

РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

УДК 577.2

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СТРЕСС ЭРИТРОЦИТОВ ИНДУЦИРУЕТ ГЛУТАТИОНИЛИРОВАНИЕ ГЕМОГЛОБИНА

© 2023 г. П. И. Зарипов^{a, b}, Ю. Д. Кулешова^a, Ю. М. Полуэктов^{a, c}, С. В. Сидоренко^b, О. К. Кван^c,
Г. В. Максимов^b, В. А. Митькевич^a, А. А. Макаров^a, И. Ю. Петрушанко^a *

^aИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

^bБиологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

^cНациональный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко,
Москва, 125047 Россия

*e-mail: irina-pva@mail.ru

Поступила в редакцию 10.06.2023 г.

После доработки 14.07.2023 г.

Принята к публикации 14.07.2023 г.

Метаболический стресс, вызванный недостатком глюкозы, существенно влияет на состояние эритроцитов, в которых гликолиз является основным путем производства АТФ. Гипогликемия может быть как физиологической, возникающей при голодании и больших физических нагрузках, так и патологической, сопровождающей ряд заболеваний, таких как сахарный диабет. В данной работе нами охарактеризовано состояние изолированных эритроцитов при метаболическом стрессе, вызванном отсутствием глюкозы. Установлено, что 24 ч инкубации эритроцитов в безглюкозной среде, имитирующей плазму крови, приводит к снижению уровня АТФ в 2 раза относительно соответствующего временного контроля. По-видимому, наблюдаемое при этом увеличение размера клеток и повышение внутриклеточной концентрации ионов Na^+ связано с нарушением работы ионных транспортеров из-за падения концентрации АТФ. При недостатке глюкозы в среде в изолированных эритроцитах не изменялся уровень ни ионов Ca^{2+} , ни активных форм кислорода (АФК), ни оксида азота (NO), в то время как уровень основного низкомолекулярного тиола клеток глутатиона (GSH) снижался почти в 2 раза. Выявлено, что метаболический стресс изолированных эритроцитов, несмотря на отсутствие роста АФК, индуцирует глутатионилирование гемоглобина. Это связано с недостатком АТФ, что приводит к снижению уровня восстановленного GSH за счет ингибирования его синтеза, а также, вероятно, со снижением концентрации NADPH, необходимого для восстановления окисленного глутатиона (GSSG) и для деглутатионилирования белков. Таким образом, метаболический стресс эритроцитов индуцирует глутатионилирование гемоглобина, не связанное с ростом АФК. Этот процесс может иметь важное физиологическое значение, так как глутатионилирование гемоглобина изменяет его сродство к кислороду.

Ключевые слова: эритроциты, метаболический стресс, глутатионилирование гемоглобина, редокс-статус эритроцитов, глутатион

DOI: 10.31857/S0026898423060241, **EDN:** SMPPEE

ВВЕДЕНИЕ

Эритроциты – самые многочисленные клетки крови, обеспечивающие снабжение всех органов и тканей кислородом, который переносится основным белком эритроцитов гемоглобином. Продолжительность жизни и функциональная активность эритроцитов определяется условиями их созревания в красном костном мозге, а также различными стрессовыми факторами и составляет в среднем около 115 дней [1]. Вследствие отсутствия органелл и рибосом эритроцит имеет ограниченный и невосполняемый запас белков [1–3], окислительное повреждение которых приводит к изменению функционирования и старению эрит-

роцита [4]. Перемещаясь по кровотоку, эритроциты испытывают механический, осмотический и метаболический стресс. Последний во многом обусловлен прохождением клеток через органы и ткани с различным содержанием кислорода и доступностью питательных веществ, что в свою очередь влияет на редокс-статус эритроцитов и их способность восполнять уровень АТФ. Выраженность стресса определяется функциональным состоянием организма. Метаболический стресс в эритроцитах возникает при дефиците АТФ и NADPH вследствие снижения уровня глюкозы в крови при голодании или метаболических нарушениях [5]. Так, например, сахарный диабет (СД) типа 1 и 2

приводит к сверхфизиологическим колебаниям уровня глюкозы, а заболевания дыхательной системы (например, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), астма, фиброз легких) приводят к формированию дыхательной недостаточности, метаболического ацидоза и хронической гипоксии [6, 7]. Пожилые люди с диабетом имеют более высокий риск гипогликемии из-за возрастного нарушения целого ряда адаптивных физиологических реакций [8]. Хроническая гипогликемия повышает риск когнитивной дисфункции и сердечно-сосудистых заболеваний. Частота возникновения гипогликемических эпизодов коррелирует с длительностью заболевания СД и продолжительностью лечения инсулином [9]. Для того, чтобы предотвратить или уменьшить влияние гипогликемии на функциональное состояние эритроцитов, необходимо понимать, к каким изменениям состояния эритроцитов приводит данный фактор.

Из-за отсутствия митохондрий эритроцитам недоступен аэробный путь получения АТФ с помощью дыхания [10], и в зрелых эритроцитах гликолиз является единственным источником АТФ. На синтез АТФ посредством гликолиза затрачивается около 90% поступающей в эритроциты глюкозы, а оставшиеся 10% направляется по пентозофосфатному пути, в котором происходит образование NADPH [11]. При активном расходе NADPH концентрация NADP^+ в цитозоле эритроцитов растет, в результате чего активируется пентозофосфатный путь, позволяющий восстановить окисленный NADPH. Дефицит АТФ приводит к нарушению функции трансмембранных ионных насосов (Na^+/K^+ -АТФазы, Ca^{2+} -АТФазы), обеспечивающих поддержание ионного градиента, а также синтеза восстановленного глутатиона (GSH), являющегося важным звеном антиоксидантной защиты; метаболизма пуринов и пиримидинов; поддержания железа гемоглобина в восстановленном состоянии (Fe^{2+}); защиты клеточных белков от окислительного повреждения; сохранения асимметрии мембранных фосфолипидов [10, 12]. Неспособность эритроцитов обеспечить свои энергетические потребности при гипогликемии приводит к нарушению работы антиоксидантной системы, повреждению ограниченного запаса белков, ускорению процессов старения и преждевременному гемолизу [13].

Процессы формирования активных форм кислорода (АФК) в эритроцитах до конца не изучены, однако известно, что аутоокисление гемоглобина приводит к продукции супероксид-аниона. Дисфункция ионных транспортеров, перегрузка кальцием, а также формирование АФК эндотелиальными клетками приводят к окислительному стрессу в эритроцитах, что в свою очередь индуцирует перекисное окисление липидов и окислитель-

ное повреждение белков [14]. Антиоксидантная система эритроцитов состоит из ферментов, таких как супероксиддисмутаза (СОД), катализа, пероксиредоксин-2, глутаредоксин, глутатионпероксидаза, NADPH, и пула восстановленного GSH [4] – основного низкомолекулярного тиола клеток млекопитающих [15]. При развитии окислительного стресса GSH взаимодействует с АФК и окисленными до SOH тиоловыми группами белков, что приводит к существенному снижению отношения восстановленного глутатиона к окисленному глутатиону (GSH/GSSG) и инициирует запуск глутатионилирования тиоловых групп белков [16]. Глутатионилирование тиоловых групп не только предотвращает их необратимое окисление, но и в ряде случаев изменяет функциональную активность белка [17, 18]. При нормализации редокс-статуса, а именно восстановлении уровня NADPH, глутаредоксин осуществляет деглутатионилирование SH-групп белков [16]. Гемоглобин также способен подвергаться глутатионилированию, которое считается одним из маркеров окислительного стресса эритроцитов [19]. В настоящее время имеющиеся в литературе данные о влиянии депривации глюкозы на состояние эритроцитов в организме [20, 21] и изолированных эритроцитов [22, 23] несколько противоречивы, поэтому вопрос о влиянии глюкозного голодания на редокс-статус изолированных эритроцитов и редокс-зависимые модификации гемоглобина остается открытым.

Понимание ключевых механизмов повреждения и адаптации эритроцитов при метаболическом стрессе позволит разработать новые подходы для повышения их адаптационной способности при различных патологических состояниях. В данной работе мы охарактеризовали состояние эритроцитов при метаболическом стрессе, индуцированном отсутствием глюкозы, по изменению их размера, уровня АТФ, внутриклеточного редокс-статуса, ионного гомеостаза и степени глутатионилирования гемоглобина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Подготовка образцов. Забор образцов проводили во время донации цельной донорской крови из контейнера Бактивам (“Maco Pharma”, Франция) в пробирку с гепарином после поворота – для предотвращения попадания воздуха в адаптер для вакуумных пробирок Вакувам (“Improvacuter”, Россия). Отсутствие воздуха предотвращало активацию клеточного состава, гепарин необходим для антикоагуляции. Для получения эритроцитов кровь центрифугировали, отбирали супернатант и ресуспендировали эритроциты в буфере, имитирующем плазму крови (140 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 2 мМ CaCl_2 , 0,75 мМ MgSO_4 , 0,015 мМ ZnCl_2 , 100 мкМ L-аргинин, 200 мкМ глутамат натрия, 200 мкМ

глицин, 200 мкМ аланин, 600 мкМ глутамин, 20 мМ HEPES-имидазол, pH 7.4), как описано ранее [24]. Процедуру центрифугирования повторяли трижды. В буфер, используемый для ресуспендирования контрольной группы, предварительно добавили 10 мМ глюкозы. Отмытые эритроциты ресуспендировали соответствующим буфером (в объемном соотношении 1 : 2) и инкубировали в буфере с глюкозой (контроль) и в безглюкозной среде (стресс) в течение 24 ч при 37°C.

Проточная цитометрия. Методом проточной цитофлуориметрии проведен анализ внутриклеточного редокс-статуса клеток по уровням GSH, АФК и оксида азота (NO), а также определен уровень внутриклеточного кальция (Ca^{2+}). Для окрашивания клеток флуоресцентными красителями 1 мкл суспензии эритроцитов ресуспендировали в 100 мкл буфера, имитирующего плазму крови, с глюкозой (контроль) и без глюкозы (стресс). Содержание низкомолекулярных тиолов оценивали с использованием флуоресцентного красителя монобромбимана (Ex/Em = 392/490 нм; “Thermo Fisher Scientific”, США), который добавляли до конечной концентрации 20 мкМ [24]. Уровень АФК и уровень NO определяли с помощью окрашивания 5 мкМ дигидрородамина 123 (DHR123) (Ex/Em = 507/525 нм; “Thermo Fisher Scientific”) [25] и 5 мкМ DAF-FM DA (Ex/Em = 495/515 нм; “Thermo Fisher Scientific”) [26] соответственно. Внутриклеточный Ca^{2+} определяли окрашиванием клеток 2.5 мкМ Fluo-4 (Ex/Em = 494/506 нм; “Thermo Fisher Scientific”), как описано ранее [27]. После окрашивания клетки инкубировали в темноте в течение 30 мин при 37°C. Также оценивали среднее значение параметров малоуглового (FSC) и бокового светорассеяния (SSC), характеризующих соответственно размер и форму/гранулярность клеток [28]. Анализ эритроцитов проводили на проточном цитофлуориметре BD LSR-Fortessa™ (“Becton Dickinson”, США).

Атомно-абсорбционная спектроскопия. Методом атомно-абсорбционной спектроскопии оценивали содержание ионов Na^{+} и K^{+} в контрольных образцах и образцах после стресса, как описано ранее [29]. После завершения эксперимента клетки несколько раз отмывали холодным раствором 0.1 М $MgCl_2$ путем центрифугирования при 2000 g в течение 10 мин с последующим отбором супернатанта и ресуспендированием клеток в 0.1 М $MgCl_2$. После отмывки осажденные клетки ресуспендировали в 5%-ной трихлоруксусной кислоте (ТХУ) для осаждения белков [30]. После центрифугирования в течение 10 мин при 13700 g супернатант собирали и определяли в нем концентрации ионов Na^{+} и K^{+} на приборе Квант-2М (“КОРТЭК”, Россия) [31]. Осадок растворяли в 0.1 М NaOH и использовали для определения белка по методу Бредфорда. Полученные значе-

ния концентраций Na^{+} и K^{+} в пробах нормировали на содержание в них белка.

Оценка уровня АТФ. Содержание АТФ в клетках оценивали по уровню флуоресценции на микропланшетном ридере Spark (“Tecan”, Австрия) при помощи набора ATP Assay Kit (“Sigma-Aldrich”, США) [26].

Иммуноблоттинг. Глутатионилирование гемоглобина в клетках оценивали методом иммуноблоттинга. После инкубации клеток в безглюкозной среде или в контрольных условиях эритроциты лизировали путем трехкратного цикла разморозки–заморозки и добавляли буфер для образцов (Tris-Glycine SDS sample-buffer; “Novex”, США) без меркаптоэтанола. Электрофорез проводили в 14%-ном ПААГ. Перед инкубацией в блокирующем буфере (5%-ное молоко) мембраны фиксировали 5%-ным раствором формалина в течение 40 мин (для снижения потерь α - и β -субъединиц гемоглобина, M_r 12–13 кДа). Уровень глутатионилирования гемоглобина оценивали с использованием антител на глутатион в составе белков (MAB5310; “Millipore”, США) в разведении 1 : 1000. Полученный сигнал нормировали на содержание α - и β -субъединиц гемоглобина, которое оценивали с использованием коммерческих антител (ab92492 и ab214049 соответственно; “Abcam”, Великобритания) в разведении 1 : 1000.

Статистическая обработка. Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 8. Нормальность распределения данных оценивали по критерию Шапиро–Уилка. Для оценки достоверности различий между двумя группами использовали парный *t*-критерий Стьюдента для двух зависимых (парных) выборок. При значении $p < 0.05$ различия между средними значениями групп считали достоверными. На графиках приведены средние значения и величина стандартного отклонения, рассчитанные на основании 3–5 независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С целью оценить влияние депривации по глюкозе на энергетический баланс эритроцитов определяли уровень АТФ. Установлено, что инкубация эритроцитов в безглюкозной среде в течение 24 ч приводит к существенному снижению уровня АТФ в клетках – на 47% относительно контроля ($p = 0.0149$) (рис. 1). Известно, что падение уровня АТФ ниже 25% от нормального приводит к разрушению цитоскелета с последующим гемолизом [32]. В условиях проведенного нами эксперимента критического падения внутриклеточного АТФ не зарегистрировано. Таким образом, наблюдаемое через 24 ч депривации по глюкозе снижение содержания АТФ свидетельствует

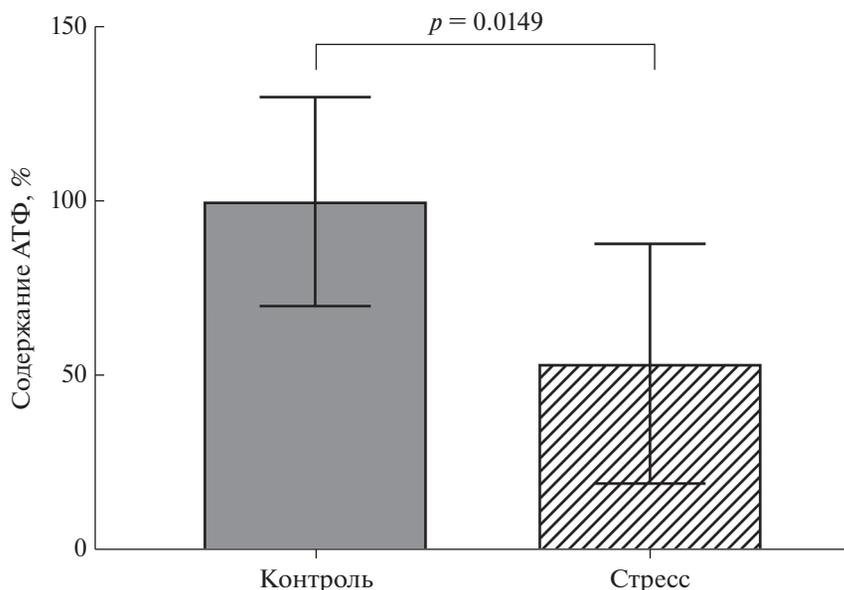


Рис. 1. Содержание АТФ в эритроцитах через 24 ч инкубации в среде с глюкозой (контроль) и в безглюкозной среде (стресс). Данные представлены как среднее \pm SD, $n = 3$.

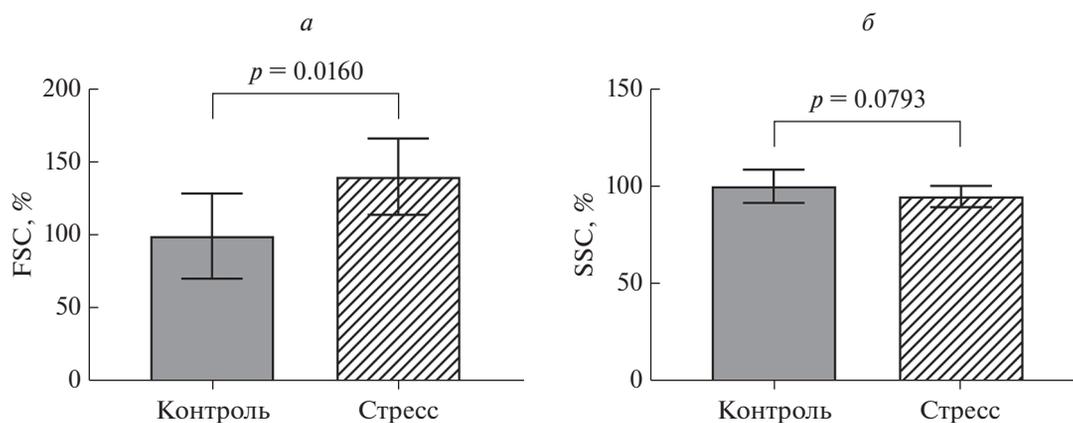


Рис. 2. Изменение параметров малоуглового (FSC) (а) и бокового (SSC) (б) светорассеяния эритроцитов через 24 ч инкубации в среде с глюкозой (контроль) и в безглюкозной среде (стресс). Данные представлены как среднее \pm SD, $n = 5$.

об успешной индукции метаболического стресса в эритроцитах.

Как следует из результатов, полученных методом проточной цитометрии, 24-часовая инкубация эритроцитов в безглюкозной среде приводила к росту среднего значения малоуглового рассеяния (FSC), характеризующего размер клеток, на 40% ($p = 0.0160$) (рис. 2а); при этом параметр бокового рассеяния клеток (SSC), характеризующий их гранулярность и форму, практически не изменялся (рис. 2б).

Для того, чтобы выяснить, с чем связано изменение объема клеток, мы оценили внутриклеточ-

ные уровни ионов Na^+ и K^+ . Установлено, что при метаболическом стрессе существенно ($p = 0.0104$) возрастает содержание внутриклеточного Na^+ (рис. 3а). Концентрация K^+ при этом достоверно не меняется, хотя и наблюдается некоторая тенденция к снижению (рис. 3б). Таким образом, увеличение размера клеток связано с нарушением градиента Na^+ и K^+ , что, по-видимому, обусловлено снижением активности Na^+/K^+ -АТФазы.

Как видно из результатов, представленных на рис. 4а, не выявлено значимых отличий в уровне внутриклеточного Ca^{2+} через 24 ч инкубации в безглюкозной среде по сравнению с контролем.

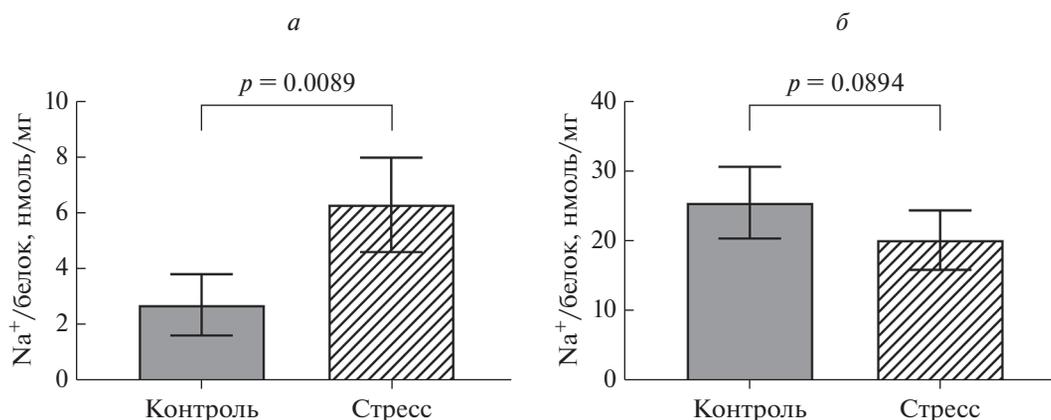


Рис. 3. Содержание в эритроцитах внутриклеточного Na⁺ (а) и K⁺ (б) через 24 ч инкубации в среде с глюкозой (контроль) и в безглюкозной среде (стресс). Данные представлены как среднее ± SD, n = 3.

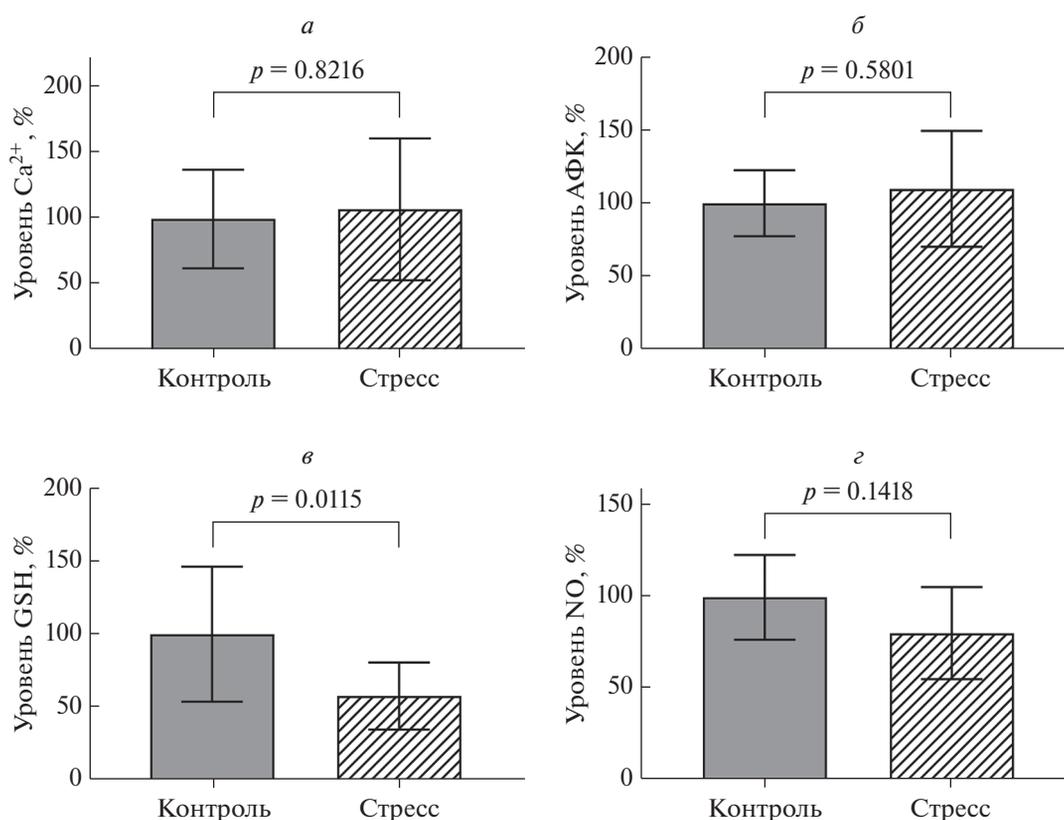


Рис. 4. Уровень Ca²⁺ (а), АФК (б), GSH (в), NO (г) в эритроцитах через 24 ч инкубации в среде с глюкозой (контроль) и в безглюкозной среде (стресс). За 100% принято значение исследуемых параметров в контроле. Данные представлены как среднее ± SD, n = 5.

Влияние метаболического стресса на редокс-статус эритроцитов оценивали по изменению уровня АФК, GSH и NO при инкубации в условиях депривации глюкозы. Выявлено, что через 24 ч глюкозного голодания уровень АФК не изменялся (рис. 4б), что свидетельствует об отсутствии окислительного стресса. Несмотря на это, наблюдалось значительное, на 42% ($p = 0.0115$), сниже-

ние уровня GSH (рис. 4в). Уровень NO при этом достоверно не изменялся ($p = 0.1418$), хотя тенденция к снижению просматривалась (рис. 4г).

С целью оценить, как метаболический стресс влияет на состояние основного белка эритроцитов – гемоглобина, мы определили степень его глутатионилирования. Согласно результатам им-

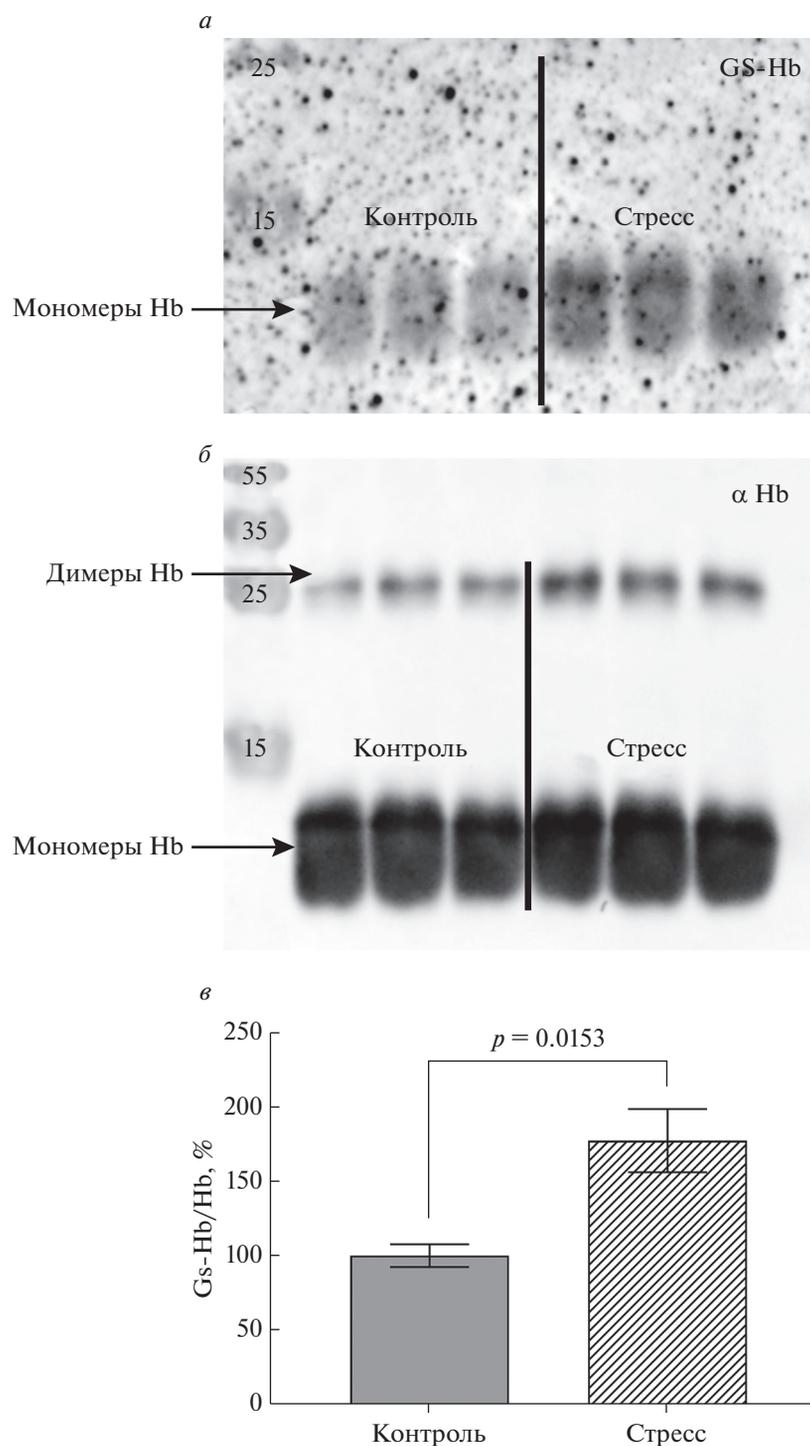


Рис. 5. Уровень глутатионирования гемоглобина (Hb) через 24 ч инкубации эритроцитов в среде с глюкозой (контроль) и в безглюкозной среде (стресс). Иммуноблоттинг с антителами против глутатионированного белка (GS-Hb) (а) и α -субъединицы гемоглобина (α -Hb) (б). в – Результаты количественного анализа. За 100% принят уровень глутатионирования Hb в эритроцитах, инкубируемых в присутствии глюкозы (контроль). Данные представлены как среднее \pm SD.

муноблот-анализа, 24-часовой метаболический стресс эритроцитов приводил к значительному, почти в 2 раза, увеличению степени глутатионирования гемоглобина (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В проведенном исследовании оценили изменения в состоянии эритроцитов и их основного белка – гемоглобина – в условиях метаболиче-

ского стресса, который был вызван отсутствием глюкозы в среде инкубации. В результате 24-часового голодания по глюкозе в эритроцитах в 2 раза снижался уровень АТФ по сравнению с соответствующим временным контролем (рис. 1). Ранее в литературе описано и более существенное (на 80% от начального значения) снижение АТФ при отсутствии глюкозы в среде [22]. Однако необходимо заметить, что авторы, G. Ромео и др. [22], не приводят данные о соответствующем временном контроле, и описанный ими буфер для эритроцитов не содержал не только глюкозы, но и аминокислот, в то время как нами использована среда, имитирующая плазму крови, в состав которой входил ряд необходимых аминокислот.

В организме человека физиологической нормой считается суточная гликемическая вариабельность, подразумевающая поочередную смену пониженного и повышенного уровня глюкозы [33], который варьирует в пределах 3.9–6.1 ммоль/л. Снижение уровня глюкозы ниже 3.9 ммоль/л считается состоянием гипогликемии, хотя первые симптомы начинают проявляться при снижении содержания глюкозы до 3.0 ммоль/л [8, 34]. При некоторых заболеваниях, таких как СД типа I и II [35, 36], поражениях гипофиза [37], патологических состояниях (сепсис [38]), в том числе обусловленных хирургическим вмешательством (бариатрическая хирургия [39]) и несвоевременной коррекцией гипогликемической терапии [40], может развиваться хроническая гипогликемия, которая влечет за собой развитие окислительного стресса, вызывающего сосудистые осложнения, риск тромбозов и эндотелиальную дисфункцию [41].

Гипогликемия, индуцированная введением инсулина здоровым волонтерам, также приводила к быстрому росту АФК как в эндотелиальных клетках [41], так и в эритроцитах [21], такой же эффект вызывала физическая активность пациентов с СД типа 2 [20]; при этом падал уровень тиолов и снижалась активность СОД [21]. Согласно полученным нами данным, инкубация эритроцитов в отсутствие глюкозы в течение 24 ч не приводит к росту АФК (рис. 4б). Это может быть связано с тем, что в организме АФК возрастает вследствие окислительного стресса эндотелиальных клеток, чего в изолированных эритроцитах не происходит.

Несмотря на отсутствие окислительного стресса в изолированных эритроцитах, нехватка глюкозы приводит к значительному снижению уровня GSH (рис. 4в). Это обусловлено как недостатком NADPH, необходимого для восстановления GSSG глутатионредуктазой, так и нарушением синтеза GSH ферментами синтеза глутатиона: γ -глутамилцистеинсинтетазой и глутатионсинтазой, — вызванного дефицитом АТФ [23]. Ранее показано, что нарушение метаболизма глюкозы

через пентозофосфатный путь в эритроцитах быстро приводит к снижению содержания NADPH и GSH [42]. В отсутствие глюкозы в среде происходит ингибирование глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PD) — основного фермента пентозофосфатного пути, в ходе которого NADP⁺ восстанавливается до NADPH. Известно, что снижение активности G6PD вследствие мутаций или при добавлении ингибитора ведет к повышению чувствительности эритроцитов к окислительному стрессу и, как следствие, к их усиленному гемолизу. Это один из механизмов патогенеза гемолитической анемии. В клетках с дефицитом G6PD GSSG не восстанавливается до GSH; а при окислительном стрессе в клетке не происходит восстановления дисульфидных связей в мембранных белках, которое индуцируется присутствием GSH [43]. При анализе метаболомного состава эритроцитов, испытывающих недостаток глюкозы в течение 48 ч, наблюдали снижение общего пула глутатиона, которое происходило на фоне роста внутриклеточных концентраций непосредственных его предшественников — глутамата и цистеина [23]. Это свидетельствует о том, что вследствие недостатка АТФ снижается активность двух АТФ-зависимых ферментов, участвующих в синтезе глутатиона: γ -глутамилцистеинсинтетазы и глутатионсинтазы. Также наблюдается снижение метаболитов гликолиза и увеличение отношения пирувата к лактату, что свидетельствует о нарушении гомеостаза восстановительных эквивалентов [23].

Условия снижения уровней GSH и NADPH благоприятны для глутатионилирования внутриклеточных белков [17]. Нами обнаружено, что индуцированный метаболический стресс вызывает повышение уровня глутатионилирования основного белка эритроцитов — гемоглобина (рис. 5). Это может иметь важное физиологическое значение, поскольку ранее показано, что глутатионилирование гемоглобина приводит к увеличению его сродства к кислороду [44, 45]. Тетрамер гемоглобина, в состав которого входит 2 α - и 2 β -субъединицы, содержит 6 остатков цистеина — по 1 на каждой α -субъединице (Cys104) и по 2 на каждой β -субъединице (Cys93, Cys112) [46]. Каждая из субъединиц имеет гем, обеспечивающий связывание O₂ [47]. В настоящее время доказано глутатионилирование по остаткам Cys93 β [48] и Cys112 β [45], в то время как данные о глутатионилировании Cys104 α противоречивы [49, 50]. Как нами показано ранее, доступность Cys93 β для глутатионилирования гораздо выше в деоксиформе гемоглобина, в то время как Cys112 β доступен для глутатионилирования как в окси-, так и в деоксиформе, а доступность Cys104 α сомнительна [49]. На рис. 6 показаны остатки цистеина на трехмерной модели гемоглобина человека. Следует заметить, что эксперимент проводили в условиях 20%-ного кислорода, при которых весь гемогло-

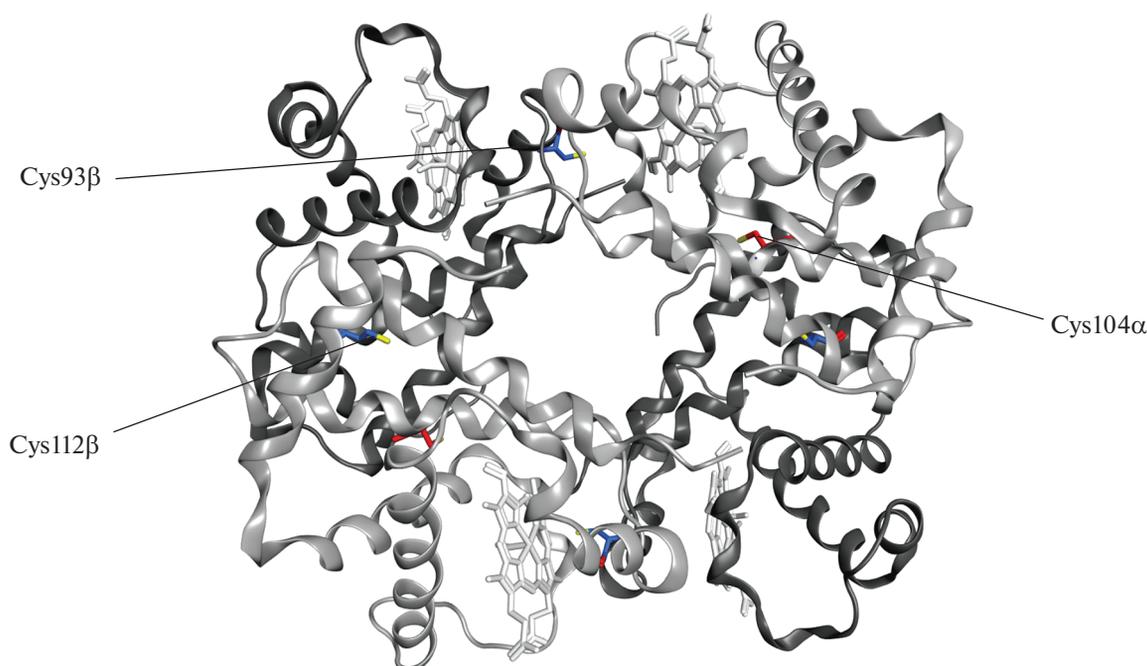


Рис. 6. Структура гемоглобина человека (PDB Acc. No. 1GZX). Темно-серым цветом показаны β -субъединицы молекулы, светло-серым – α -субъединицы. Синим выделены остатки цистеина C93 β и C112 β , которые могут подвергаться глутатионилрованию, красным – остаток C104 α , сведения о глутатионилровании которого противоречивы.

бин находится в оксиформе [51]. В этом случае, скорее всего, происходит глутатионирование остатка Cys112 β .

Необходимо отметить, что значительное повышение степени глутатионирования гемоглобина описано при диабете, хронической почечной недостаточности и железодефицитной анемии [52]. Причиной возрастания уровня глутатионирования считают окислительный стресс, развивающийся при этих патологиях. Так, при окислительном стрессе возрастает степень глутатионирования не только гемоглобина, но и ключевых мембранных белков, а также белков цитоскелета клетки (спектрина, анкирина), что сказывается на реологических свойствах эритроцитов [19]. Несмотря на то, что окислительный стресс относится к одной из наиболее часто встречающихся причин глутатионирования белков, которое защищает тиоловые группы белков от необратимого окисления и в ряде случаев изменяет их функционирование [17], мы показали, что метаболический стресс в отсутствие роста АФК также может быть индуктором глутатионирования.

Наблюдаемое нами повышение уровня внутриклеточного Na^+ (рис. 3а), наряду с увеличением среднего размера клеток (рис. 2а), свидетельствует о снижении активности Na^+/K^+ -АТФазы [53] – как следствия падения уровня АТФ (рис. 1). На основании зарегистрированного нами повышения глутатионированной формы гемоглобина (рис. 5) можно предположить, что в снижение

активности Na^+/K^+ -АТФазы вносит вклад также ее глутатионирование, которое ингибирует активность фермента [18].

Необходимо также отметить, что гемоглобин может образовывать нековалентный комплекс с глутатионом, высвобождая две из четырех молекул GSH при деоксигенации [49], поэтому снижение уровня глутатиона при метаболическом стрессе влияет на этот процесс и тем самым изменяет адаптационную способность эритроцитов к гипоксии.

Таким образом, метаболический стресс, вызванный недостатком глюкозы, приводит к снижению уровня АТФ и глутатиона, что, несмотря на отсутствие окислительного стресса, индуцирует глутатионирование гемоглобина. В связи с тем, что глутатионирование гемоглобина изменяет его сродство к кислороду [44, 45], этот процесс может существенно изменить функциональную активность эритроцитов. На фоне снижения АТФ также нарушается работа ионных транспортеров, что приводит к увеличению внутриклеточной концентрации Na^+ и объема эритроцитов. На основании полученных данных можно сделать вывод, что метаболический стресс повышает степень глутатионирования белков эритроцитов, что может оказывать влияние на функционирование не только гемоглобина, но и других компонентов этих клеток, в частности белков ионного транспорта.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-14-00374).

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От всех пациентов получено информированное согласие на проведение медицинского обследования, в том числе взятие образцов крови.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Franco R.S. (2012) Measurement of red cell lifespan and aging. *Transfus. Med. Hemotherapy*. **39**, 302–307. <https://doi.org/10.1159/000342232>
2. Moura P.L., Hawley B.R., Mankelov T.J., Griffiths R.E., Dobbe J.G.G., Streekstra G.J., Anstee D.J., Satchwell T.J., Toye A.M. (2018) Non-muscle myosin II drives vesicle loss during human reticulocyte maturation. *Haematologica*. **103**, 1997–2007. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.199083>
3. Ovchinnikova E., Aglialoro F., Von Lindern M., Van Den Akker E. (2018) The shape shifting story of reticulocyte maturation. *Front. Physiol.* **9**, 829. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00829>
4. Mohanty J.G., Nagababu E., Rifkind J.M. (2014) Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Front. Physiol.* **5**, 84. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00084>
5. Tang H., Ho H., Wu P., Chen S., Kuypers F.A., Cheng M., Chiu D.T. (2015) Inability to maintain GSH pool in G6PD-deficient red cells causes futile AMPK activation and irreversible metabolic disturbance. *Antioxid. Redox Signal.* **22**, 744–759. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6142>
6. Mamillapalli C., Tentu R., Jain N.K., Bhandari R. (2019) COPD and type 2 diabetes. *Curr. Respir. Med. Rev.* **15**, 112–119. <https://doi.org/10.2174/1573398X15666190211155640>
7. Vasileiadis I., Alevrakis E., Ampelioti S., Vagionas D., Rovina N., Koutsoukou A. (2019) Acid-base disturbances in patients with asthma: a literature review and comments on their pathophysiology. *J. Clin. Med.* **8**, 563. <https://doi.org/10.3390/jcm8040563>
8. Sircar M., Bhatia A., Munshi M. (2016) Review of hypoglycemia in the older adult: clinical implications and management. *Can. J. Diabetes*. **40**, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.cjcd.2015.10.004>
9. UK Hypoglycaemia study group (2007) Risk of hypoglycaemia in types 1 and 2 diabetes: effects of treatment modalities and their duration. *Diabetologia*. **50**, 1140–1147. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0599-y>
10. van Wijk R., van Solinge W.W. (2005) The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood*. **106**, 4034–4042. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1622>
11. Pandey K.B., Rizvi S.I. (2011) Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. *Biomed. Pap.* **155**, 131–136. <https://doi.org/10.5507/bp.2011.027>
12. Miwa S. (1983) Hereditary disorders of red cell enzymes in the emben-meyerhof pathway. *Am. J. Hematol.* **14**, 381–391. <https://doi.org/10.1002/ajh.2830140410>
13. Koralkova P., van Solinge W.W., van Wijk R. (2014) Rare hereditary red blood cell enzymopathies associated with hemolytic anemia – pathophysiology, clinical aspects, and laboratory diagnosis. *Int. J. Lab. Hematol.* **36**, 388–397. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12223>
14. Lang F., Abed M., Lang E., Föller M. (2014) Oxidative stress and suicidal erythrocyte death. *Antioxid. Redox Signal.* **21**, 138–153. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5747>
15. Gilbert H.F. (2006) Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **63**, 69–172.
16. Poluektov Y.M., Petrushanko I.Yu., Undrovinas N.A., Lakunina V.A., Khapchaev A.Y., Kapelko V.I., Abramov A.A., Lakomkin V.L., Novikov M.S., Shirinsky V.P. (2019) Glutathione-related substances maintain cardiomyocyte contractile function in hypoxic conditions. *Sci. Rep.* **9**, 4872. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41266-2>
17. Mיעאל J.J., Gallogly M.M., Qanungo S., Sabens E.A., Shelton M.D. (2008) Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1941–1988. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2089>
18. Petrushanko I.Yu., Yakushev S., Mitkevich V.A., Kamanina Y.V., Ziganshin R.H., Meng X., Anashkina A.A., Makhro A., Lopina O.D., Gassmann M. (2012) S-glutathionylation of the Na,K-ATPase catalytic α subunit is a determinant of the enzyme redox sensitivity. *J. Biol. Chem.* **287**, 32195–32205. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.391094>
19. Giustarini D., Dalle-Donne I., Milzani A., Braconi D., Santucci A., Rossi R. (2019) Membrane skeletal protein S-glutathionylation in human red blood cells as index of oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* **32**, 1096–1102. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00408>
20. Brinkmann C., Neumann E., Blossfeld J., Frese S., Orthmann P., Montiel G., Bloch W., Brixius K. (2011) Influence of glycemic status and physical fitness on oxidative stress and the peroxiredoxin system in the erythrocytes of non-insulin-dependent type 2 diabetic men. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* **119**, 559–564. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1279712>
21. Yousefzade G., Nakhaee A. (2012) Insulin-induced hypoglycemia and stress oxidative state in healthy people. *Acta Diabetol.* **49**, 81–85. <https://doi.org/10.1007/s00592-011-0311-z>
22. Pompeo G., Girasole M., Cricenti A., Boumris G., Bellelli A., Amiconi S. (2010) Erythrocyte death *in vitro* induced by starvation in the absence of Ca^{2+} . *Biochim. Biophys. Acta.* **1798**, 1047–1055. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2010.02.002>
23. Nemkov T., Qadri S.M., Sheffield W.P., D'Alessandro A. (2020) Decoding the metabolic landscape of patho-

- physiological stress-induced cell death in anucleate red blood cells. *Blood Transfus.* **130**, 130–142. <https://doi.org/10.2450/2020.0256-19>
24. Van Cromvoirt A.M., Fenk S., Sadafi A., Melnikova E.V., Lagutkin D.A., Dey K., Petrushanko I.Yu., Hegemann I., Goede J.S., Bogdanova A. (2021) Donor age and red cell age contribute to the variance in lorrca indices in healthy donors for next generation ektacytometry: a pilot study. *Front. Physiol.* **12**, 639722. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.639722>
 25. Petrushanko I., Bogdanov N., Bulygina E., Grenacher B., Leinsoo T., Boldyrev A., Gassmann M., Bogdanova A. (2006) Na-K-ATPase in rat cerebellar granule cells is redox sensitive. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **290**, 916–925. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00038.2005>
 26. Petrushanko I.Yu., Bogdanov N.B., Lapina N., Boldyrev A.A., Gassmann M., Bogdanova A.Yu. (2007) Oxygen-induced regulation of Na/K ATPase in cerebellar granule cells. *J. Gen. Physiol.* **130**, 389–398. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709783>
 27. Mitkevich V.A., Kretova O.V., Petrushanko I.Yu., Burnysheva K.M., Sosin D.V., Simonenko O.V., Ilinskaya O.N., Tchurikov N.A., Makarov A.A. (2013) Ribonuclease binase apoptotic signature in leukemic kasumi-1 cells. *Biochimie.* **95**, 1344–1349. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.02.016>
 28. Yamamoto A., Saito N., Yamauchi Y., Takeda M., Ueki S., Itoga M., Kojima K., Kayaba H. (2014) Flow cytometric analysis of red blood cell osmotic fragility. *SLAS Technol.* **19**, 483–487. <https://doi.org/10.1177/2211068214532254>
 29. Slatinskaya O.V., Zaripov P.I., Brazhe N.A., Petrushanko I.Yu., Maksimov G.V. (2022) Changes in the conformation and distribution of hemoglobin in the erythrocyte upon inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase activity. *Biophys.* **67**, 726–733. <https://doi.org/10.1134/S0006350922050189>
 30. Makhro A., Huisjes R., Verhagen L.P., Mañú-Pereira M. del M., Llaudet-Planas E., Petkova-Kirova P., Wang J., Eichler H., Bogdanova A., van Wijk R. (2016) Red cell properties after different modes of blood transportation. *Front. Physiol.* **7**, 288. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00288>
 31. Fedorov D.A., Sidorenko S.V., Yusipovich A.I., Parshina E.Y., Tverskoi A.M., Abramicheva P.A., Maksimov G.V., Orlov S.N., Lopina O.D., Klimanova E.A. (2021) Na⁺/K⁺ imbalance contributes to gene expression in endothelial cells exposed to elevated NaCl. *Heliyon.* **7**, e08088. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08088>
 32. Zhang R., Xiang Y., Ran Q., Deng X., Xiao Y., Xiang L., Li Z. (2014) Involvement of calcium, reactive oxygen species, and ATP in hexavalent chromium-induced damage in red blood cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **34**, 1780–1791. <https://doi.org/10.1159/000366378>
 33. Suh S., Kim J.H. (2015) Glycemic variability: how do we measure it and why is it important? *Diabetes Metab. J.* **39**, 273–282. <https://doi.org/10.4093/dmj.2015.39.4.273>
 34. Cryer P.E., Axelrod L., Grossman A.B., Heller S.R., Montori V.M., Seaquist E.R., Service F.J. (2009) Evaluation and management of adult hypoglycemic disorders: an endocrine society clinical practice guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**, 709–728. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1410>
 35. Szadkowska A., Czyżewska K., Pietrzak I., Mianowska B., Jarosz-Chobot P., Myśliwiec M. (2018) Hypoglycemia unawareness in patients with type 1 diabetes. *Pediatr. Endocrinol. Diabetes Metab.* **24**, 126–134. <https://doi.org/10.5114/pedim.2018.80994>
 36. Silbert R., Salcido-Montenegro A., Rodriguez-Gutierrez R., Katabi A., McCoy R.G. (2018) Hypoglycemia among patients with type 2 diabetes: epidemiology, risk factors, and prevention strategies. *Curr. Diab. Rep.* **18**, 53. <https://doi.org/10.1007/s11892-018-1018-0>
 37. Vega-Cano S., Cordero-Vázquez E., Mestre-Torres J. (2021) Hipoglucemia como forma de presentación de infiltración hipofisaria por un linfoma. *Med. Clínica.* **156**, 362–363. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2020.01.040>
 38. Wang J., Zhu C.-K., Yu J.-Q., Tan R., Yang P.-L. (2021) Hypoglycemia and mortality in sepsis patients: a systematic review and meta-analysis. *Heart Lung.* **50**, 933–940. <https://doi.org/10.1016/j.hrtlng.2021.07.017>
 39. Salehi M., Vella A., McLaughlin T., Patti M.-E. (2018) Hypoglycemia after gastric bypass surgery: current concepts and controversies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **103**, 2815–2826. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-00528>
 40. Amiel S.A. (2021) The consequences of hypoglycemia. *Diabetologia.* **64**, 963–970. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05366-3>
 41. Papachristoforou E., Lambadiari V., Maratou E., Makrilakis K. (2020) Association of glycemic indices (hyperglycemia, glucose variability, and hypoglycemia) with oxidative stress and diabetic complications. *J. Diabetes Res.* 2020, 7489795. <https://doi.org/10.1155/2020/7489795>
 42. Rogers T.B., Lokuta A.J. (1994) Angiotensin II signal transduction pathways in the cardiovascular system. *Trends Cardiovasc. Med.* **4**, 110–116. [https://doi.org/10.1016/1050-1738\(94\)90062-0](https://doi.org/10.1016/1050-1738(94)90062-0)
 43. Kosower N.S., Zipser Y., Faltin Z. (1982) Membrane thiol-disulfide status in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells. relationship to cellular glutathione. *Biochim. Biophys. Acta.* **691**, 345–352. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(82\)90424-2](https://doi.org/10.1016/0005-2736(82)90424-2)
 44. Craescu C.T., Poyart C., Schaefferl C., Garel M.-C., Kisterp J., Beuzard Y. (1986) Covalent binding of glutathione to hemoglobin. II. Functional consequences and structural changes reflected in NMR spectra. *J. Biol. Chem.* **261**, 14710–14716.
 45. Metere A., Iorio E., Scorza G., Camerini S., Casella M., Crescenzi M., Minetti M., Pietraforte D. (2014) Carbon monoxide signaling in human red blood cells: evidence for pentose phosphate pathway activation and protein deglutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 403–416. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5102>
 46. Colombo G., Dalle-Donne I., Giustarini D., Gagliano N., Portinaro N., Colombo R., Rossi R., Milzani A. (2010) Cellular redox potential and hemoglobin S-glutathio-

- nylation in human and rat erythrocytes: a comparative study. *Blood Cells. Mol. Dis.* **44**, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2009.11.005>
47. Perutz M.F. (1970) Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin: haem–haem interaction and the problem of allostery. *Nature.* **228**, 726–734. <https://doi.org/10.1038/228726a0>
48. Rubino F.M. (2021) The redox potential of the β -93-cysteine thiol group in human hemoglobin estimated from *in vitro* oxidant challenge experiments. *Molecules.* **26**, 2528. <https://doi.org/10.3390/molecules26092528>
49. Fenk S., Melnikova E.V., Anashkina A.A., Poluektov Y.M., Zaripov P.I., Mitkevich V.A., Tkachev Y.V., Kaestner L., Minetti G., Mairbäurl H. (2022) Hemoglobin is an oxygen-dependent glutathione buffer adapting the intracellular reduced glutathione levels to oxygen availability. *Redox Biol.* **58**, 102535. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102535>
50. Chen H.-J.C., Lin W.-P., Chiu S.-D., Fan C.-H. (2014) Multistage mass spectrometric analysis of human hemoglobin glutathionylation: correlation with cigarette smoking. *Chem. Res. Toxicol.* **27**, 864–872. <https://doi.org/10.1021/tx5000359>
51. Collins J.-A., Rudenski A., Gibson J., Howard L., O'Driscoll R. (2015) Relating oxygen partial pressure, saturation and content: the haemoglobin–oxygen dissociation curve. *Breathe (Sheff).* **11**, 194–201. <https://doi.org/10.1183/20734735.001415>
52. Ghezzi P. (2013) Protein glutathionylation in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **1830**, 3165–3172. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.009>
53. Radosinska J., Vrbjar N. (2021) Erythrocyte deformability and Na,K-ATPase activity in various pathophysiological situations and their protection by selected nutritional antioxidants in humans. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 11924. <https://doi.org/10.3390/ijms222111924>

Metabolic Stress of Red Blood Cells Induces Hemoglobin Glutathionylation

P. I. Zaripov^{1, 2}, Iu. D. Kuleshova¹, Yu. M. Poluektov^{1, 3}, S. V. Sidorenko², O. K. Kvan³, G. V. Maksimov², V. A. Mitkevich¹, A. A. Makarov¹, and I. Yu. Petrushanko¹. *

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

²Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

³Burdenko National Medical Research Center for Neurosurgery, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 125047 Russia

*e-mail: irina-pva@mail.ru

Metabolic stress caused by a lack of glucose significantly affects the state of red blood cells, where glycolysis is the main pathway for the production of ATP. Hypoglycemia can be both physiological (occurring during fasting and heavy physical exertion) and pathological (accompanying a number of diseases, such as diabetes mellitus). In this study, we have characterized the state of isolated erythrocytes under metabolic stress caused by the absence of glucose. It was established that 24 h of incubation of the erythrocytes in a glucose-free medium simulating blood plasma led to a twofold decrease in the ATP level into them. Besides, the cell sizes as well as intracellular sodium concentration were increased. These findings could be the result of a disruption in ion transporters' functioning because of a decrease in the ATP level. The calcium level remained unchanged. With a lack of glucose in the medium of isolated erythrocytes, there was no increase in ROS and significant change in the level of nitric oxide, while the level of the main low-molecular weight thiol of cells, glutathione (GSH), decreased by almost 2 times. It was found that the metabolic stress of isolated red blood cells induced hemoglobin glutathionylation despite the absence of ROS growth. The reason was the lack of ATP, which led to a decrease in the level of GSH because of the inhibition of its synthesis and probably, by decrease in the NADPH level required for glutathione (GSSG) reduction and protein de-glutathionylation. Thus, erythrocyte metabolic stress induced hemoglobin glutathionylation, which is not associated with an increase in ROS. This may have an important physiological significance, since glutathionylation of hemoglobin changes its affinity for oxygen.

Keywords: red blood cells, metabolic stress, hemoglobin glutathionylation, erythrocyte redox status, glutathione