

УДК 612.111.11

## **ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА НА ОБРАЗОВАНИЕ МЕМБРАНОСВЯЗАННОГО ГЕМОГЛОБИНА В УСЛОВИЯХ КАРБОНИЛЬНОГО СТРЕССА**

**Э. И. Насыбуллина, О. В. Космачевская, А. Ф. Топунов**

*Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия*

В интактных эритроцитах гемоглобин (Hb) может существовать в растворимой и мембраносвязанной формах. Переход гемоглобина в мембраносвязанное состояние (MBHb) может иметь физиологическое значение и являться адаптивной реакцией, направленной на изменение состояния мембраны и метаболизма эритроцита. Известно, что оксид азота (NO) и активные карбонильные соединения могут влиять на связывание Hb с мембранами. В работе показано, что добавление NaNO<sub>2</sub>, CysNO и GSNO в различных концентрациях к суспензии эритроцитов вызывает изменения содержания MBHb. Наибольшие изменения уровня MBHb наблюдались при действии на эритроциты NaNO<sub>2</sub>, что может быть связано с образованием свободнорадикальных метаболитов в системе (oxyHb–NaNO<sub>2</sub>). Метилглиоксаль (MG) вызывал дозозависимое увеличение уровня MBHb, не оказывая влияния на окислительно-восстановительное состояние Hb. Наблюдалась отрицательная корреляция между долей MBHb и количеством восстановленных SH-групп мембранных белков. Добавление метаболитов NO к суспензии эритроцитов на фоне действия MG приводило к разным последствиям: NaNO<sub>2</sub> снижал концентрацию MBHb на 50 %, CysNO на 20 %, а GSNO, напротив, приводил к незначительному увеличению уровня MBHb. Действие нитрозотиолов можно объяснить образованием свободнорадикальных продуктов в системе (MG–NH<sub>3</sub>–Hb–RSNO), которые, индуцируя окислительные процессы у липидов и белков, способствуют связыванию Hb с компонентами мембраны. Показано, что даже незначительные флуктуации уровня MBHb влияли на степень гемолиза эритроцитов.

**Ключевые слова:** эритроциты; гемоглобин; метилглиоксаль; нитрозотиолы; нитрит натрия.

### **E. I. Nasybullina, O. V. Kosmachevskaya, A. F. Topunov. EFFECT OF NITRIC OXIDE METABOLITES ON THE FORMATION OF MEMBRANE-BOUND HEMOGLOBIN UNDER CARBONYL STRESS**

Hemoglobin (Hb) in intact erythrocytes exists both in soluble and membrane-bound states. Hemoglobin transition to the membrane-bound state (MBHb) can be physiologically significant. We can presume that it provokes an adaptive reaction aimed to change different parameters connected with erythrocyte biochemistry and membrane properties. Nitric oxide (NO) is known to affect Hb-membrane binding. We have shown that the addition of NaNO<sub>2</sub>, CysNO and GSNO to the suspension of erythrocytes results in changes in MBHb concentration. Hemolytic stability depends on MBHb level: even small MBHb fluctuations change the level of erythrocytes hemolysis. NaNO<sub>2</sub> triggered the highest

amplitude of MBHb changes due to the formation of free-radical products in the system (oxyHb – NaNO<sub>2</sub>). Methylglyoxal (MG) provoked a dose-dependent increase of MBHb, whereas the Hb oxidative-reductive state was not affected. The level of MBHb was negatively correlated with the amount of reduced SH-groups of membrane proteins. The addition of NO metabolites to erythrocytes suspension in the presence of MG induced various effects: NaNO<sub>2</sub> reduced MBHb by 50 %, CysNO by 20 %, while GS-NO, on the contrary, slightly promoted the MBHb level. The effect of nitrosothiols can be explained by free-radical products being formed in the system (MG–NH<sub>3</sub>–Pr–RSNO), which promote Hb binding with membrane components by inducing lipid and protein oxidation processes. It was shown that even insignificant MBHb fluctuations resulted in changes of erythrocyte hemolysis rates.

**Key words:** erythrocytes; hemoglobin; methylglyoxal; nitrosothiols; sodium nitrite.

## Введение

В последнее время повсеместно наблюдается высокая распространенность заболеваний, ассоциированных с метаболическими нарушениями. Одним из таких заболеваний является сахарный диабет 2-го типа, при котором развиваются нарушения сердечно-сосудистой системы. В патогенезе сердечно-сосудистых осложнений важную роль играют изменения структуры и функций эритроцитов. Известно, что при сахарном диабете развивается гипергликемия, которая является причиной образования активных карбонильных соединений (АКС). Группу АКС составляют вещества, в составе которых имеется карбонильная, альдегидная или кето-группа, при участии которой они вступают в неферментативные реакции гликирования с различными биомолекулами [Thornalley, 2008]. Эритроциты являются первыми клеточными мишенями действия глюкозы и продуктов ее окислительной деградации (3-дезоксиглюкозона и метилглиоксаля).

Известно, что хроническая гипергликемия и связанные с ней метаболические нарушения воздействуют на мембрану эритроцита, которая имеет ключевое значение в его функциональной активности. Так, у крыс с аллоксановым сахарным диабетом с увеличением срока гипергликемии нарастало количество необратимо измененных эритроцитов. На третьей-четвертой неделе количество сфероцитов составляло 55 % против 20 % у интактных животных [Емельянов и др., 2016].

Имеется большое количество публикаций, указывающих на повышенную вязкость и жесткость мембраны эритроцитов больных сахарным диабетом [Shin et al., 2007; Singh, Shin, 2009]. В экспериментах *in vitro* было показано, что наблюдаемые нарушения свойств эритроцитов вызваны действием АКС на компоненты мембраны [Iwata et al., 2004]. Повреждение мембран негативно сказывается на их механи-

ческих 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 (Hb). Известно, что в эритроцитах Hb находится в растворимой и мембраносвязанной формах, соотношение между которыми меняется в зависимости от состояния молекул гемоглобина и мембран. Обратимое связывание Hb с мембраной носит регуляторный характер и является инструментом настройки свойств мембраны и углеводного метаболизма при изменении условий функционирования, например, при изменении pO<sub>2</sub> [Rifkind, Nagababu, 2013; Mohanty et al., 2014; van Zwieten et al., 2014; Космачевская и др., 2017]. При действии различных окислителей может происходить необратимая ковалентная пришивка Hb к компонентам мембраны, что дестабилизирует мембрану и приводит к выходу Hb в плазму. Поэтому представляется актуальным изучение механизмов стабилизации эритроцитов и поиск веществ, снижающих степень гемолиза при функционировании клеток в условиях карбонильного стресса. Одними из биологически активных веществ, оказывающих стабилизирующее действие на эритроциты, являются метаболиты NO в низких физиологических концентрациях (нитрозоглутатион, динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами) [Шумаев и др., 2017].

Целью настоящей работы было сравнительное изучение действия различных метаболитов NO на изолированные эритроциты в присутствии метилглиоксаля, моделирующего карбонильный стресс. В качестве критериев оценки модификации эритроцитов мы использовали концентрации мембраносвязанного гемоглобина (MBHb – membrane-bound hemoglobin) и Hb во внеклеточной среде, поскольку эти параметры очень чувствительны к присутствию АКС, а также активных форм кислорода и NO.

## Материалы и методы

### Приготовление суспензии эритроцитов

В работе использовали эритроциты, полученные из крови крыс Wistar, стабилизированной цитратом натрия. Эритроциты непосредственно перед опытом отмывали от компонентов плазмы двукратным центрифугированием (1200 г, 10 мин, 4 °С) пятикратным объемом изотонического раствора в фосфатно-солевом буфере, содержащем 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl (рН 7,4) 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ MgCl<sub>2</sub>. Отмытые эритроциты использовали для приготовления суспензии с гематокритом 0,2 (содержание гемоглобина 50 ± 3 мг/мл). В качестве среды инкубирования использовали такой же раствор, дополнительно содержащий 5 мМ глюкозы.

К 100 мкл суспензии эритроцитов добавляли 10 мМ раствора NaNO<sub>2</sub>, *N*-ацетил-*L*-цистеина (CysNO) или *S*-нитрозоглутатиона (GSNO) до конечных концентраций 0,4; 0,8; 2; 3 и 4 мМ. При моделировании карбонильного стресса проводили предынкубирование эритроцитов с метилглиоксалем (3 мМ) в течение 20 минут. 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 г в течение 10 мин. Определяли концентрацию Hb в супернатанте, отражающую степень гемолиза, и содержание метгемоглобина, осадок использовали для оценки количества Hb, связанного с мембранами.

### Определение концентрации гемоглобина

Концентрацию Hb определяли пиридингемохромным методом Риггса в нашей модификации [Космачевская, Топунов, 2007]. Этот же метод использовали и для определения концентрации мембраносвязанного гемоглобина. Для анализа брали 100 мкл крови, производили отмывку эритроцитов от компонентов плазмы в 1 мл фосфатно-солевого буфера и затем полностью гемолизировали. Тени эритроцитов, содержавшие Hb, отделяли центрифугированием при 5000 г в течение 5 мин. К двукратно отмытым тням добавляли 100 мкл воды и 450 мкл 30% щелочного раствора пиридина. После полного растворения осадка определяли концентрацию гемоглобина пиридингемохромным методом. Для этого непосредственно перед измерением раствор Hb в пиридине восстанавливали

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

Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Cary 300 (Varian-Bio, США) в кювете с длиной оптического пути 1 см при скорости сканирования 600 нм/мин.

### Определение SH-групп в низкомолекулярных и белковых тиолах

Количественную оценку свободных сульфгидрильных групп проводили с помощью тиол-специфичной флуоресцентной метки ThioGlo1. Методика заключается в том, что при добавлении ThioGlo1 к раствору белка образуется флуоресцирующий аддукт с максимумом испускания флуоресценции при 506 нм при длине волны возбуждения 379 нм [Hoff et al., 2013]. Для изучения взаимодействия цистеина и глутатиона с метилглиоксалем к 50 мкл 7 мМ раствора тиолового соединения в 0,1 М К-фосфатном буфере (рН 7,4) добавляли 50 мкл 7 мМ раствора MG (RSH : MG = 1:1), затем смесь инкубировали при 25 °С в течение 24 мин.

Образцы для анализа восстановленных SH-групп мембранных белков 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 г 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 (рН 7,4) вносили 10 мкл исследуемой смеси и регистрировали флуоресценцию на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301 PC (Япония). Ширина щели возбуждающего и испускающего света составляла 1,5 нм для образцов цистеина и глутатиона и 3 нм для белков мембран эритроцитов.

### Синтез нитрозоглутатиона и нитрозоцистеина

Нитрозоглутатион и нитрозоцистеин синтезировали непосредственно перед внесением в среду инкубации, смешивая эквивалентные количества глутатиона или *N*-ацетил-*L*-цистеина и NaNO<sub>2</sub>. Концентрацию образовавшихся нитрозотиолов определяли по поглощению при  $\lambda = 335 \text{ нм}$ , используя

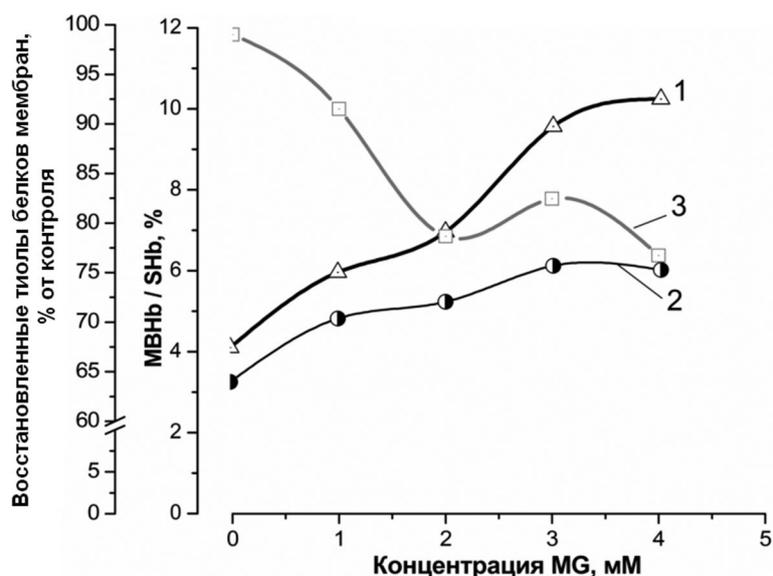


Рис. 1. Содержание Hb в мембранах (1), гемолизате (2) и восстановленные тиолы (R-SH) белков мембран (3) при инкубации суспензии эритроцитов с разными концентрациями MG. 100 % – показатели без добавления MG

Fig. 1. Hb content in membranes (1) and hemolysate (2), and reduced SH-groups of membrane proteins (3) at the erythrocyte incubation with different concentrations of MG. 100 % – indicators without addition of MG

молярный коэффициент экстинкции, равный  $774 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

При проведении исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

## Результаты и обсуждение

Как было показано в наших предыдущих работах, GSNO стимулирует образование радикальных интермедиатов реакции лизина с метилглиоксалем, по сравнению с другими донорами NO [Шумаев и др., 2009; Kosmachevskaya et al., 2013]. GSNO и  $\text{NaNO}_2$  в присутствии метилглиоксаля могут вызывать нитрование порфирина Hb (нитриHb) [Kosmachevskaya et al., 2014]. Эти результаты послужили основанием для проведения сравнительного изучения влияния нитрит-ионов и нитрозотиолов на переход Hb в мембраносвязанное состояние в условиях карбонильного стресса.

Для изучения действия метилглиоксаля на эритроциты отмытую суспензию интактных эритроцитов инкубировали в течение 20 минут с различными концентрациями MG. На рисунке 1 представлены кривые, изображающие

изменение трех параметров в зависимости от концентрации метилглиоксаля в инкубационной среде. Анализ этих 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, 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 перекисного окисления липидов, индуцированного как самим гемоглобином, так и продуктами его распада (железом и гемовой группой) [Nagababu et al., 2010; Rifkind, Nagababu, 2013].

Известно, что гемоглобин в мет- и феррил-формах выступает в качестве активного окислителя. Также гемоглобин в состоянии полунасыщения ( $2\text{Hb}-[\text{Fe}^{\text{II}}]-2\text{Hb}-[\text{FeO}_2]$ ) является источником супероксид-анион-радикала [Abugo, Rifkind, 1994; van Zwieten et al., 2014]. Однако в исследуемой системе окисления гемоглобина не происходило, поэтому можно предположить иные механизмы связывания Hb с мембраной. Наблюдаемое в наших экспериментах увеличение доли MBHb при добавлении к эрит-

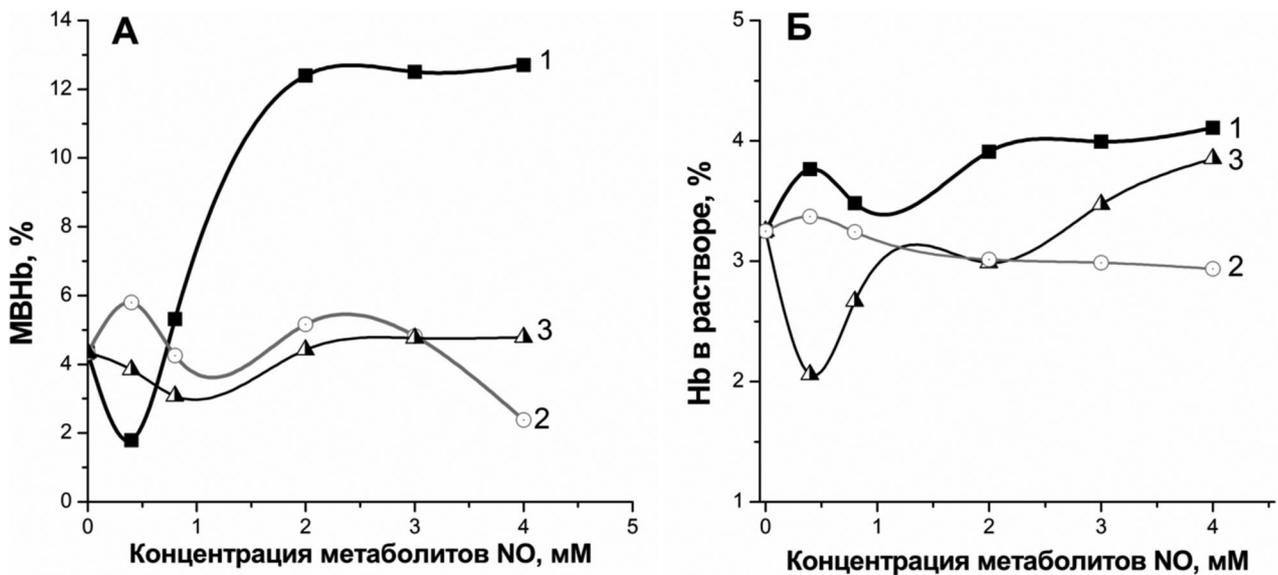


Рис. 2. Содержание Hb в мембранах (А) и в гемолизате (Б) при инкубации эритроцитов с разными концентрациями NaNO<sub>2</sub> (1), CysNO (2), GSNO (3). 100 % – показатели без добавления метаболитов NO

Fig. 2. Hb content in membranes (A) and hemolysate (Б) at the erythrocyte incubation with different concentrations of NaNO<sub>2</sub> (1), CysNO (2), GSNO (3). 100 % – indicators without addition of NO metabolites

роцитам метилглиоксала согласуется с отмеченной в статье [Маюрова, 2012] положительной корреляцией 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. 1, кривая 3). Параллельно снижению SH-групп мембранных белков происходило увеличение содержания Hb в мембранах. Этот факт указывает на то, что снижение количества восстановленных тиолов может быть связано с уменьшением их доступности в результате экранирования молекулами Hb примембранного слоя. В ряде работ было показано, что при низких концентрациях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> количество доступных тиоловых групп коррелирует с содержанием белка в мембране эритроцитов [Sharma, Premachandra, 1991; Rocha et al., 2009; Mendanha et al., 2012]. Нельзя исключить и возможность образования ковалентных аддуктов мембранных сульфгидрилов с метилглиоксалем [Zeng, Davies, 2005].

Имеются данные, что при окислительном стрессе 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 лучше связывается с мембранами эритроцитов больных сахарным диабетом, чем с мембранами контрольных эритроцитов [Bryszewska, Szosland, 1988]. Примечательно, что сродство гликированного Hb к мембранам было ниже, чем у немодифицированного. В условиях наших экспериментов образование гликированного Hb невозможно из-за слишком малого времени инкубации клеток с метилглиоксалем.

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<sub>2</sub>, CysNO и GSNO. Только в случае инкубации с NaNO<sub>2</sub> наблюдалось значительное увеличение доли MBHb – с 4 до 12 % (рис. 2, А, кривая 1). При действии нитрозотиолов колебания концентрации MBHb были наименее выражены. На графике, отражающем зависимость уровня MBHb от концентрации NaNO<sub>2</sub>/CysNO, присутствует экстремум при концентрации 0,4 мМ (рис. 2, А). В случае использования NaNO<sub>2</sub> происходит уменьшение MBHb на 2 %, а в случае CysNO – увеличение на 2 %. Примечательно, что на графике зависимости концентрации гемоглобина в инкубационной среде (степень гемолиза) от концентрации внесенных в среду NO-доноров имеются аналогичные экстремумы, но противоположной направленности

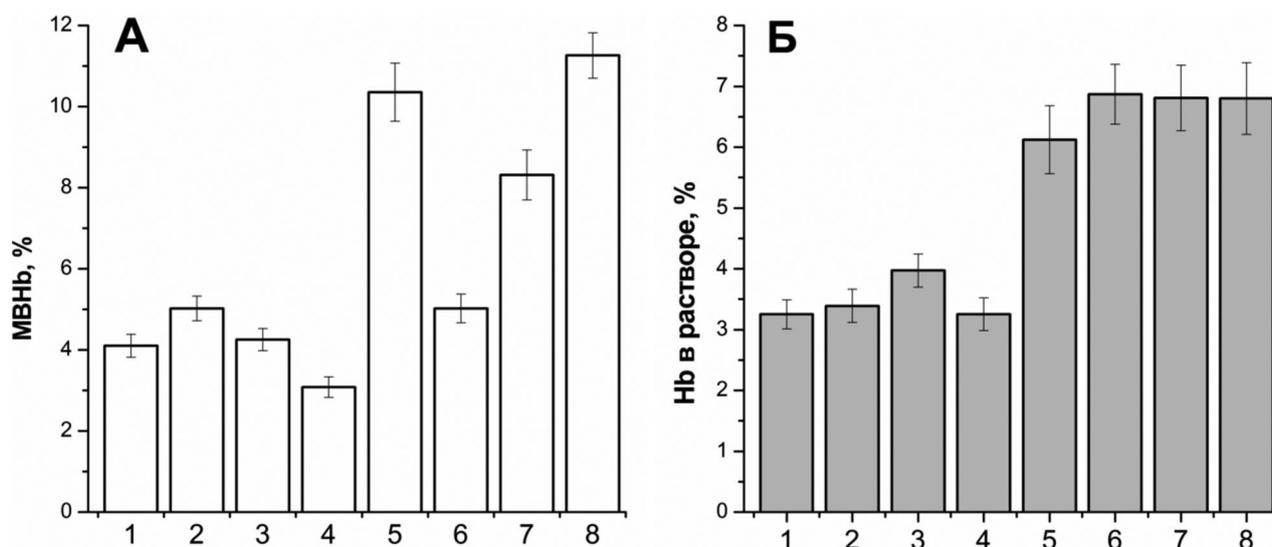


Рис. 3. Содержание Hb в мембранах (А) и в гемолизате (Б) при инкубации эритроцитов с MG (3 мМ) и NaNO<sub>2</sub>/Cys-NO/GS-NO (0,8 мМ). 1 – без добавок; 2 – NaNO<sub>2</sub>; 3 – CysNO; 4 – GSNO; 5 – MG; 6 – MG + NaNO<sub>2</sub>; 7 – MG + CysNO; 8 – MG + GSNO. 100 % – показатели без добавления редокс-активных веществ. Данные представлены в виде M±m

Fig. 3. Hb content in membranes (A) and hemolysate (Б) at the incubation of erythrocytes with MG (3 mM) and NaNO<sub>2</sub>/Cys-NO/GS-NO (0.8 mM). 1 – no additives; 2 – NaNO<sub>2</sub>; 3 – CysNO; 4 – GSNO; 5 – MG; 6 – MG + NaNO<sub>2</sub>; 7 – MG + CysNO; 8 – MG + GSNO. 100 % – indicators without addition of red-ox reactive compounds. The data are represented as M±SEM

(рис. 2, Б), что может быть косвенным указанием на существующую взаимосвязь между этими параметрами.

Сопоставляя графики на рисунке 2, можно предположить, что в определенных концентрационных пределах (до 1 мМ) метаболиты NO определяют уровень MBHb и гемолитическую устойчивость эритроцитов. Повышение MBHb на 2 % от уровня контроля оказывает стабилизирующий эффект на мембрану эритроцита (рис. 2, сопоставление кривых 2), снижение на 2 % – дестабилизирующий (рис. 2, сопоставление кривых 1). Наблюдаемое снижение степени гемолиза в экспериментах с CysNO (рис. 2, кривые 2), при увеличении доли MBHb, можно объяснить стабилизирующим действием гемоглобина на мембраны. Это предположение подтверждается данными работ [Knutton et al., 1970; Комиссарчик и др., 1977], в которых показано, что разрушение липопротеиновой структуры эритроцитарных мембран с высоким содержанием Hb происходило в гораздо меньшей степени по сравнению с мембранами с малым содержанием Hb. Однако результаты, полученные на телях эритроцитов, следует переносить на целую клетку с большой осторожностью.

Поскольку ранее нами было показано, что различные метаболиты NO ингибируют протекание реакции Майяра [Kosmachevskaya et al., 2013, 2014], мы решили проверить действие

этих соединений на эритроциты. Была проведена совместная инкубация эритроцитов с метилглиоксалем и NO-донорными соединениями. На рисунке 3 представлены результаты по содержанию MBHb в эритроцитах (А) и Hb в инкубационной среде (Б). При концентрации MG в инкубационной среде 3 мМ доля MBHb составляла ~ 10 %.

Внесение в среду инкубации NaNO<sub>2</sub> и CysNO приводило к снижению доли связанного с мембранами Hb на 50 и 20 % соответственно, по сравнению с эритроцитами, обработанными только метилглиоксалем. В противоположность этому GSNO вызывал незначительное (в пределах ошибки эксперимента) увеличение доли MBHb. Наблюдаемое отличие в действии нитрит-ионов и нитрозотиолов можно объяснить исходя из химических свойств этих соединений. Нитрозотиолы непосредственно высвобождают NO, который способен вступать в свободнорадикальные реакции. Нитрозотиолы содержат также редокс-активную SH-группу, которая может окисляться с образованием тильного радикала (RS<sup>·</sup>). В условиях карбонильного стресса GSNO стимулирует образование свободнорадикальных интермедиатов [Шумаев и др., 2009; Kosmachevskaya et al., 2013], которые, в свою очередь, могут стимулировать реакции перекисного окисления липидов и тем самым образование новых порций АКС, усиливая карбонильный стресс. Перечисленные про-

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

Вероятно, 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 свободнорадикальных 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  $\text{NO}_2^-$  ингибирования образования MBHb. Если сами по себе нитрит-ионы оказывают токсическое действие на эритроциты, то в условиях карбонильного стресса они могут оказывать протекторное действие.

Нитрозотиолы (CysNO и GSNO) в разной степени ингибировали связывание гемоглобина с мембраной, индуцированное метилглиоксалем (рис. 3, А, столбцы 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. 4, кривая 2). Реакция MG с глутатионом носит равновесный характер, образование тиогемиацетала происходит только при значительном избытке GSH. В условиях эксперимента клетки скорее испытывают недостаток GSH, который активно расходуется в глиоксалазной реакции [Valentine et al., 1970; Larsen et al., 1985; Thornalley et al., 1989].

Во всех вариантах опытов с суспензией эритроцитов, инкубированных с метилглиоксалем, количество внеклеточного Hb возрастало примерно в 2 раза по сравнению с эритроцитами, обработанными только метаболитами NO (рис. 3, Б). Этот эффект может быть связан с повреждением мембран эритроцитов свободнорадикальными интермедиатами, образующимися в реакции MG с аминокислотными остатками и NO-донорными соединениями.

Что касается эффектов, вызванных нитрит-ионами, то они могут быть разнонаправленными. С одной стороны,  $\text{NO}_2^-$  в реакции с охуHb приводит к образованию метаболитов с высокой окислительной способностью ( $\text{NO}_2^+$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), стимулирующих ПОЛ (перекисное окисление липидов) и окисление гемоглобина до Hb- $[\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}]$  [Zavodnik et al., 1999; Gow et al., 1999; Keszler et al., 2008]. Это способствует встраиванию гемоглобина, а также продуктов его

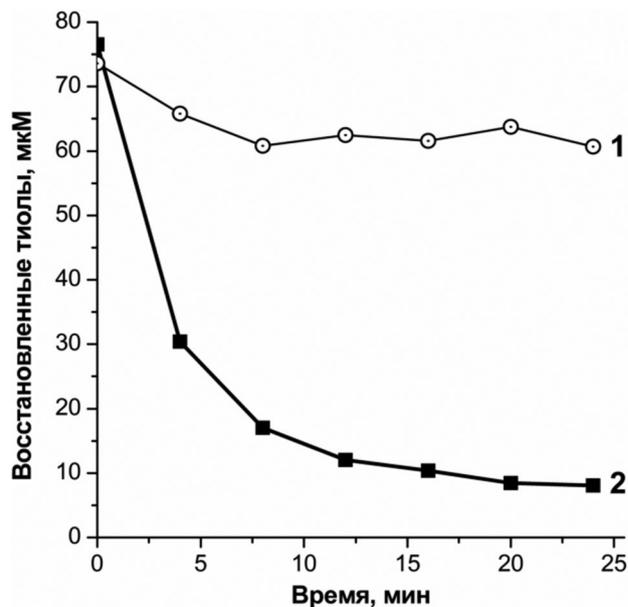


Рис. 4. Изменение содержания восстановленных тиолов в модельной системе: цистеина (1) и глутатиона (2) при инкубации их с метилглиоксалем (RSH: MG = 1: 1). Состав реакционной смеси описан в разделе «Материалы и методы»

Fig. 4. Changes in the content of reduced thiols in the model system: cysteine (1 – the bold line) and glutathione (2 – the thin line) during their incubation with methylglyoxale (RSH: MG = 1: 1). The reaction mixture is described in the Materials and Methods section

окисления и деструкции (железа, гема и денатурированного 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 менее реакционноспособных нитропропроизводных, купируя дальнейшее участие оснований Шиффа в свободнорадикальных превращениях с участием MG и  $\text{O}_2$ . Поэтому при действии MG на эритроциты нитрит-ионы нивелируют вызванный им эффект и препятствуют переходу Hb в мембраносвязанное состояние.

Метилглиоксаль также активно связывается с SH-группами Cys-93  $\beta$ -цепей гемоглобина, причем степень модификации сульфгидрильных групп выше для охуHb, поскольку в R-конформации их доступность возрастает (SH-эффект) [Aboluwoye et al., 1998]. Модификация Hb метилглиоксалем меняет зарядные характеристики молекулы белка, что повышает его гидрофобность и предрасположенность к связыванию с мембраной. Имеются данные [Заводник, Лапшина, 1996], показывающие, что обработка Hb в течение одного часа мало-

новым и глутаровым диальдегидами облегчала процесс автоокисления охуHb. Эти альдегиды, так же как и метилглиоксаль, относятся к активным карбонильным соединениям, образуемым в результате реакций ПОЛ. Можно предположить, что в условиях карбонильного стресса существует сеть взаимоусиливающихся процессов, в результате которых образуются как активные формы кислорода, так и новые АКС, причем 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 гемолиз указывают на тесную связь между карбонильным и окислительным стрессами [Kalapos, 2008a, b; Шумаев и др., 2009].

Особо отметим, что окисления гемоглобина в присутствии метилглиоксаля не происходило во всех вариантах эксперимента. Причиной может быть восстановление окисленного гемоглобина (metHb), образующегося в реакции охуHb с NO, редокс-активными интермедиатами реакции Майяра [Kosmachevskaya et al., 2013, 2014].

## Заключение

Полученные результаты позволили сделать вывод, что нитрит-ионы активнее, чем нитрозотиолы, индуцируют переход Hb из растворимого в мембраносвязанное состояние. Вероятнее всего, это происходит за счет индукции окислительных процессов, в частности, окисления SH-групп как самого Hb, так и белков мембраны. При обработке эритроцитов метилглиоксалем эффект был противоположным. Это, как нам кажется, связано с тем, что ионы  $\text{NO}_2^-$  в этих условиях блокировали образование свободнорадикальных продуктов реакции Майяра. Нельзя исключить и того, что низкие концентрации NO могут оказывать стабилизирующее действие на эритроцитарные мембраны посредством модуляции уровня MBHb, участвующего 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]. Понижение содержания MBHb при обработке эритроцитов 0,4 мМ  $\text{NaNO}_2$  (рис. 2, А, кривая 1) можно объяснить развитием адаптивной реакции, направленной на активацию пентозофосфатного пути. В работе [Атауллаханов и др., 1984] 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].

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, вызывает гемолиз и выход гемоглобина в сосудистое русло.

Добавим также, что данные о мембраносвязанном гемоглобине могут быть дополнительным параметром для общей оценки состояния системы крови и для диагностики гемоглобинопатий и анемий, в том числе связанных с различными заболеваниями и определяемых с помощью компьютерной экспертной системы, разрабатываемой нами совместно с кафедрой «Компьютерные медицинские системы» НИЯУ МИФИ и клинично-диагностической лабораторией Российского онкологического научного центра им. Н. Н. Блохина [Насыбуллина и др., 2015].

## Литература

- 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. 1984. Т. 49, № 2. С. 193–197.
- Емельянов В. В., Леонтьев Д. В., Ищенко А. В., Булавицева Т. С., Саватеева Е. А., Данилова И. Г. Атомно-силовая микроскопия эритроцитов и метаболические нарушения при экспериментальном сахарном диабете и его коррекции липоевой кислотой // Биофизика. 2016. Т. 61, № 6. С. 922–926.
- Заводник И. Б., Лапшина Е. А. Процессы окисления гемоглобина человека // Биохимия. 1996. Т. 61, № 1. С. 42–48.
- 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 // Общие механизмы клеточных реакций на повреждающие воздействия: Сб. науч. тр. Л.: Ин-т цитол., 1977. С. 29–31.
- Космачевская О. В., Насыбуллина Э. И., Блиндарь В. Н., Топунов А. Ф. Роль эритроцитарного гемоглобина в адсорбционном механизме адаптации клетки // Актуальные вопросы экспериментальной биологии и медицины: Матер. Сухумской меж-

дунар. науч.-практ. конф. 2017. С. 421–429. URL: [http://niiepit2017.com/img/Materialy\\_konferentzii\\_niiepit2017.pdf](http://niiepit2017.com/img/Materialy_konferentzii_niiepit2017.pdf) (дата обращения: 05.03.2018).

Космачевская О. В., Топунов А. Ф. Метод определения содержания гемоглобинподобных белков в гетерогенных смесях // Прикладная биохимия и микробиология. 2007. Т. 43, № 3. С. 347–353. doi: 10.1134/S0003683807030131

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

Насыбуллина Э. И., Никитаев В. Г., Проничев А. И., Блиндарь В. Н., Космачевская О. В., Топунов А. Ф. Экспертная система диагностики гемоглобинопатий с использованием данных о состоянии крови, эритроцитов и гемоглобина // Краткие сообщения по физике. 2015. Т. 42, № 7. С. 22–27. doi: 10.3103/S1068335615070039

Шумаев К. Б., Горудко И. В., Космачевская О. В., Панасенко О. М., Пугаченко И. С., Топунов А. Ф., Рууге Э. К. Ингибирование динитрозильными комплексами железа гемолиза эритроцитов, индуцированного гипогалоидными кислотами // Актуальные вопросы экспериментальной биологии и медицины: Матер. Сухумской междунар. науч.-практ. конф. 2017. С. 445–452. URL: [http://niiepit2017.com/img/Materialy\\_konferentzii\\_niiepit2017.pdf](http://niiepit2017.com/img/Materialy_konferentzii_niiepit2017.pdf) (дата обращения: 05.03.2018).

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.

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. Vol. 12. P. 17–25.

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

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. Vol. 314. P. 838–845.

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

Chu H., Breite A., Ciraolo P., Franco R. S., Low P. S. Characterization of the deoxyhemoglobin binding site on human erythrocyte band 3: implications for O<sub>2</sub> regulation of erythrocyte properties // Blood. 2008. Vol. 111. P. 932–938.

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

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. Vol. 96. P. 9027–9032.

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

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

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

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

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

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. Vol. 7. P. 357–371.

Kosmachevskaya O. V., Shumaev K. B., Nasybulina E. I., Gubkina S. A., Topunov A. F. Interaction of S-nitrosoglutathione with methemoglobin under conditions of modeling carbonyl stress // Hemoglobin. 2013. Vol. 37, no. 3. P. 205–218. doi: 10.3109/03630269.2013.773911

Kosmachevskaya O. V., Shumaev K. B., Nasybulina E. I., Topunov A. F. Formation of nitri- and nitrosyl-hemoglobin in systems modeling the Maillard reaction // Clin. Chem. Lab. Med. 2014. Vol. 52, no. 1. P. 161–168. doi: 10.1515/cclm-2012-0792

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. Vol. 82. P. 625–638.

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. Vol. 45, no. 6. P. 473–481.

Misiti F., Meucci E., Zuppi C., Vincenzoni F., Giardina B., Castagnola M., Messina I. O<sub>2</sub>-dependent stimulation of the pentose phosphate pathway by S-nitrosocysteine in human erythrocytes // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. Vol. 294. P. 829–834.

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. Vol. 5. e84. doi: 10.3389/fphys.2014.00084

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. Vol. 86. P. 133–138.

Rifkind J. M., Nagababu E. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging // Antioxid. Redox Signal. 2013. Vol. 18. P. 2274–2283.

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 Mol. Dis. 2009. Vol. 43. P. 68–73.

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

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. Vol. 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. Vol. 45. P. 121–128.

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

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

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. Vol. 7. P. 115–120.

Valentine W. N., Paglia D. E., Neerhout R. C., Konrad P. N. Erythrocyte glyoxalase II deficiency with coincidental hereditary elliptocytosis // *Blood.* 1970. Vol. 36. P. 797–808.

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

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. Vol. 287. P. 454–464.

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. Vol. 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. Vol. 18. P. 1232–1241.

Поступила в редакцию 12.03.2018

## References

Ataullakhanov F. I., Vitvitskii V. M., Zhabotin-skii A. M., Kiyatkin A. B., Pichugin A. V. Steady-state dependence of methemoglobin reduction rate on its concentration in intact human erythrocytes. *Biochemistry (Moscow)*. 1984. Vol. 49, no. 2. P. 150–154.

Emel'yanov V. V., Leont'ev D. V., Ishchenko A. V., Bulavintseva T. S., Savateeva E. A., Danilova I. G. Atomic-force microscopy of erythrocytes and metabolic disorders in experimental diabetes mellitus and during the correction of diabetes with lipoic acid. *Biophysica*. 2016. Vol. 61, no. 6. P. 906–910.

Komissarchik Ya. Yu., Levin S. V., Sviridov B. E., Sabalyauskas I. Yu., Aiditite G. S. Stabiliziruyushchaya rol' primembrannykh belkov v podderzhanii strukturnoi teslostonosti kletochnykh membran [The stabilization role of perimembrane proteins in the maintenance of structural integrity of cell membranes]. *Obsh. mekhanizmy kletochnykh reaktsii na povrezhdayushchie vozd.: Sbornik nauch. tr. [General Mechanisms of Cell Reactions to Damaging Actions: Coll. Sci. Papers]*. Leningrad: Ins-t tsitol., 1977. P. 29–31.

Kosmachevskaya O. V., Nasybullina E. I., Blindar V. N., Topunov A. F. Rol' eritrotsitarnogo gemoglobina v adsorbtsionnom mekhanizme adaptatsii kletki [The role of erythrocytic hemoglobin in adsorption mechanism of cell adaptation]. *Aktual'nye vopr. eksp. biol. i meditsiny. Mater. Sukhumskoj mezhdunar. nauch.-prakt. konf. [Current Iss. of Experimental Biol. and Medicine: Proceed. Sukhum Int. Sci.-Pract. Conf.]*. Sukhum. 2017. P. 421–429. URL: [http://niiepit2017.com/img/Materialy\\_konferentzii\\_niiepit2017.pdf](http://niiepit2017.com/img/Materialy_konferentzii_niiepit2017.pdf) (accessed: 05.03.2018).

Kosmachevskaya O. V., Topunov A. F. Method of determination of the content of hemoglobin-like proteins in heterogenic mixtures. *Prikl. biokhim. i mikrobiol. [Appl. Biochem. Microbiol.]*. 2007. Vol. 43, no. 3. P. 313–319. doi: 10.1134/S0003683807030131

Mayurova T. V. The specificity of oxidative processes of sportsman-skaters. *Vestnik Yuzhnoural'skogo*

gos. univ. [Bull. South Ural St. Univ.]. 2012. No. 28. P. 126–128.

Nasybullina E. I., Nikitaev V. G., Pronichev A. N., Blindar V. N., Kosmachevskaya O. V., Topunov A. F. Expert diagnostic system for hemoglobinopathies using the data on blood, erythrocyte, and hemoglobin state. *Bull. Lebedev Physics Inst.* 2015. Vol. 42, no. 7. P. 206–208. doi: 10.3103/S1068335615070039

Shumaev K. B., Gorudko I. V., Kosmachevskaya O. V., Panasenko O. M., Pugachenko I. S., Topunov A. F., Ruuge E. K. Ingibirovanie dinitrozil'nymi kompleksami zheleza gemoliza eritrotsitov, indutsirovannogo gipogaloidnymi kislotami [Dinitrosyl iron complexes inhibition hemolysis of erythrocytes induced by hypohaloid acids]. *Aktual'nye vopr. eksp. biol. i meditsiny. Mater. Sukhumskoj mezhdunar. nauch.-prakt. konf. [Current Iss. of Experimental Biol. and Medicine: Proceed. Sukhum Int. Sci.-Pract. Conf.]*. Sukhum. 2017. P. 445–452. URL: [http://niiepit2017.com/img/Materialy\\_konferentzii\\_niiepit2017.pdf](http://niiepit2017.com/img/Materialy_konferentzii_niiepit2017.pdf) (accessed: 05.03.2018).

Shumaev K. B., Gubkina S. A., Kumsikova E. M., Shepel'kova G. S., Ruuge E. K., Lankin V. Z. Mechanism for the superoxide radical formation upon L-lysine interaction with dicarbonyl compounds. *Biochemistry (Moscow)*. 2009. Vol. 74, no. 4. P. 461–466.

Zavodnik I. B., Lapshina E. A. Oxidation of human hemoglobin. *Biochemistry (Moscow)*. 1996. Vol. 61, no. 1. P. 29–34.

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. Vol. 12. P. 17–25.

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

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. Vol. 314. P. 838–845.
- Bryszewska M., Szosland K. Association between the glycation of erythrocyte membrane proteins and membrane fluidity. *Clin. Biochem.* 1988. Vol. 21. P. 49–51.
- Chu H., Breite A., Ciraolo P., Franco R. S., Low P. S. Characterization of the deoxyhemoglobin binding site on human erythrocyte band 3: implications for O<sub>2</sub> regulation of erythrocyte properties. *Blood.* 2008. Vol. 111. P. 932–938.
- Chu H., Low P. S. Mapping of glycolytic enzyme-binding sites on human erythrocyte band 3. *Biochem J.* 2006. Vol. 400. P. 143–151.
- 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. Vol. 96. P. 9027–9032.
- Hoff S., Larsen F. H., Andersen M. L., Lund M. N. Quantification of protein thiols using ThioGlo1 fluorescent derivatives and HPLC separation. *Analyst.* 2013. Vol. 138. P. 2096–2103.
- Iwata H., Ukeda H., Maruyama T., Fujino T., Sawamura M. Effect of carbonyl compounds on red blood cells deformability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. Vol. 321. P. 700–706.
- Kalapos M. P. Methylglyoxal and glucose metabolism: a historical perspective and future avenues for research. *Drug. Metabol. Drug. Interact.* 2008a. Vol. 23. P. 69–91.
- Kalapos M. P. The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chem. Biol. Interact.* 2008b. Vol. 171. P. 251–271.
- Keszler A., Piknova B., Schechter A. N., Hogg N. The reaction between nitrite and oxyhemoglobin: a mechanistic study. *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. P. 9615–9622.
- 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. Vol. 7. P. 357–371.
- Kosmachevskaya O. V., Shumaev K. B., Nasybulina E. I., Gubkina S. A., Topunov A. F. Interaction of S-nitrosoglutathione with methemoglobin under conditions of modeling carbonyl stress. *Hemoglobin.* 2013. Vol. 37, no. 3. P. 205–218. doi: 10.3109/03630269.2013.773911
- Kosmachevskaya O. V., Shumaev K. B., Nasybulina E. I., Topunov A. F. Formation of nitri- and nitrosyl-hemoglobin in systems modeling the Maillard reaction. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2014. Vol. 52, no. 1. P. 161–168. doi: 10.1515/ccim-2012-0792
- 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. Vol. 82. P. 625–638.
- 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. Vol. 45, no. 6. P. 473–481.
- Misiti F., Meucci E., Zuppi C., Vincenzoni F., Giardina B., Castagnola M., Messina I. O<sub>2</sub>-dependent stimulation of the pentose phosphate pathway by S-nitrosocysteine in human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. Vol. 294. P. 829–834.
- 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. Vol. 5. e84. doi: 10.3389/fphys.2014.00084
- Nagababu E., Mohanty J. G., Bhamidipaty S., Oshera G. R., Rifkind J. M. Role of membrane in the formation of heme degradation products in red blood cells. *Life Sci.* 2010. Vol. 86. P. 133–138.
- Rifkind J. M., Nagababu E. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. *Antioxid. Redox Signal.* 2013. Vol. 18. P. 2274–2283.
- Rocha S., Costa E., Coimbra S., Nascimento H., Catarina 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 Mol. Dis.* 2009. Vol. 43. P. 68–73.
- Sayare M., Fikiet M. Cross-linking of hemoglobin to the cytoplasmic surface of human erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 1981. Vol. 256. P. 13152–13158.
- 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. Vol. 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. Vol. 45. P. 121–128.
- Singh M., Shin S. Changes in erythrocyte aggregation and deformability in diabetes mellitus: a brief review. *Indian J. Exp. Biol.* 2009. Vol. 47. P. 7–15.
- Thornalley P. J. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems – role in ageing and disease. *Drug. Metabol. Drug. Interact.* 2008. Vol. 23. P. 125–150.
- 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. Vol. 7. P. 115–120.
- Valentine W. N., Paglia D. E., Neerhout R. C., Konrad P. N. Erythrocyte glyoxalase II deficiency with coincidental hereditary elliptocytosis. *Blood.* 1970. Vol. 36. P. 797–808.
- van Zwieten R., Verhoeven A. J., Roos D. Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells. *Free. Radic. Biol. Med.* 2014. Vol. 67. P. 377–386.
- 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. Vol. 287. P. 454–464.
- 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. Vol. 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. Vol. 18. P. 1232–1241.

Received March 12, 2018

## **СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:**

### **Насыбуллина Эльвира Ильгизовна**

младший научный сотрудник, к. б. н.  
Институт биохимии им. А. Н. Баха,  
Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН  
Ленинский проспект, 33, стр. 2, Москва, Россия, 119071  
эл. почта: lvirus198709@rambler.ru

### **Космачевская Ольга Владимировна**

старший научный сотрудник, к. б. н.  
Институт биохимии им. А. Н. Баха,  
Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН  
Ленинский проспект, 33, стр. 2, Москва, Россия, 119071  
эл. почта: rizobium@yandex.ru

### **Топунов Алексей Федорович**

заведующий лаб., д. б. н., проф.  
Институт биохимии им. А. Н. Баха,  
Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН  
Ленинский проспект, 33, стр. 2, Москва, Россия, 119071  
эл. почта: aftopunov@yandex.ru

## **CONTRIBUTORS:**

### **Nasybullina, Elvira**

Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre  
“Fundamentals of Biotechnology”,  
Russian Academy of Sciences  
bldg. 2, 33 Leninsky pr., 119071 Moscow, Russia  
e-mail: lvirus198709@rambler.ru

### **Kosmachevskaya, Olga**

Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre  
“Fundamentals of Biotechnology”,  
Russian Academy of Sciences  
bldg. 2, 33 Leninsky pr., 119071 Moscow, Russia  
e-mail: rizobium@yandex.ru

### **Topunov, Alexey**

Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre  
“Fundamentals of Biotechnology”,  
Russian Academy of Sciences  
bldg. 2, 33 Leninsky pr., 119071 Moscow, Russia  
e-mail: aftopunov@yandex.ru