы миоглобина (А). Скорость восстановления $Mb^{IV}=O$ до metMb динитрозильными комплексами железа с фосфатными и карнозиновыми лигандами, а также их компонентами (В). 1 – контроль, 2 – GSH, 3 – $FeSO_4$, 4 – $NaNO_2$, 5 – карнозин, 6 – MG, 7 – карнозин + MG, 8 – карнозин + MG + соль Ангели, 9 – ДНКЖ- PO_4^- , 10 – ДНКЖ- PO_4^- + карнозин, 11 – карнозиновые ДНКЖ, 12 – карнозин + MG (24 ч при 20 °С), 13 – продукты распада карнозиновых ДНКЖ и фосфатных ДНКЖ – 14.

В заключении этого раздела отметим, что образование ДНКЖ, связанных с продуктами модификации аминокислот, пептидов и белков метилглиоксалем, можно рассматривать как механизм адаптации к высоким уровням активных карбонильных соединений, накапливающихся в условиях гипергликемии. Нельзя исключить, что эти комплексы также могут участвовать в сигнальных и регуляторных путях NO, а также защищать от окислительного и карбонильного стрессов.

3.2. Нитрозилирование и нитрование гемоглобина в условиях, моделирующих реакцию Майяра

В качестве системы, моделирующей процессы модификации аминокислотных остатков белков активными карбонильными соединениями, мы использовали реакцию метилглиоксаля с *L*-лизином (система Lys-MG). Использование *L*-лизина было обусловлено тем, что эта аминокислота является одной из основных мишеней действия активных карбонильных соединений в белковых молекулах [Bourajja et al., 2003]. Известно, что реакции неферментативного гликирования сопровождаются образованием свободнорадикальных интермедиатов. Механизмы образования свободных радикалов в реакции метилглиоксаля с *L*-аланином и *L*-лизином были подробно исследованы в работах [Thornalley, 1985; Yim et al., 1995]. Было установлено, что в этой реакции образуется катион-радикал шиффовых оснований (диалкилимин), анион-радикал метилглиоксаля (семидион метилглиоксаля) и супероксидный анион-радикал. Диалкилимин представляет собой основание Шиффа, возникающее в процессе взаимодействия карбонильных групп MG с двумя молекулами *L*-лизина [Шумаев с соавт., 2009]. В реакции диалкилимина с ещё одной молекулой α -кетоальдегида образуются, соответственно, катион-радикал основания Шиффа и семидион метилглиоксаля. При одноэлектронном окислении последнего кислородом образуется супероксид.

3.2.1. Взаимодействие нитрозоглутатиона с гемоглобином в присутствии метилглиоксаля

Влияние процессов неферментативного гликирования на метаболизм *S*-нитрозоглутатиона представляет особый интерес, так как с нитрозотиолами связаны многие физиологические функции NO [Angelo et al., 2008]. На рис. 23 представлены кинетические кривые восстановления гемоглобина и нитрозилирования его гемовой группы в используемой модельной системе Lys-MG в микроаэрофильных условиях и в кислородсодержащей среде. В обоих случаях в ходе реакции Майяра происходит восстановление metHb до deoxyHb и нитрозилирование железа гема под действием GSNO

с образованием $\text{HbFe}^{\text{II}}\text{NO}$ (рис. 23). В системе, не содержащей MG и лизин, нитрозилирование было существенно меньшим и составляло $8 \pm 1,2$ и $20 \pm 2,3\%$ в зависимости от содержания кислорода. Эти данные хорошо согласуются с результатами работы [Bastian et al., 2002], в которой показан низкий уровень нитрозилирования metHb под действием свободного оксида азота или GSNO. Известно, что при взаимодействии метгема с NO возникает нестабильный комплекс последнего с Fe^{III} , для формирования стабильного нитрозильного комплекса необходимо восстановление гемового железа [Hughes, 2007].

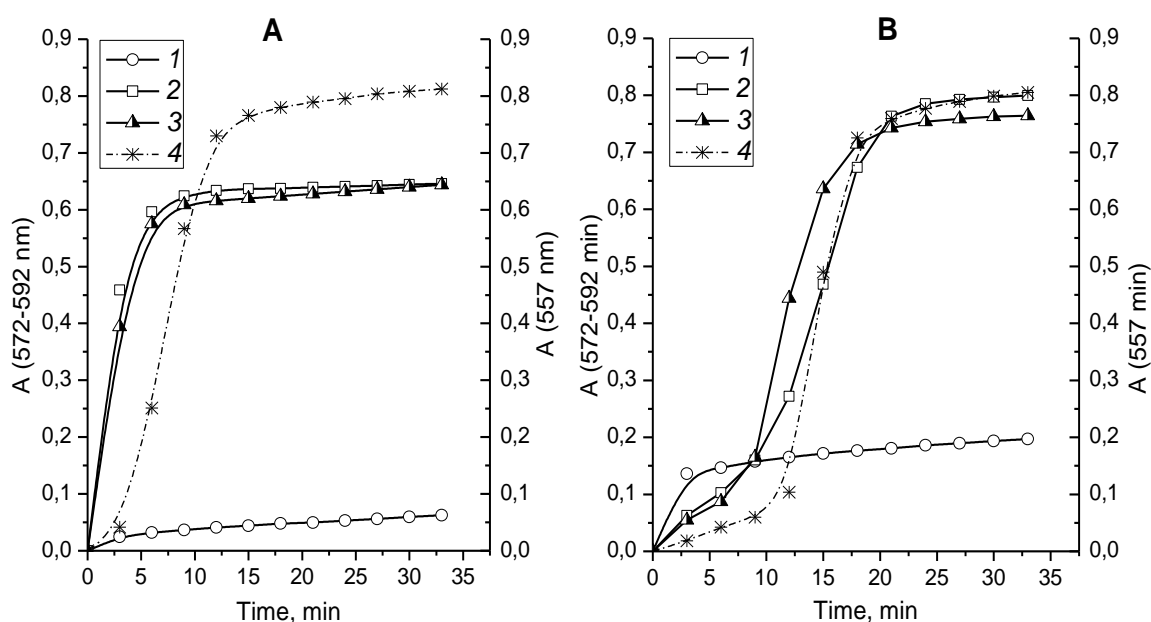


Рис. 23. Кинетики нитрозилирования и восстановления метгемоглобина (метHb) в анаэробных условиях (продувка реакционной смеси аргоном) — А и в кислородсодержащей среде — В. Состав реакционной среды: 0,1 М К,Na-фосфатный буфер (pH 8,5), 0,05 мМ метHb, 3,2 мМ GSNO – (1); то же что и (1) + 40 мМ L-лизина, 40 мМ MG – (2); то же что и (2) + СОД (600 ед/мл) – (3); кинетика восстановления метHb в реакционной среде, содержащей L-лизин и MG – (4).

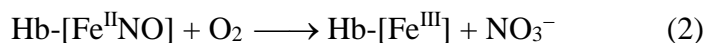
Из представленных на рис. 23 кинетических кривых видно, что в кислородсодержащей среде восстановление metHb в системе Lys-MG происходило с лаг-периодом, который сохранялся и в случае нитрозилирования гемоглобина (рис. 23 В). В анаэробных условиях на кривых восстановления и нитрозилирования лаг-фаза практически отсутствовала (рис. 23 А). Эти данные свидетельствуют о том, что наличие кислорода в системе влияет на скорость и характер восстановления и соответственно

нитрозилирования metHb в первые минуты протекания реакции Майяра. Мы также показали, что спустя 50 мин от начала реакции лизина с метилглиоксалем восстановление и нитрозилирование metHb в кислородсодержащей среде происходило без лаг-фазы. Это указывает на то, что кислород ингибирует процессы восстановления и нитрозилирования только на первой стадии протекания реакции.

Влияние кислорода на ход реакции может быть разнонаправленным. С одной стороны, кислород может окислять образующиеся на начальных стадиях реакции Майяра органические радикалы, анион радикал метилглиоксала и катион радикал диалкилимина. Образующийся при этом супероксид может восстанавливать метилглиоксаль анион до гидроксиацетона. В общем виде реакция может быть представлена таким образом:



С другой стороны, наличие лаг-периода в кинетике образования нитрозилгемоглобина при аэробных условиях можно объяснить тем, что молекулярный кислород окисляет Hb-[Fe^{II}NO] в нитроксилазной реакции (рис. 23, кривая 3) [Angelo et al., 2008]:



Если предположить, что анион-радикал метилглиоксала может восстанавливать metHb, то окисление его кислородом приводит к уменьшению восстановительного потенциала системы. Аналогичный эффект может вызывать оксид азота, который по редокс свойствам близок к O₂. В результате одноэлектронного восстановления оксида азота может образовываться нитроксильный анион (NO⁻), который эффективно нитрозилирует metHb с образованием Hb-[Fe^{II}NO] [Hushes, 2007; Angelo et al., 2008].

Влияние супероксиддисмутазы на кинетику нитрозилирования гемоглобина

Было также изучено влияние супероксиддисмутазы (СОД) на кинетику нитрозилирования метгемоглобина. Было показано, что СОД незначительно уменьшает лаг-период реакции нитрозилирования metHb в системе Lys-MG в кислородсодержащей среде (рис. 23 В, кривая 3) и не влияет в микроаэрофильных условиях (рис. 23 А, кривая 3). Хотя СОД несущественно влияла на ход кривых нитрозилирования metHb в системе Lys-MG, следует отметить тот факт, что в присутствии этого фермента выход Hb-[Fe^{II}NO] был на 4% меньше (сравнивались значения трех независимых экспериментов). Как следует из анализа кривых, представленных на рис. 24, в микроаэрофильных условиях в присутствии СОД происходило нитрозилирование Hb под действием GSNO (рис. 24, кривая 4), в отсутствие СОД образование Hb-[Fe^{II}NO] практически не наблюдалось (рис. 24, кривая 3). В кислородсодержащих условиях происходила незначительная активация

нитрозилирования Hb под влиянием СОД (рис. 24, кривая 2), как и в случае нитрозилирования Hb в системе Lys-MG. Влияние СОД на процесс нитрозилирования гемоглобина в отсутствие свободнорадикальных интермедиатов реакции Майяра можно объяснить способностью этого фермента восстанавливать не только супероксид, но и оксид азота до NO^- [Шумаев с соавт., 2009].

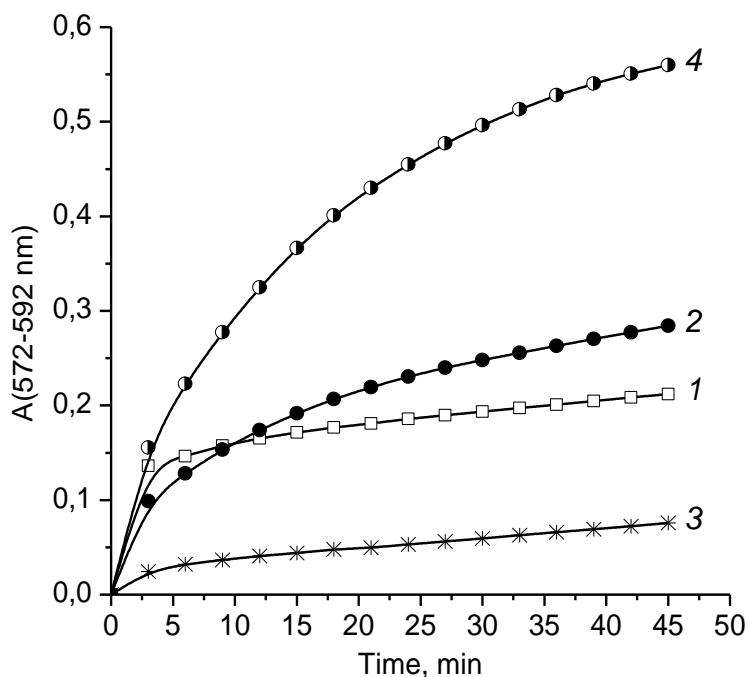


Рис. 24. Нитрозилирование метгемоглобина под действием GSNO в кислородсодержащей среде – 1 и в микроаэрофильных условиях 2, а также в системе, содержащей кроме GSNO супероксиддисмутазу (600 ед/мл) в кислородсодержащей среде – 2 и микроаэрофильных условиях – 4. Среда инкубации содержала 0,1 М К,Na-фосфатный буфер (pH 8,5) и 3,2 мМ GSNO.

Изучение влияния кислорода на восстановительные свойства реакции лизина с метилглиоксалем

Поскольку реакция Майяра в аэробных условиях, сопровождается генерацией $\text{O}_2^{\cdot-}$, нами было изучено влияние кислорода на восстановительные свойства системы Lys-MG, которые оценивали по восстановлению дифенилтетразолий бромид (МТТ). Известно, что при восстановлении МТТ образуются окрашенные продукты — формазаны, накопление которых служит индикатором образования супероксида. Однако в исследуемой системе мы наблюдали восстановление МТТ и в микроаэрофильных условиях. Причем начальная скорость восстановления МТТ в среде с низким содержанием кислорода была в 2 раза выше по сравнению с кислородсодержащей средой (табл. 7). На рис. 25 приведена

динамика изменения скорости восстановления МТТ в зависимости от времени инкубации реакционной системы Lys-MG. Видно, что в присутствии кислорода образование формазанов происходило с лаг-периодом в то время как в анаэробных условиях лаг-период отсутствовал. Анализируя полученные результаты, можно сделать вывод, что и кислород и GSNO приводят к снижению скорости восстановления МТТ интермедиатами реакции (рис. 25, кривая 2 и 3). Кислород ингибирует восстановление в первые 20 минут протекания реакции, а S-нитрозоглутатион начинает оказывать влияние спустя 10 мин от начала реакции. Мы считаем, что этот факт служит подтверждением того, что кислород, окисляя семидион метилглиоксаля и диалкилимин основания Шиффа, снижает уровень восстановительных эквивалентов. Однако добавление супероксиддисмутазы (СОД) в реакционную систему способствовало увеличению скорости восстановления МТТ (рис. 25, кривая 2; табл. 7.).

Табл. 7. Начальные скорости восстановления МТТ в реакционной системе, содержащей 0,1 М К,Na-фосфатный буфер (рН 8,5), 0,625 мМ МТТ, 40 мМ L-лизина и 40 мМ метилглиоксаля, 3,2 мМ GS-NO и СОД (600 ед/мл).

	Кислородсодержащая среда	В присутствии СОД	Микроаэрофильные условия
Lys+MG	0,176	0,250	0,415
Lys+MG+GSNO	0,203	0,225	0,392
GSNO	0,034	—	0,019

Также было исследовано влияние на процесс восстановления МТТ синтетического донора оксида азота DETA/NO. Следует отметить, что DETA/NO незначительно увеличивал скорость восстановления МТТ в системе Lys-MG (рис. 25, кривая 4). Однако сам по себе DETA/NO не восстанавливал МТТ. Это согласуется с тем фактом, что DETA/NO незначительно влияет на выход свободнорадикальных интермедиатов реакции лизина с метилглиоксалем [Шумаев с соавт., 2009].

Наблюдавшееся в экспериментах восстановление МТТ в анаэробных условиях показывает, что этот процесс обусловлен не только супероксидом, но и другими свободнорадикальными интермедиатами реакции лизина с MG. По данным работы [Шумаев с соавт., 2009] в условиях аэрации реакционной смеси были зарегистрированы следовые количества свободнорадикальных интермедиатов. Следовательно, кислород выступает в качестве фактора, ингибирующего образование свободнорадикальных продуктов.

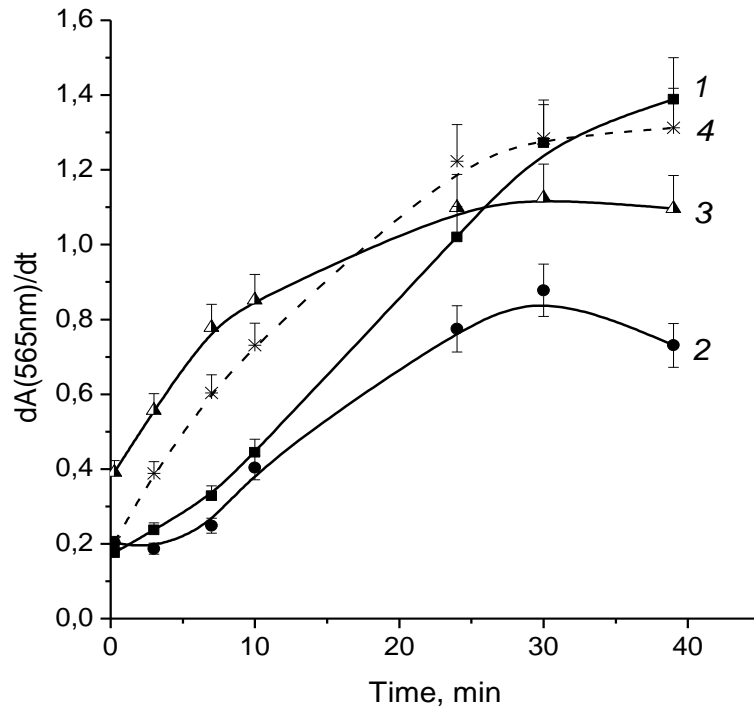


Рис 25. Начальные скорости восстановления МТТ при разном времени инкубации реакционной смеси, содержащей 0,1 М K_2Na -фосфатный буфер (pH 8,5), 0,625 мМ МТТ, 40 мМ *L*-лизина и 40 мМ MG – 1; 2 – то же, что и (1) + 3,2 мМ GSNO; 3 – то же, что и (2) в микроаэрофильных условиях; 4 – то же, что и (1) + 3,5 мМ DETA/NO.

Вызываемый СОД эффект может быть связан с удалением супероксида, продуцируемого в исследуемой модельной системе [Phillips, Thornalley, 1993; Lee et al., 1998; Suji, Sivakami, 2007]. Как было показано в работе [Шумаев с соавт., 2009], в этих условиях СОД элиминирует супероксид, а также снижает скорость падения интенсивности сигнала ЭПР при смене продувки реакционной среды азотом на аэрацию. Следовательно, СОД позволяет увеличить выход свободнорадикальных производных метилглиоксаля и диалкилимина, являющихся потенциальными восстановителями МТТ, а также, вероятно, NO и metHb. Это предположение подтверждают установленные нами факты увеличения скорости восстановления МТТ в микроаэрофильных условиях в присутствии СОД (табл. 7).

Продукты распада GSNO также способны восстанавливать МТТ (табл. 7). Следовательно, мы предполагаем, что незначительное повышение скорости восстановления МТТ в первые минуты реакции (лаг-период) в системе Lys-MG-GSNO обусловлено вкладом продуктов распада *S*-нитрозоглутатиона в процесс восстановления.

Поэтому мы исследовали процесс распада *S*-нитрозоглутатиона в К,Na-фосфатном буфере и в системе Lys-MG. Как видно из кривых, представленных на рис. 26, распад GSNO происходит в различных случаях с разной скоростью. Однако в системе Lys-MG в кислородсодержащей среде на кривой деструкции GSNO наблюдался лаг-период, как и на кривых восстановления и нитрозилирования гемоглобина (рис. 26, кривая 3). Этот факт, по-видимому, указывает на взаимодействие *S*-нитрозоглутатиона не только с $O_2^{\cdot-}$, но и другими продуктами реакции Майяра. Следует отметить, что в литературе описывается несколько механизмов взаимодействия нитрозоглутатиона с $O_2^{\cdot-}$ [Trujillo et al., 1998]. Основными продуктами этого взаимодействия является нитроксильный анион и пероксинитрит:

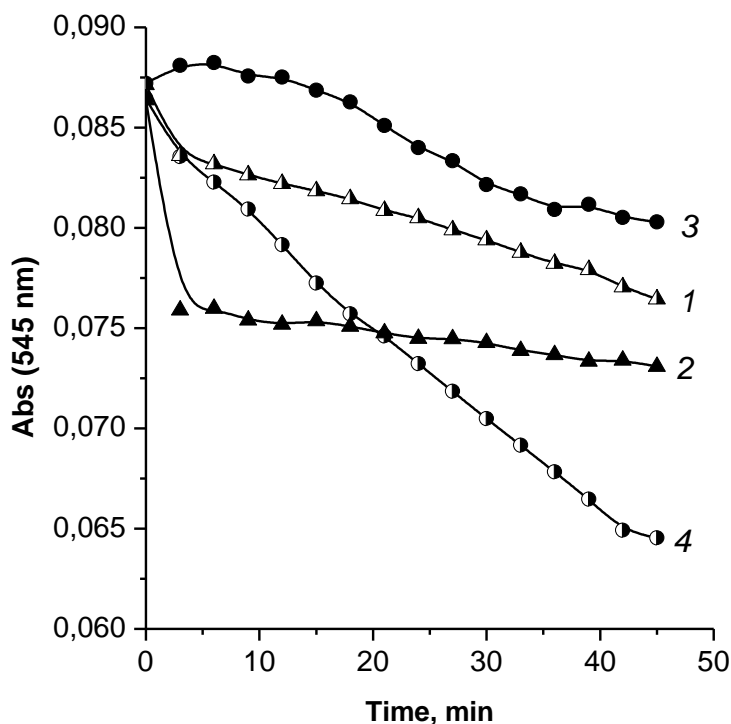


Рис. 26. Кинетика деструкции *S*-нитрозоглутатиона. Реакционная смесь содержала 3,2 мМ GSNO в 0,1 М К,Na-фосфатном буфере (pH 8,5) (1 и 2); (3 и 4) — то же, что и (1 и 2) + 40 мМ *L*-лизина, 40 мМ метилглиоксаля. Кривые (1) и (4) показывают деструкцию GSNO в анаэробных условиях.

Реакция 6 является диффузионно-контролируемой ($k = 4,3-9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [Huie, Padmaja, 1993; Griffiths, 2005]. В связи с этим в аэробных условиях на первой стадии реакции Майяра большая часть оксида азота может превращаться в пероксинитрит (ONOO^-), вследствие чего ингибируется нитрозилирование метHb. Стоит отметить, что образование пероксинитрита возможно и при взаимодействии NO^- с молекулярным кислородом, однако скорость этой реакции сравнительно невелика ($k = 1,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [Hughes, 2007]:



Нельзя исключить, что нитроксильный анион может образовываться и при одноэлектронном восстановлении NO семидином метилглиоксаля. Затем нитроксильный анион, как и супероксид анион радикал, может восстанавливать семидион метилглиоксаля до гидроксиацетона.

Первым продуктом реакции NO с кислородом является диоксид азота (NO_2^\bullet), который в водных растворах взаимодействует с NO с образованием N_2O_3 [Hughes, 2007]. В работе [Jourdeuil et al., 2001] показано, что примерно 35% протонированного пероксинитрита (ONOOH) распадается с образованием NO_2^\bullet и OH^\bullet . Поскольку оксиды NO_2^\bullet и N_2O_3 являются эффективным нитрозилирующими агентами, то они могут вступать в реакцию с гемоглобином и основанием Шиффа с образованием нитрозаминов и нитрованных аминокислот (тирозина, триптофана, метионина) [Herold, 2003; Chen et al., 2008]. Однако в исследуемой системе образование пероксинитрита не наблюдалось. Кинетика восстановления дигидрородамина интермедиатами реакционной системы Lys-MG-GSNO представляет собой суперпозицию кинетик восстановления компонентами системы Lys-MG и нитрозоглутатионом (рис. 27).

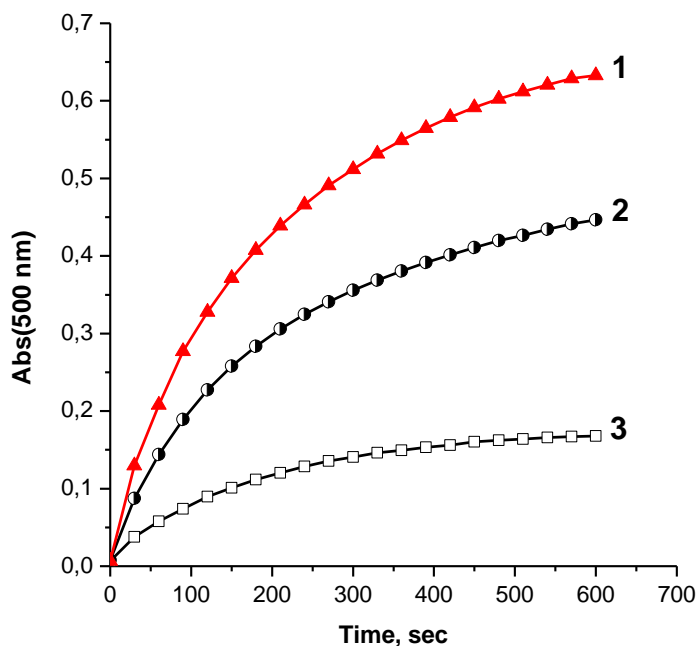
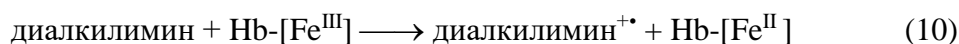


Рис. 27. Восстановление дигидроамина компонентами системы Lys-MG-GSNO – 1, Lys-MG – 2 и GSNO – 3.

Образование своднорадикальных интермедиатов в реакции лизина с метилглиоксалем: влияние GSNO, metHb и NO⁻

На рис. 28 приведены результаты ЭПР-спектроскопии продуктов реакции лизина с метилглиоксалем. Поскольку молекулярный кислород резко снижает концентрацию свободных радикалов метилглиоксала и шиффовых оснований, регистрацию этих радикалов проводили в анаэробных условиях (рис. 28 В). Спектры ЭПР этих свободнорадикальных интермедиатов характеризуются многокомпонентной сверхтонкой структурой и являются суперпозицией спектров катион-радикала диалкилимину и анион-радикала метилглиоксала [Lee et al., 1998]. В наших экспериментах выход органических свободных радикалов, образующихся в системе Lys-MG, увеличивался под действием S-нитрозоглутатиона и метгемоглобина (рис. 28, кривые 2 и 3).

Вероятно, GSNO, оксид азота и metHb окисляют основание Шиффа (диалкилимину L-лизина с метилглиоксалем) до катион-радикала, восстанавливаясь при этом до анион-радикала GSNO, нитроксильного аниона (NO⁻) и дезоксигемоглобина соответственно, в следующих реакциях:



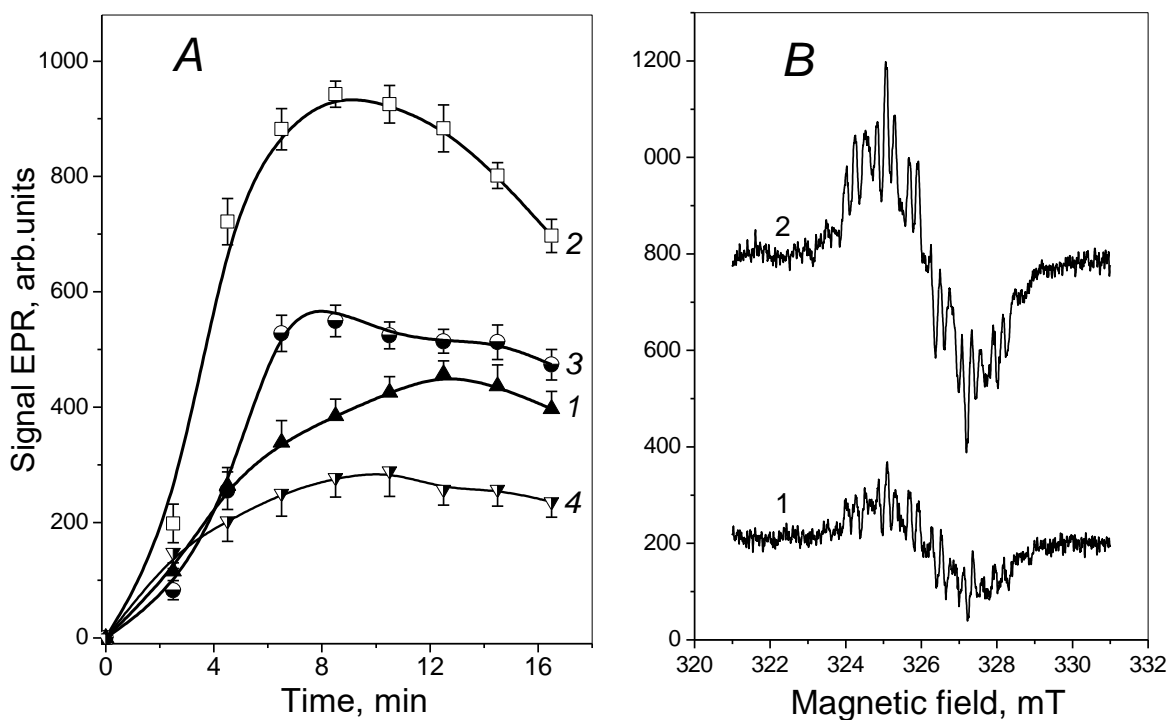
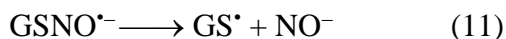


Рис. 28. Влияние GSNO, метHb и нитроксильного аниона на образование семидиона метилглиоксала и катион радикала диалкилимина в реакции лизина и метилглиоксала. А: кинетики образования свободнорадикальных продуктов в реакционной смеси, содержащей лизин и МG в концентрации 100 мМ – 1; в той же смеси в присутствии 3,2 мМ GSNO – 2, 0,2 мМ метHb – 3 и 4 мМ соли Ангели – 4. В: суперпозиция спектров ЭПР органических свободных радикалов в среде с МG и лизином – 1, то же в присутствии GSNO – 2. Спектры регистрировали в условиях продувки азотом через 6 мин инкубации реакционной смеси при комнатной температуре.

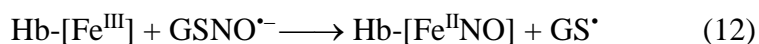
В то же время можно предположить, что $GSNO^{\cdot-}$ и нитроксильный анион восстанавливают МG до семидиона. Однако было показано, что нитроксильный анион, ингибирует образование регистрируемых ЭПР свободных радикалов в реакции лизина с метилглиоксалем (рис. 28 А, кривая 4). Из этого следует, что нитроксильный анион вряд ли может взаимодействовать с метилглиоксалем. Кроме того, возможно, что избыток NO^- смещает равновесие в реакции 9 в сторону образования диалкилимина. Следует отметить и тот факт, что NO^- может образовываться и при гомолизе анион-радикала GSNO:



Исходя из полученных результатов, можно предположить, что редокс-активные продукты реакции Майяра могут взаимодействовать с метаболитами оксида азота. Причем стимулирование образования свободных радикалов шиффовых оснований и

метилглиоксаля и ингибирование процесса восстановления МТТ, вероятно, обусловлено исключительно редокс-активными производными *S*-нитрозотиолов, поскольку доноры NO и NO⁻ оказывали несущественное влияние на эти процессы. Мы считаем, что протекание исследованной реакции связано с образованием анион-радикала GSNO, который, по-видимому, является медиатором одноэлектронного окисления диалкилимина семидионом метилглиоксаля.

Мы предполагаем, что за восстановление и нитрозилирование metHb ответственны свободно радикальные интермедиаты реакции Майяра. Например, известно, что феррицитохром *c* окисляет модифицированный метилглиоксалем альбумин с образованием связанного с белком катион-радикала основания Шиффа [Lee et al., 1998]. Помимо нитрозилирования metHb нитроксильным анионом [Bastian et al., 2002; Hughes, 2007], нельзя исключить возможность одновременного восстановления и нитрозилирования metHb в реакции с GSNO^{•-}:



Следует обратить внимание на то, что кривые нитрозилирования metHb *S*-нитрозоглутатионом в системе Lys-MG смещены влево, что указывает на образование в этой системе неких интермедиатов GSNO, которые служат восстановительными и нитрозилирующими агентами для metHb (рис. 23). На взаимодействие metHb с редокс-активными производными GSNO указывает и тот факт, что в исследуемой системе, содержащей также metHb, уровень свободнорадикальных интермедиатов увеличивается в меньшей степени, чем в среде без метгемоглобина (рис. 28, кривые 2 и 3).

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что основания Шиффа и другие редокс-активные продукты реакции Майяра могут существенно влиять на метаболизм *S*-нитрозотиолов в условиях карбонильного стресса. Мы предполагаем, что эти редокс-активные соединения вызывают распад GSNO и восстановление метгемоглобина, в результате чего происходит нитрозилирование железа гемовой группы. Редокс-активные производные GSNO могут выступать в роли медиатора одноэлектронного окисления диалкилимина метилглиоксалем. Возможно, что в качестве такого медиатора функционируют анион-радикалы *S*-нитрозотиолов [Manoj et al., 2006]. Влияние процессов неферментативного гликирования на метаболизм *S*-нитрозоглутатиона, в том числе возможное образование GSNO^{•-}, представляет особый интерес, так как с *S*-нитрозотиолами связаны многие физиологические функции оксида азота [Angelo et al., 2008]. Следует отметить, что образование анион-радикалов *S*-нитрозотиолов было зафиксировано при одноэлектронном восстановлении GSNO в ходе

радиолиза воды [Manoj, et al., 2006] и фотоиндуцированном распаде содержащих тиолы нитрозильных комплексов железа [Wang et al., 2002].

Из вышеизложенного следует, что *S*-нитрозотиолы могут играть регуляторную и протекторную роль в условиях карбонильного стресса. Полученные экспериментальные данные позволяют лучше понять роль оксида азота и его метаболитов в процессах модификации биологических макромолекул активными карбонильными соединениями, образование которых часто сопровождается усилением свободнорадикальных процессов в клетках и тканях.

3.2.2. Образование нитригемоглобина в системе, содержащей метилглиоксаль

В наших исследованиях совместное действие GSNO и метилглиоксала на metHb приводило к возникновению «зеленой» формы гемоглобина. В работе [Otsuka et al., 2010] показано, что «зеленый» гемоглобин образуется в реакции взаимодействия metHb с нитритом в кислородсодержащей среде. При этом в результате ковалентной модификации винильной группы порфирина metHb превращается в нитриметгемоглобин. В работе было показано [Bondoc, Timkovich, 1989], что нитрование порфирина происходит с выходом 94% в простой реакции электрофильного замещения при взаимодействии метмиоглобина со 100-кратным избытком нитрита при pH 5,5. Некоторые свойства (щелочные переходы ферри-форм и условия связывания кислорода с ферро-формами) нитригемоглобина практически не отличались от обычного гемоглобина [Bondoc, Timkovich, 1989; Otsuka et al., 2010]. Известно, что нитри-metHb образует с щелочным раствором пиридина гемохромоген, характеризующийся полосами поглощения при 522, 553 и 582 нм [Otsuka et al., 2010]. Из представленных на рис. 29 А данных видно, что возникающий в используемой нами модельной системе модифицированный зеленый metHb также образует аналогичный гемохромоген. Спектр оптического поглощения реакционной смеси, содержащей нитриметгемоглобин, приведен на рис. 29 А (вставка). Наиболее высокий уровень нитриметгемоглобина зафиксирован после 24 часов инкубации metHb в аэробных условиях в среде, содержащей GSNO и метилглиоксаль (рис. 29 В, кривая 1). При дальнейшей инкубации содержание нитриметгемоглобина в реакционной смеси постепенно снижается. Замена GSNO нитритом приводит к снижению скорости нитрования гемоглобина (рис. 30 В, кривые 3 и 4).

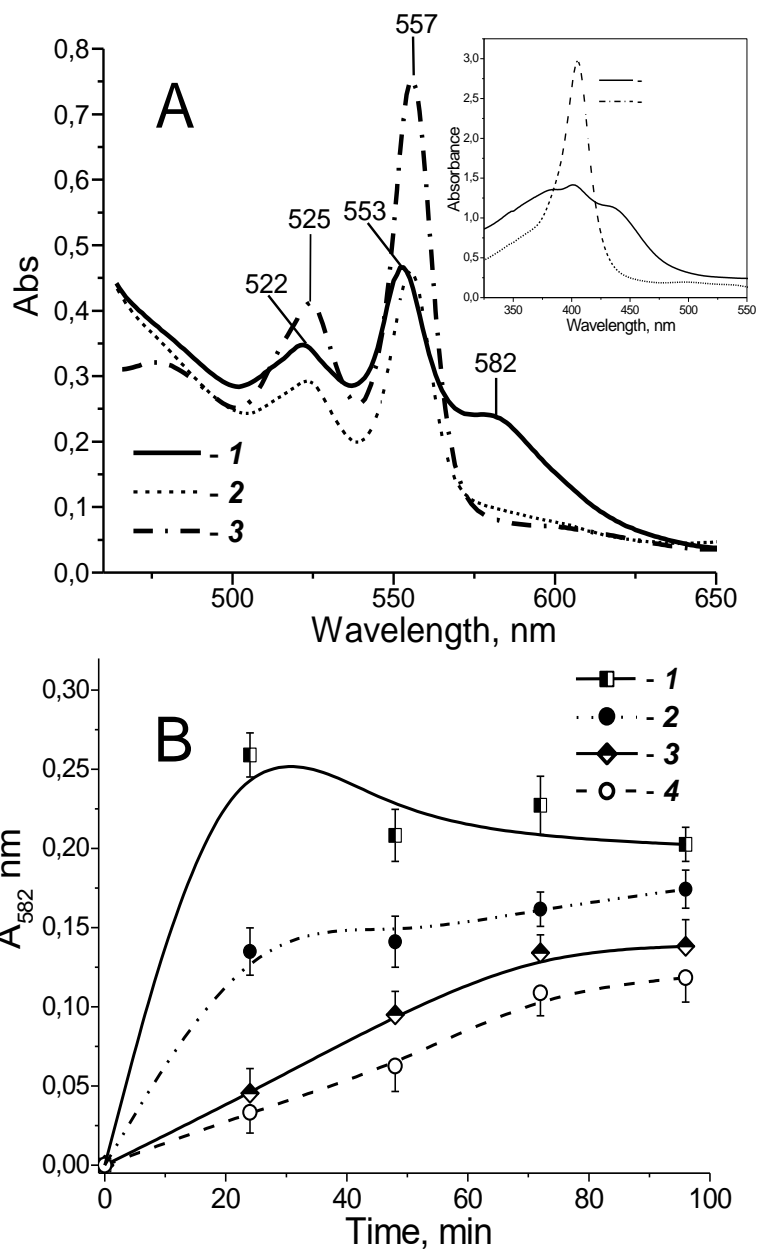


Рис. 29. Образование нитригемоглобина в системе MG+GSNO+metHb (A) Спектры поглощения нитриHb – 1, гемоглобина – 2, 3 в щелочном растворе пиридина. Состав реакционной среды: metHb инкубированный 24 часа в аэробных условиях в 25 мМ К-фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 20 мМ MG и 5 мМ GSNO – 1; 2 – то же что и (1) + 1200 Ед/мл СОД; (3) – metHb в среде без метилглиоксаля и GSNO. На вставке представлены спектры оптического поглощения metHb (пунктирная линия) и metHb после 24 часов инкубации с MG и GSNO (сплошная линия). **(B)** Кинетика образования нитриHb (оценивались по полосе поглощения при 582 нм) в системах, содержавших: 1 – metHb, 20 мМ MG и 5 мМ GSNO в 25 мМ К-фосфатного буфере, pH 7,4, аэробная инкубация; 2 – то же, что и (1), но инкубация в микроаэрофильных условиях; (3) то же что (1), но вместо GSNO добавлен 5 мМ нитрит натрия; (4) то же что (3), но инкубация в микроаэрофильных условиях. Концентрация metHb во всех модельных системах составляла 0,3 мМ.

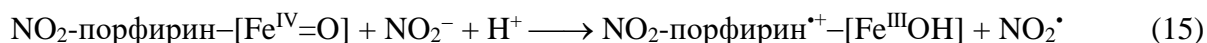
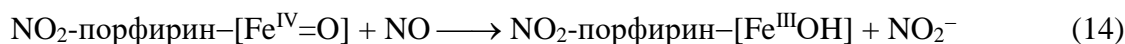
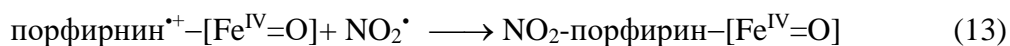
В литературе содержатся указания на образование нитригемоглобина в условиях 100-кратного избытка нитрита натрия при слабокислых значениях $\text{pH}=5,5$ [Bondoc, Timkovich, 1989], $\text{pH} = 5,7$ [Otsuka et al., 2010]. В наших исследованиях нитрование порфирина происходило при 18-кратном избытке доноров оксида азота (GSNO или NO_2^-) и в присутствии существенного избытка метилглиоксаля ($\text{Hb} : \text{MG} = 1 : 65$) при начальном значении pH реакционной смеси 6,9. Существенно, что в отсутствие метилглиоксаля как GSNO, так и нитрит не вызывали превращения metHb в нитригемоглобин.

Авторы уже упомянутой работы [Otsuka et al., 2010] предполагают, что модификация metHb происходит с участием комплекса нитрита с железом гема и таких нитрующих агентов, как N_2O_3 и N_2O_5 . С данными Otsuka с соавт. согласуется тот факт, что в наших экспериментах выход нитриметгемоглобина снижается при низкой концентрации кислорода (Рис. 29 В, кривая 2). Формирование в этих условиях нитригемоглобина может быть связано с анаэробной генерацией N_2O_3 [Otsuka et al., 2010]. Ранее было установлено, что в реакциях аминогрупп аминокислот и белков с метилглиоксалем молекулярный кислород восстанавливается до $\text{O}_2^{\cdot-}$ анион-радикалом метилглиоксаля, который, в свою очередь, образуется при взаимодействии метилглиоксаля с продуктами реакции Майяра [Yim et al., 1995; Yim et al., 2001; Шумаев с соавт., 2009]. Также показано образование супероксида при автоокислении гликированного миоглобина [Roy et al., 2004]. Таким образом, вероятно, что $\text{O}_2^{\cdot-}$ генерируется и при взаимодействии метилглиоксаля с гемоглобином. В связи с этим было изучено влияние СОД на образование нитриметгемоглобина. Добавление СОД в реакционную систему ингибирует формирование нитриметгемоглобина под действием GSNO и метилглиоксаля (рис. 29 А, кривая 2). Основными продуктами реакций $\text{O}_2^{\cdot-}$ с оксидом азота и GSNO являются NO^- и ONOO^- [Trujillo et al., 1998] (реакции 3-7).

Хорошо известно, что пероксинитрит и возникающий при его распаде диоксид азота (NO_2^{\cdot}) участвуют в нитровании многих биологических молекул [Lushinger et al., 2003; Romero et al., 2003; Pietraforte et al., 2003; Schopfer et al., 2009; Augusto et al., 2002; Goldstein, Merenyi, 2008]. Поэтому действие СОД может быть обусловлено ингибированием образования активных нитрующих агентов (ONOO^- и NO_2^{\cdot}) в результате элиминации $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Тем не менее, для эффективного нитрования полиненасыщенных жирных кислот и остатков тирозина необходимо взаимодействие свободных радикалов этих соединений с NO_2^{\cdot} [Augusto et al., 2002; Goldstein, Merenyi, 2008]. Действительно, модификацию гемоглобина вызывают интермедиаты, образующиеся в реакции ONOO^- с железом гема [Romero et al., 2003; Pietraforte et al., 2003]. Такими интермедиатами могут быть: комплекс

гема с пероксинитритом и NO_2^\bullet и катион-радикал порфирина оксоферрильной формы гема (порфирин $^{*+}$ -[Fe $^{\text{IV}}$ =O]) [Lushinger et al., 2003; Romero et al., 2003; Pietraforte et al., 2003; Schopfer et al., 2009]. Известно также, что оксоферрилгемоглобин (порфирин-Fe $^{\text{III}}$ OH) окисляет NO до нитрита, а последний, в свою очередь, до NO_2^\bullet [Herold et al., 2003]. Поэтому мы предположили, что предшественником нитриHb является оксоферрильная форма этого белка. Вероятно, в исследуемой нами модельной системе нитригемоглобин образуется в следующих реакциях:



Это предположение согласуется с тем, что в работе [Nicolis et al., 2007] обнаружено образование нитринейроглобина в системе, содержащей NO_2^- и пероксид водорода. В этих условиях формирование оксоферрильной формы нейроглобина происходит при взаимодействии гемопротеида с H_2O_2 .

Согласно [Fernandez et al., 2003] источником NO_2^\bullet может быть реакция окисления нитрита не только феррильной, но и ферриформой гема. При этом NO_2^- катализирует восстановительное нитрозилирование ферриформ гемопротеидов.

Из спектров ЭПР, представленных на рис. 30 А, видно, что в аэробных условиях наблюдается незначительное нитрозилирование гемового железа (не более ~10%) в течение 48 часов инкубации гемоглобина с GSNO и метилглиоксалем. При более длительной инкубации сигнал ЭПР нитрозилированного гемоглобина (Hb-[Fe $^{\text{II}}$ NO]) исчезает, что может быть обусловлено реакцией окислительного денитрозилирования Hb-[Fe $^{\text{II}}$ NO]. Кроме того, в элиминации свободного или связанного с гемом NO должен участвовать O_2^- , продуцируемый в ходе реакции Майяра. В микроаэрофильных условиях в исследуемой реакционной системе metHb нитрозилируется существенно эффективней (рис. 30 В). Зарегистрированный после 24 часов инкубации уровень Hb-[Fe $^{\text{II}}$ NO] увеличивается на порядок к 48 часам и достигает максимума к 72 часам. Изменения в форме спектров ЭПР отражают динамику нитрозилирования различных субъединиц гемоглобина. Исходя из данных работ [Gow et al., 1999; Gladwin et al., 2009], мы полагаем, что регистрируемые спектры преимущественно являются суперпозицией сигналов ЭПР полностью нитрозилированного тетрамера гемоглобина с шестикоординированными гемами α - и β -субъединиц и нитрозилированной формы пятикоординированного гема α -субъединицы. Для спектра ЭПР нитрозилированной формы пентакоординированного гема характерна сверхтонкая триплетная структура

(^{14}N triplet ^{14}N hyperfine structures) с $g=2,009$, которая возникает благодаря разрыву связи между железом гема и проксимальным гистидином α -субъединицы.

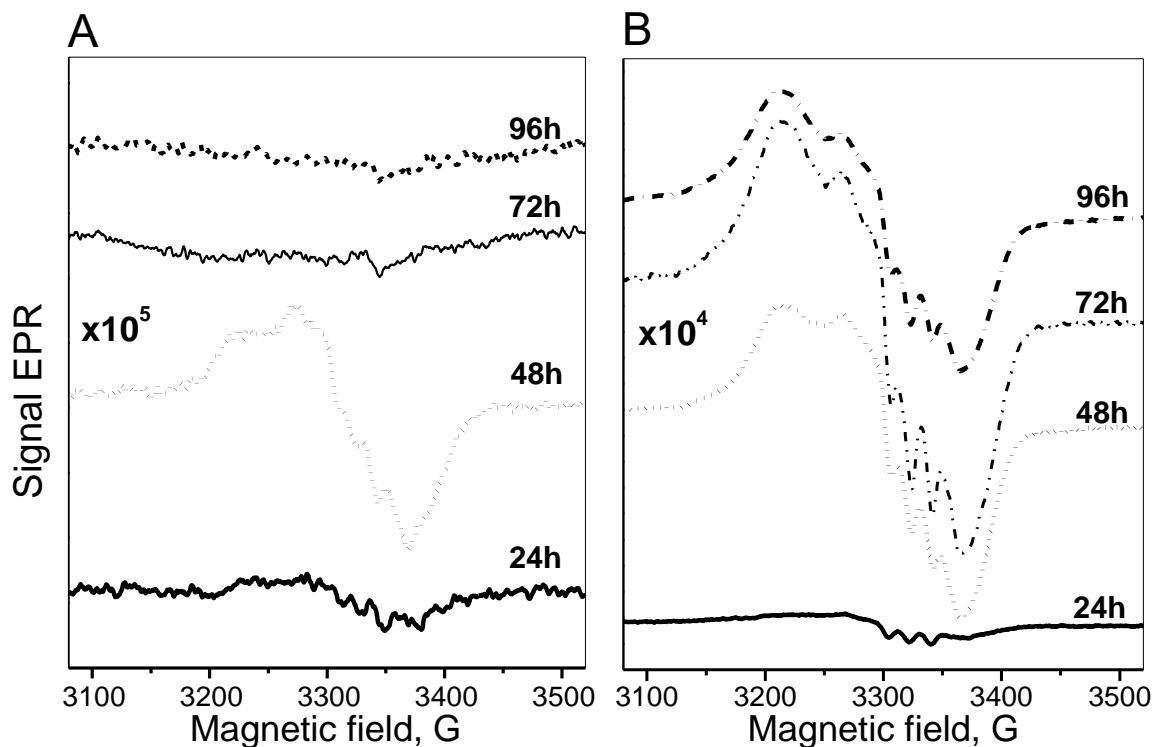


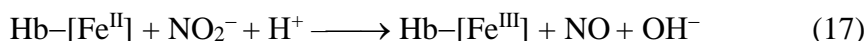
Рис. 30. Спектры ЭПР нитрозильных комплексов железа гемоглобина быка. $\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}]$ получали в результате инкубации metHb с GSNO и метилглиоксалем в аэробных (A) и микроаэрофильных условиях (B). Условия регистрации: СВ-частота 9,33 ГГц, СВЧ мощность 10 мВт; частота модуляции 100 кГц; амплитуда модуляции 8 Гс, усиление: 10^5 (A) или 10^4 (B); температура регистрации 80 К. Состав реакционной среды приведен в подписи к рис. 29.

В то же время в зарегистрированных нами спектрах присутствуют ромбическая и аксиальные компоненты, характерные для сигналов ЭПР гексакоординированных нитрозилированных гемовых групп гемоглобина [Gow et. al., 1999; Gladwin et. al., 2009]. Известно, что при температуре жидкого азота нитрозилированные гемы α -субъединиц обладают ромбической, а β -субъединицы аксиальной симметрией [Gow et. al., 1999; Gladwin et. al., 2009]. Кроме того, в микроаэрофильных условиях эффективное нитрозилирование metHb происходило в системе, содержащей либо один GSNO, либо сочетание нитрита с метилглиоксалем (рис. 31). В присутствии GSNO, выступающего в качестве донора оксида азота, может происходить восстановительное нитрозилирование metHb в соответствии с реакцией [Gladwin et. al., 2009]:



Luchsingер с соавт. показали, что в этой реакции важную роль играет SH-группа цистеина β -субъединицы гемоглобина [Lushinger et al., 2003]. Интересно, что MG взаимодействует с остатками цистеина белков с образованием гемитиоацеталей [Lo et al., 1994]. Такая модификация белковой части гемоглобина может быть причиной более медленного накопления $\text{Hb-[Fe}^{\text{II}}\text{NO]}$ в присутствии метилглиоксаля и GSNO, по сравнению с системой, содержащей только GSNO (рис. 30). Действительно, блокирование сульфгидрильной группы β -субъединицы гемитиоацеталем должно ингибировать нитрозилирование гема этой субъединицы, а также формирование связанного с гемоглобином *S*-нитрозотиола. Существенно, что это предположение согласуется с данными спектроскопии ЭПР (рис. 30 В), а именно с возникновением популяции гемоглобина, нитрозилированного только по α -субъединице. С другой стороны, интермедиаты реакции Майяра могут предотвращать нитрозилирование гема, перехватывая NO [Asahi et al., 2000; Bucala et al., 1991].

В течение 24 часов инкубации metHb в присутствии NO_2^- и MG гемоглобин нитрозилируется приблизительно на 50%. При дальнейшей инкубации уровень нитрозилирования достигает 90% (рис. 20, белые столбцы). Тем не менее, в отсутствие метилглиоксаля нитрит не приводит к нитрозилированию metHb (рис. 31, черные столбцы). Следует отметить, что при инкубации гемоглобина только с метилглиоксалем в микроаэрофильных условиях происходило восстановление metHb (рис. 31, серые столбцы). В настоящее время известно, что дезоксиформа гемоглобина ($\text{Hb-[Fe}^{\text{II}}\text{]}$) может восстанавливать NO_2^- до NO, в результате чего также образуется $\text{Hb-[Fe}^{\text{II}}\text{NO]}$ [Lushinger et al., 2003; Angelo et al., 2008]:



Это может объяснить наблюдаемое в нашем эксперименте нитрозилирование metHb в системе MG – NaNO_2 в микроаэрофильных условиях (рис. 31, белые столбцы).

В предыдущем разделе (3.2.1.) было описано, что в реакции метилглиоксаля с лизином образуются редокс-активные интермедиаты, которые способны восстанавливать гемопротеиды. На основании вышеизложенного можно заключить, что продукты гликирования, возникающие при взаимодействии метилглиоксаля с аминокислотными остатками гемоглобина, стимулируют образование $\text{Hb-[Fe}^{\text{II}}\text{NO]}$ за счет восстановления ферригема. Таким образом, метилглиоксаль существенно влияет на взаимодействие гемоглобина с GSNO или нитритом. Важным фактором, влияющим на эти процессы, является содержание кислорода в реакционной среде. В аэробных условиях наблюдается модификация гема с образованием нитригемоглобина.

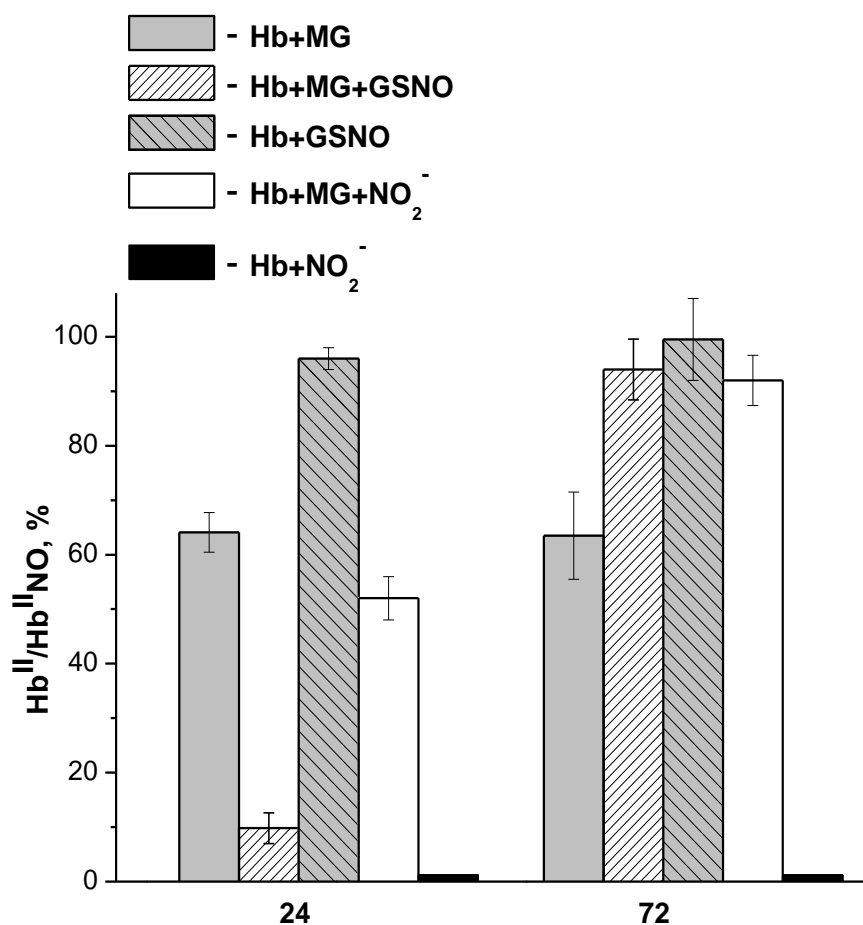


Рис. 31. Содержание восстановленного и нитрозилгемоглобина. Изменение содержания восстановленного гемоглобина (оценивали по oхuHb) в системе, содержащей MG (серые столбцы); $\text{Hb-}[\text{Fe}^{\text{II}}\text{NO}]$ в системах, содержащих GSNO и MG (белые заштрихованные столбцы), только GSNO (серые заштрихованные столбцы); нитрит натрия и MG (белые столбцы) или только нитрит натрия (черные столбцы). Во всех модельных системах инкубация проводилась в микроаэрофильных условиях. Состав реакционной среды приведен в подписи к рис. 29.

Отсутствие нитрования гема в условиях ферментативной утилизации $\text{O}_2^{\bullet-}$ свидетельствует о том, что в модификации гема участвуют пероксинитрит и пероксинитрозокарбонат, образующийся при взаимодействии CO_2 с ONOO^- . В настоящее время наиболее изучена реакция нитрования тирозина. Основным механизмом считается окисление до тирозинового радикала, который далее рекомбинирует с NO_2^{\bullet} [Augusto et al., 2002; Goldstein, Merenyi, 2008]. В качестве окислителя могут выступать катион-радикал порфирина, оксоферрильная форма железа и карбонатный анион-радикал ($\text{CO}_3^{\bullet-}$), который продуцируется при распаде пероксинитрозокарбоната [Augusto et al., 2002;

Goldstein, Merenyi, 2008]. В то же время в работе [Schopfer et al., 2009] продемонстрировано, что нитрование производных фенола происходит под действием комплекса пероксинитрита с гемом. Аналогичные механизмы можно предложить и для нитрования винильных групп порфирина (реакция 14). При низком парциальном давлении кислорода в используемой нами модельной системе преобладает процесс нитрозилирования гемовой группы. Известно, что нитрозилированный пятикоординированный α -гем типичен для T-состояния, а нитрозилированные формы шестикоординированных гемов — для R-состояния гемоглобина [Gow et al., 1999]. Изменение соотношения T- и R-состояний гемоглобина при его модификации GSNO и метилглиоксалем свидетельствует об аллостерическом эффекте этого процесса. В работе [Roy et al., 2004] показано, что гликирование приводит к снижению S-нитрозилирования гемоглобина, что согласуется с выдвинутым нами предположением о модификации сульфгидрильной группы β -субъединицы. В то же время в этой работе показано, что при гликировании гемоглобина содержание Hb-[Fe^{II}NO] в эритроцитах возрастает. Исходя из наших данных, этот факт можно объяснить тем, что в физиологических условиях гликированный гемоглобин нитрозилируется в соответствии с реакцией 12 (раздел 3.2.1.).

Полученные данные указывают на то, что как в нитрозилировании железа гема, так и в нитровании винильных групп порфирина важную роль играют интермедиаты реакции гликирования гемоглобина. К таким редокс-активным соединениям можно отнести продукты перегруппировки Амадори, основания Шиффа и их свободнорадикальные формы, а также свободные радикалы дикарбонильных соединений [Asahi et al., 2000; Turk 2010; Yim et al., 1995; Yim et al., 2001; Шумаев с соавт., 2009]. Мы полагаем, что проявление цитопротекторных (антиоксидантных) и цитотоксических свойств метаболитов NO зависит от взаимодействия их с интермедиатами не только окислительного, но и карбонильного стресса.

3.3. Переход гемоглобина из растворимого в мембраносвязанное состояние в условиях различных видов стресса

3.3.1. Разработка методики определения мембраносвязанного гемоглобина

В интактных эритроцитах гемоглобин может существовать в растворимой и мембраносвязанной формах (МВНб). Данные последних лет показывают, что связывание Hb с компонентами мембраны имеет множественное биологическое значение. Это регуляция метаболизма глюкозы и свойств цитоскелета в зависимости от концентрации кислорода, а также формирование сигнала об окислительном повреждении и старении эритроцита [Barvitenko et al., 2005; Rifkind, Nagababu, 2013; Mohanty et al., 2014; van

Zwieten et al., 2014]. Повышенное количество МВНб может быть связано со многими болезнями системы крови, вызванными не только нарушениями структуры молекулы гемоглобина, но и нарушениями в системе антиоксидантной защиты и действием различных ксенобиотиков, окислительных и гликирующих агентов [Sharma, Premachandra, 1991; Rogers et al., 2008; van Zwieten et al., 2014].

В настоящее время концентрацию МВНб в эритроцитах определяют следующими методами: спектрофотометрической оценкой гемоглобина, ассоциированного с тенями эритроцитов [Токтамысова, Биржанова, 1990; Nogueira et al., 2015]; SDS-электрофорезом белков теней в ПААГ с последующей денситометрией полосы Нб [Sears, Lewis, 1980], измерением тушения гемоглобином флуоресценции зондов, встроенных в мембрану и специфически взаимодействующих с белком полосы 3 [Eisinger et al., 1982]. Количественная оценка Нб в геле является трудоемким и к тому же не очень точным методом. Измерения флуоресценции чувствительны и обеспечивают возможность детектировать низкие концентрации Нб. Однако для этой процедуры требуются дорогостоящие реактивы. Наиболее удобным и дешевым является спектрофотометрический способ, однако этот подход не позволяет детектировать низкие концентрации МВНб. Поэтому перед нами стала задача разработать простую, чувствительную и недорогостоящую методику спектрофотометрической оценки содержания МВНб в эритроцитах.

Прототипами предложенного нами способа определения МВНб послужили два методических подхода. Первый — спектрофотометрическая оценка МВНб, включающая следующие стадии: получение теней эритроцитов, обработка их 5% Тритоном X-100 (рН 8), и измерение поглощения при 415 нм за вычетом фонового поглощения при 700 нм [Nogueira et al., 2015]. Второй — метод измерения концентрации гемоглобина в щелочном растворе пиридина, предложенный Riggs'ом [Riggs, 1981]. Суть нашей методики заключается в определении связанного с тенями эритроцитов Нб после полного гемолиза клеток. Для перевода гемоглобина в растворимую форму было предложено использовать 30% щелочной раствор пиридина [Космачевская, Топунов, 2007], что позволило одновременно солюбилизовать мембраны и перевести Нб в удобную для спектрофотометрической детекции форму — пиридингемохромоген (рис. 32). Разработанная методика имеет хорошую точность, позволяя обнаруживать менее 0,1% МВНб в пробе. Точность определения контролировали 3-кратным анализом одного и того же образца. Максимальный разброс значений МВНб при измерении одного и того же образца (параллельные пробы) не превышает 10%, что свидетельствует о хорошей

сходимости измерений. На рис. 33 представлена последовательность операций при определении МВНб в пробах крови.

Отметим, что определение гемопротеидов по спектрам восстановленного гемового комплекса с пиридином — достаточно старый методический прием. Еще Баркрофт, ссылаясь на работы Кейлина, дает следующую характеристику этому методическому подходу: «...если подозревать присутствие гематина, необходимо только добавить пиридин в присутствии восстанавливающего агента, и если гематин присутствует даже в безгранично малых количествах, его можно обнаружить» [Баркрофт, 1937, с. 69].

Разработанная методика была испытана в модельных экспериментах с суспензией эритроцитов и на цельной крови здоровых доноров и пациентов РОНЦ РАМН. Был установлен диапазон нормальных значений для МВНб: 3,3%—4,9%, соответствующий высокой гемолитической устойчивости эритроцитов (раздел 3.3.2). Разработанная методика позволяет быстро и надежно определить количество МВНб в пробах крови.

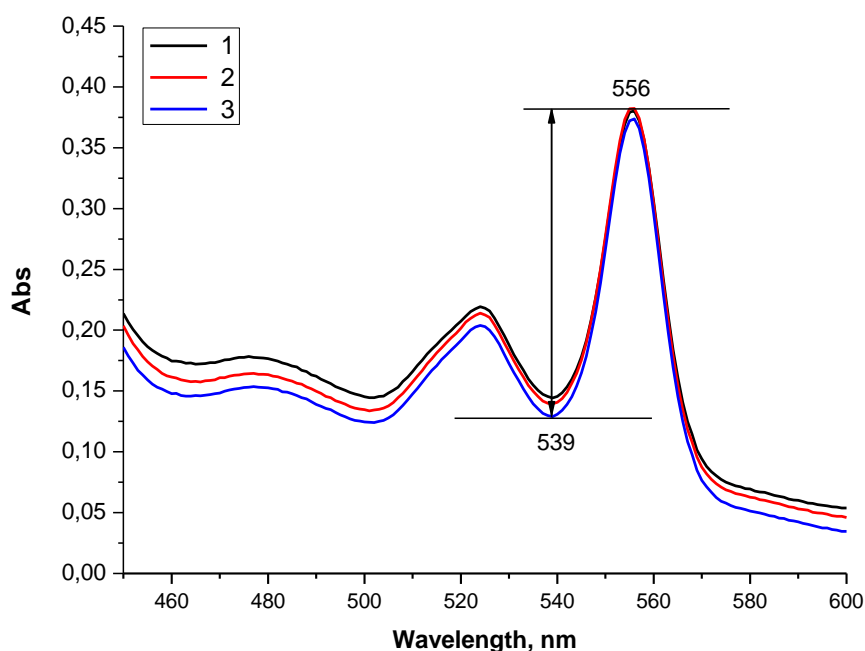


Рис. 32. Спектры поглощения пиридингемохромогена гемоглобина, солюбилизированных связанного с мембранами эритроцитов. 1, 2, 3 — параллельные пробы.

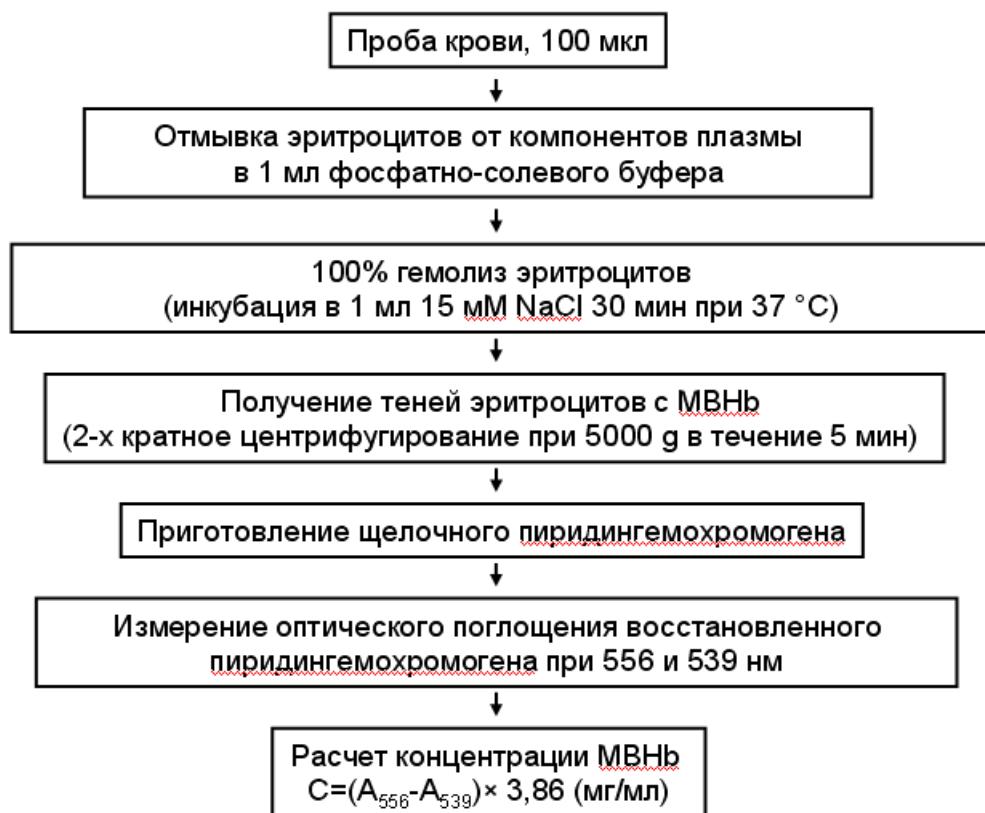


Рис. 33. Последовательность операций при спектрофотометрической оценки содержания мембраносвязанного гемоглобина в пробах крови.

Известно, что изменение состояния эритроцитов отражает функциональное состояние системы крови, которое в свою очередь связано с определенным состоянием организма в условиях нормы и патологии. Изменение морфофункциональных свойств эритроцитов происходит под влиянием физической нагрузки, гипоксии, эндотоксинов, фармакологических препаратов. В настоящее время предлагается рассматривать реактивность эритроцитов в качестве индикатора стрессового состояния или адаптационной реакции организма [Гусев, Уразов, 2008; Яхно, 2011]. Существуют разные способы оценки реактивности эритроцитов: по устойчивости суспензии эритроцитов к окислительному или осмотическому гемолизу, по электрофоретической подвижности клеток [Шурхина с соавт., 2014], по реактивности плазматических мембран, по липидному составу мембран. В качестве примера можно привести работу [Зайцева с соавт., 2004], в которой сообщается о существовании нескольких адаптивных вариантов эритроцитов с различной реактивностью клеточных мембран. Можно предложить использовать содержание МВНб в качестве еще одного достаточно простого критерия для оценки реактивности эритроцитов.

Интересные данные о потенциальной возможности использования МВНб в гематологической практике содержатся в заявке на патент [Пивоваров с соавт, 2008].

Авторы патента предложили использовать данные о содержании мембраносвязанного Hb для расчета коэффициента, позволяющего оценить устойчивость эритроцитов к функциональной нагрузке — тканевой гипоксии. Расчетный коэффициент представляет собой среднее из четырех показателей (metHb, МВHb, содержание окисленных нуклеотидов, суммарная оптическая плотность), каждый из которых представлен разницей величин после и до проведения функциональной пробы. Анализ приведенных в заявке примеров показал, что наибольший вклад в величину коэффициента устойчивости эритроцитов к ишемии вносит Δ МВHb.

Таким образом, на основании приведенных выше и других содержащихся в литературе примеров можно рассматривать уровень МВHb в эритроцитах как интегральный показатель адаптационных процессов, состояния напряженности функциональных систем организма в ответ на различные внешние воздействия.

3.3.2. Взаимосвязь между уровнем мембраносвязанного гемоглобина и устойчивостью эритроцитов

Руководствуясь точкой зрения, что уровень мембраносвязанного гемоглобина в эритроцитах может быть индикатором функционального состояния клеток, можно заключить, что отклонение уровня МВHb от нормальных значений является комплексным показателем воздействия токсинов и окислителей на мембрану и внутриклеточные белки. Чтобы биохимический параметр служил в качестве диагностического маркера, он должен коррелировать с определенными патологическими процессами.

В литературе содержатся противоречивые сведения о роли МВHb в формировании устойчивости эритроцитов к гемолизу. По данным одних авторов, связывание Hb с компонентами мембраны является компенсаторно-приспособительным процессом, направленным на стабилизацию мембраны эритроцита [Knutton et al., 1970; Mendanha et al., 2012]. По другим данным, отмечена положительная корреляция между уровнем гемолиза и содержанием МВHb [Luneva et al., 2016]. Разрешить это противоречие возможно, если принять во внимание тот факт, что связываться с мембраной Hb может разными способами и в разной степени. Так, например, было показано линейное увеличение ковалентно связанного МВHb в зависимости от концентрации H_2O_2 [Sharma, Premachandra, 1991; Rocha et al., 2009; Mendanha et al., 2012]. Следует особо отметить, что уровень гемолиза не линейно зависит от выраженности окислительного стресса [Mendanha et al., 2012], поэтому наблюдаемый в эксперименте эффект во многом будет определяться используемой дозой окислителя.

Для того, чтобы понять, как оба параметра, устойчивость и доля МВНб, связаны между собой, мы провели две серии экспериментов. В первой серии мы изучали дозозависимый гемолиз эритроцитов, индуцированный хлорноватистой кислотой (НОСІ/ОСІ⁻). Хлорноватистая кислота является предшественником свободных радикалов и важнейшей составляющей бактерицидной системы организма человека и животных [Панасенко с соавт., 2013]. Кривые, отражающие изменение уровня гемолиза (оценивали по Нб в растворе — SHb (soluble Hb)) и МВНб, были представлены на одном графике (рис. 34). Видно, что одна кривая является как бы зеркальным отражением другой. Такой характер взаиморасположения кривых указывает на существование связи между двумя параметрами. Колебаниям МВНб в диапазоне концентраций 3,3 – 4,25% (обозначен штриховкой) соответствует область повышенной устойчивости клеток к гемолизу (снижение SHb). Возрастание гемолиза, превышающего контрольный уровень, сопровождается снижением МВНб.

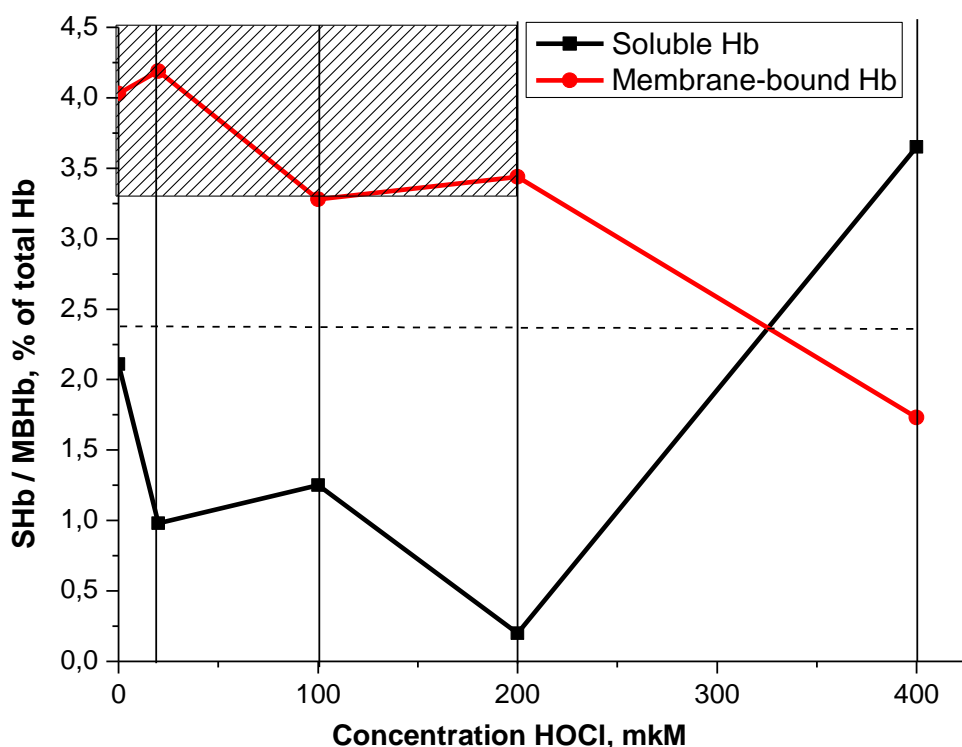


Рис. 34. Взаимосвязь между уровнем МВНб (красная кривая) и гемолитической устойчивостью (черная кривая) эритроцитов при действии возрастающих концентраций НОСІ на суспензию эритроцитов. Штриховкой выделена область значений МВНб, соответствующих норме. Каждая точка — среднее из трех опытов.

На следующем этапе была проведена серия экспериментов с суспензией отмытых эритроцитов, полученных из цельной крови пациентов РОНЦ РАМН, получавшие лечение химиотерапевтическими препаратами. Отмытые от компонентов плазмы эритроциты инкубировали в присутствии НОСІ/ОСІ^- в течение 20 мин, и затем в пробах определяли степень гемолиза по концентрации вышедшего в раствор Hb (SHb) и уровень МВHb по описанной выше методике. В зависимости от образца были получены различные пары значений для SHb и МВHb, которые ранжировали в порядке увеличения МВHb. В ходе анализа полученных данных была выявлена зависимость между степенью окислительного гемолиза эритроцитов и уровнем МВHb, которая имела сложный нелинейный характер. На кривой зависимости SHb от МВHb (рис. 35), можно выделить пять концентрационных диапазонов МВHb: 1 – до 0,7%; 2 – 0,7-2,2%; 3 – 2,3–3,3%; 4 – 3,3-4,9% и 5 – от 4,9%. Второму (0,7-2,2%) и четвертому (3,3-4,9%) диапазону соответствует степень гемолиза, не превышающая уровень, допустимый для эритроцитарных суспензий в искусственных средах (рис. 35, заштрихованная область).

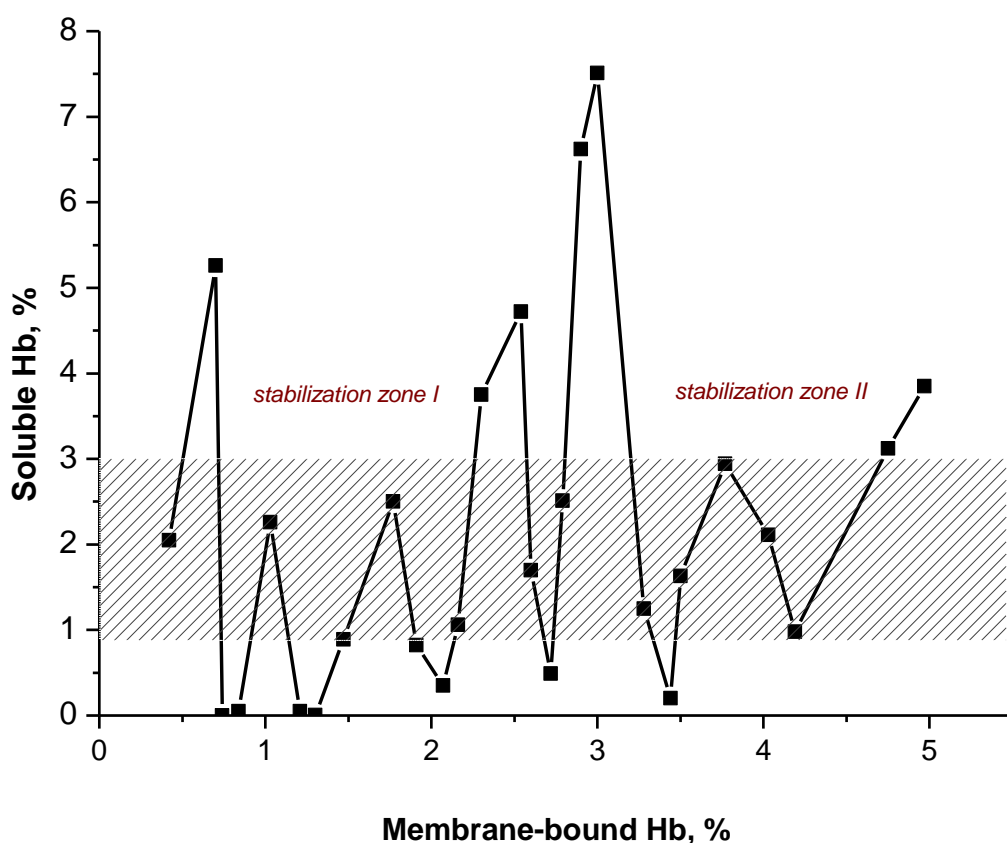


Рис. 35. Зависимость гемолитической устойчивости эритроцитов от уровня МВHb. Штриховкой выделена область выраженности автогемолиза, допустимого для отмытой от компонентов плазмы суспензии эритроцитов.

Эти зоны обозначены как зона стабилизации I и зона стабилизации II. Снижение МВНб до уровня первой зоны мы рассматриваем как адаптационный процесс, направленный на активацию пентозофосфатного пути, в котором синтезируется NADPH – кофактор антиоксидантных ферментов. Повышение гемолитической устойчивости в этой зоне можно объяснить стимуляцией антиоксидантной функции клеток. По данным ряда работ, содержание МВНб в эритроцитах в норме составляет ~ 4%. Основываясь на этих фактах, вторая зона стабилизации была принята за норму. Вариации концентрации МВНб в пределах этой зоны также могут быть объяснены с позиций формирования адаптивного ответа, направленного на увеличение устойчивости. Смещение к нижней границы нормы связано с усилением антиоксидантной компоненты, к верхней — энергетической. В первом случае реализуется пассивная стратегия адаптации, во втором — активная.

Как видно, уровень гемолиза, соответствующий первой зоне стабилизации, в среднем ниже, чем уровень гемолиза второй зоны стабилизации. Это дает основания предположить, что снижение МВНб до 2,2% переводит клетки на другой, более низкий уровень реактивности. В поддержку этого тезиса можно привести факт об увеличении осмотической резистентности истощенных по АТФ эритроцитов человека [Шпакова с соавт., 2013]. В ходе истощения эритроциты целенаправленно снижают фонд адениловых нуклеотидов за счет дезаминирования или дефосфорилирования АМР [Атауллаханов с соавт., 1984а]. Образующиеся при этом рибозофосфаты могут катаболизироваться по пентозному пути. Таким образом, эритроцит стабилизирует энергетический заряд (или отношение концентрации АТФ к фонду аденилатов), что позволяет клетке пережить неблагоприятные условия.

Между первой и второй зонами стабилизации располагается зона дестабилизации или критическая зона, которой присуще определенное соотношение параметров, характерное для периода смены метаболической стратегии клетки. На существование аналогичной промежуточной зоны дестабилизации указывают данные работы [Комиссарчик с соавт., 1977], в которой было показано, что эритроцитарные тени после экстракции 10% примембранного белка теряют свои осмотические свойства, при экстракции еще 5% белка осмотические свойства восстанавливаются.

Несмотря на отсутствие в эритроцитах ядерного и белоксинтезирующего аппаратов, эти клетки обладают многоуровневой способностью к адаптации [Зайцева с соавт., 2004; Petibois, Délérís, 2005; Karaman et al., 2009; Martusevich et al., 2016]. В отличие от ядросодержащих клеток, адаптационные возможности эритроцитов млекопитающих ограничены цитоплазматическими механизмами. Основу цитоплазматических механизмов клеточного ответа составляют обратимые

кооперативные фазовые переходы белков, взаимодействие их с мембраной, изменения в мембранных белках и белках цитоскелета, а также нарушение проницаемости мембраны. Эти механизмы есть ни что иное как проявление филогенетически древней программы реагирования клетки на различные факторы, известной как «универсальная реакция клетки» [Насонов, 1962; Александров, 1985; Matveev, 2005]. Развертка адаптационного ответа в любой клетке начинается с неспецифического комплекса реакций, хорошо описанного в научной литературе, и только позже подключаются механизмы регуляции генной экспрессии. Из-за отсутствия ядерного аппарата и простоты устройства эритроциты являются удобной моделью для изучения негенетических механизмов формирования адаптационного ответа. Мы полагаем, что ключевую роль в реализации «универсальной реакции» эритроцита играет молекула гемоглобина.

Показанное в экспериментах повышение гемолитической устойчивости эритроцитов при действии НОСІ/ОСІ^- (рис. 34), как мы полагаем, является иллюстрацией неспецифического ответа клетки на действие различных окислителей, ксенобиотиков или биологически активных веществ. Молекулярный механизм этой устойчивости, вероятно, связан, с перестройками в мембране и цитоскелете, направленными на увеличение ее жесткости (ригидности). Существенный вклад в увеличение жесткости мембраны вносят белковые примембранные слои [Knutton et al., 1970; Mendanha et al., 2012]. Связанное с увеличением прочности снижение деформируемости мембраны негативно сказывается на функциональных свойствах эритроцита, способности выдерживать деформационные напряжения при прохождении через капилляр. В какой мере обозначенные процессы можно отнести к компенсаторно-приспособительным физиологическим ответам клетки или к патологии, остается под вопросом. Может быть, в некоторых случаях клетка включает древние адаптационные механизмы, эволюционно сформировавшиеся еще у одноклеточных форм, и поэтому не учитывающие или даже противоречащие интересам многоклеточного организма. То есть компенсаторно-приспособительный с точки зрения клетки процесс может быть предпосылкой для развития патологического с точки зрения целостного организма процесса.

На следующей стадии было проведено сравнительное исследование образования МВНб у здоровых доноров и онкологических больных с использованием разработанной методики. Материал для исследования был предоставлен клинико-диагностической лабораторией РОНЦ РАМН. Поскольку показатели выборки (As и Ex) не превышали критических величин при уровне значимости $p \leq 0,05$ (табл. 8), то это дало нам основание признать распределение нормальным и использовать в расчетах статистические параметрические критерии. По данным обобщенной выборки, пациенты, которые

получали химиотерапию, характеризуются более высоким уровнем МВНб по сравнению со здоровыми донорами. Анализ уровня МВНб у онкобольных показал, что в 61% случаев наблюдается отклонение от нормы (свыше 4,9 %), что может свидетельствовать о развитии либо компенсаторного процесса, либо хронической эндогенной интоксикации (рис. 36). В контрольной группе отклонение от нормального диапазона наблюдалось у 38% обследованных. Различия носят достоверный характер ($t=1,7$; $p<0,05$).

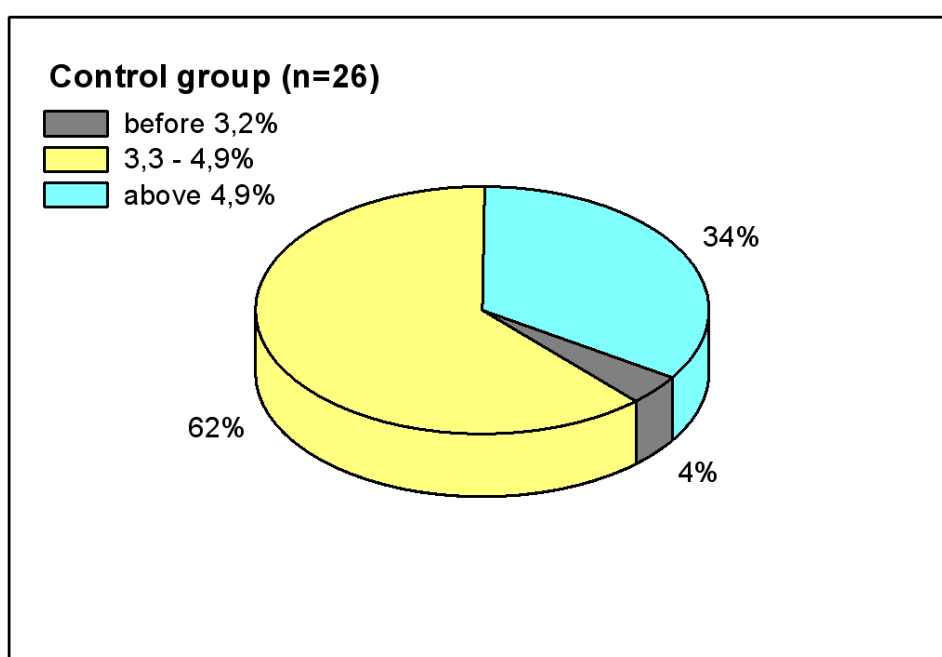
Табл. 8. Некоторые показатели выборки для контрольной выборки и выборки пациентов РОНЦ РАМН.

Некоторые показатели выборки	Контроль (n=26)	Онкобольные (n=125)
	$p\leq 0,05$	$p\leq 0,05$
Средняя выборочная, \bar{x}	4,69	5,00
Дисперсия, D	1,21	1,48
Среднее квадратическое отклонение, σ	1,1	1,22
Коэффициент вариации, v	23,48%	24,34%
Предельная ошибка выборки, ϵ	$\pm 0,454$	$\pm 0,216$
Показатель асимметрии, A_s	0,61 ($S_{A_s}=0,43$)	0,31 ($S_{A_s}=0,31$)
Показатель эксцесса, E_x	0,0324 ($S_{E_x}=0,72$)	-0,13 ($S_{E_x}=0,41$)

Выборка пациентов включала группу онкологических больных с диагностированной анемией (анемия хронических заболеваний, железодефицитная анемия, микроангиопатическая гемолитическая анемия). Был предпринят сравнительный анализ двух равных выборок ($n = 23$): доноры без анемии и пациенты с анемией. Распределения обеих выборок близки к нормальному, с несущественной асимметрией и слабой вариацией. Сдвиг вариационной кривой пациентов вправо происходит вследствие снижения в эритроцитах процентного содержания МВНб первого и второго классов, соответствующих зоне дестабилизации и зоне стабилизации II, до 13 и 4,3% против 17,4 и 34,8 % контрольной группы. Несоответствие норме у пациентов с анемией наблюдалось в 74% случаев, в контрольной группе — в 35% ($t=2,05$; $p<0,05$).

Сдвиг содержания МВНб у онкобольных в сторону превышения диапазона нормальных значений можно объяснить как с позиций развития интоксикации, вызванной приемом противоопухолевых препаратов, так и с позиций развития адаптации к анемии, сопровождающей болезнь. Диагностируемая анемия также может быть следствием хронической эндогенной интоксикации. Этиология анемии у онкологических больных многофакторна и обусловлена не только нарушениями эритропоэза и обмена железа, но и

сдвигами метаболического статуса клеток и дестабилизацией клеточной мембраны в условиях действия окислителей и ксенобиотиков. Как хорошо известно, причина развития гемолитической анемии, вызванной лекарственными препаратами, связана с преждевременным удалением макрофагами поврежденных эритроцитов из кровеносного русла. Этот процесс во многом обусловлен образованием в эритроцитах активных форм кислорода под действием гемолитических агентов [Mohanty et al., 2014]. Показано, что ключевую роль в формировании «сигналов смерти» играет фракция мембраносвязанного гемоглобина, состоящая из окисленной и денатурированной форм Hb [McMillan et al., 2005]. В данном случае повышение уровня МВHb можно рассматривать как процесс, направленный на элиминацию поврежденных эритроцитов, т.е. предшествующий анемии. Однако возможен и другой сценарий, когда с помощью повышения уровня МВHb эритроциты адаптируются к анемии и связанной с ней гипоксии. Например, снижение концентрации мембраносвязанного 2,3-дифосфоглицерата — аллостерического регулятора, понижающего сродство Hb к кислороду, освобождает места для связывания гемоглобина, поскольку этот органический фосфат конкурирует с deoxyHb за сайт связывания с белком полосы 3 [Chetrite, Cassoly, 1985]. Увеличение доли deoxyHb в гипоксических условиях может быть еще одним фактором, способствующим повышению уровня МВHb при анемии [Mohanty et al., 2014]. Какие именно процессы, патологические или компенсаторные, обуславливают повышенный уровень МВHb у онкобольных, особенно с анемией, на данном этапе исследования сказать сложно.



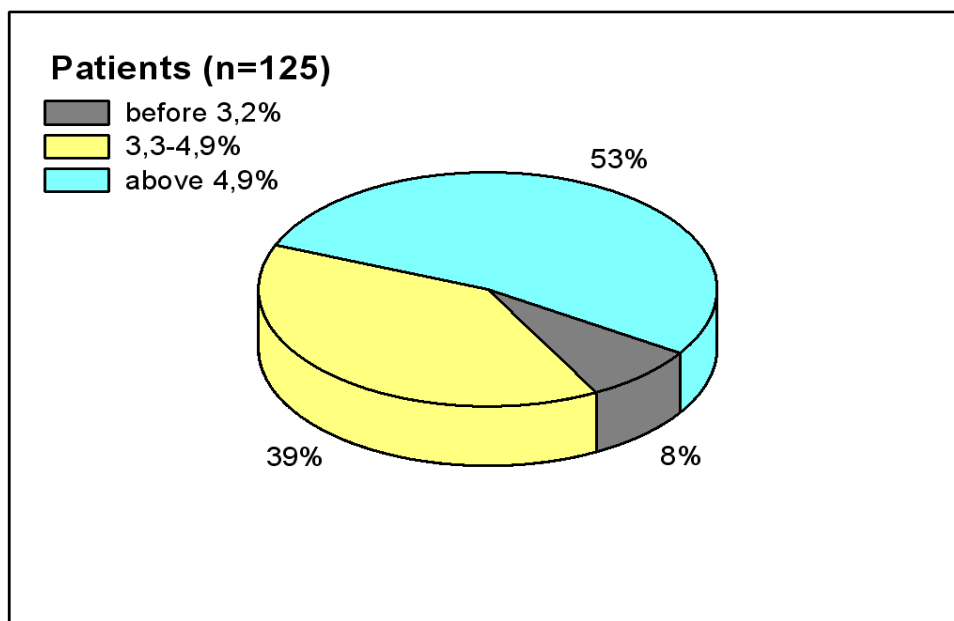


Рис. 36. Распределение обследованных здоровых доноров и онкологических больных по группам в зависимости от уровня МВНб в крови. Желтый сегмент – соответствие норме, голубой – превышение нормы, серый – ниже нормы.

3.3.3. Стабилизирующее действие глутатионовых ДНКЖ на эритроциты

Для коррекции нарушенного клеточного метаболизма целесообразно применение биологически активных веществ, задействующих механизмы повышения общей неспецифической резистентности. Среди биологически активных веществ широкого спектра действия особое место занимают динитрозильные комплексы железа [Тимошин с соавт., 2007; Timoshin et al., 2007; Shumaev et al., 2008a,b; Ванин, 2015]. ДНКЖ образуются в организме человека и животных в качестве стабильных доноров оксида азота. Эти комплексы, как известно, являются универсальными регуляторами различных биохимических и физиологических процессов. ДНКЖ включают три компонента: NO-группу, двухвалентное железо и лиганды [Ванин, 2015]. В качестве лигандов ДНКЖ могут выступать различные физиологические вещества: фосфатные ионы, глутатион, цистеин, карнозин, липоевая кислота, эрготионеин и продукты модификации аминокислот метилглиоксалем [Шумаев с соавт, 2013]. В эритроцитах наиболее вероятно образование низкомолекулярных ДНКЖ с глутатионовыми и эрготионеиновыми лигандами, поскольку их содержание в клетке достаточно велико. ДНКЖ поддерживают прооксидантно-антиоксидантное равновесие в клетке благодаря антиоксидантному, антирадикальному и хелатному действиям, показанных в работах Шумаева с соавторами [Шумаев с соавт, 2007; Shumaev et al., 2008a,b, 2009, Dudylyna et al., 2016]. Ранее в нашей лаборатории было показано образование ДНКЖ, связанных с SH-группой остатка цистеина β-цепи

гемоглобина [Shumaev et al., 2008b]. В условиях индуцированного окислительного стресса эти комплексы защищали тиоловые группы Hb от окисления [Shumaev et al., 2008b]. В рамках данной работы мы продолжили изучение биорегуляторного действия ДНКЖ в модельных экспериментах с суспензией эритроцитов. Имеются данные, что ДНКЖ с глутатионом повышают эластичность эритроцитов и тем самым улучшают микроциркуляцию [Шамова с соавт, 2011]. Известно также, что NO участвует в регуляции выживаемости эритроцитов [Nicolay et al., 2008].

Нами было исследовано влияние ДНКЖ с глутатионовыми лигандами (ДНКЖ-GS) на устойчивость суспензии эритроцитов к индуцированному хлорноватистой кислотой (HOCl/OCl^-) гемолизу. В условиях HOCl-индуцированного гемолиза предобработка эритроцитов глутатионовыми ДНКЖ в концентрации 3 мкМ приводила к расширению зоны дозозависимого ответа клеток (рис. 37, красная кривая).

Во всем диапазоне используемых концентраций окислителя в предобработанных динитрозильными комплексами эритроцитах уровень гемолиза был ниже, чем в контрольном образце. Можно предположить, что стабилизирующее действие ДНКЖ-GS связано с переводом клеток на более низкий уровень реактивности. Клетки становятся менее чувствительны, но более устойчивы к повреждению. Поддержание уровня МВНб в предобработанных эритроцитах в зоне стабилизации I (раздел 3.3.2.) (рис. 38, красная кривая) также является указанием на переключение метаболической программы клеток. Следует отметить, что другие метаболиты оксида азота GSNO и NaNO_2 не оказывали выраженного влияния на уровень МВНб по сравнению с контролем.

Для сравнения была исследована стабилизирующая способность веществ, образующихся при диссоциации динитрозильных комплексов железа или их распаде: нитрозоглутатион, восстановленный глутатион, нитрит-ионы и двухвалентное железо. Предварительная обработка суспензии эритроцитов перечисленными веществами, взятыми в концентрациях эквивалентных их содержанию в динитрозильных комплексах, приводила к ингибированию окислительного гемолиза эритроцитов.

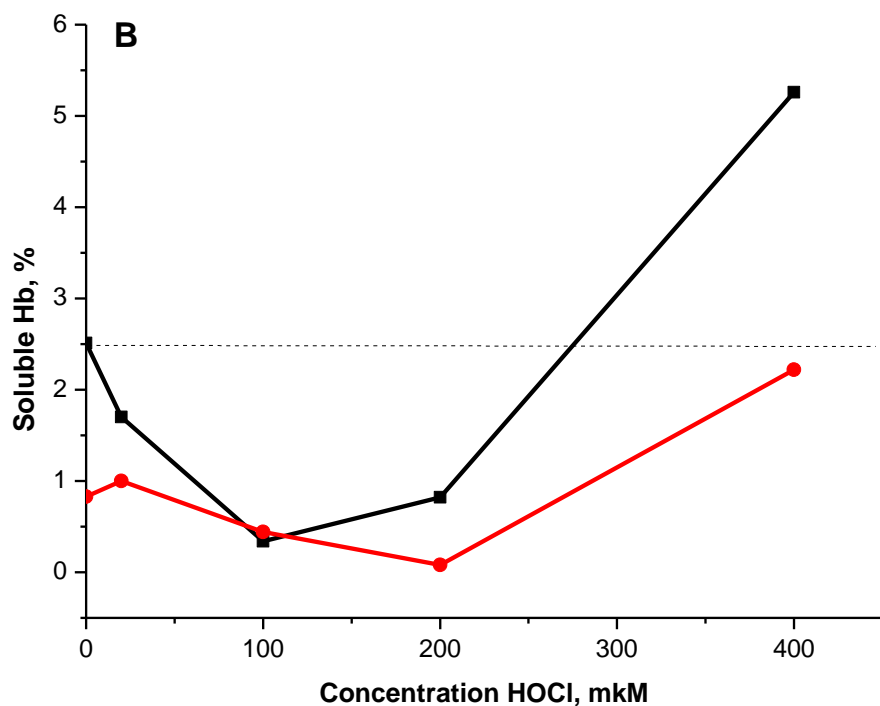
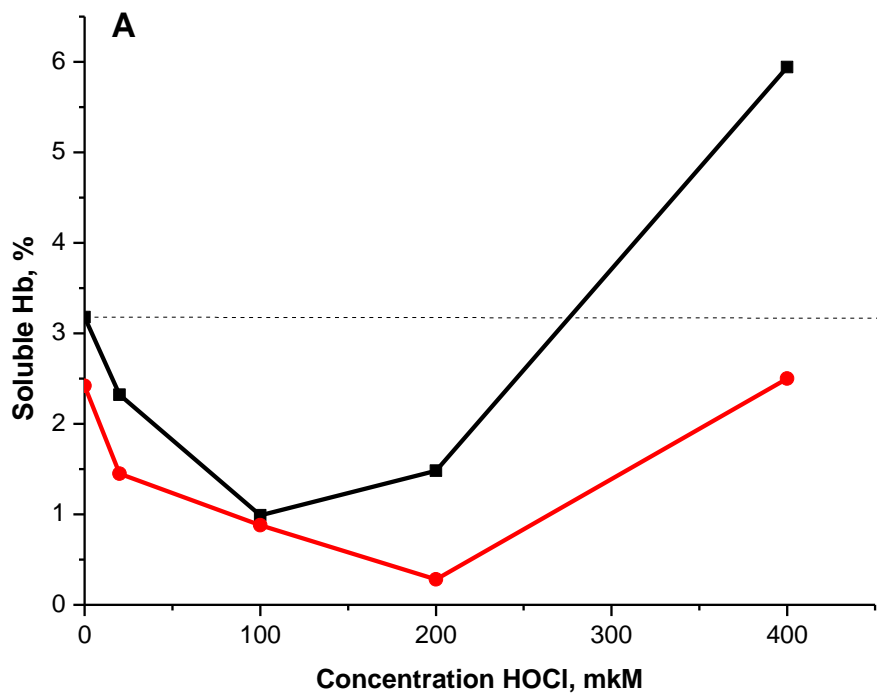


Рис. 37. Индуцированный HOCl гемолиз эритроцитов. Красная кривая обозначает изменение гемолитической устойчивости эритроцитов, предобработанные ДНКЖ-GS. А и В — серии экспериментов с эритроцитами, полученными от разных доноров. Каждая точка — среднее из трех опытов. Горизонтальная пунктирная прямая — уровень автогемолиза контроля для данной серии опытов.

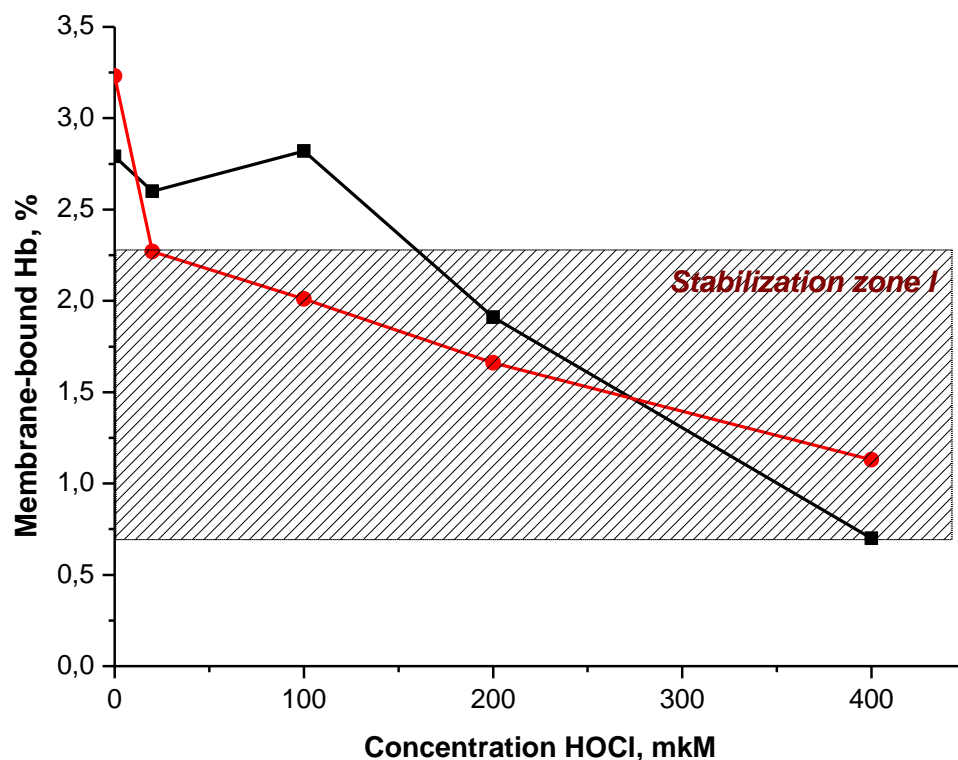


Рис. 38. Изменение содержания МВНб в эритроцитах, инкубированных с различными концентрациями HOCl. Красная кривая – эритроциты предобработанные ДНКЖ-GS. Каждая точка — среднее из трех опытов. Штриховкой отмечена зона стабилизации I.

Как видно из представленных на рис. 39 данных, наибольшее цитопротекторное действие оказывали ДНКЖ-GS (степень ингибирования 55%), в то время как ингибирующее действие компонентов этих комплексов было менее выражено: нитрит ингибировал на 35%, GSNO – на 20%, GSH – на 42%, а Fe^{2+} практически не оказывало влияния на устойчивость клеток. Так как не только динитрозильные комплексы железа, но и составляющие их компоненты оказывали стабилизирующее влияние на эритроциты, то это наводит на мысль, что все эти вещества приводят в действие механизм «универсальной реакции клетки», известной еще как двухфазная реакция или явление гормезиса [Кузин, 1995; Calabrese et al., 2010]. Графическим выражением этой реакции является U-образная или перевернутая U-образная кривая, показывающая изменение знака биологического эффекта при возрастании дозы химического вещества [Насонов, 1962].

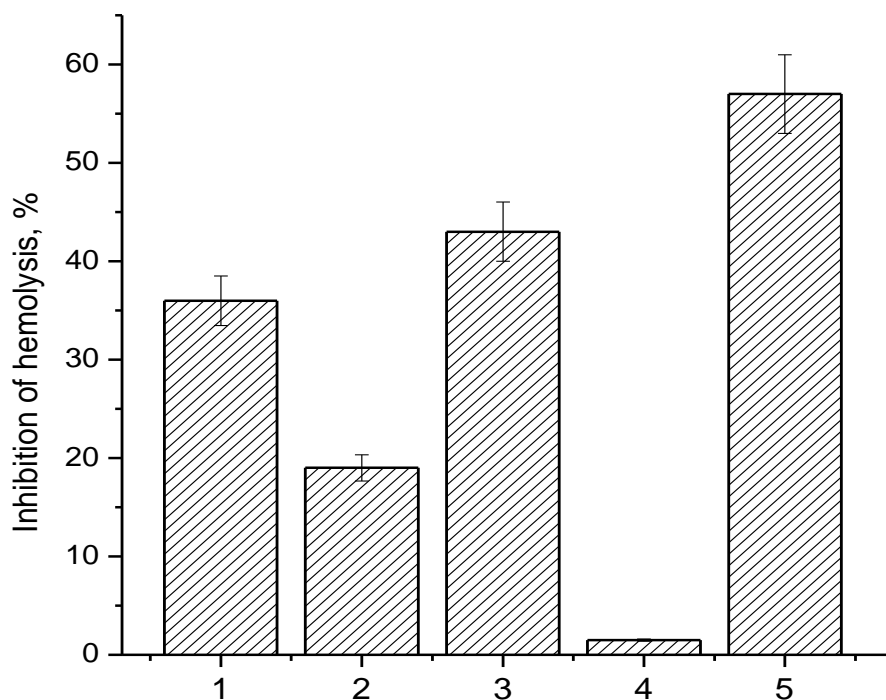


Рис. 39. Ингибирование окислительного гемолиза эритроцитов GS-ДНКЖ и их компонентами. Окислительный гемолиз индуцировали добавлением HOCl в концентрации 400 мкМ. Суспензии эритроцитов предварительно инкубировали в течение 7-8 мин с редокс-активными веществами в концентрации 3 мкМ. 1 – NaNO_2 , 2 – GSNO, 3 – GSH, 4 – FeSO_4 , 5 – ДНКЖ-GS.

Еще одним указанием на то, что полученные результаты могут быть описаны с позиций двухфазной реакции, является тот факт, что и сама по себе хлорноватистая кислота в одном интервале концентраций стабилизирует эритроциты, а в другом — индуцирует гемолиз (рис. 37, черная кривая). Следуя этой логике, в следующей серии экспериментов мы произвели преадаптацию эритроцитов к HOCl/OCl^- путем инкубирования эритроцитов с гемолитиком, взятым в концентрации, вызывающей максимальное стабилизирующее действие на клетки (200 мкМ) в течение 20 мин. Затем клетки обработали новой порцией 200 мкМ HOCl/OCl^- . Как было показано в наших экспериментах, хлорноватистая кислота в концентрации 400 мкМ вызывает гемолиз (рис. 38, черная кривая), однако та же доза, внесенная дробно, оказывает противоположное действие (рис. 40). Феномен преадаптации живых систем низкими сублетальными дозами хорошо известен и применяется в медицинской практике.

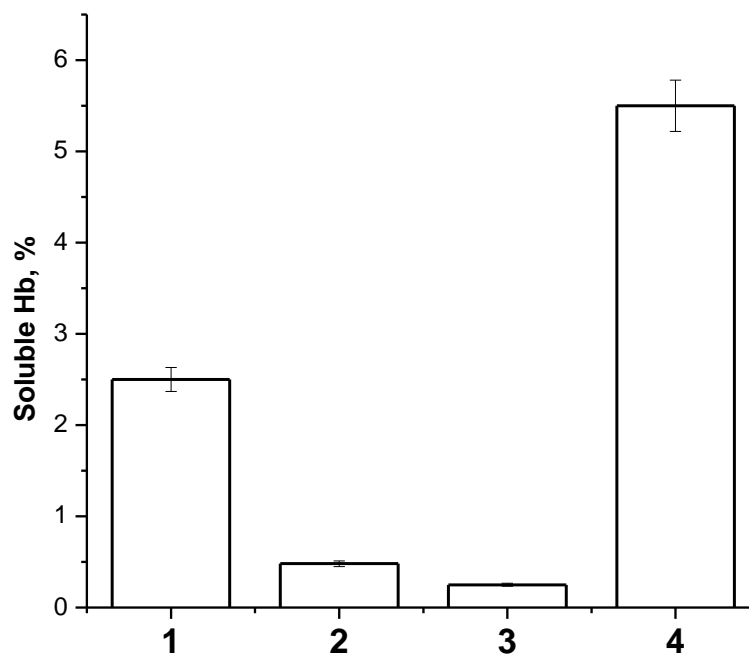


Рис. 40. Ингибирование окислительного гемолиза эритроцитов: эффект преадаптации к НОСІ. 1 – контроль, 2 – 200 мкМ НОСІ, 3 – 200 мкМ НОСІ (20 мин инкубации) + 200 мкМ НОСІ, 4 – 400 мкМ НОСІ.

Нельзя исключить, что наблюдаемое цитопротекторное действие ДНКЖ может быть связано с антиоксидантным и антирадикальным действием этих комплексов. В исследованиях Шумаева с соавторами, с помощью спектроскопии ЭПР было показано, что ДНКЖ-GS эффективно перехватывают НОСІ [Григорьева с соавт., 2016]. На основании этого факта можно заключить, что цитопротекторное действие железонитрозильных комплексов может быть обусловлено их способностью непосредственно взаимодействовать с НОСІ. Однако принимая во внимание используемые в эксперименте низкие микромолярные концентрации ДНКЖ-GS, мы полагаем, что наиболее вероятно сигнально-регуляторное действие этих комплексов, которое может реализоваться с участием адсорбционного механизма.

На то, что антиоксидантная составляющая в реализации защитного эффекта все же может присутствовать, указывают следующие факты. В условиях предобработки эритроцитов GSH и ДНКЖ-GS ингибирование окислительного гемолиза составляло 78 и 86% соответственно (рис. 41 А). Если же редокс-активные вещества вносили через 6-7 мин после добавления НОСІ, то ингибирующий эффект был менее выражен и составлял 15 и 36% (рис. 41 В). В этом эксперименте были использованы более высокие концентрации редокс-активных веществ: 50 мкМ ДНКЖ-GS и 100 мкМ GSH.

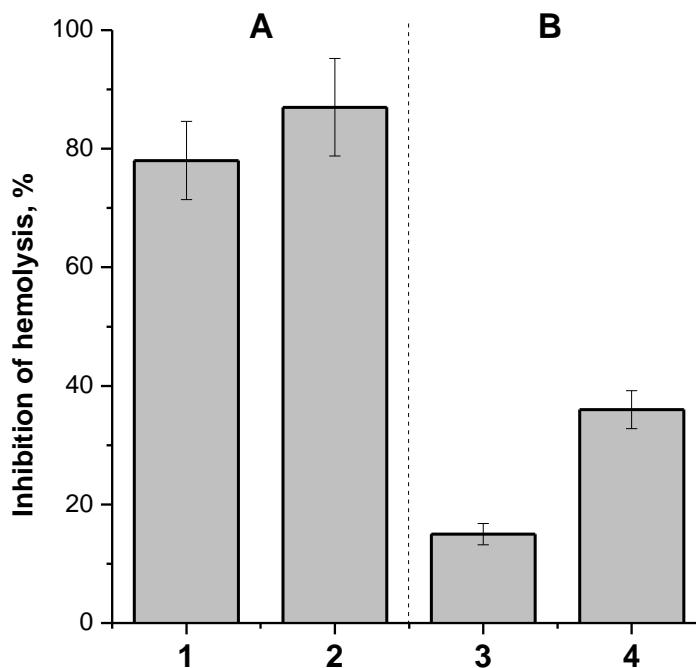


Рис. 41. Ингибирование НОСІ-индуцированного гемолиза эритроцитов GSH (100 мкМ) – 1 и 3; ДНКЖ-GS (50 мкМ) – 2 и 4. А — GSH и ДНКЖ-GS добавляли перед НОСІ; В — после НОСІ. За 100 % принят уровень гемолиза в контроле (20 мин инкубации с 400 мкМ НОСІ).

Представленные в данном разделе экспериментальные данные в первую очередь продемонстрировали способность ДНКЖ-GS выступать в роли регуляторов биологических процессов. Механизм оказываемого этими метаболитами NO стабилизирующего действия на клетки включает как неспецифическую, так и специфическую компоненту. Графики, представленные на рис. 42, наглядно демонстрируют отличие ДНКЖ-GS от других химических веществ, также способных в определенных дозах оказывать цитопротекторное действие. Фазный характер ответных реакций клетки известен в цитологии как закон Арндта-Шульца: *«Каждый раздражитель, действуя на одиночную клетку или группу клеток, составляющих орган, вызывает усиление или ослабление их физиологической деятельности в зависимости от меньшей или большей интенсивности раздражителя...»* (цит. по [Александров, 1985, с 213.]) Поэтому нет ничего удивительного, что такие разные вещества, как ДНКЖ-GS и НОСІ, могут оказывать стабилизирующее действие на клетки. Однако особенность ДНКЖ-GS как биорегуляторов состоит в том, что у этих соединений разница между биологически активной дозой и повреждающей намного больше, чем у нефизиологических раздражителей. ДНКЖ-GS в концентрации 400 мкМ все еще

оказывали положительный эффект на клетки, в то время как НОСІ в этих концентрациях индуцировали гемолиз (рис. 42). Таким образом, можно считать ДНКЖ с глутатионовыми лигандами эндогенными биорегуляторами естественной резистентности, оказывающими модулирующее действие на уровне цитоплазмы и белок-липидных взаимодействий. Полученные результаты согласуются с ранее установленными фактами положительного влияния ДНКЖ на метаболизм эритроцитов [Шамова с соавт, 2011].

Хотелось бы особо отметить, что механизм многих исследованных веществ, снижающих степень гемолиза в условиях действия окислителей, как правило, связывают с их антиоксидантными и антирадикальными свойствами, не принимая во внимание их неспецифического влияния на клеточный метаболизм, хотя в литературе содержатся указания на существование такой реакции у эритроцитов. Неспецифическая реакция эритроцитов может развиваться не только в ответ на экзогенные стимулы, но также и на внутриклеточные факторы. Например, показано, что при наличии патологического состояния человека происходит потеря чувствительности эритроцитов к слабым воздействиям [Оганесян с соавт., 1999]. При выходе больного из кризисного состояния и улучшении клинических показателей происходит повышение чувствительности. Фазные изменения состояний эритроцитов в зависимости от дозы воздействия, к сожалению, не всегда учитываются исследователями, работающими над проблемой повышения стабильности эритроцитов, несмотря на то, что они часто сталкиваются с наличием зон стабилизации и дестабилизации.

Предобработка низкими дозами эндогенных редокс-регуляторов может изменить характеристики зависимости «доза-ответ», например, увеличить зону стабилизации. Для эритроцитов показано стабилизирующее действие низких доз оксида азота [Шамова с соавт, 2011], озона [Белых с соавт., 2007], иона уранила [Шевченко, 2014], мелатонина [Tesoriere et al., 1999].

Особенностью ДНКЖ как цитопротекторов является низкий порог эффективной дозы (2 мкМ) в отличие, например, от α -токоферола и аскорбиновой кислоты, оказывающих 100% ингибирование окислительного гемолиза только начиная с концентрации 100 мкМ [Mendanha et al., 2012]. Поэтому изучение защитного влияния ДНКЖ на эритроциты важно не только для понимания механизмов, лежащих в основе регуляции жизнедеятельности клетки, но и имеет практическую значимость для разработки лекарственных препаратов.

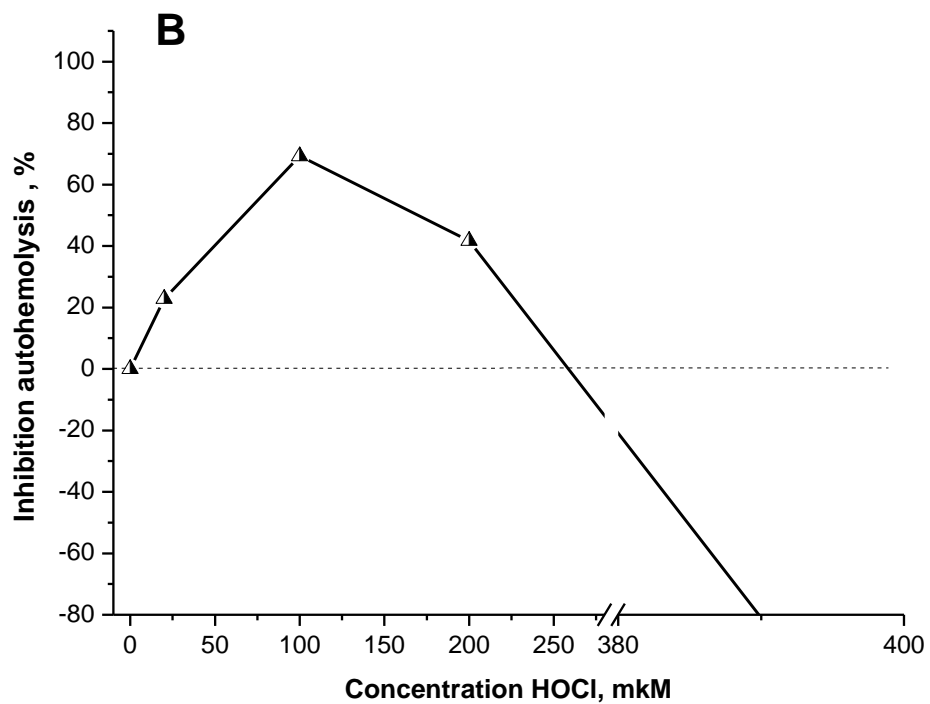
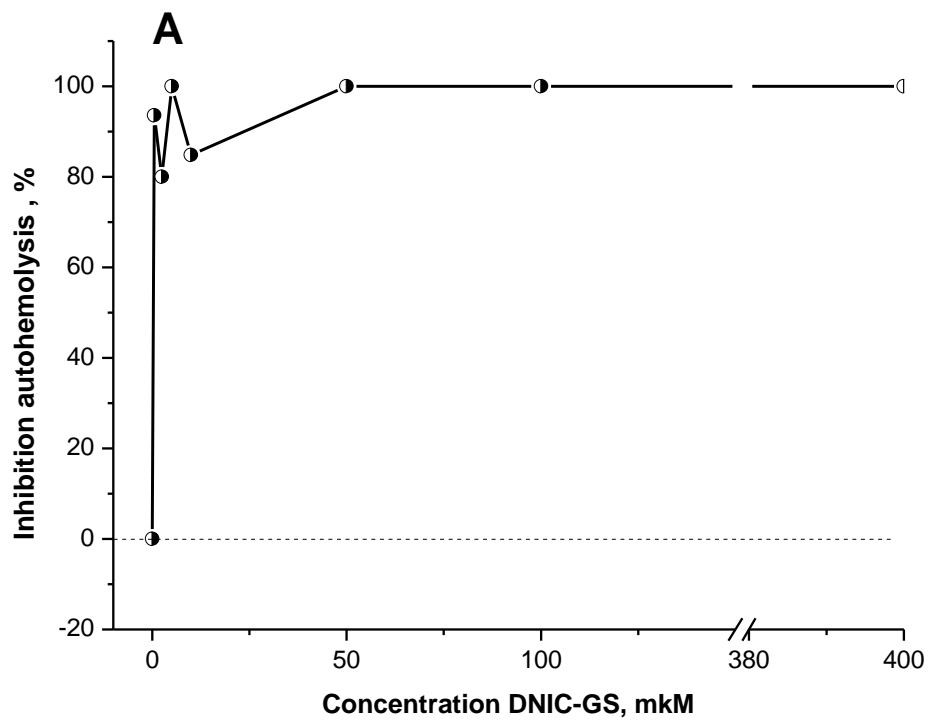


Рис. 42. Ингибирование автогемолиза эритроцитов возрастающими концентрациями ДНКЖ-GS (А) и HOCl (В). За ноль принято ингибирование гемолиза в контроле. Каждая точка — среднее из трех опытов.

3.3.4. Влияние метаболитов оксида азота на переход гемоглобина в мембраносвязанное состояние в условиях карбонильного стресса

Как было показано в предыдущих разделах, 1) GSNO стимулирует образование радикальных интермедиатов реакции лизина с метилглиоксалем по сравнению с другими донорами NO (раздел 3.2.1.); 2) GSNO и NaNO₂ в присутствии метилглиоксала могут вызывать нитрование порфирина Hb, причем в одних и тех же условиях выход нитриHb в реакции с NaNO₂ был в 2 раза ниже, чем с GSNO (раздел 3.2.2.). Эти результаты послужили основанием для проведения сравнительного изучения влияния нитрит-ионов и нитрозотиолов на переход гемоглобина в мембраносвязанное состояние в условиях карбонильного стресса. С целью изучения действия метилглиоксала на эритроциты, отмытую суспензию интактных эритроцитов, выделенных из крови крысы, инкубировали в течение 20 мин с различными концентрациями метилглиоксала. На рис. 43 представлены кривые, отражающие изменения трех параметров в зависимости от концентрации MG в инкубационной среде. Анализ представленных на рис. 43 зависимостей показывает, что доля MBHb практически линейно возрастает с увеличением концентрации MG в среде инкубирования, и коррелирует с увеличением доли Hb, вышедшего в раствор. Поскольку количество Hb в растворе отражает степень гемолиза эритроцитов, то можно утверждать, что индуцированное метилглиоксалем связывание Hb с мембраной в данных условиях носит патологический характер. В ряде исследований было показано, что гемолиз эритроцитов происходит вследствие развития процесса липопероксидации, индуцированного как самим гемоглобином, так и продуктами его распада (железом и гемовой группой) [Nagababu et al., 2010; Rifkind, Nagababu, 2013].

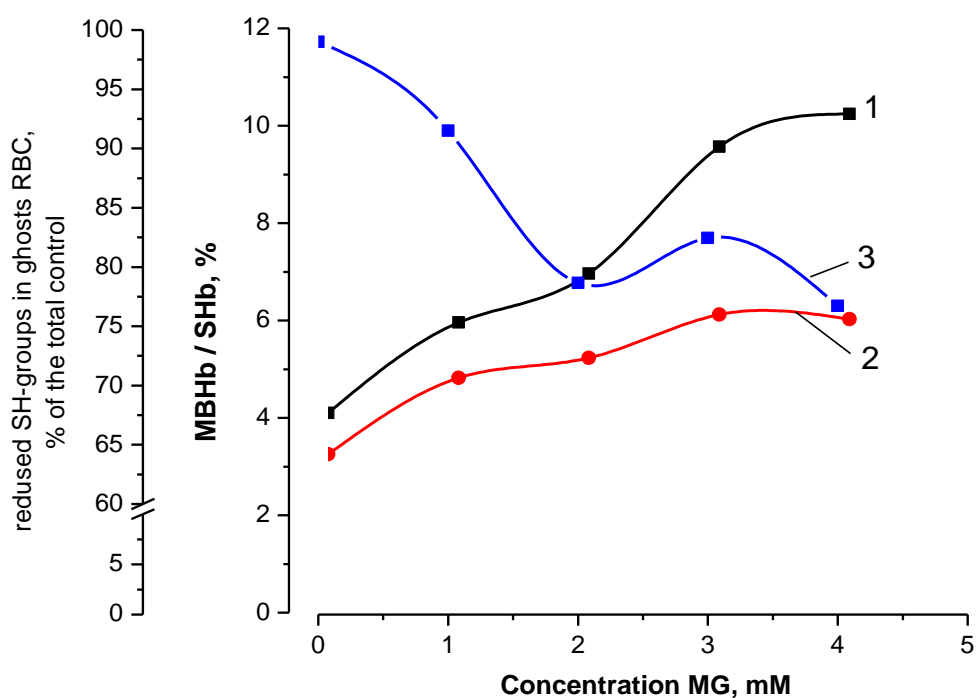


Рис. 43. Содержание Hb в мембранах (черный – 1), гемолизате (красный – 2) и восстановленные SH-группы белков мембран (синий – 3) при инкубации суспензии эритроцитов с разными концентрациями MG. За 100% приняты показатели в эритроцитах без добавлений MG.

Известно, что гемоглобин в мет- и феррил- формах выступает в качестве активного окислителя. Источником супероксид-анион- радикала также является гемоглобин в состоянии полунасыщения ($2\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{II}}]-2\text{Hb}-[\text{FeO}_2]$) [Abugo, Rifkind, 1994; van Zwieten et al., 2014]. Однако, в исследуемой системе окисление гемоглобина не происходило. Поэтому, можно предположить иные механизмы связывания Hb с мембраной. Наблюдаемое в наших экспериментах увеличение доли MBHb при добавлении к эритроцитам метилглиоксаля согласуется с фактом отмеченной в статье [Маюрова, 2012] положительной корреляции между содержанием MBHb и гептанрастворимыми шиффовыми основаниями в условиях алкогольного делирия.

Известно, что одним из показателей функциональной активности мембран является степень восстановленности сульфгидрильных групп мембранных белков. Количественная оценка свободных сульфгидрильных групп белков эритроцитарной мембраны с помощью флуоресцентной метки ThioGlo1 показала, что с увеличением концентрации MG уменьшается доля восстановленных SH-групп по сравнению с контрольными

эритроцитами (рис. 44, синяя кривая). Наблюдаемое в эксперименте снижение SH-групп мембранных белков сопровождалось параллельным увеличением содержания Hb в мембранах. Это указывает на то, что уменьшение количества восстановленных тиолов может быть связано с уменьшением их доступности в результате экранирования молекулами гемоглобина. Тот факт, что количество доступных тиоловых групп коррелирует с содержанием белка в мембране эритроцитов при низких концентрациях H_2O_2 , было отмечено в ряде работ [Sharma, Premachandra, 1991; Rocha et al. 2009; Mendanha et al., 2012]. Нельзя исключить и возможность образования ковалентных аддуктов мембранных тиолов с метилглиоксалем [Zeng, Davies, 2005, 2006].

Имеются данные, показывающие, что в условиях окислительного стресса гемоглобин связывается с белками цитоскелета через формирование межмолекулярных дисульфидных связей [Sayare, Fikiet, 1981; Bowman et al., 2005]. На возможное изменение свойств мембраны в условиях карбонильного стресса указывает и тот факт, что Hb связывается с более высоким сродством с мембранами эритроцитов больных сахарным диабетом по сравнению с контрольными мембранами [Bryszewska, 1988]. Примечательно, что сродство гликированного Hb к мембранам было ниже, чем у нормального гемоглобина. В условиях нашего эксперимента образование гликированного Hb невозможно из-за слишком малого времени инкубации клеток с MG.

Следующая часть нашей работы была посвящена оценке количественного содержания MBHb в эритроцитах, при их обработке метилглиоксалем, и влияния на этот процесс метаболитов оксида азота. Эритроциты инкубировали с различными концентрациями доноров NO: $NaNO_2$, CysNO и GSNO. Только в случае инкубации с $NaNO_2$ наблюдалось значительное увеличение доли MBHb с 4 до 12 % (рис. 44 А, черная кривая). При действии нитрозотиолов колебания концентрации MBHb менее выражены. На графике, отражающем зависимость уровня MBHb от концентрации $NaNO_2$ /CysNO, присутствует выраженный экстремум в области концентрации 0,4 мМ (рис. 44 А). В случае использования $NaNO_2$ происходит уменьшение концентрации MBHb на 2%, а в случае CysNO — увеличение на 2%. Примечательно, что график зависимости концентрации гемоглобина в инкубационной среде (степень гемолиза) от концентрации внесенных в среду NO-донорных соединений содержит аналогичные экстремумы, но противоположной направленности (рис. 44 В), что является косвенным указанием на существующую взаимосвязь между этими параметрами.

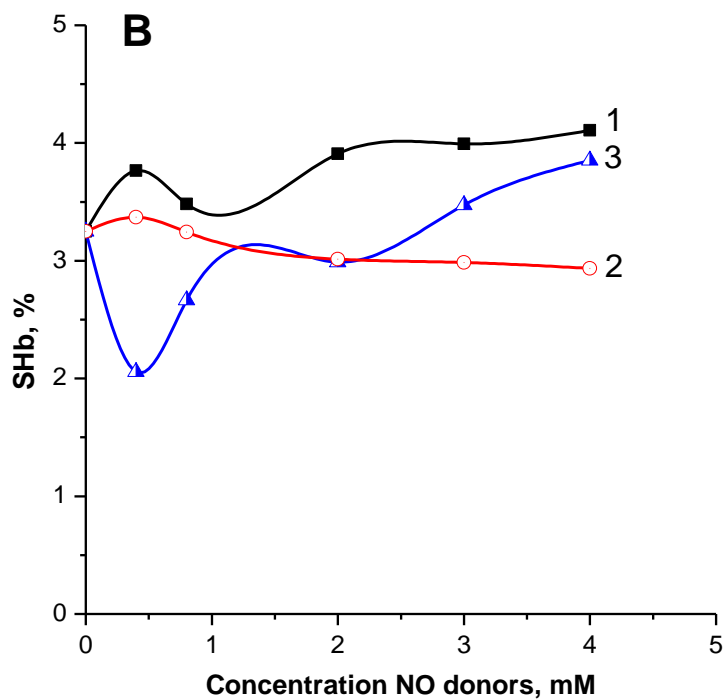
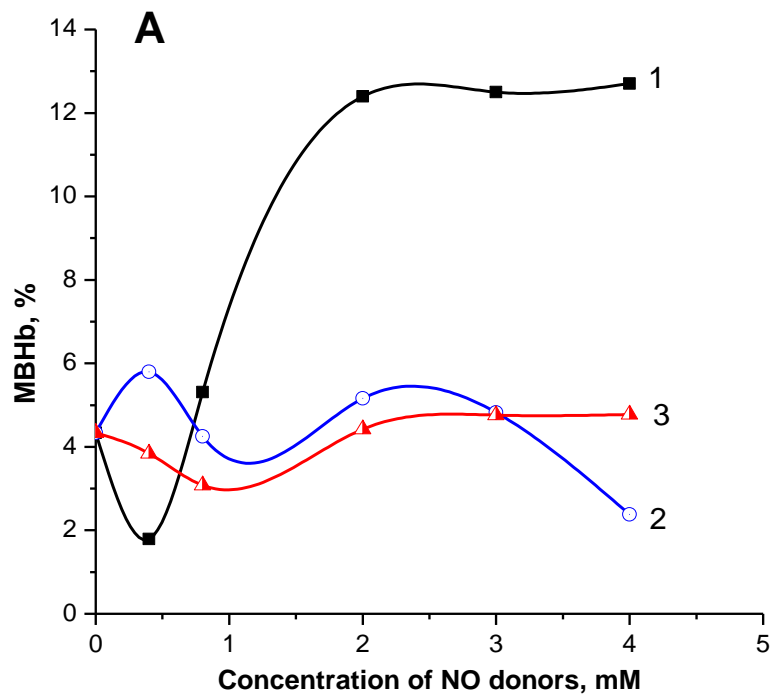


Рис. 44. Содержание мембраносвязанного Нб (А) и степень гемолиза эритроцитов (В) при инкубации с разными концентрациями 1 – NaNO_2 (черная), 2 – CysNO (голубая), 3 – GSNO (красная). За 100% приняты показатели в эритроцитах без добавления NO -донорных соединений.

Сопоставляя графики (рис. 44), можно предположить, что в определенных концентрационных пределах NO-донорных соединений (до 1 мМ) уровень МВНб определяет гемолитическую устойчивость эритроцитов. Повышение на 2% от уровня в контроле оказывает стабилизирующий эффект на мембрану эритроцита (рис. 44, сопоставление синих кривых), снижение на 2% — дестабилизирующий (рис. 44, сопоставление черных кривых). Результаты этой серии экспериментов согласуются с данными, полученными при исследовании корреляции между уровнем МВНб и степенью НОС1-индуцированного гемолиза эритроцитов человека (раздел 3.3.3). Наблюдаемое снижение степени гемолиза в экспериментах с CysNO (рис. 44, синие кривые), сопровождающееся увеличением доли МВНб, можно объяснить стабилизирующим действием примембранного слоя гемоглобина. Это предположение подтверждается данными работ [Knutton et al., 1970; Комиссарчик с соавт., 1977], в которых показано, что разрушение липопротеиновой структуры эритроцитарных мембран с высоким содержанием Нб происходило в гораздо меньшей степени по сравнению с эритроцитарными мембранами с малым содержанием Нб. Однако результаты, полученные на телях эритроцитов, с большой осторожностью следует переносить на всю клетку.

Поскольку ранее нами было показано, что различные метаболиты NO ингибируют протекание реакции Майяра (раздел. 3.1.1.), мы решили проверить действие этих соединений на эритроциты. Была проведена совместная инкубация эритроцитов с метилглиоксалем и NO-донорными соединениями. На рис. 45 представлены результаты по содержанию МВНб в эритроцитах (А) и Нб в инкубационной среде (В). При концентрации MG в инкубационной среде — 3 мМ доля МВНб составляла ~10%.

Внесение в среду инкубации NaNO₂ и CysNO приводит к снижению доли связавшегося с мембранами Нб на 50% и 20% соответственно по сравнению с эритроцитами, обработанными только метилглиоксалем. В противоположность этому, GSNO вызывал незначительное (в пределах ошибки эксперимента) увеличение доли МВНб. Наблюдаемое отличие в действии нитрита и нитрозотиолов можно объяснить, исходя из особенностей строения этих веществ. Нитрозотиолы непосредственно высвобождают NO, который способен вступать в свободно-радикальные реакции. Нитрозотиолы содержат также и редокс-активную SH-группу, которая может окисляться с образованием тиильного радикала. Как было показано в предыдущих исследованиях (раздел. 3.1.3.), в условиях карбонильного стресса GSNO стимулирует образование свободно-радикальных интермедиатов, которые, в свою очередь, могут стимулировать реакции перекисного окисления липидов и образование новых порций активных карбонильных соединений, тем самым усиливая карбонильный стресс. Перечисленные

процессы могут индуцировать повреждение фосфолипидного бислоя и приводить к ковалентному связыванию гемоглобина с компонентами мембраны.

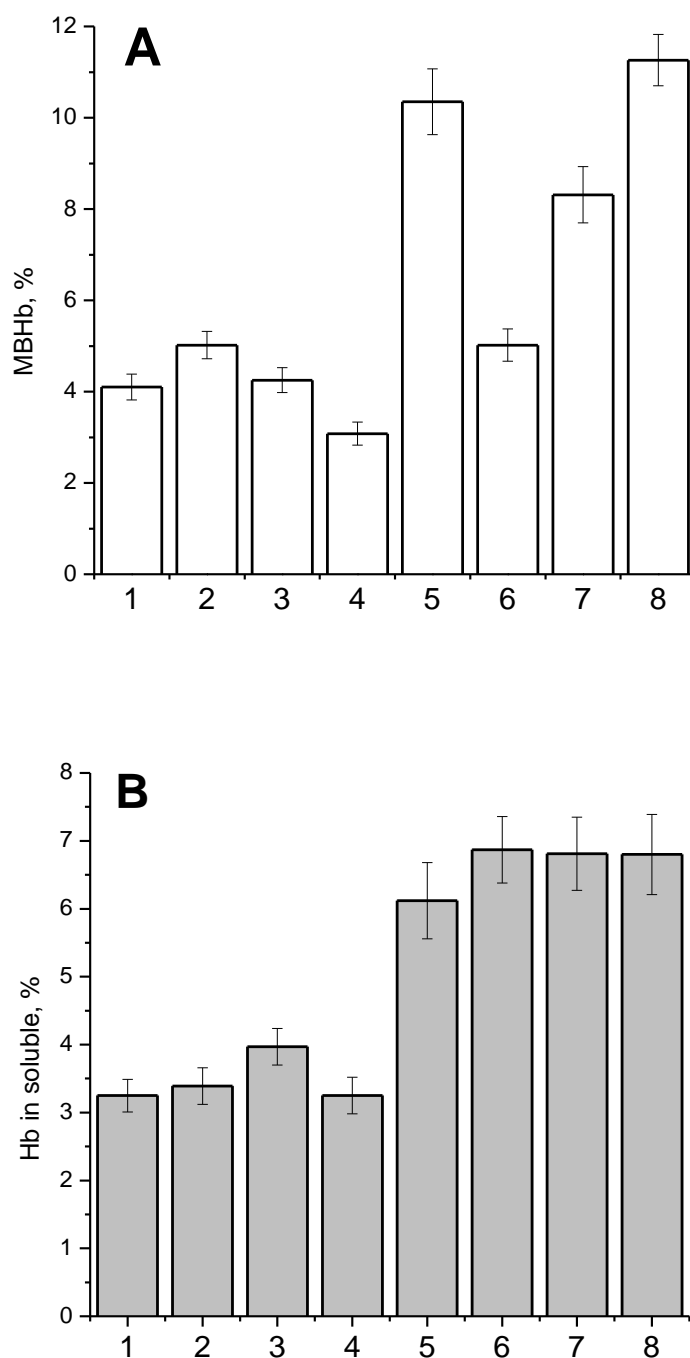


Рис. 45. Содержание Нб в мембранах (А) и гемолизате (В) при инкубации суспензии эритроцитов с MG (3 мМ) и NaNO₂/Cys-NO/GS-NO (0,8 мМ). 1 – без добавок, 2 – NaNO₂, 3 – Cys-NO, 4 – GS-NO, 5 – MG, 6 – MG + NaNO₂, 7 – MG + Cys-NO, 8 – MG + GS-NO. За 100% приняты показатели в эритроцитах без добавления редокс-активных веществ.

Вполне вероятно, что нитрит-ионы в восстановительных условиях реакции Майяра являются наиболее предпочтительным агентом для образования аддуктов оснований Шиффа с оксидом азота и динитрозильных комплексов железа с минимальным выходом свободно-радикальных интермедиатов. Восстановление нитрит-ионов до NO, который затем включается в комплексы с интермедиатами реакции Майяра, выводя их из дальнейших превращений, может быть еще одним объяснением наблюдаемого под действием NO₂⁻ ингибирования образования МВНб. Если сами по себе нитрит-ионы оказывают токсическое действие на эритроциты, то в условиях карбонильного стресса они могут оказывать протекторное действие.

CysNO и GSNO в разной степени ингибировали связывание гемоглобина с мембраной, индуцированное метилглиоксалем (рис. 45 А, 7 и 8). Этот эффект можно объяснить различной способностью цистеина и глутатиона образовывать аддукты с MG. Цистеин образует с MG стабильные аддукты, что выражается в снижении количества восстановленных SH-групп (рис. 46). Реакция MG с глутатионом носит равновесный характер, образование тиогемиацетала происходит только при значительном избытке GSH, что имеет место в физиологических условиях. В условиях эксперимента клетки скорее испытывают недостаток GSH, который расходуется в глиоксалазной реакции [Valentine et al., 1970; Larsen et al., 1985; Thornalley et al., 1989].

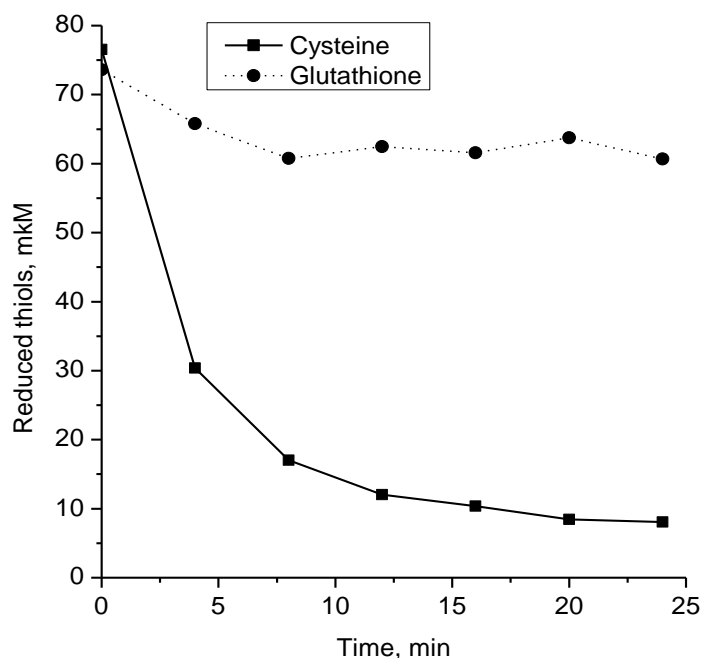


Рис. 46. Динамика изменения восстановленных SH-групп цистеина и глутатиона при инкубации их с метилглиоксалем (R-SH : MG = 1 : 1). Состав реакционной смеси описан в разделе «Материалы и методы».

Во всех вариантах опытов с суспензией эритроцитов, инкубированных с метилглиоксалем, количество внеклеточного Hb возросло примерно в два раза по сравнению с эритроцитами, обработанными только донорами NO (рис. 45 В). Этот эффект, по-видимому, связан с повреждением эритроцитарных мембран свободнорадикальными интермедиатами, образующимися в реакции MG с аминокислотными остатками и NO-донорными соединениями.

Что касается эффектов, вызванных нитритными ионами, то они могут быть разнонаправленными. С одной стороны, NO_2^- в реакции с охуHb приводят к образованию свободнорадикальных метаболитов (NO_2^\cdot и H_2O_2), которые стимулируют процессы перекисного окисления липидов и окисление гемоглобина до Hb-[Fe^{IV}=O] [Zavodnik et al., 1999; Gow et al., 1999; Keszler et al., 2008], что способствует встраиванию гемоглобина и продуктов его окисления и деструкции (железо, гем и денатурированные формы Hb) в эритроцитарную мембрану [Sharma, Premachandra, 1991; Rocha et al., 2009; Mendanha et al., 2012]. С другой стороны, нитритные ионы восстанавливаются интермедиатами реакции Майяра до NO, который в реакции с основаниями Шиффа приводит к образованию их нитропроизводных, таким образом, купируя дальнейшее участие оснований Шиффа в свободнорадикальных превращениях с участием MG и O₂ (раздел 3.1.1). Поэтому при действии на эритроциты метилглиоксала нитрит-ионы нивелируют эффект, вызванный MG и не стимулируют переход Hb в связанное с мембранами состояние.

Метилглиоксаль также активно связывается с SH-группами Cys-93 β-цепей гемоглобина, причем степень модификации сульфгидрильных групп выше для охуHb, поскольку в R-конформации доступность SH-групп выше, чем в T-конформации (SH-эффект) [Aboluwoye et al., 1998]. Модификация Hb метилглиоксалем меняет зарядные характеристики молекулы, что повышает гидрофобность молекул гемоглобина и степень его ассоциации с мембраной. Имеются экспериментальные данные [Заводник, Лапшина, 1996], показывающие, что обработка Hb в течение одного часа малоновым и глутаровым диальдегидами облегчает процесс автоокисления охуHb. Эти альдегиды так же, как и метилглиоксаль, относятся к активным карбонильным соединениям, образуемым в результате реакций ПОЛ. Принимая во внимание этот факт, можно предположить, что в условиях карбонильного стресса существует сеть взаимоусиливающихся процессов, в результате которых образуются как АФК, так и новые АКС. Гемоглобин является основным компонентом этой сети свободнорадикальных реакций. Таким образом, переход Hb из растворимого в мембраносвязанное состояние при обработке эритроцитов высокими концентрациями MG и сопутствующий этому переходу гемолиз, указывают на

существование тесной связи между карбонильным стрессом и окислительным [Kalapos, 2008; Шумаев с соавт., 2009].

Следует особо отметить, что во всех вариантах эксперимента в присутствии метилглиоксаля окисления гемоглобина не происходило. Причиной этому может быть восстановление metHb, образующегося в реакции oxuHb с NO, редокс-активными интермедиатами реакции Майяра, как это было показано в наших предыдущих исследованиях (раздел 3.1.3).

Полученные результаты позволили сделать вывод, что нитрит-ионы по сравнению с нитрозотиолами индуцируют переход гемоглобина из растворимого в связанное с мембранами состояние, вероятно, за счет индукции окислительных процессов, в частности окисления SH-групп как самого гемоглобина, так и белков мембраны. В условиях обработки эритроцитов метилглиоксалем эффект был противоположным, что, как нам кажется, связано с тем, что ионы NO_2^- в этих условиях блокировали образование свободнорадикальных продуктов реакции Майяра. Нельзя исключить и тот факт, что низкие концентрации NO могут оказывать стабилизирующее действие на эритроцитарные мембраны посредством модуляции уровня MBHb (раздел 3.3.3.), который участвует в регуляции метаболического поведения клетки. Как известно, повышение уровня MBHb приводит к активации гликолитических ферментов и синтеза АТФ, а снижение — пентозофосфатного пути, поставляющего NADPH [Weber et al., 2004; Chu, Low, 2006; Chu et al., 2008]. Снижение содержания MBHb при обработке эритроцитов 0,4 мМ NaNO_2 (рис. 44 А, черная кривая) можно объяснить развитием адаптивной реакции, направленной на активацию пентозофосфатного пути. В работе [Атауллаханов с соавт., 1984b] было показано, что добавление нитрита к суспензии отмытых эритроцитов приводит к резкому увеличению потока через пентозофосфатный путь. Активация пентозофосфатного пути связана с потреблением NADPH и GSH в окислительных процессах. С этими данными согласуется и тот факт, что предобработка эритроцитов CysNO увеличивает поток глюкозы через пентозофосфатный путь [Misiti et al., 2002].

В заключение хотелось бы отметить, что колебания уровня MBHb в определенных концентрационных пределах носят компенсаторно-приспособительный характер, в то время как более значительное связывание Hb с компонентами мембраны, происходящее вследствие окислительных процессов, наоборот, дестабилизирует мембрану, вызывая гемолиз и выход гемоглобина в сосудистое русло.

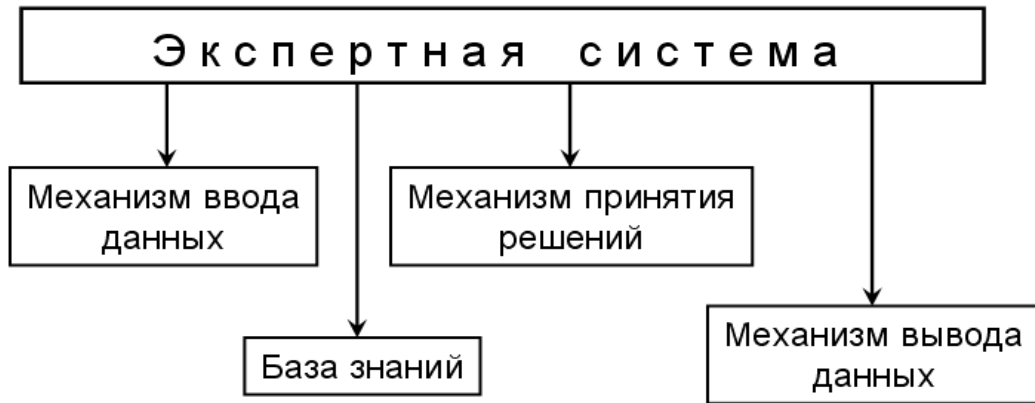
3.4. Создание компьютерной экспертной системы для диагностики анемий

Работа по созданию экспертной системы «BLOOD» проводилась совместно с кафедрой компьютерных медицинских систем Национального исследовательского ядерного университета "МИФИ" и клиничко-диагностической лабораторией РОНЦ РАМН. Данная система предназначена для использования в клинической практике в помощь врачу при диагностике анемий различного генеза. Структура компьютерной медицинской экспертной системы для диагностики анемий включает четыре основных блока: модель базы знаний, механизм принятия решений, механизмы ввода и вывода данных. Структура разработанной экспертной системы представлена в виде концептуальной модели (рис. 47).

База знаний включает следующие данные: информация о пациентах (ФИО, возраст, пол и диагноз, при его наличии; информация о нормальных значениях признаков, по которым производится непосредственный анализ), информация о результатах анализов с привязкой к конкретному пациенту; информация, носящая справочный характер (гlossарий и энциклопедия). Просмотр данных, содержащихся в базе данных, а также их редактирование реализовано с помощью нескольких форм. Из главной формы можно перейти к просмотру любого раздела базы данных с помощью кнопки «База данных» (доступ к информации о пациентах, признаках и результатах анализов).

Разработана концептуальная модель, показывающая, как структурирована информация в разных элементах экспертной системы. Модель базы знаний состоит из модуля анализа количественных и качественных показателей. К количественным показателям относятся количество эритроцитов (RBC) и лейкоцитов (WBC), концентрация гемоглобина (HGB), содержание гематокрита (HCT), средний объем эритроцита (MCV), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), количество тромбоцитов (PLT), ширина распределения эритроцитов — стандартное отклонение (RDW-SD), ширина распределения эритроцитов — коэффициент вариации (RDW-CV), ширина распределения тромбоцитов по объему (PDW), средний объем тромбоцита (MPV), а также данные анализатора лейкоцитарной формулы: количество нейтрофилов (NEUT), лимфоцитов (LYMPH), моноцитов (MONO), эозинофилов (EO), базофилов (BASO), ретикулоцитов (RET), незрелых гранулоцитов (IG) и среднее содержание гемоглобина в ретикулоците (RET-HE). В дополнение к стандартным количественным показателям, мы считаем необходимым ввести еще один диагностический показатель — уровень мембраносвязанного гемоглобина в эритроцитах.

I.



II.

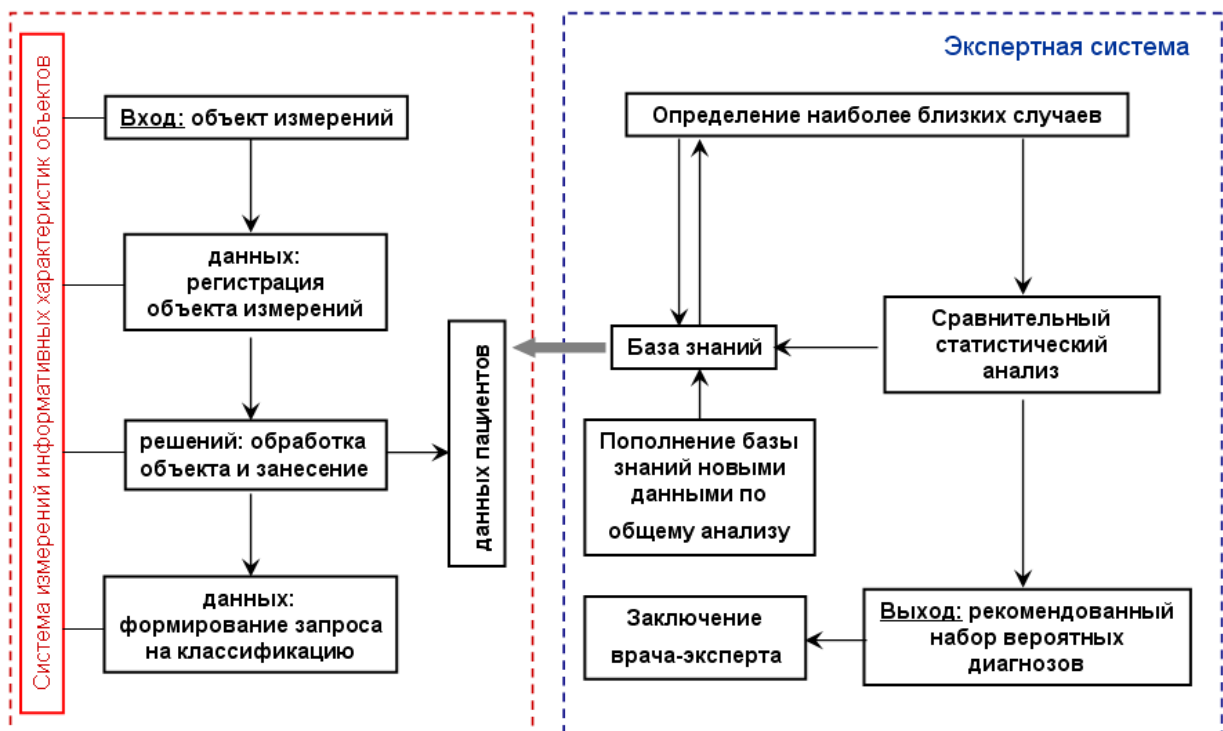


Рис. 47. Концептуальная модель диагностической экспертной системы. I — общий вид, II — расширенная версия.

Экспертная система «BLOOD» реализована в среде Qt Creator, система управления базами данных: sqlite. В настоящий момент выборка включает 350 пациентов РОНЦ РАМН им. Н.Н. Блохина различных половозрастных групп, перенесших онкологические заболевания, с диагностированной анемией (анемия хронических заболеваний — АХЗ, железодефицитная анемия — ЖДА, МГА — микроангиопатическая гемолитическая анемия). Экспертная система проводит вероятностную оценку и постановку диагноза на основе метода эталонов. При загрузке модуля диагностики

программа производит анализ всех имеющихся в базе случаев, сортирует данные по имеющимся диагнозам и находит эталонные значения признаков для каждого из них. Впоследствии, при выборе пациента, система сравнивает его параметры с полученными эталонами и для каждого из признаков выбирает наиболее близкий. После этого, на основе совокупности полученных данных для массива признаков, выдается вероятностная оценка наличия у пациента каждого из представленных в базе заболеваний.

Экспертная система «BLOOD» содержит возможность работы с базой знаний, а именно просмотр, редактирование, добавление новых элементов, проведение сравнительного анализа и статистическую постановку диагноза на основе имеющихся в базе случаев. Отдельными компонентами системы являются справочник, содержащий необходимую информацию о заболеваниях, методах диагностики и лечения, и глоссарий, включающий в себя все связанные с темой термины и понятия. Для увеличения достоверности прогноза необходимо добавление как можно большего количества исходных данных (не менее 100 пациентов для каждого из заболеваний).

Была проведена проверка работоспособности экспертной системы по обработке имеющихся данных на всех доступных пациентах. С этой целью было проведено добавление информации по 350 пациентам и 48 признакам. Получившиеся в итоге формы представлены на рисунках 48-51. Форма «Анализ» (рис. 50) представлена в виде таблицы, содержащей значения изучаемых параметров для всех имеющихся в базе случаев, привязанные к конкретным пациентам. В таблице применено цветовое кодирование информации: если значение признака укладывается в границы нормы, соответствующая ячейка окрашена зеленым цветом, если значение ниже нормы — желтым, если выше — красным. При отсутствии в базе данных информации по какому-либо признаку для данного пациента, то в соответствующей ячейке таблицы ставится прочерк и она выделяется серым цветом.

Был произведен анализ имеющихся случаев и поставлен вероятностный диагноз в каждом из них. Результаты, полученные в программе, представлены в табл. 9. По результатам проведенных экспериментов можно утверждать, что система в полной мере реализует все заявленные функции и верно определяет диагноз.

Код	Возраст	Пол	Диагноз
1	25	Ж	АХЗ
2	0	М	АХЗ
3	0	Ж	АХЗ
4	0	М	АХЗ
5	63	М	АХЗ
6	52	Ж	АХЗ
7	74	Ж	ЖДА
8	49	Ж	АХЗ
9	22	Ж	ЖДА
10	60	Ж	ЖДА
11	52	Ж	АХЗ
12	0	Ж	АХЗ
13	28	Ж	ЖДА
14	55	М	АХЗ

Рис. 48. Форма «Пациенты»

Код	Название	Границы нормы
1	Лейкоциты (WBC)	8.8-4
2	Эритроциты (RBC)	5.6-3.5
3	Гемоглобин (Hb)	16.5-11.5
4	Гематокрит (HCT)	48-36
5	Средний объем эритроцита (MCV)	100-80
6	Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH)	31-27
7	Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC)	38-32
8	Тромбоциты (PLT)	320-180
9	Ширина распределения эритроцитов - стандартное отклонение (RDW-SD)	54-37
10	Ширина распределения эритроцитов - коэффициент вариации (RDW-CV)	15-10
11	Ширина распределения тромбоцитов по объему (PDW)*	18-10
12	Средний объем тромбоцита (MPV)	11-7
13	Тромбокрит (PCT)	0.5-0.1
14	Нейтрофилы (NEUT%)	78-48
15	Лимфоциты (LYMPH%)	37-19
16	Моноциты (MONO%)	11-3
17	Эозинофилы (EO%)	5-0.5
18	Базофилы (BASO%)	1-0
19	Нейтрофилы (NEUT#)	6.8-2
20	Лимфоциты (LYMPH#)	3.2-1.1
21	Моноциты (MONO#)	0.8-0.1
22	Эозинофилы (EO#)	0.3-0
23	Базофилы (BASO#)	0.7-0
24	Нормобласты (NRBC%)	0-0
25	Ретикулоциты (RET%)	1.2-0.5
26	Среднее содержание гемоглобина в ретикулоците (RET-HE)	35-28
27	Незрелые гранулоциты (IG%)	0.45-0
28	Палочкоядерные нейтрофилы	6-0
29	Сегментоядерные нейтрофилы	78-48
30	Лимфоциты	37-19
31	Моноциты	11-3
32	Эозинофилы	5-1
33	Базофилы	1-0
34	Плазматические клетки	0-0
35	Миелоциты	0-0
36	Метамелоциты	0-0
37	Нормобласты	0-0
38	СОЭ по Вестергрену	30-0
39	Ферритин (иммуноферментный метод)	112-22
40	Растворимые рецепторы трансферрина (иммуноферментный метод)	1.2-0.5
41	Ретикулоциты	1.2-0.8
42	Абсолютное количество ретикулоцитов	70-30
43	Средняя концентрация гемоглобина в ретикулоците (Ret-Hb)	36.4-28.2
44	Фракция незрелых ретикулоцитов (IRF)	14-2
45	IPF (Immature platelet fraction) - Фракция незрелых тромбоцитов	6-0
46	FRS - фрагментоциты	0.4-0.1
47	Эритропоэтин (иммуноферментный метод)	32.9-4.3
48	Свободный гемоглобин в плазме крови (гемоглобинцианидный метод)	0.4-0.09

Рис. 49. Форма «Параметры»

Табл. 9. Сравнение результатов диагнозов, поставленных в клиничко-диагностической лаборатории РОНЦ РАМН и результатов, полученных с помощью экспертной системы «BLOOD».

ПАЦИЕНТ №	КЛИНИКО- ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ	ЭКСПЕРТНАЯ СИСТЕМА «BLOOD»		
		ЖДА	МГА	АХЗ
1	ЖДА	65.85%	12.19%	21.95%
2	МГА	26.82%	43.90%	29.26%
3	МГА + ЖДА	33.30%	38.88%	27.77%
4	-	41.37%	34.48%	24.13%
5	АХЗ	41.46%	26.82%	31.70%
6	АХЗ + ЖДА	41.86%	25.58%	32.55%
7	МГА	19.04%	61.90%	19.04%
8	АХЗ	26.31%	28.94%	44.73%
9	АХЗ + ЖДА	43.90%	14.63%	41.46%
10	АХЗ	30.76%	30.76%	38.46%
11	АХЗ + ЖДА	42.85%	28.57%	28.57%
12	-	34.78%	30.43%	34.78%
13	АХЗ + МГА	7.14%	47.61%	45.23%
14	МГА + ЖДА	51.28%	20.51%	28.20%

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Составной частью метаболизма являются неферментативные реакции, включающие образование и окислительно-восстановительные превращения реакционноспособных соединений: активных форм кислорода, азота, серы, галогенов и активных карбонильных соединений. Все эти разные по химическому строению и свойствам вещества объединяет одно общее качество — способность спонтанно вступать в реакции с аминокислотными остатками белков. Редокс-активные метаболиты совместно с системами, их элиминирующими (антиоксидантные и антигликирующие ферменты и низкомолекулярные метаболиты) образуют единую систему. Ферментативные системы детоксикации — это не единственные регуляторы редокс-метаболизма. Модулирующее действие на редокс-метаболизм оказывают ионы металлов переменной валентности. Еще один способ регуляции заключается в организации реакций в виде циклической последовательности, что наделяет систему каталитическими и авторегуляторными свойствами. Как правило, химические пути редокс-активных соединений пересекаются, образуя сеть реакций с определенными узлами. Одним из таких узлов неферментативного редокс-метаболизма являются динитрозильные комплексы железа.

Мы считаем, что при изучении действия редокс-активных веществ на биологическую систему необходимо учитывать их взаимовлияние. В качестве примера, разъясняющего этот тезис, мы кратко опишем действие доноров оксида азота на исход процесса неферментативной модификации гемоглобина метилглиоксалем. В ходе работы над диссертацией было установлено, что нитрозоглутатион увеличивает образование радикальных интермедиатов реакции лизина с метилглиоксалем, что приводит к восстановлению и нитрозилированию гемоглобина. С другой стороны, нитрозоглутатион ингибирует модификацию гемоглобина метилглиоксалем и образование межбелковых сшивок. При действии на эритроциты, предварительно обработанные метилглиоксалем, нитрозоглутатион не оказывает цитопротекторное действие. Нитрозоглутатион также в некоторых случаях является источником активных форм азота, вызывающих необратимую модификацию порфирина (образование нитриметгемоглобина). Полученные результаты обобщены в виде схемы, на которой представлены основные пути образования продуктов и свободнорадикальных интермедиатов, возникающих в системе Hb–GSNO–MG (рис. 52). Присутствие в системе кислорода и/или оксида азота определяет характер и степень ковалентной модификации гемоглобина. Эта схема является иллюстрацией сети превращений, которые сопровождают обмен метаболитов оксида азота, активных карбонильных соединений и гемоглобина в норме и при патологии.

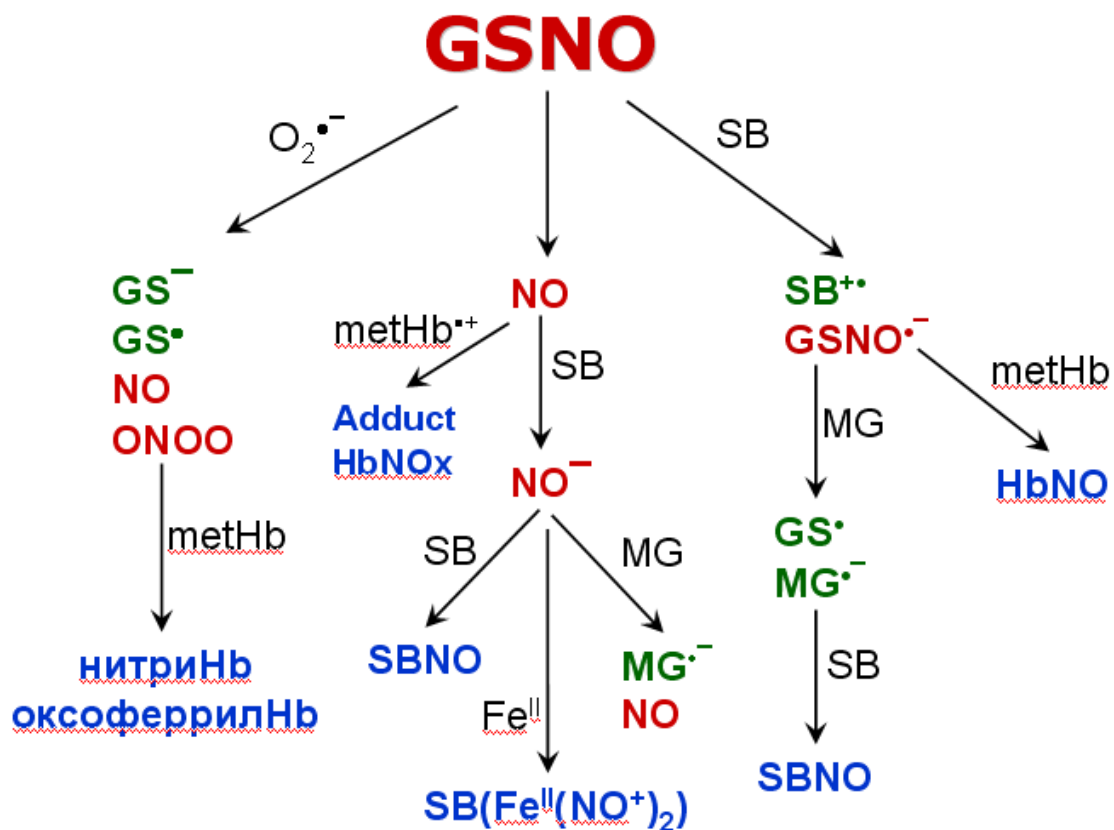


Рис. 52. Набор продуктов и свободнорадикальных интермедиатов, образующихся в реакции S-нитрозоглутатиона с метилглиоксальем в присутствии гемоглобина. Обозначения: R-SNO – нитрозотиолы (нитрозоглутатион, нитрозоцистеин), MG –метилглиоксаль, SB (Schiff base) – основание Шиффа, SBNO – аддукт основания Шиффа с NO, $SB(Fe^{II}(NO^+)_2)$ – динитрозильные комплексы железа, связанные с основаниями Шиффа, нитриHb – нитрованный по винильной группе порфиринового кольца гемоглобин, metHb – окисленный гемоглобин, $metHb^{•+}$ – связанный с гемоглобином катион-радикала основания Шиффа, оксоферрилHb – оксоферрильная форма гемоглобина ($Hb-Fe^{IV}=O$).

ВЫВОДЫ

- 1) Физиологические метаболиты оксида азота (*S*-нитрозоглутатион, динитрозильные комплексы железа, нитроксильный анион, нитрит анион) ингибируют реакцию неферментативного гликирования аминокислотных остатков гемоглобина и карнозина, индуцированную метилглиоксалем.
- 2) Показано образование динитрозильных комплексов железа с продуктами модификации гемоглобина и карнозина метилглиоксалем. Формирование ДНКЖ является одним из механизмов антигликирующего действия метаболитов оксида азота.
- 3) Нитрозоглутатион в условиях карбонильного стресса стимулирует образование редокс-активных соединений, которые могут быть нитрозилирующими и нитрующими агентами для метгемоглобина, а также вызывать окислительную модификацию гемоглобина и его связывание с компонентами мембраны эритроцита.
- 4) Разработана спектрофотометрическая методика оценки доли мембраносвязанного гемоглобина в эритроцитах, позволяющая обнаруживать менее 0,1% МВНб в образце. Установлен диапазон нормальных значений для МВНб: 3,3% – 4,9%.
- 5) Среди обследованных онкологических больных, которым была назначена химиотерапия, несоответствие норме уровня МВНб наблюдалось у 61%, в то время как в контрольной группе эта величина составляла 36%. Среди пациентов с диагностированной анемией данный показатель составлял 74%, в контрольной группе — 35%.
- 6) Разработана пилотная версия компьютерной экспертной системы для диагностики анемий у онкобольных, учитывающая данные о содержании мембраносвязанного гемоглобина.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю свою искреннюю благодарность моему научному руководителю заведующему лабораторией биохимии азотфиксации и метаболизма азота ФИЦ Биотехнологии РАН, профессору научно-образовательного центра по биоинженерии доктору биологических наук Алексею Федоровичу Топунову за приглашение работать в лаборатории, предложенную тему, постоянную поддержку и внимание.

Хочу поблагодарить старших научных сотрудников этой же лаборатории кандидата биологических наук Ольгу Владимировну Космачевскую за обучение меня всем необходимым лабораторным методикам и повседневную помощь в работе, а также доктора биологических наук Константина Борисовича Шумаева за помощь в работе с динитрозильными комплексами железа и в экспериментах по ЭПР спектроскопии. Благодарю всех сотрудников лаборатории за неизменно доброжелательное отношение ко мне и моей работе.

Хочу выразить свою признательность старшему научному сотруднику лаборатории биоэнергетики ФИЦ Биотехнологии РАН кандидату биологических наук Владимиру Вениаминовичу Шубину за высококвалифицированную помощь при спектрофотометрических исследованиях.

Неоценимую помощь в работе по созданию компьютерной экспертной системы оказали заведующий кафедрой «Компьютерные медицинские системы» Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ» доктор технических наук профессор Валентин Григорьевич Никитаев, коллектив кафедры и ее выпускник Константин Ключев, за что я выражаю им всем свою искреннюю благодарность.

Также хочу поблагодарить ведущего научного сотрудника клинко-диагностической лаборатории Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина доктора биологических наук Валентину Николаевну Блиндарь за предоставленные образцы крови пациентов и консультацию при проведении гематологических исследований.

Огромное спасибо и низкий поклон всей моей семье, оказывавшей мне постоянную моральную и материальную поддержку все эти долгие годы работы над диссертацией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Александров В.Я. Реактивность клеток и белки. / Л.: Наука, 1985. 318 с.
- Атауллаханов Ф.И., Витвицкий В.М., Жаботинский А.М., Кияткин А.Б., Пичугин А.В. Стационарная зависимость скорости восстановления метгемоглобина от его концентрации в интактных эритроцитах человека. // *Биохимия*. 1984б. Т. 49. № 2. С. 193-197.
- Атауллаханов Ф.И., Витвицкий В.М., Жаботинский А.М., Пичугин А.В., Помазанов В.В., Титкова Н.Ф. Влияние гликолиза на метаболизм аденилатов в эритроцитах человека. // *Биохимия*. 1984а. Т. 49. № 1. С. 104-110.
- Баркрофт Дж. Основные черты архитектуры физиологических функций. / М.-Л.: Биомедгиз, 1937. 318 с.
- Белых И.А., Воловельская Е.Л., Зинченко В.Д. Влияние малых доз озона на гипертонический лизис эритроцитов. // *Проблемы криобиологии*. 2007. Т. 17. № 3. С. 237-242.
- Бердникович Е.Ю., Козин Р.Г., Кулябичев Ю.П., Никитаев В.Г., Проничев А.Н., Сельчук В.Ю., Харaziшвили Д.В., Чистов К.С., Чистяков С.С. Компьютерные медицинские системы интеллектуальной поддержки принятия решения. Учебное пособие. / М.: НИЯУ МИФИ, 2011. 216 с.
- Блиндарь В.Н., Никитаев В.Г., Нагуманова Ю.Ф., Проничев А.Н., Чистов К.С. Экспертная система для диагностики острых лейкозов // *Спецтехника и связь*. 2011. № 4-5. С. 74-78.
- Вальовка Г.Й., Назаренко В.І., Коробов В.М., Великий М.М. Фізико-хімічна характеристика і функціональні властивості мембранозв'язаного гемоглобину. // *Укр. Біохим. Журн.* 1998. Т. 70. № 1. С. 59-63.
- Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами: физикохимия, биология, медицина. / М.: Ин-т комп. Исследований, 2015. 219 с.
- Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции и резистентность организма. / Ростов-на-Дону: Изд-во Ростовского ун-та, 1979. 128 с.
- Голубев А.Г. Изнанка метаболизма. // *Биохимия*. 1996. Т. 61. № 11. С. 2018-2039.
- Григорьева Д.В., Горудко И.В., Терехова М.С., Шамова Е.В., Панасенко О.М., Шумаев К.Б., Ванин А.Ф., Черенкевич С.Н. Антиоксидантное и антирадикальное действие динитрозильных комплексов железа. // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Международная научная конференция: Двенадцатый съезд белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, Минск, 28-30

июня 2016 г.: Сборник статей: в двух частях. Минск: Издательский центр БГУ, 2016. Ч. 2. С. 200-203.

Громов П.С., Захаров С.Ф., Шишкин С.С., Ильинский Р.В. Двумерная карта мембранных белков эритроцитов человека. // *Биохимия*. 1988. Т. 53. № 8. С. 1316-1326.

Гусев Н.И., Уразов Д.В. Роль гемоглобина в формировании кооперативных свойств эритроцитов у некоторых позвоночных животных. / Ижевск: Издательский дом «Удмуртский Университет». 2008. 148 с.

Давыдов В.В., Божков А.И. Метаболизм эндогенных альдегидов: участие в реализации повреждающего действия оксидативного стресса и его возрастные аспекты. // *Биомедицинская химия*. 2003. Т. 49. № 4. С. 374-387.

Заводник И.Б., Лапшина Е.А. Процессы окисления гемоглобина человека. // *Биохимия*. 1996. Т. 61. № 1. С. 42-48.

Зайцева О.И., Терещенко В.П., Манчук В.Т., Прахин Е.И., Эверт Л.С., Нягашкина Е.И. Варианты реактивности клеточных мембран и их роль в формировании метаболической адаптации у здоровых детей. // *Фундаментальные исследования. Биологические науки*. 2004. № 6. С. 18-21.

Иржак Л.И. Гемоглобины и их свойства. / М.: Наука, 1975. 240 с.

Кленова Н.А. Механизмы дестабилизации эритроцитарных клеток в условиях лактоцидоза и действия нитрозотиолов. // *Вестник СамГУ-естественнонаучная серия*. 2002. № 2(24). С. 158-162.

Кленова Н.А., Языкова М.Ю. Влияние экзогенных нитрозотиолов на состояние гемоглобина эритроцитов человека. // *Сборник научных трудов «Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии»* 2004, выпуск 1.

Комиссарчик Я.Ю., Левин С.В., Свиридов Б.Е., Сабалаяускас И.Ю., Айдитите Г.С. Стабилизирующая роль примембранных белков в поддержании структурной целостности клеточных мембран. // *Сборник научных трудов «Общие механизмы клеточных реакций на повреждающие воздействия»*. Л.: «Институт цитологии». 1977. 202 с.

Корсаков С.Н. Начертание нового способа исследования при помощи машин, сравнивающих идеи. / М.: МИФИ. 2009. 44 с. [Пер. с франц.: Karsakof S. Apercu d'un procede nouveau d'investigation au moyen de machines a comparer les idees. / St. Petersburg. 1832. 22 p., 2 pl.].

Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Гемоглобины – разнообразие структур и функций. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2009. Т. 45. № 6. С. 627-653.

Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Метод определения содержания гемоглобинподобных белков в гетерогенных смесях. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2007. Т. 43. № 3. С. 347-353.

Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Образование гликированного рекомбинантного леогоглобина в клетках *Esherichia coli*. // *Прикл. биох. микробиол.* 2010. Т. 46. № 3. С. 324-330.

Космачевская О.В., Шумаев К.Б., Топунов А.Ф. Карбонильный стресс у бактерий: причины и последствия. // *Успехи биологической химии*. 2015. Т. 55. С. 49–82.

Космачевская О.В., Шумаев К.Б., Топунов А.Ф. Сигнальное и регуляторное действие метилглиоксаля в эукариотических клетках. // *Прикл. биох. микробиол.* 2017. Т. 53. № 3. С. 253-270.

Костычев С., Бриллиант В. Синтез азотистых веществ после автолиза дрожжей II. // *Изв. Имп. Акад. Наук*. 1916. Т. 12. С. 953-970.

Кузин А.М. Идеи радиационного гормезиса в атомном веке. / М.: Наука, 1995. 156с.

Лунева О.Г., Браже Н.А., Фадюкова О.Е., Алахая М.Я., Байжуманов А.А., Паршина Е.Ю., Демидова А.Е., Кошелев В.Б., Максимов Г.В. Изменение вязкости плазматической мембраны конформации гемопорфирина гемоглобина эритроцитов при ишемии и репрофузии мозга крыс. // *Доклады Академии наук*. 2005. Т. 405. № 6. С. 834-836.

Лунева О.Г., Сидоренко С.В., Максимов Г.В., Григорчик Р., Орлов С.Н. Эритроциты как регуляторы сосудистого тонуса. // *Биологические мембраны*. 2015. Т. 32. № 4. С. 223-234.

Маюрова Т.В. Особенности оксидативных процессов у спортсменов-конькобежцев. // *Вестник ЮУрГУ*. 2012. № 28. С. 126-128.

Насонов Д.Н. Местная реакция протоплазмы и распространяющееся возбуждение. / М.-Л.: Издательство Академии наук СССР, 1962. 426 с.

Никитаев В.Г., Воробьев И.А., Блиндарь В.Н., Блиндарь В.Н., Бередникович Е.Ю., Голоденко В.И., Зайцев С.М., Зубрихина Г.Н., Комаров В.В., Матвеева И.И., Проничев А.Н., Погорелов А.Г., Сущенко И.Б., Харaziшвили Д.В., Чистов К.С., Чуракова Ж.В., Шеваль Е.В., Широкова В.И. Компьютерные системы гематологической диагностики. Введение. // М.: «Трoвант», 2006. 168 с.

Оганесян А.С., Габриелян А.Р., Оганесян С.С. Чувствительность эритроцитов к электромагнитным волнам миллиметрового диапазона как фактор определения стресса. // II съезд биофизиков России. Тезисы. М., 1999. <http://www.library.biophys.msu.ru/gettext?Serial=75701>.

Опарин А.И. Материя. Жизнь. Интеллект. / М.: Наука, 1977. 203 с.

Панасенко О.М., Горудко И.В., Соколов А.В. Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах. // *Успехи биологической химии*. 2013. Т.53. С.195–244.

Пивоваров Ю.И., Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г., Корякина Л.Б. Способ оценки устойчивости эритроцитов к функциональной нагрузке. / Патент Российской Федерации на изобретение № 2008108370/15 от 03.03.2008.

Северина И.С., Бусыгина О.Г., Пятакова Н.В. Карнозин как регулятор растворимой гуанилатциклазы. // *Биохимия*. 2000. Т. 65. № 7. С. 921-927.

Сент-Дьёрдьи А. Биоэлектроника. Исследование в области клеточной регуляции, защитных механизмов и рака. Пер. с англ. / М.: Мир, 1971. 80 с.

Тимошин А.А., Орлова Ц.Р., Ванин А.Ф., Санина Н.А., Руге Э.К., Алдошин С.М., Чазов Е.И. Динитрозильные комплексы железа – новый тип гипотензивных препаратов. // *Российский Химический журнал*. 2007. Т. 51. № 1. С. 88-92.

Токтамысова З.С., Биржанова Н.Х. О мембраносвязанном гемоглобине. // *Биофизика*. 1990. Т. 35. № 6. С. 1019-1020.

Топунов А.Ф., Голубева Л.И. Редуктазы, восстанавливающие кислородпереносящие гемопротеиды: гемоглобин, миоглобин и левоглобин. // *Успехи биологической химии*. 1989. Т.30. С.239-252.

Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Физика белка: Курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями. / М.: Книжный дом «Университет», 2002. 376 с.

Шамова Е.В., Бичан О.Д., Дрозд Е.С., Горудко И.В., Чижик С.А., Шумаев К.Б., Черенкевич С.Н., Ванин А.Ф. Регуляция функциональных и механических свойств тромбоцитов и эритроцитов донорами монооксида азота. // *Биофизика*. 2011. Т. 56. № 2. С. 265-271.

Шевченко О.Г. Влияние ионов уранила в наномолярных концентрациях на чувствительность эритроцитов *in vitro* к действию факторов, провоцирующих острый окислительный стресс. // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2014. Т. 54. № 4. С. 377-384.

Шпакова Н.М., Нипот Е.Е., Орлова Н.В., Александрова, Д.И., Шапкина О.А. Осмотическая чувствительность эритроцитов млекопитающих после их истощения по АТФ. // *Доповіді Національної академії наук України*. 2013. № 1. С. 151-155.

Шперлинг И.А., Рязанцева Н.В., Куприна Н.П., Филиппова О.Н., Рогов О.А., Акимова В.В., Бас В.В. О составе мембранно-связанного гемоглобина при метгемоглобинемиях. // *Материалы конференции «Современные наукоемкие технологии»*. 2004. С. 104-105.

Шумаев К.Б., А.А. Губкин, С.А. Губкина, Л.Л. Гудков, Свиряева И.В., Тимошин А.А., Топунов А.Ф., Ванин А.Ф., Рууге Э.К. Взаимодействие динитрозильных комплексов железа с интермедиатами окислительного стресса. // *Биофизика*. 2006. Т. 51. № 3. С. 472-477.

Шумаев К.Б., Губкина С.А., Ванин А.Ф., Бурбаев Д.Ш., Мох В.П., Топунов А.Ф., Рууге Э.К. Образование нового типа динитрозильных комплексов железа, связанных с цистеином, модифицированным метилглиоксалем. // *Биофизика*. 2013. Т. 58. № 2. С. 239–245.

Шумаев К.Б., Губкина С.А., Гудков Л.Л., Лакомкин В.Л., Топунов А.Ф., Ванин А.Ф., Рууге Э.К. Взаимодействие связанных с альбумином динитрозильных комплексов железа и активных форм кислорода. // *Биофизика*. 2007. Т. 52. № 3. С. 534-538.

Шумаев К.Б., Губкина С.А., Кумскова Е.М., Шепелькова Г.С., Рууге Э.К., Ланкин В.З. Механизм образования супероксидного радикала при взаимодействии L-лизина с дикарбонильными соединениями. // *Биохимия*. 2009. Т. 74. № 4. С. 568-574.

Шумаев К.Б., Петрова Н.Э., Заббарова И.В., Ванин А.Ф., Топунов А.Ф., Ланкин В.З., Рууге Э.К. Взаимодействие оксоферрилмиоглобина и динитрозильных комплексов железа. // *Биохимия*. 2004. Т. 69. № 5. Р. 699-705.

Шурхина Е.С., Нестеренко В.М., Цветаева Н.В., Никулина О.Ф. Атауллаханов Ф.И. Метод исследования распределения эритроцитов по плотности. Практические рекомендации. // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014. № 6. С. 41-46.

Яхно Т.А. Агрегатное состояние и кооперативные реакции компонентов цельной крови в норме и патологии. / Дис.... докт. биол. наук. Пушино: ИТЭБ РАН, 2011. 298 с.

Aboluwoye C.O., Adebayo E.A., Egunlusi D., Tijani K., Bolaji S., Olayinka S. Effect of conformation and spin state on sulphhydryl reactivities of hemoglobins. // *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 1998. V. 12. P. 17-25.

Abugo O.O., Rifkind J.M. Oxidation of hemoglobin and the enhancement produced by nitroblue tetrazolium. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 24845–24853.

Aldini G., Maffei-Fracino R., Beretta G., Carini M. Carnosine and related dipeptides as quenchers of reactive carbonyl species: from structural studies to therapeutic perspectives. // *BioFactors*. 2005. V. 24. P. 77-87.

Allaman I., Bélanger M., Magistretti P.J. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. // *Front. Neurosci.* 2015. V. 9. doi: 10.3389/fnins.2015.00023.

Alomar F. Singh J., Jang H.S., Rozanski G.J., Shao C.H., Padanilam B.J., Mayhan W.G., Bidasee K.R. Methylglyoxal impairs endothelial cell-mediated vasodilatation of cerebral microvessels in type 1 diabetic rats. // *Br. J. Pharmacol.* 2016. doi: 10.1111/bph.13617.

Anderson H.M., Turner J.C. Preparation and the haemoglobin content of red cell "ghosts". // *Nature (Lond.)* 1959. V. 183. P. 112.

Anderson H.M., Turner J.C. Relation of hemoglobin to the red cell membrane. // *J. Clin. Invest.* 1960. V. 39. P. 1.

Angelo M., Hauslanden A., Singel D.J., Stamler J.S. Interaction of NO with hemoglobin: from microbes to man. // *Methods in Enzymology.* 2008. V. 436. P. 131-168.

Antonelou M.H., Kriebardis A.G., Papassideri I.S. Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice. // *Blood Transfus.* 2010. V. 8. P. 39-47.

Asahi K., Ichimori K., Nakazawa H., Izuhara Y., Inagi R., Watanabe T., Miyata T., Kurokawa K. Nitric oxide inhibits the formation of advanced glycation end products. // *Kidney Int.* 2000. V. 58. P. 1780–1787.

Augusto O., Bonini M.G., Amanso A.M., Linares E., Santos C.C., De Menezes S.L. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. // *Free Radic. Biol. Med.* 2002. V. 32. P. 841–859.

Bakhtiari N., Hosseinkhani S., Larijani B., Mohajeri-Tehrani M.R., Fallah A. Red blood cell ATP/ADP and nitric oxide: The best vasodilators in diabetic patients. // *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders.* 2012. V. 11. P. 1-7.

Baran E.J. Metal complexes of carnosine. // *Biochemistry (Moscow).* 2000. V. 65. P. 789–797.

Barski O.A., Tipparaju S.M., Bhatnagar A. The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. // *Drug Metab. Rev.* 2008. V. 40. P. 553-624.

Barvitenko N.N., Adragna N.C., Weber R.E. Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance. // *Cell Physiol. Biochem.* 2005. V. 15. P. 1-18.

Barvitenko N.N., Adragna N.C., Weber R.E. Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance. // *Cell Physiol. Biochem.* 2005. V.15. P.1-18.

Battah S., Ahmed N., Thornally P.J. Novel anti-glycation therapeutic agents: glyoxylase-1-mimetics. // *Int. Congr. Ser.* 2002. V. 1245. P. 107–111.

Baynes J.W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. // *Diabete.* 1991. V. 40. P. 405–412.

Beckman J.S., Koppenol W.H. Nitrogen oxides, the good, the bad, and the ugly. // *Am. J. Physiol.* 2002. V. 26. P. 115-127.

Belcher J.D., Chen C., Nguyen J., Milbauer L., Abdulla F., Alayash A.I., Smith A., Nath K.A., Hebbel R.P., Vercellotti G.M. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. // *Blood*. 2014. V. 123. P. 377-390.

Bergfeld G.R., Forrester T. Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. // *Cardiovasc. Res*. 1992. V. 26. P. 40-47.

Berlanga J., Cibrian D., Guillén I., Freyre F., Alba J.S., Lopez-Saura P., Merino N., Aldama A., Quintela A.M., Triana M.E., Montequin J.F., Ajamieh H., Urquiza D., Ahmed N., Thornalley P.J. Methylglyoxal administration induces diabetes-like microvascular changes and perturbs the healing process of cutaneous wounds. // *Clin. Sci*. 2005. V. 109. P. 83-95.

Biswas U.K., Kumar A. Study on the changes of Carbonic Anhydrase activity in insulin resistance and the effect of methylglyoxal. // *J. Pak. Med. Assoc*. 2012. V.62. P.417-421.

Blank M., Wollberg J., Gerlach F., Reimann K., Roesner A., Hankeln T., Fago A., Weber R.E., Burmester T. A Membrane-bound vertebrate globin. // *PLoS ONE*. 2011. V. 6. P. 1-9.

Bolognesi M., Bordo D., Rizzi M., Tarricone C., Ascenzi P. Nonvertebrate hemoglobins: structural bases for reactivity. // *Prog. Biophys. Mol. Biol*. 1997. V. 68. P. 29–68.

Bonamore A., Farina A., Gattoni M., Schininà M.E., Bellelli A., Boffi A.. Interaction with membrane lipids and heme ligand binding properties of *Escherichia coli* flavohemoglobin. // *Biochem*. 2003. V. 42. P. 5792–5801.

Bonamore A., Gentili P., Schininà M.E., Ilari A., Boffi A.. The flavohemoglobin from *Escherichia coli* is an efficient alkylhydroperoxide reductase. // *J. Biol. Chem*. 2003. V. 278. P. 22272–22277.

Bondoc L.L., Timkovich R. Structural characterization of nitrimyoglobin // *J. Biol. Chem*. 1989. V. 264. P. 6134-6146.

Bor-Kucukatay M., Wenby R.B., Meiselman H.J., Baskurt O.K. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. // *Am J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2003. V. 284. P. 1577-1584.

Bourajjaj M., Stehouwer C.D.A., van Hinsbergh V.W.M., Schalkwijk C.G. Role of methylglyoxal adducts in the development of vascular complications in diabetes mellitus. // *Biochem. Soc. Trans*. 2004. V. 31. P. 1400-140.

Bowman Z.S., Morrow J.D., Jollow D.J., McMillan D.C. Primaquine-induced hemolytic anemia: role of membrane lipid peroxidation and cytoskeletal protein alterations in the hemotoxicity of 5-hydroxyprimaquine. // *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2005. V. 314. P. 838-845.

Breitling-Utzmann C.M., Unger A., Friedl D.A., Lederer M.O. Identification and quantification of phosphatidylethanolamine-derived glucosylamines and aminoketoses from human erythrocytes--influence of glycation products on lipid peroxidation. // *Arch. Biochem. Biophys*. 2001. V. 391. P. 245-254.

Bryszewska M. Interaction of normal and glycated human haemoglobin with erythrocyte membranes from normal and diabetic individuals. // *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1988. V. 26. P. 809-813.

Bryszewska M., Szosland K. Association between the glycation of erythrocyte membrane proteins and membrane fluidity. // *Clin. Biochem.* 1988. V. 21. P. 49–51.

Bucala R., Cerami A., Tracey K.J. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. // *J. Clin. Invest.* 1991. V. 87. P. 432-438.

Buehler P.W., D'Agnillo F. Toxicological consequences of extracellular hemoglobin: biochemical and physiological perspectives. // *Antioxid. Redox. Signal.* 2010. V. 12. P. 275-291.

Bunn H.F. Modification of hemoglobin and other proteins by nonenzymatic glycosylation. // *Prog. Clin. Biol. Res.* 1981. V. 51. P. 223-239.

Burcham P.C. Kaminskas L.M., Tan D., Pyke S.M. Carbonylscavenging drugs and protection against carbonyl stress associated cell injury. // *Med. Chem.* 2008. V. 8. P. 319–330.

Calabrese V., Cornelius C., Dinkova-Kostova A.T., Calabrese E.J., Mattson M.P. Cellular stress responses, the hormesis paradigm, and vitagenes: novel targets for therapeutic intervention in neurodegenerative disorders. // *Antioxid. Redox Signal.* 2010. V. 13. № 11. P. 1763–1811.

Calabrese V., Colombrita C., Guagliano E., Sapienza M., Ravagna A., Cardile V., Scapagnini G., Santoro A.M., Mangiameli A., Butterfield A., Giuffrida A.M., Rizzarelli E. Protective effect of carnosine during nitrosative stress in astroglial cell cultures. // *Neurochem. Res.* 2005. V. 30. P. 797–807.

Cantu-Medellin N., Vitturi D. A., Rodriguez C., Murphy S., Dorman S., Shiva S., Zhou Y., Jia Y., Palmer A. F., Patel R. P. Effects of T-state and R-state stabilization on deoxyhemoglobinnitrite reactions and stimulation of nitric oxide signaling // *Nitric Oxide.* 2011. V. 25. P. 59–69.

Cao Z., Bell J.B., Mohanty J.G., Nagababu E., Rifkind J.M. Nitrite enhances RBC hypoxic ATP synthesis and the release of ATP into the vasculature: a new mechanism for nitrite-induced vasodilation. // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2009. V. 297. P. 1494–1503.

Casazza J.P., Felver M.E., Veech R.L. The metabolism of acetone in rat. // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. P. 231–236.

Castagnola M., Messana I., Sanna M.T., Giardina B. Oxygen-linked modulation of erythrocyte metabolism: state of the art. // *Blood Transfus.* 2010. V. 8. P. 53-58.

Chain M.K. Heme protein biosensors. // *Porphyrins and Phthalocyanines.* 2000. V. 4. P. 358-361.

Chan E., Desforges J.F. The role of disulfide bonds in Heinz body attachment to membranes. // *Blood*. 1974. V. 44. P. 926.

Chen K., Xie F., Liu S., Li G., Chen Y., Shi W., Hu H., Liu L., Yin D. Plasma reactive carbonyl species: Potential risk factor for hypertension. // *Free Radic. Res*. 2011. V. 45. P. 568-574.

Chu H., Breite A., Ciralo P., Franco R.S., Low P.S. Characterization of the deoxyhemoglobin binding site on human erythrocyte band 3: implications for O₂ regulation of erythrocyte properties. // *Blood*. 2008. V. 111. P. 932-938.

Chu H., Low P.S. Mapping of glycolytic enzyme-binding sites on human erythrocyte band 3. // *Biochem J*. 2006. V. 400. P. 143-151.

Chung H.S., Wang S.B., Venkatraman V., Murray C.I., Van Eyk J.E. Cysteine oxidative posttranslational modifications: emerging regulation in the cardiovascular system. // *Circulation Research*. 2013. V. 112. P. 382–392.

Clark S.L., Santin A.E., Bryant P.A., Holman R., Rodnick K.J. The initial noncovalent binding of glucose to human hemoglobin in nonenzymatic glycation. // *Glycobiology*. 2013. V. 11. P. 1250-1259.

Cokić V.P., Schechter A.N. Effects of nitric oxide on red blood cell development and phenotype. // *Curr. Top. Dev. Biol*. 2008. V. 82. P. 169-215.

Colzani M., Criscuolo A., Casali G., Carini M., Aldini G. A method to produce fully characterized ubiquitin covalently modified by 4-hydroxy-nonenal, glyoxal, methylglyoxal, and malondialdehyde. // *Free Radic. Res*. 2016. V. 50. P. 328-336.

Constantin A., Constantinescu E., Dumitrescu M., Calin A., Popov D. Effects of ageing on carbonyl stress and antioxidant defense in RBCs of obese Type 2 diabetic patients. // *J. Cell. Mol. Med*. 2005. V. 9. P. 683-691.

Cortese-Krott M.M., Kelm M. Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: Key to a new erythrocyte function? // *Red. Biology*. 2014. V. 2. P. 251–258.

Crow J. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. // *Nitric Oxide Biol. Chem*. 1997. V. 1. P. 145-157.

Dalsgaard T., Simonsen U., Fago A. Nitrite-dependent vasodilation is facilitated by hypoxia and is independent of known NO-generating nitrite reductase activities. // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol*. 2007. V. 292. P. 3072-3078.

Datta P., Chakrabarty S., Chakrabarty A., Chakrabarty A. Membrane interactions of hemoglobin variants, HbA, HbE, HbF and globin subunits of HbA: Effects of aminophospholipids and cholesterol. // *Biochim Biophys Acta*. 2008. V. 1778. № 1. P. 1–9.

Decker E.A., Livisay S.A., Zhou S.A. Re-evaluation of the antioxidant activity of purified carnosine. // *Biochemistry (Moscow)*. 2000. V. 65. № 7. P. 766-770.

Delplanque J., Delpierre G., Opperdoes F.R., Van Schaftingen E. Tissue distribution and evolution of fructosamine 3-kinase and fructosamine-3-kinase-related protein. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 27. P. 46606–46613.

Demehin A.A., Abugo O.O., Jayakumar J.R., Rifkind J.M. Binding of hemoglobin to red cell membranes with eosin-5-maleimide-Labeled Band 3: analysis of centrifugation and fluorescence data. // *Biochem.* 2002. V. 41. P. 8630-8637.

Depositatar E.L., Santore D.T., Shipley R.K. Method of determining hemoglobin in blood. // *Patents*. US 3663175 A. 1972.

Desai K.M., Wu L. Free radical generation by methylglyoxal in tissues. // *Drug Metabol. Drug Interact.* 2008. V. 23. P. 151-173.

Di Giulio A., Bonamore A. Globin interactions with lipids and membranes // *Methods Enzymol.* 2008. V. 436. P. 239-253.

Doctor A., Platt R., Sheram M.L., Eischeid A., McMahon T., Maxey T., Doherty J., Axelrod M., Kline J., Gurka M., Gow A., Gaston B. Hemoglobin conformation couples erythrocyte S-nitrosothiol content to O₂ gradients. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 5709–5714.

Doctor A., Spinella P. Effect of processing and storage on red blood cell function *in vivo*. // *Semin. Perinatol.* 2012. V. 36. P. 248-259.

Doyle M.P., Pickering R.A., DeWeert T.M., Hoekstra J.W., Pater D. Kinetics and mechanism of the oxidation of human deoxyhemoglobin by nitrites. // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. P. 12393–12398.

Duan G., Walther D. The Roles of post-translational modifications in the context of protein interaction networks. // *PLoS Comput. Biol.* 2015. V. 11. e1004049.

Ducrocq C., Blanchard B., Pignatelli B., Ohshima H. Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent. // *Cell Mol. Life Sci.* 1999. V. 55. P. 1068–1077.

Dudylyna AL, Ivanova M.V., Shumaev K.B., Ruuge E.K. Generation of Superoxide Radicals by Complex III in heart mitochondria and antioxidant effect of dinitrosyl iron complexes at different partial pressure of oxygen. // *Biofizika*. 2016. V. 61. P. 304-309.

Dutra F.F., Bozza M.T. Heme on innate immunity and inflammation. // *Front. Pharmacol.* 2014. V. 115 doi: 10.3389/fphar.2014.00115.

Eisinger J., Flores J., Salhany J.M. Association of cytosol hemoglobin with the membrane in intact erythrocytes. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1982. V. 79. P. 408-412.

Ellsworth M.L., Ellis C.G., Goldman D., Stephenson A.H., Dietrich H.H., Sprague R.S. Erythrocytes: oxygen sensors and modulators of vascular tone. // *Physiology (Bethesda)*. 2009. V. 24. P. 107-116.

Ertas B., Kiger L., Blank M., Marden M.C., Burmester T. A. Membrane-bound hemoglobin from gills of the green shore crab *Carcinus maenas*. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 3185–3193.

Fernandez B.O., Lorkovic I.M., Ford P.C. Nitrite catalyzes reductive nitrosylation of the water-soluble Ferri-Heme model Fe(III)(TPPS) to Fe(II)(TPPS)(NO). // *Inorg. Chem.* 2003. V. 42. P. 2–4.

Fischer D.J., Torrence N.J., Sprung R.J., Spence D.M. Determination of erythrocyte deformability and its correlation to cellular ATP release using microbore tubing with diameters that approximate resistance vessels *in vivo*. // *Analyst*. 2003. V. 128. P. 1163-1168.

Freitas T.A., Saito J., Hou S., Alam M. Globin-coupled sensors, protoglobins, and the last universal common ancestor // *J. Inorg. Biochem.* 2005. V. 99. P. 23-33.

Fujii J., Myint T., Okado A., Kaneto H., Taniguchi N. Oxidative stress caused by glycation of Cu,Zn-superoxide dismutase and its effects on intracellular components. // *Nephrol. Dial. Transplant*. 1996. V. 11. P. 34-40.

Fung L.W. Spin-label detection of hemoglobin-membrane interaction at physiological pH. // *Biochem.* 1981. V. 20. P. 7162-7166.

Galligan J.J., Mitchener M.M., Wauchope O.R., Wang T., Rose K.L., Spiegel D.A., Marnett L.J. Histones are targets for modification by glucose-derived methylglyoxal. // *The FASEB Journal*. 2016. V. 30. Supplement 586.2

Gardner A.M., Cook M.R., Gardner P.R. Nitric-oxide dioxygenase function of human cytoglobin with cellular reductants and in rat hepatocytes. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 23850–23857.

Gardner P.R. Hemoglobin: A Nitric-Oxide Dioxygenase. // *Scientifica*. 2012. Article ID 683729, 34 pages.

Gardner P.R. Nitric oxide dioxygenase function and mechanism of flavohemoglobin, hemoglobin, myoglobin and their associated reductases. // *J. Inorg. Biochem.* 2005. V. 99. P.2 47–266.

Gardner R.M. Computerized clinical decision-support in respiratory care. // *Respiratory Care*. 2004. V. 49. P. 378–388.

Geng X., Ma J., Zhang F., Xu C. Glyoxalase I in tumor cell proliferation and survival and as a potential target for anticancer therapy. // *Oncol. Res. Treat.* 2014. V. 37. P. 570-574.

Giacco F., Brownlee M., Schmidt A.M., Editor G. Oxidative stress and diabetic complications. // *Circulation Research*. 2010. V. 107. P. 1058-1070.

Gladwin M.T., Grubina R., Doyle M.P. The new chemical biology of nitrite reactions with hemoglobin: R-state catalysis, oxidative denitrosylation, and nitrite reductase/angidrase. // *Acc. Chem. Res.* 2009. V. 42. P. 157-167.

Gladwin M.T., Raat N.J., Shiva S., Dezfulian C., Hogg N., Kim-Shapiro D.B., Patel R.P. Nitrite as a vascular endocrine nitric oxide reservoir that contributes to hypoxic signaling, cytoprotection, and vasodilation. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006. V. 291. P. 2026–2035.

Goldstein S., Merenyi G. The chemistry of peroxyxynitrite: implication for biological activity. // *Methods in Enzymology*. 2008. V. 436. P. 49-61.

Goodarzi M.T., Safari M.R., Zal F. Cytotoxic Effect of "glycated albumin–transition metal ion" on rat hepatocyte suspension. // *Iranian Biomedical Journal*. 2006. V.10. P.139–143.

Gopalkrishnapillai B., Nadanathangam V., Karmakar N., Anand S., Misra A. Evaluation of autofluorescent property of hemoglobin-advanced glycation end product as a long-term glycemic index of diabetes // *Diabetes April*. 2003. V. 52. P. 1041-1046.

Gow A.J., Luchsinger B.P., Pawloski J.R., Singel D.J., Stamler J.S. The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. P. 9027–9032.

Griffiths H.R. Chemical modifications of biomolecules by oxidants. // *The handbook of Environmental Chemistry*. 2005. V. 2. P. 33-62.

Hamdane D., Kiger L., Dewilde S., Green B.N., Pesce A., Uzan J., Burmester T., Hankeln T., Bolognesi M., Moens L., Marden M.C. The redox state of the cell regulates the ligand binding affinity of human neuroglobin and cytoglobin. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 51713–51721.

Hassan Y., Johnson B., Nader N., Gannon M.C., Nuttall F.Q. The relationship between 24-hour integrated glucose concentrations and % glycohemoglobin. // *J. Lab. Clin. Med.* 2006. V. 147. P. 21-26.

Hayashi T., Namiki M. Formation of two-carbon sugar fragments at an early stage of the browning reaction of sugar and amine. // *Agric. Biol. Chem.* 1980. V. 44. P. 2575-2580.

Helms C., Kim-Shapiro D.B. Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling. // *Free Radic. Biol. Med.* 2013. V. 61. P. 464–472.

Herold S., Rehmann F.-J.K. Kinetics of the reactions of nitrogen monoxide and nitrite with ferryl hemoglobin. // *Free Radic. Biol. Med.* 2003. V. 34. P. 531-545.

Hill A.V. The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curve. // *J. Physiol. (London)*. 1910. V. 40. Suppl. P. iv–vii. doi:10.1113/jphysiol.1910.sp001386.

Hill B.G., Dranka B.P., Bailey S.M., Lancaster JR. Jr., Darley-Usmar V.M. What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 19699–19704.

Hipkiss A.R., Brownson C. Carnosine reacts with protein carbonyl groups: another possible role for the anti-ageing peptide? // *Biogerontology*. 2000. V. 1. P. 217–223.

Hobart L.J., Seibel I., Yeagans G.S., Seidler N.W. Anti-crosslinking properties of carnosine: significance of histidine. // *Life Sci.* 2004. V. 75. P. 1379-1389.

Hoff S., Larsen F.H Andersen M.L., Lund M.N. Quantification of protein thiols using ThioGlo1 fluorescent derivatives and HPLC separation // *Analyst*. 2013. V. 138. P. 2096-2103.

Hou S., Freitas T., Larsen R.W., Piatibratov M., Sivozhelezov V., Yamamoto A., Meleshkevitch E.A., Zimmer M., Ordal G.W., Alam M. Globin-coupled sensors: a class of hemecontaining sensors in *Archaea* and *Bacteria*. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. P. 9353-9358.

Huang K.T., Han T.H., Hyduke D.R., Vaughn M.W., Van Herle H., Hein T.W., Zhang C., Kuo L., Liao J.C. Modulation of nitric oxide bioavailability by erythrocytes. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. P. 11771–11776.

Huang K.T., Keszler A., Patel N., Patel R.P., Gladwin M.T., Kim-Shapiro D.B., Hogg N. The reaction between nitrite and deoxyhemoglobin. Reassessment of reaction kinetics and stoichiometry. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 31126-31131.

Huang Z., Shiva S., Kim-Shapiro D.B., Patel R.P., Ringwood L.A., Irby C.E., Huang K.T., Ho C., Hogg N., Schechter A.N., Gladwin M.T. Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. // *J. Clin. Invest.* 2005. V. 775. P. 2099–2107.

Hughes M.N. Chemistry of nitric oxide and related species. // *Methods in Enzymology*. 2007. V. 436. P. 3-19.

Huie R.E., Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. // *Free Radical Res. Commun.* 1993. V. 18. P. 195-199.

Ichihashi M., Yagi M., Nomoto K., Yonei Y. Glycation stress and photo-aging in skin. // *Anti-Aging Med.* 2011. V. 8. P. 23–29.

Ischiropoulos H. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 305. P. 776–783.

Iwata H., Ukeda H., Maruyama T., Fujino T., Sawamura M. Effect of carbonyl compounds on red blood cells deformability. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 321. P. 700-706.

Jacobson R., Mignemi N., Rose K., O'Rear L., Sarilla S., Hamm H.E., Barnett J.V., Verhamme I.M., Schoenecker J. The hyperglycemic by product methylglyoxal impairs anticoagulant activity through covalent adduction of antithrombin III. // *Thromb. Res.* 2014. V. 134. P. 1350-1357.

Jagger J.E., Bateman R.M., Ellsworth M.L., Ellis C.G. Role of erythrocyte in regulating local O₂ delivery mediated by hemoglobin oxygenation. // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2001. V. 280. P. 2833-2839.

Jia L., Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. // *Nature.* 1996. V. 380. P. 221–226.

Jia X., Wu L. Accumulation of endogenous methylglyoxal impaired insulin signaling in adipose tissue of fructose-fed rats. // *Mol. Cell. Biochem.* 2007. V. 306. P.133-139.

Jones D.P., Sies H. The redox code. // *Antioxid. Redox Signal.* 2015. V. 23. P. 734-746.

Jourd'heuil D., Jourd'heuil F. L., Kutchukian P. S., Musah R. A., Wink D. A., Grisham M. B. Reaction of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite implications for peroxynitrite-mediated oxidation reactions in vivo. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 28799-28805.

Kalapos M.P. Methylglyoxal and glucose metabolism: a historical perspective and future avenues for research. // *Drug Metabol. Drug Interact.* 2008a. V. 23. P. 69–91.

Kalapos M.P. The tandem of free radicals and methylglyoxal. // *Chem. Biol. Interact.* 2008b. V. 171. P. 251–271.

Kamtekar S., Schiffer J., Xiong H., Babik J., Hecht M. Protein design by patterning of polar and nonpolar amino acids. // *Science.* 1993. V. 262. P. 1680–1685.

Kang J.H. Protective effects of carnosine and relative compounds on DNA cleavage by advanced glycation end products. // *Bull. Korean Chem. Soc.* 2005. V. 26. P. 178–180.

Karaman Yu. K., Novgorodtseva T.P., Zhukova N.V. Blood erythrocyte lipids in conditions of adaptation to alimentary stress-factors of rats. // *International journal of applied and fundamental research.* 2009. V. 2. P. 15-16.

Katz C., Cohen-Or I., Gophna U., Ron E.Z. The ubiquitous conserved glycolipidase GcP prevents accumulation of toxic glycated proteins. // *mBio.* 2010. V. 1. № 3: e00195-10. doi: 10.1128/mBio.00195-10.

Kemp-Harper B.K. Nitroxyl (HNO): a novel redox signaling molecule. // *Antioxid. Redox Signal.* 2011. V. 14. P. 1609-1613.

Keszler A., Piknova B., Schechter A.N., Hogg N. The reaction between nitrite and oxyhemoglobin: a mechanistic study. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 9615–9622.

Kleinbongard P., Schulz R., Rassaf T., Lauer T., Dejam A., Jax T., Kumara I., Gharini P., Kabanova S., Özüyaman B., Schnürch H.-G., Gödecke A., Weber A.-A., Robenek M., Robenek H., Bloch W., Rösen P., Kelm M. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. // *Blood.* 2006. V. 107. P. 2943-2951.

Knipp M., He C. Nitrophorins: nitrite disproportionation reaction and other novel functionalities of insect heme-based nitric oxide transport proteins. // *IUBMB Life.* 2011. V. 63. P. 304–312.

Knutton S., Finean J.B., Coleman R., Limbrick A.R. Low-angle X-Ray diffraction and electron-microscope studies of isolated erythrocyte membranes. // *J. Cell Sci.* 1970. V. 7. P. 357-371.

Kodippili G., Low P.S. Oxygen regulates the band 3–ankyrin bridge in the human erythrocyte membrane. // *Biochem. J.* 2013. V. 449. P.143–150.

Koltai K., Feher G., Kesmarky G., Keszthelyi Z., Czopf L., Toth K. The effect of blood glucose levels on hemorheological parameters, platelet activation and aggregation in oral glucose tolerance tests. // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2006. V. 35. P. 517-525.

Kriebardis A.G., Antonelou M.H., Stamoulis K.E., Economou-Petersen E., Margaritis L.H., Papassideri I.S. Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. // *J. Cell. Mol. Med.* 2007. V. 11. P. 148-155.

Kuhla B., Boeck K., Schmidt A., Ogunlade V., Arendt T., Münch G., Lüth H.J. Age- and stage-dependent glyoxalase I expression and its activity in normal and Alzheimer's disease brains.// *Neurobiol. Aging.* 2007. V. 28. P. 29–41.

Kumar S., Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. // *Toxicol. Lett.* 2005. V. 157. P. 175–188.

Kurganov B.I. Control in reversibly adsorptive enzyme systems. // *Organized multienzyme systems: catalytic properties.* Ed. Welch G.R. / N.Y. etc.: Acad. Press, 1985. P. 263-267.

Kurganov B.I., Lyubarev A.E. Hypothetical structure of the complex of glycolytic enzymes (glycolytic metabolon), formed on the membrane of erythrocytes. // *Molek. Biologia.* (in Russian). 1988. V. 22. P. 1605-1613.

Larsen K., Aronsson A.C., Marmstal E., Mannervik B. Immunological comparison of glyoxalase-I from yeast and mammals and quantitative-determination of the enzyme in human-tissues by radioimmunoassay. // *Comp. Biochem. Physiol. B.* 1985. V. 82. P. 625-638.

Lecomte J.T.J., Vuletich D., Lesk A.M. Structural divergence and distant relationships in proteins: evolution of the globins. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005. V. 15. P. 290-301.

Lee C., Yim M.B., Chock P.B., Yim H.-S., Kang S.-O. Oxidation-reduction properties of methylglyoxal-modified protein in relation to free radical generation. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 25272–25278.

Li G., Liu L., Hu H., Zhao Q., Xie F., Chen K., Liu S., Chen Y., Shi W., Yin D. Age-related carbonyl stress and erythrocyte membrane protein carbonylation. // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2010. V.4 6. P. 305-311.

Liu L., Hausladen A., Zeng M., Que L., Heitman J., Stamler J.S. A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. // *Nature.* 2000. V. 410. P. 490-494.

Lo T.W.C., Westwood M.E., McLellan A.C., Selwood T., Thornalley P.J. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 32299–32305.

Loidl-Stahlhofen A., Spiteller G. *Alpha*-hydroxyaldehydes, products of lipid peroxidation. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1994. V. 1211. P. 156–160.

Low P.S., Rathinavelu P., Harrison M.L. Regulation of glycolysis via reversible enzyme binding to the membrane protein, band 3. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 14627–14631.

Luchsinger B.P., Rich E.N., Gow A.J., Williams E.M., Stamler J.S., Singel D.J. Routes to S-nitroso-hemoglobin formation with heme redox and preferential reactivity in the β subunits // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V.100. P. 461–466.

Luckey M. Membrane structural biology with biochemical and biophysical foundations. / Cambridge, New York, USA: Cambridge Univ. Press, 2008. 332 p.

Luneva O.G., Sidorenko S.V., Ponomarchuk O.O., Tverskoy A.M., Cherkashin A.A., Rodnenkov O.V., Alekseeva N.V., Deev L.I., Maksimov G.V., Grygorczyk R., Orlov S.N. Deoxygenation affects composition of membrane-bound proteins in human erythrocytes. // *Cell Physiol. Biochem.* 2016. V. 39. P. 81-88.

Maillard L.C. Action des acides amine sur les sucres: formation des melanoidines per voie methodique. // *C. R. Acad. Sci.* 1912. V. 154. P. 66–68.

Manoj V.M., Mohan H., Aravind U.K., Aravindakumar C.T. One-electron reduction of S-nitrosothiols in aqueous medium. // *Free Rad. Biol. Med.* 2006. V. 41. P. 1240-1246.

Marschner J.P., Rietbrock N. Oxygen release kinetics in healthy subjects and diabetic patients. I: The role of 2,3-diphosphoglycerate. // *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 1994. V. 32. P. 533-535.

Martusevich A.A., Deryugina A.V., Martusevich A.K. Functional state of rat's erythrocytes under different stress conditions. // *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 2016. V. 12. P. 5-11.

Matveev V.V. Protoreaction of protoplasm. // *Cell. Mol. Biol.* 2005. V. 51. P. 715-723.

McLellan A.C., Thornalley P.J., Benn J., Sonksen P.H. Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. // *Clin. Sci. (Lond)*. 1994. V. 87. P. 21-29.

McMillan D.C., Powell C.L., Bowman Z.S., Morrow J.D., Jollow D.J. Lipids versus proteins as major targets of pro-oxidant, direct-acting hemolytic agents. // *Toxicological Sciences*. 2005. V. 88. P. 274–283.

Mendanha S.A., Anjos J.L.V., Silva A.H.M., Alonso A. Electron paramagnetic resonance study of lipid and protein membrane components of erythrocytes oxidized with hydrogen peroxide. // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2012. 45. V. 4 P. 73-481.

Messana I., Orlando M., Cassiano L., Pennacchietti L., Zuppi C., Castagnola M., Giardina B. Human erythrocyte metabolism is modulated by the O₂-linked transition of hemoglobin. // *FEBS Lett.* 1996. V. 390. P. 25-28.

Mihai D.M., Hall S., Deng H., Welch C.J., Kawamura A. Benzophenone and its analogs bind to human glyoxalase 1. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015. V. 25. P. 5349-5351.

Misiti F., Meucci E., Zuppi C., Vincenzoni F., Giardina B., Castagnola M., Messana I. O₂-dependent stimulation of the pentose phosphate pathway by S-nitrosocysteine in human erythrocytes. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 294. P. 829–834.

Miyata T., Kurokawa K., van Ypersele de Strihou C. Advanced glycation and lipoxidation end products: role of reactive carbonyl compounds generated during carbohydrate and lipid metabolism. // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000. V. 11. P. 1744–1752.

Miyata T., van Ypersele de Strihou C., Kurokawa K., Baynes J.W. Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of “carbonyl stress” in long-term uremic complications. // *Kidney Int.* 1999. V. 55. P. 389–399.

Miyazawa T., Suzuki T., Fujimoto K., Kinoshita M. Age-related change of phosphatidylcholine hydroperoxide and phosphatidylethanolamine hydroperoxide levels in normal human red blood cells. // *Mech. Ageing Dev.* 1996. V. 86. P. 145–150.

Mohamed G.G., Omar M.M., Hindy A.M. Metal complexes of schiff bases: preparation, characterization, and biological activity. // *Turk. J. Chem.* 2006. V. 30. P. 361–382.

Mohanty J.G., Nagababu E., Rifkind J.M. Red blood cell oxidative stress impairs delivery and induces red blood cell aging. // *Frontiers in Physiology*. 2014. V. 5. e84. doi: 10.3389/fphys.2014.00084.

Mohr S., Stamler J.S., Brüne B. Mechanism of covalent modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at its active site thiol by nitric oxide, peroxynitrite and related nitrosating agents. // *FEBS Lett.* 1994. V. 48. P.223-227.

Monnier V.M., Wu X. Enzymatic deglycation with amadoriase enzymes from *Aspergillus* sp. as a potential strategy against the complications of diabetes and aging. // *Biochem. Soc. Trans.* 2003. V. 31. P. 1349-1353.

More S.S., Vince R. Inhibition of glyoxalase I: the first low-nanomolar tight-binding inhibitors. // *J. Med. Chem.* 2009. V. 52. P. 4650-4656.

Mukhopadhyay S., Ghosh A., Kar M. Methylglyoxal increase in uremia with special reference to snakebite-mediated acute renal failure. // *Clin. Chim. Acta.* 2008. V. 391. P. 13-17.

Nagababu E., Mohanty J.G., Bhamidipaty S., Ostera G.R., Rifkind J.M. Role of membrane in the formation of heme degradation products in red blood cells. // *Life Sci.* 2010. V. 86. P. 133–138.

Nagababu E., Mohanty J.G., Bhamidipaty S., Ostera G.R., Rifkind J.M. Role of membrane in the formation of heme degradation products in red blood cells. // *Life Sci.* 2010. V. 86. P. 133–138.

Nash G.B., Meiselman H.J. Red cell and ghost viscoelasticity. Effects of hemoglobin concentration and in vivo aging. // *Biophys J.* 1983. V. 43. P. 63–73.

Nathan D.M., Turgeon H., Regan S. Relationship between glycated haemoglobin levels and mean glucose levels over time. // *Diabetologia.* 2007. V. 50. P. 2239-2244.

Ng J.Y., Boelen L., Wong J.W.H. Bioinformatics analysis reveals biophysical and evolutionary insights into the 3-nitrotyrosine post-translational modification in the human proteome. // *Open Biol.* 2013. V. 3. P. 120-148.

Nicolay J.P., Liebig G., Niemoeller O.M., Koka S., Ghashghaeinia M., Wieder T., Haendeler J., Busse R., Lang F. Inhibition of suicidal erythrocyte death by nitric oxide. // *Pflugers Arch.* 2008. V. 456. P. 293-305.

Nicoletti V.G., Santoro M.S., Grasso G., Vagliasindi L.I., Giuffrida M.L., Cuppari C., Purrello V.S., Giuffrida A.M., Rizzarelli E. Carnosine interaction with nitric oxide and astroglial cell protection. // *J. Neurosci Res.* 2007. V. 85. P. 2239–2245.

Nicolis S., Monzani E., Ciaccio C., Ascenzi P., Moens L., Casella L. Reactivity and endogenous modification by nitrite and hydrogen peroxide: does human neuroglobin act only as a scavenger? // *Biochem J.* 2007. V. 407. P. 89-99.

Nirala B.K., Saluja S., Mishra A., Gohil N.K. Erythrocyte ATPase activity in relation to hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic urban Indian population. // *Int. J. Diabetes & Metab.* 2012. V. 20. P. 75-79.

O'Brien J. Stability of trehalose, sucrose and glucose to nonenzymatic browning in model systems. // *J. Food Sci.* 1996. V. 61. P. 679–682.

Odani H., Shinzato T., Matsumoto Y., Usami J., Maeda K. Increase in three alpha, beta-dicarbonyl compound levels in human uremic plasma: specific in vivo determination of intermediates in advanced Maillard reaction. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. V. 256. P. 89–93.

Olearczyk J.J., Stephenson A.H., Lonigro A.J., Sprague R.S. Heterotrimeric G protein Gi is involved in a signal transduction pathway for ATP release from erythrocytes. // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2004. V. 286. P. 940-945.

Oparin A.I., Manskaja S.M., Magaram M. Uber den einfluss der koagulation von begleitenden eiweisstoffem auf die aktivitat der amylase. // *Biochem. Z.* 1933. Bd. 265. S. 21-28.

Orosz F., Oláh J., Ovádi J. Triosephosphate isomerase deficiency: facts and doubts. // *IUBMB Life.* 2006. V. 58. P. 703-715.

Orosz F., Wágner G., Liliom K., Kovács J., Baróti K., Horányi M., Farkas T., Hollán S., Ovádi J. Enhanced association of mutant triosephosphate isomerase to red cell membranes and to brain microtubules. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 1026-1031.

Otsuka M., Marks S.A., Winnica D.E., Amoscato A.A., Pearce L.L., Peterson J. Covalent modifications of hemoglobin by nitrite anion: formation kinetics and properties of nitrihemoglobin. // *Chem. Res. Toxicol.* 2010. V. 23. P. 1786–1795.

Ozyamak E., Black S.S., MacLean M.J., Bartlett W., Miller S., Booth I.R. The critical role of S-lactoylglutathione formation during methylglyoxal detoxification in *Escherichia coli*. // *Molecular Microbiolog.* 2011. V. 78. P. 1577-1590.

Perazzolli M., Dominici P., Romero-Puertas M.C., Zago E., Zeier J., Sonoda M., Lamb C., Delledonne M. Arabidopsis nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. // *Plant Cell.* 2004. V. 16. P. 2785–2794.

Petibois C., Déléris G. Erythrocyte adaptation to oxidative stress in endurance training. // *Arch. Med. Res.* 2005. V. 36. P. 524–531.

Phillips S.A., Thornalley P.J. The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. // *Eur. J. Biochem.* 1993. V.212. P.101-105.

Pietraforte D., Salzano A.M., Marino G., Minetti M. Peroxynitrite-dependent modifications of tyrosine residues in hemoglobin. Formation of tyrosyl radical(s) and 3-nitrotyrosine. // *Amino Acids.* 2003. V. 5. P. 341–350.

Price D.L., Rhatt P.M., Thorpe S.R., Baynes J.W. Chelating activity of advanced glycation end-product inhibitors. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 48967–48972.

- Qadri S.M., Su Y., Cayabyab F.S., Liu L. Endothelial Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 participates in redox-sensitive leukocyte recruitment triggered by methylglyoxal. // *Cardiovasc. Diabetol.* 2014. V. 13. Article 134.
- Rabbani N., Thornalley P.J. Glycation research in amino acids: a place to call home. // *Amino Acids.* 2012. V. 42. P. 1087–1096.
- Rabbani N., Thornalley P.J. Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome. // *Amino Acids.* 2010. V. 42. P. 1133-1142.
- Rahbar S. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. // *Clin. Chim. Acta.* 1968. V. 22. P. 296–298.
- Rahbar S. The discovery of glycated hemoglobin. A major event in the study of nonenzymatic chemistry in biological systems. // *Ann. NY Acad. Sci.* 2005. V. 1043. P. 9-19.
- Rajasekar P., O'Neill C.L., Eeles L., Stitt A.W., Medina R.J. Epigenetic changes in endothelial progenitors as a possible cellular basis for glycemic memory in diabetic vascular complications // *J. Diabetes. Res.* 2015. V. 2015. Article 436879.
- Ramamurthy B., Jones A.D., Larsson L. Glutathione reverses early effects of glycation on myosin function. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2003. V. 285. P. 419–424.
- Ramandeep, Hwang K.W., Raje M., Kim K.J., Stark B.C., Dikshit K.L., Webster D.A. *Vitreoscilla* hemoglobin. Intracellular localization and binding to membranes. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 24781-24789.
- Ramdani G., Langsley G. ATP, an extracellular signaling molecule in red blood cells: a messenger for malaria? // *Biomedical Journal.* 2014. V. 37. P. 284-292.
- Ray M., Ray S. L-Threonine dehydrogenase from goat liver. Feedback inhibition by methylglyoxal. // *J. Biol. Chem.* 1985. V.260. P.5913–5918.
- Reddy V.P., Garrett M.R., Perry G., Smith M.A. Carnosine: A versatile antioxidant and antiglycating agent. // *Sci. Aging Knowl. Environ.* 2005. V. 18. Article 12.
- Rice J.C., Allis C.D. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation.// *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2001. V. 13. P. 263-273.
- Richard J.P. Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. // *Biochem. Soc. Trans.* 1993. V. 21. P. 549–553.
- Rifkind J.M., Nagababu E. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. // *Antioxid. Redox Signal.* 2013. V. 18. P. 2274-2283.
- Rifkind J.M., Nagababu E. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. // *Antioxid. Redox Signal.* 2013. V. 18. P. 2274-2283.
- Riggs A. Preparation of blood hemoglobins of vertebrates. // *Methods in Enzymology.* 1981. V. 76. P. 5-29.

Rocha S., Costa E., Coimbra S., Nascimento H., Catarino C., Rocha-Pereira P., Quintanilha A., Belo L., Santos-Silva A. Linkage of cytosolic peroxiredoxin 2 to erythrocyte membrane imposed by hydrogen peroxide-induced oxidative stress. // *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2009. V. 43. P. 68–73.

Rogers S.C., Ross J.G.C., d'Avignon A., Gibbons L.B., Gazit V., Hassan M.N., McLaughlin D., Griffin S., Neumayr T., DeBaun M., DeBaun M.R., Doctor A. Sickle hemoglobin disturbs normal coupling among erythrocyte O₂ content, glycolysis, and antioxidant capacity. // *Blood*. 2013. V. 121. P. 1651-1662.

Romano A.H., Conway T. Evolution of carbohydrate metabolic pathways. // *Res Microbiol*. 1996. V. 147. P. 448–455.

Romero N., Radi R., Linares E., Augusto O., Detweiler C.D., Mason R.P., Denicola A. Reaction of human hemoglobin with peroxynitrite. Isomerization to nitrate and secondary formation of protein radicals. // *J. Biol. Chem*. 2003. V. 278. P. 44049-44057.

Rosca M.G., Mustada T.G., Kinter M.T., Ozdemir A.M., Kern T.S., Szweda L.I., Brownlee M., Monnier V.M., Weiss M.F. Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. // *Am. J. Physiol-Renal*. 2005. V. 289. P. 420-430.

Roy A., Sen S., Chakraborti A.S. In vitro nonenzymatic glycation enhances the role of myoglobin as a source of oxidative stress. // *Free Rad. Res*. 2004. V. 38. P. 139-146.

Saleh J. Glycated hemoglobin and its spinoffs: Cardiovascular disease markers or risk factors? // *World J. Cardiol*. 2015. V. 7. P. 449-453.

Salhany J.M. Kinetics of reaction of nitrite with deoxy hemoglobin after rapid deoxygenation or predeoxygenation by dithionite measured in solution and bound to the cytoplasmic domain of Band 3 (SLC4A1). // *Biochemistry*. 2008. V. 47. P. 6059-6072.

Salman K.A., Ashraf S. Reactive Oxygen Species: A link between chronic inflammation and cancer. // *As. Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol*. 2013. V. 21. P. 42-49.

Sang Y., Shi Q., Mo M., Ni C., Li Z., Liu B., Deng Q., Creighton D.J., Zheng Z.B. Novel bivalent inhibitors with sub-nanomolar affinities towards human glyoxalase I. // *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2015. V. 25. P. 4724-4727.

Sayare M., Fikiet M. Cross-linking of hemoglobin to the cytoplasmic surface of human erythrocyte membranes. // *J. Biol. Chem*. 1981. V. 256. P. 13152-13158.

Schaer D.J., Buehler P.W., Alayash A.I., Belcher J.D., Vercellotti G.M. Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. // *Blood*. 2013. V. 121. P. 1276-1284.

Schopfer M.P., Mondal B., Lee D-H., Sarjeant A.N., Karlin K.D. Heme/O₂/*NO nitric oxide dioxygenase (NOD) reactivity: phenolic nitration via a putative heme-peroxynitrite intermediate. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 11304-11305.

Scott M.D., van den Berg J.J., Repka T., Rouyer-Fessard P., Hebbel R.P., Beuzard Y., Lubin B.H. Effect of excess alpha-hemoglobin chains on cellular and membrane oxidation in model beta-thalassemic erythrocytes. // *J. Clin. Invest.* 1993. V. 91. P. 1706-1712.

Sears D.A., Lewis P.C. Measurement of hemoglobin chains bound to the erythrocyte membrane. // *J. Lab. Clin. Med.* 1980. V. 96. P. 318-327.

Sears D.A., Luthra M.G. Membrane-bound hemoglobin in the erythrocytes of sickle cell anemia. // *J. Lab. Clin. Med.* 1983. V. 102. P. 694-698.

Seet B.T., Dikic I., Zhou M.-M., Pawson T. Reading protein modifications with interaction domains. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2006. V. 7. P. 473-483.

Sega M.F., Chu H., Christian J., Low P.S. Interaction of deoxyhemoglobin with the cytoplasmic domain of murine erythrocyte band 3. // *Biochem.* 2012. V. 51. P. 3264-3272.

Semchyshyn H.M. Reactive carbonyl species *in vivo*: generation and dual biological effects. // *Scientific World Journal.* 2014. V. 2014. Article 417842.

Shaklai N., Ranney H.R. Interaction of hemoglobin with membrane lipids: a source of pathological phenomena. // *Isr. J. Med. Sci.* 1978. V. 14. P. 1152-1156.

Shaklai N., Sharma V.S., Ranney H.M. Interaction of sickle cell hemoglobin with erythrocyte membranes. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981. V. 78. P. 65-68.

Shaklai N., Yguerabide J., Ranney H.M. Classification and localization of hemoglobin binding sites on the red blood cell membrane. // *Biochem.* 1977. V. 16. P. 5593-5597.

Shapiro R., McManus M., Garrick L., McDonald M.J., Bunn H.F. Nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin at multiple sites. // *Metabolism.* 1979. V. 4. P. 427-430.

Sharma R., Premachandra B.R. Membrane-bound hemoglobin as a marker of oxidative injury in adult and neonatal red blood cells. // *Biochem. Med. Metab. Biol.* 1991. V. 46. P. 33-44.

Shin S., Ku Y., Babu N., Singh M. Erythrocyte deformability and its variation in diabetes mellitus. // *Indian J. Exp. Biol.* 2007. V. 45. P. 121-128.

Shiva S. Nitrite: A physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function. // *Redox Biology.* 2013. V. 1. P. 40-44.

Shumaev K.B., Gubkin A.A., Serezhenkov V.A., Lobysheva I.I., Kosmachevskaya O.V., Ruuge E.K., Lankin V.Z., Topunov A.F., Vanin A.F. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin – and hemoglobin bound dinitrosyl iron complexes. // *Nitric Oxide.* 2008a. V. 18. № 1. P. 37-46.

Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F. Dinitrosyl iron complexes bound with haemoglobin as markers of oxidative stress. // *Methods in Enzymology*. 2008b. V. 436. P. 445-461.

Sikora J., Orlov S.N., Furuya K., Grygorczyk R. Hemolysis is a primary ATP-release mechanism in human erythrocytes. // *Blood*. 2014. V. 124. P. 2150–2157.

Singh M., Shin S. Changes in erythrocyte aggregation and deformability in diabetes mellitus: a brief review. // *Indian J. Exp. Biol.* 2009. V. 47. P. 7-15.

Škrha J.Jr., Muravská A., Flekač M., Horová E., Novák J., Novotný A., Prázný M., Škrha J., Kvasnička J., Landová L., Jáchymová M., Zima T., Kalousová M. Fructosamine 3-kinase and glyoxalase I polymorphisms and their association with soluble RAGE and adhesion molecules in diabetes. // *Physiol. Res.* 2014. V. 63. Supl. 2. P. 283-291.

Soppa J. Protein acetylation in archaea, bacteria, and eukaryotes. // *Archaea*. 2010. V. 16. Article 820681.

Sprague R.S., Ellsworth M.L., Stephenson A.H., Lonigro A.J. Participation of cAMP in a signal-transduction pathway relating erythrocyte deformation to ATP release. // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2001. V. 281. P. 1158-1164.

Stamler J.S. S-Nitrosothiols in the blood roles, amounts, and methods of analysis. // *Circulation Research*. 2004. V. 94. P. 414-417.

Stamler J.S., Singel D.J., Piantadosi C.A. SNO-hemoglobin and hypoxic vasodilation. // *Nat. Med.* 2008. V. 14. P. 1008-1009.

Suji G., Sivakami S. DNA damage during glycation of lysine by methylglyoxal: assessment of vitamins in preventing damage. // *Amino Acids*. 2007. V. 33. P. 615–621.

Sullivan S.G., Stern A. Membrane protein changes induced by tert-butyl hydroperoxide in red blood cells. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1984. V. 774. P. 215-220.

Switzer C.H., Flores-Santana W., Mancardi D., Donzelli S., Basudhar D., Ridnour L.A., Miranda K.M., Fukuto J.M., Paolocci N., Wink D.A. The emergence of nitroxyl (HNO) as a pharmacological agent. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2009. V. 1787. P. 835–840.

Szwergold B.S. Intrinsic toxicity of glucose, due to non-enzymatic glycation, is controlled by deglycation systems including: FN3K-mediated deglycation of fructosamines and transglycation of aldoses. // *Med. Hypotheses*. 2005. V. 65. P. 337–348.

Takahashi S., Nakashima Y., Toda K. Carnosine facilitates nitric oxide production in endothelial f-2 cells. // *Biol. Pharm. Bull.* 2009. V. 32. P. 1836-1839.

Taniguchi N., Kinoshita N., Arai K., Iizuka S., Usui M., Naito T. Inactivation of erythrocyte Cu-Zn-superoxide dismutase through nonenzymatic glycosylation. // *Prog. Clin. Biol. Res.* 1989. V. 304. P. 277-290.

Tesoriere L., D'Arpa D., Conti S., Giaccone V., Pintaudi A.M., Livrea M.A. Melatonin protects human red blood cells from oxidative hemolysis: New insights into the radical-scavenging activity. // *Pineal Research*. 1999. V. 27. P. 95-105.

Thomas D.D. Breathing new life into nitric oxide signaling: A brief overview of the interplay between oxygen and nitric oxide. // *Redox Biol*. 2015. V. 5. P. 225-233.

Thornalley P. Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction. // *Ann. NY Acad. Sci*. 2005. V. 1043. P. 111–117.

Thornalley P., Wolff S., Crabbe J., Stern A. The autoxidation of glyceraldehyde and other simple monosaccharides under physiological conditions catalysed by buffer ions. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1984. V. 797. P. 276–287.

Thornalley P.J. Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction. // *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2005. V. 1043. P. 111–117.

Thornalley P.J. Monosaccharide autoxidation in health and disease. // *Environ Health Perspect*. 1985. V. 64. P. 297-307.

Thornalley P.J. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems — role in ageing and disease. // *Drug. Metabol. Drug. Interact*. 2008. V. 23. P. 125–150.

Thornalley P.J. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. // *Biochem J*. 1990. V. 269. № 1. P. 1–11.

Thornalley P.J., Hooper N.I., Jennings P.E., Florkowski C.M., Jones A.F., Lunec J., Barnett A.H. The human red blood cell glyoxalase system in diabetes mellitus. // *Diabetes Res. Clin. Pract*. 1989. V. 7. P. 115-120.

Thornalley P.J., Ladan M.J., Ridgway S.J.S., Kang Y. Antitumor activity of S-(p-bromobenzyl)glutathione diesters in vitro: A structure-activity study. // *J. Med. Chem*. 1996. V. 39. P. 3409-3411.

Thornalley P.J. Modification of the glyoxalase system in human red blood cells by glucose in vitro. // *Biochem. J*. 1988. V. 254. P. 751-755.

Timoshin A.A., Vanin A.F., Orlova Ts.R., Sanina N.A., Ruuge E.K., Aldoshin S.M., Chazov E.I. Protein-bound dinitrosyl-iron complexes appearing in blood of rabbit added with a low-molecular dinitrosyl-iron complexes: EPR studies. // *Nitric Oxide*. 2007. V. 16. P. 286-293.

Trujillo M., Alvarez M.N., Peluffo G., Freeman B.A., Radi R. Xanthine oxidase-mediated decomposition of S-nitrosothiols. // *J. Biol. Chem*. 1998. V. 273. P. 7828–7834.

Tsai M.C., Tsai F.T., Lu T.T., Tsai M.L., Wei Y.C., Hsu I.J., Lee J.F., Liaw W.F. Relative binding affinity of thiolate, imidazolate, phenoxide, and nitrite toward the {Fe(NO)₂}

motif of dinitrosyl iron complexes (DNICs): The characteristic pre-edge energy of $\{\text{Fe}(\text{NO})_2\}_9$ DNICs. // *Inorg. Chem.* 2009. V. 48. P. 9579–9591.

Tsuneshige A., Imai K., Tyuma I. The binding of hemoglobin to red cell membrane lowers its oxygen affinity. // *J. Biochem.* 1987. V. 101. P. 695-704.

Turk Z. Glycotoxines, carbonyl stress and relevance to diabetes and its complications. // *Physiol. Res.* 2010. V. 59. P. 147-156.

Turkseven S., Ertuna E., Yetik-Anacak G., Yasa M. Methylglyoxal causes endothelial dysfunction: the role of endothelial nitric oxide synthase and AMP-activated protein kinase α . // *J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.* 2014. V. 25. P. 109-115.

Valentine W.N., Paglia D.E., Neerhout R.C., Konrad P.N. Erythrocyte glyoxalase II deficiency with coincidental hereditary elliptocytosis. // *Blood.* 1970. V. 36. P.7 97–808.

van Zwieten R., Verhoeven A.J., Roos D. Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells. // *Free. Radic. Biol. Med.* 2014. V. 67. P. 377–386.

Vander Jagt D.L., Hundsaker L.A. Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. // *Chem. Biol. Interact.* 2003. V. 143-144. P. 341–351.

Vanderjagt D.L., Robinson B., Taylor K.K., Hunsaker L.A. Reduction of trioses by NADPH-dependent aldo-keto reductases - aldose reductase, methylglyoxal, and diabetic complications. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 4364-4369.

Vanin A.F., van Faassen E. // Radicals for life: The various forms of nitric oxide. (van Faassen E., Vanin A.F., eds.) / Amsterdam: Elsevier, 2007. P. 19–74.

Vinogradov S.N., Moens L. Diversity of globin function: enzymatic, transport, storage, and sensing // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 8773–8777.

Viskupicova J., Blaskovic D., Galiniak S., Soszyński M., Bartosz G., Horakova L., Sadowska-Bartosz I. Effect of high glucose concentrations on human erythrocytes *in vitro*. // *Redox. Biol.* 2015. V. 5. P. 381-387.

Voziyan P.A., Khalifah R.G., Thibaudeau C., Yildiz A., Jacob J., Serianni A.S., Hudson B.G. Modification of proteins *in vitro* by physiological levels of glucose pyridoxamine inhibits conversion of Amadori intermediate to advanced glycation end-products through binding of redox metal ions. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 46616–46624.

Vuletich D., Lecomte J.T.J. A phylogenetic and structural analysis of truncated hemoglobins // *J. Mol. Evol.* 2006. V. 62. P. 196-210.

Waghlikar K., MacLaughlin K.L., Kastner T.M., Casey P.M., Henry M., Greenes R.A., Hongfang L., Rajeev C. Formative evaluation of the accuracy of a clinical decision support system for cervical cancer screening. // *J. Am. Med. Inform. Assoc.* 2013. V. 20. P. 747–759.

Wallace R. Structure and dynamics of the ‘protein folding code’ inferred using Trusty’s topological rate distortion approach. // *Biosystems*. 2011. V. 103. P. 118–126.

Wallace R., Wallace D. Code, context, and epigenetic catalysis in gene expression. // *Transactions on computational systems biology*. XI. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. P. 283–334.

Wang P.G., Xian M., Tang X., Wu X., Wen Z., Cai T., Janczuk A.J. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. // *Chem. Rev.* 2002. V. 102. P. 1091-1134.

Wang X., Desai K., Chang T., Wu L. Vascular methylglyoxal metabolism and the development of hypertension. // *J. Hypertens.* 2005. V. 23. P. 1565-1573.

Ward R.A., McLeish K.R. Methylglyoxal: a stimulus to neutrophil oxygen radical production in chronic renal failure? // *Nephrol Dial Transplant.* 2004. V. 19. P. 1702–1707.

Weber R.E., Voelter W., Fago A., Echner H., Campanella E., Low P.S. Modulation of red cell glycolysis: interactions between vertebrate hemoglobins and cytoplasmic domains of band 3 red cell membrane proteins. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004. V. 287. P. 454-464.

Webster S.H. Heinz body phenomenon in erythrocytes. // *Blood.* 1949. V. 4. P. 479-497.

Wu L. The pro-oxidant role of methylglyoxal in mesenteric artery smooth muscle cells. // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2005. V. 83. P. 63–68.

Xu B., Chibber R., Ruggiero D., Kohner E., Ritter J., Ferro A. Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products. // *FASEB J.* 2003. V. 17. P. 1289-1291.

Yang J., Carroll K.S., Liebler D.C. The expanding landscape of the thiol redox proteome. // *Mol. Cell. Proteomics.* 2016. V. 15. № 1. doi: 10.1074/mcp.O115.056051.

Yim H.-S., Kang S.-O., Hah Y.-Ch., Chock P.B., Yim M.B. Free radicals generated during the glycation reaction of amino acids by methylglyoxal. A model study of protein-cross-linked free radicals. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 28228–28233.

Yim M.B., Yim H.-S., Lee Ch., Kang S.-O., Chock P.B. Protein glycation: Creation of catalytic sites for free radical generation. // *Ann. NY Acad. Sci.* 2001. V. 928. P. 2572-2578.

Yousif E., Majeed A., Al-Sammarræ K., Salih N., Salimon J., Abdullah B. Metal complexes of Schiff base: Preparation, characterization and antibacterial activity. // *Arabian Journal of Chemistry.* 2013. V. 2013. doi: 10.1016/j.arabjc.2013.06.006.

Zavodnik I.B., Lapshina E.A., Rekawiecka K., Zavodnik L.B., Bartosz G., Bryszewska M. Membrane effects of nitrite-induced oxidation of human red blood cells. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. V. 1421. P. 306-316.

Zavodnik I.B., Lapshina E.A., Rekawiecka K., Zavodnik L.B., Bartosz G., Bryszewska M. Membrane effects of nitrite-induced oxidation of human red blood cells. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1999. V. 1421. P. 306-316.

Zeng J., Davies M.J. Evidence for the formation of adducts and S-(carboxymethyl)cysteine on reaction of alpha-dicarbonyl compounds with thiol groups on amino acids, peptides, and proteins. // *Chem. Res. Toxicol.* 2005. V. 18. P. 1232-1241.

Zeng J., Davies M.J. Protein and low molecular mass thiols as targets and inhibitors of glycation reactions. // *Chem. Res. Toxicol.* 2006. V. 19. P. 1668-1676.

Zhang H., Huang Q., Zhai J., Zhao Y.N., Zhang L.P., Chen Y.Y., Zhang R.W., Li Q., Hu X.P. Structural basis for 18- β -glycyrrhetic acid as a novel non-GSH analog glyoxalase I inhibitor. // *Acta Pharmacol. Sin.* 2015. V. 36. P. 1145-1150.

Zhang H., Zhai J., Zhang L., Li C., Zhao Y., Chen Y., Li Q., Hu X.P. In vitro inhibition of glyoxalase I by flavonoids: new insights from crystallographic analysis. // *Curr. Top. Med. Chem.* 2016. V. 16. P. 460-466.

Zhang R., Hess D.T., Reynolds J.D., Stamler J.S. Hemoglobin S-nitrosylation plays an essential role in cardioprotection. // *J. Clin. Invest.* 2016. V. 126. P. 4654-4658.

Zhang W., Phillips G.N.Jr. Structure of the oxygen sensor in *Bacillus subtilis* signal transduction of chemotaxis by control of symmetry. // *Structure*. 2003. V. 11. № 9. P. 1097-1108.

Zhou Y.M., Ye X.R., Xin F.B., Xin X.Q. Solid state self-assembly synthesis of cobalt(II), nickel(II), copper(II) and zinc(II) complexes with a bis-Schiff base. // *Transition Met. Chem.* 1999. V. 24. P. 118-120.