

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА

АХМЕД ЛЮДМИЛА ВОЛОДИМИРІВНА

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

Доценко О. І.

« » _____ 2022__

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ГІПОКСІЇ НА ПРОЦЕСИ АУТООКИСЛЕННЯ
ГЕМОГЛОБІНУ В ЕРИТРОЦИТАХ ЛЮДИНИ

Спеціальність 091 Біологія

Магістерська робота

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

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

Голова Е.К.: _____
(підпис)

Вінниця 2022

Ахмед Л. В. Дослідження впливу гіпоксії на процеси аутоокислення гемоглобіну в еритроцитах людини. 091 Біологія. Донецький національний університет імені Василя Стуса. Вінниця. 2021.

Умови гіпоксії моделювали дією на суспензію еритроцитів низькочастотної вібрації в інтервали частот 8- 32 Гц, з кроком 4 Гц, постійною амплітудою $0,5 \pm 0,04$ мм продовж 3-х годин. В динаміці експерименту досліджували змінення внутрішньоклітинного рН, вміст SH-груп білкової фракції, кінетику аутоокиснення гемоглобіну калію ферріціанідом. Показано, що в умовах вібраційного впливу, зниження рН, та характер змінення SH-груп відповідають стану гіпоксії.

Показано зниження схильності гемоглобіну до аутоокислення ферріціанідом з ростом частоти вібраційного впливу, що зв'язано з окисненням SH-груп білків.

Ahmed L. V. Investigation of the effect of hypoxia on the processes of autooxidation of hemoglobin in human erythrocytes. 091 Biology. Vasyl' Stus Donetsk National University. Vinnytsia. 2021.

The hypoxia's conditions were modeled by the action on the suspension of erythrocytes of low-frequency vibration in frequency intervals of 8-32 Hz, with a peak of 4 Hz, with a constant amplitude of 0.5 ± 0.04 mm for 3 hours. In the dynamics of the experiment, changes in intracellular pH, the content of SH-groups in the protein fraction, and the kinetics of autoxidation of hemoglobin with potassium ferricyanide were studied. It is shown that under the conditions of vibration exposure, the decrease in pH and the nature of the change of SH-groups correspond to the state of hypoxia.

The tendency of hemoglobin to autoxidation by ferricyanide is shown to decrease with an increase in the frequency of vibrational influence, which is associated with the oxidation of SH-groups of proteins.

Зміст

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1. Будова гемоглобіну	6
1.2. Редокс-хімія гемоглобіну. Газовий обмін в еритроцитах	9
1.3. Реакції з активними формами кисню – киснем та пероксидом водню	13
1.4. Окиснення глобінів феріціанідом калію	14
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	19
2.1. Визначення внутрішньоклітинного рН	23
2.2. Визначення кінетики аутоокислення гемоглобіну	24
2.3. Визначення загального вмісту -SH-груп в білках еритроцитів	25
2.4. Визначення вмісту гемоглобіну в еритроцитарній пасті	27
2.5. Статистичний аналіз результатів експерименту	27
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТУ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	26
3.1. Моделювання стану гіпоксії шляхом впливу низькочастотної вібрації на суспензію еритроцитів	29
3.1.1. Дослідження змінення внутрішньоклітинного рН за дії низькочастотної вібрації	30
3.1.2. Вплив низькочастотної вібрації на вміст SH-груп в білковій фракції еритроцитів	33
3.2. Вивчення впливу низькочастотної вібрації на схильність до гемоглобіну до аутоокислення феріціанідом	37
ВИСНОВКИ	42
ЛІТЕРАТУРА	43

ВСТУП

Еритроцити є найпоширенішою клітиною в організмі людини, яка відіграє безсумнівну роль в адаптації людини до гіпоксії.

Окрім фізіологічної адаптації, еритроцити реагують на гіпоксію також через O_2 -залежну метаболічну регуляцію, яка включає конкурентне зв'язування дезоксигемоглобіну та гліколітичних ферментів з N-кінцевим цитозольним доменом смуги 3. Протягом багатьох років було отримано структурні та функціональні докази залежного від гіпоксії сприяння накопиченню 2,3-дифосфогліцерату (2,3-DPG), стабілізації деоксигенованого стану Hb та підкислення цитозолу. Завдяки цим процесам відбувається розвантаження Hb- O_2 шляхом стабілізації деоксигенованого напруженого стану (T) негативно зарядженими високофосфатними сполуками. Вважають, що гіпоксія обмежує антиоксидантний потенціал еритроцитів і сприяє посиленню процесу аутоокиснення гемоглобіну [1].

Аутоокиснення нормального гемоглобіну в метгемоглобін відбувається приблизно зі швидкістю 3% на день в організмі, але метгемоглобін також відновлюється назад до оксигемоглобіну, щоб підтримувати постійний рівень близько 1%. Рівень внутрішньоклітинного напруги кисню призводить до утворення окислювачів і перетворення нормального гемоглобіну в метгемоглобін. Оксигемоглобін знаходиться в рівновазі з киснем і гемоглобіном, але сильний окислювач може повністю перетворити оксигемоглобін в метгемоглобін [2]. Аутоокиснення гемоглобіну зазвичай відбувається при нарузі кисню, що призводить до деоксигенації гемоглобіну, і в присутності частково деоксигенованого гемоглобіну [3]. При нульовій нарузі кисню майже не утворюється метгемоглобін, але утворенню metHb сприяє підвищення напруги кисню. Коли оксигемоглобін окислюється до метгемоглобіну, це також призводить до утворення супероксидних радикалів. Супероксидний радикал спонтанно продукує пероксид водню шляхом дисмутації, що призводить до посилення окиснення нормального гемоглобіну.

Ранніми ознаками впливу вібрації на організм людини є розлади мікроциркуляції і транскапілярного обміну, які супроводжуються порушенням процесів надходження і утилізації кисню в тканинах і органах, виникнення тканинної гіпоксії. В умовах вібраційного впливу зручно моделювати як окисний стрес так і стан гіпоксії змінюючи параметри та тривалість вібрації [4]. Паралельно можна досліджувати вплив низькочастотної вібрації на стан еритроцитів людини.

Мета роботи - дослідження кінетики аутоокиснення гемоглобіну еритроцитів людини в умовах гіпоксії з застосуванням модельних експериментів.

Задачі дослідження:

1. Проаналізувати змінення рН в еритроцитах, що знаходилися у умовах дії низькочастотної вібрації в інтервалі 8- 32 Гц, з кроком 4 Гц, постійною амплітудою $0,5 \pm 0,04$ мм.
2. Проаналізувати змінення вмісту SH-груп в еритроцитах, що знаходилися у умовах дії низькочастотної вібрації в інтервалі 8- 32 Гц, з кроком 4 Гц, постійною амплітудою $0,5 \pm 0,04$ мм.
3. За лабораторними показниками визначити наявність в еритроцитах стану гіпоксії.
4. Дослідити кінетику аутоокиснення гемоглобіну еритроцитів людини в умовах дії низькочастотної вібрації.

Об'єкт дослідження: еритроцити людини в умовах гіпоксії.

Предмет дослідження: процеси аутоокиснення в еритроцитах людини, біохімічні ознаки наявності гіпоксії в еритроцитах людини.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Будова гемоглобіну

Гемоглобін – основний білок червоних кров'яних клітин. Структура, властивості та функції якого в порівнянні з іншими білками, вивчені найбільш глибоко та повно.

Структура гемоглобіну представлена двома частинами: небілковою частиною – гемом (4% молекули гемоглобіну) та білковою – глобіном, олігомерною глобулою (96%) [5]. Гем – комплекс Fe^{2+} з протопорфірином.

Чотири із шести координаційних зв'язків атома заліза в гемоглобіні зайняті атомами азоту піррольних кілець, п'ята - залишком гістидину глобіну (проксимальний залишок гістидину), а шоста - молекулою кисню в оксигемоглобіні і, відповідно, H_2O в дезоксигемоглобіні [6].

Молекула гемоглобіну складається з чотирьох субодиниць (двох - і двох -поліпептидних ланцюгів) і включає 574 амінокислоти. Ці поліпептидні ланцюги мають подібну конформацію (третинні просторові структури), але відрізняються послідовністю залишків амінокислот.

Як простетична (небілкова) група виступає особлива пігментна залізовмісна група - гем (комплекс $Fe(II)$ с протопорфірином), білкова компонента носить назву глобін. Молекулярна маса гемоглобіну людини становить 66,8 кДа.

Як видно із рис. 1.1, чотири з шести координаційних зв'язків атома заліза в гемоглобіні зайняті атомами азоту піррольних кілець, п'ята - залишком гістидину глобіну (проксимальний залишок гістидину), а шоста - молекулою кисню в оксигемоглобіні і, відповідно, H_2O в дезоксигемоглобіні. Слід зазначити, що гемоглобін робить найбільший внесок у формування рН-буферної ємності крові, оскільки його вміст у ній у чоловіків становить 140-180 г/л і 120-160 г/л у жінок, дані показники вдвічі вищі порівняно з іншими білками плазми. (50-80 г/л) [6]. Нормальна плазма містить сліди гемоглобіну, що не перевищують 10 мг, помірні підвищення зустрічаються при імунних

гемолітичних анеміях, сильні збільшення вмісту Нв спостерігаються при всіх гемоглобінуріях [6].

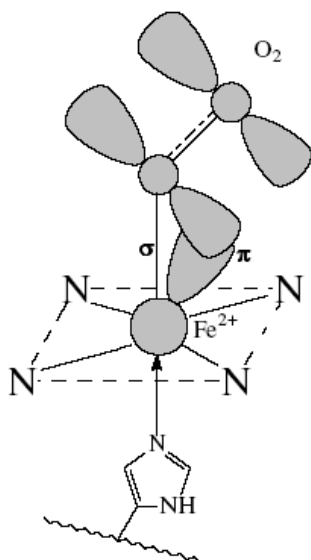


Рис. 1.1. Взаємодія електронних орбіталей кисню і іону Fe^{2+} в гемоглобіні

Гемоглобін відносять до алостеричних білків, тобто його молекули можуть оборотно переходити з однієї конформації в іншу, важливо зазначити, що при цьому змінюється спорідненість білка до ліганду. Конформація, що володіє найменшою спорідненістю до ліганду, називається Т-конформацією, або напруженою (від англ. tense). Конформація, що має найбільшу спорідненість до ліганду, називається релаксованою або R-конформацією (від англ. Relaxed). Молекули гемоглобіну даних конформацій перебувають у стані динамічної рівноваги (рис. 1.2).

Якщо молекула кисню приєднується до однієї із субодиниць Нв, це сприяє переходу напруженої конформації в релаксовану і тим самим підвищується спорідненість до O_2 інших субодиниць тієї ж молекули Нв. Це явище отримало назву кооперативного ефекту. До одним з найбільш важливих алостеричних ефекторів відносять 1) концентрацію H^+ (рН середовища); 2) CO_2 ; 3) 2,3-дифосфогліцерат (ДФГ).

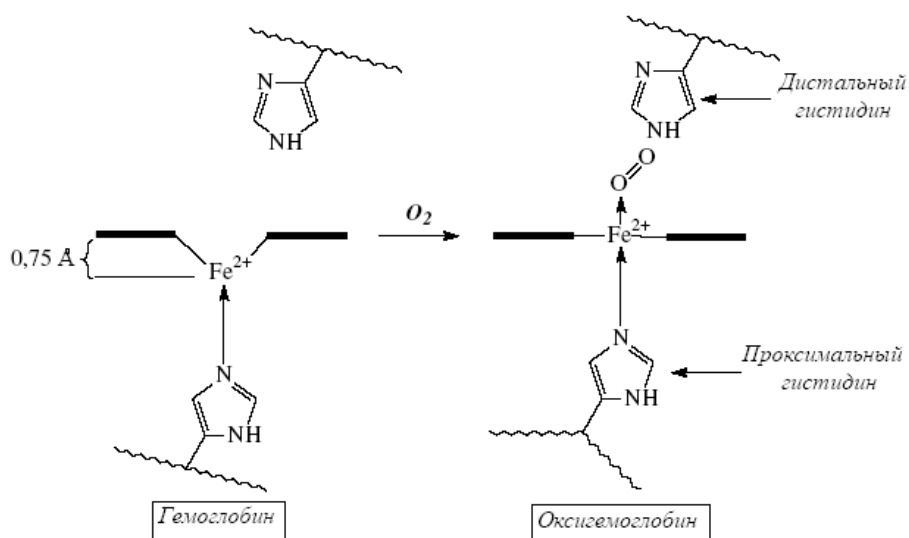


Рис. 1.2. Розташування атома заліза в гемі в оксигемоглобіні (праворуч) та в дезоксигемоглобіні

Якщо проводити класифікацію, то зазвичай виділяють певні типи (форми), похідні Hb, а також функціональні (нормальні) форми.

Під типами (формами) розуміють різновиди гемоглобіну, що відрізняються складом та будовою протомерів своєї білкової складової – глобіну. Відмінності в амінокислотних послідовностях забезпечуються тим, що варіабельні поліпептидні ланцюги різних типів Hb кодуються різними генами. До похідних гемоглобіну відносяться солянокислий гематин, метгемоглобін (MetHb), карбоксигемоглобін (HbCO), ціангемоглобін (CNHb), сульфгемоглобін (SHb), азидгемоглобін (NaN₃Hb), азидметгемоглобін (NaN₃Met). Характеристики деяких із них наведено у таблиці 1.1.

У крові існують нормальні, або як їх ще називають, функціональні форми гемоглобіну, а саме, редукований гемоглобін (відновлений, дезоксигемоглобін, його також називають феррогемоглобіном), функцію перенесення кисню здійснює оксигемоглобін, також зустрічаються карб- (слід зазначити, що дана форма в результаті взаємодії вуглекислого газу з NH₂-групами глобінової часті Hb) і метгемоглобіни (метгемоглобін відносять до непатологічним метаболітом, що неминуче утворюється).

Таблиця 1.1. Характеристика деяких похідних гемоглобіну

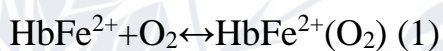
Критерій	Дезокси-	Окси-	Карб-	Карбокси	Мет-	Цианмет
				-		-
Ліганд	-	O ₂	CO ₂	CO	ОН-	CN-
Валентність заліза	II	II	II	II	III	III
Місце приєднання ліганду	-	Fe ²⁺	NH ₂ - групи глобіну	Fe ²⁺	Fe ²⁺	Fe ²⁺
Механізм утворення	-	Hb+O ₂ →HbO ₂	HbNH ₂ +CO ₂ →HbNHCOOH	HbO ₂ +CO→HbCO+O ₂	Hb+O ₂ +OH ⁻ →MetHb(OH)+O ₂	MetHb(OH)+CN ⁻ →MetHb(CN)+OH ⁻
Спорідненість до O ₂	низька	висока	низька	дуже низька	відсутня	відсутня
Присутність у крові в нормі	Присутній	присутній	відсутній	відсутній	відсутній	відсутній

1.2. Редокс-хімія гемоглобіну. Газовий обмін в еритроцитах

Розчинність кисню при 37°C становить 0,225 мл·л⁻¹·кПа⁻¹ (0,03 мл·л⁻¹·мм рт. ст.⁻¹). Кожен грам гемоглобіну здатний зв'язати 1,39 мл O₂ і, отже, за середнього вмісту Hb 150 г/л кожні 100 мл крові можуть переносити 20,8 мл кисню. Коефіцієнт розчинності CO₂ в 20 разів вище і становить 0,231 ммоль·л⁻¹·кПа⁻¹ (0,0308 ммоль·л⁻¹·мм рт.ст.⁻¹), тому вуглекислий газ дифундує швидше, ніж кисень. В артеріальній крові людини можна сказати, що практично весь білок (95-98%) знаходиться в оксигенованій формі, тобто пов'язаний з O₂ [7]. У венозній крові кількість оксигемоглобіну коливається в межах 67-75%, у той час як решта припадає на частку вільного Hb [7].

Вільний гем (без глобіну) не здатний до транспорту кисню, тому що іони Fe^{2+} пов'язують O_2 , швидко окисляючись з утворенням гематину [7].

В організмі хребетних кисень оборотно зв'язується з відновленою (ferrous) формою заліза Fe^{2+} , яке при цьому не змінює своєї валентності. Ця складна задача досягається завдяки природним еволюційним процесам, які відіграли певну роль при проектуванні O_2 -транспортуючих білків. Крім того, це забезпечується високою чутливістю як окислювально-відновного потенціалу, так і високою швидкістю відновлення глобіну заліза при взаємодії з атомами лігандів. Оборотна реакція зв'язування O_2 з Fe^{2+} залежить від парціального тиску кисню. При фізіологічному рН потенціал відновлення молекулярного O_2 (+0,815 V) вище, ніж у водного $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}/\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ (+0,770 V), і, отже, для молекулярного O_2 характерна сильна тенденція до окислення. Рівняння (1) є оборотним зв'язуванням молекули кисню з гемоглобіном, альтернативний шлях, показаний у другому рівнянні (2), призводить до окислення заліза і пов'язаних з ним каскаду окисно-відновних реакцій (ОВР):



In vitro зв'язок Fe- O_2 молекули охуНб за своєю суттю стабільний, тому мало ймовірно, що O_2 дисоціюватиме спонтанно. Кисень є досить поганим акцептором одного електрона, тому для такого переносу електронів існує значний термодинамічний бар'єр [1]. Додатковий термодинамічний бар'єр забезпечується високою гідрофобністю амінокислотних залишків, що утворюють гемову кишеню, яка може захищати центр Fe- O_2 від легкого доступу молекули води та утворення активованого комплексу, зменшуючи ступінь H_2O -промотованого аетоокислення оксиНб. Однак *in vivo* стає очевидним, що зв'язок Fe- O_2 завжди піддається нуклеофільній атаці вхідною молекулою води, з або без протонного каталізу, і атаці вхідним гідроксил-аніоном. Це може спричинити необоротне окислення групи Fe- O_2 до заліза з утворенням супероксидного аніон-радикалу. Цей механізм аутоокислення

оксиHb запропоновано раніше [8], відомий як аутоокислення Hb, яке стимулюється протонами та аніонами.

Таким чином, гемоглобін розвинувся з глобіновим фрагментом, який може захистити центр Fe-O₂ від легкого доступу молекули води або її сполучених іонів OH⁻ і H⁺ [1]. Також стало очевидним, що навіть у цих природних білках глобінова частина ще не досягла максимальної здатності блокувати надходження молекул води з центру Fe-O₂. Тим не менш, відносна стабільність оксиHb, який захищений від аутоокислення високим енергетичним бар'єром 130 кДж моль⁻¹, забезпечує основу для функціонування Hb *in vivo*. Відомо, що ця функціональна стабільність Hb легко втрачається при денатурації. Тому він повинен мати цілісний глобіновий фрагмент, щоб він міг відштовхувати воду.

Взаємодія кисню с Hb, згідно з рівнянням 2, призводить до утворення супероксиданіон радикалу O₂⁻ і метгемоглобіну, який не може брати участь у зв'язуванні O₂ і його транспортування. Ця реакція аутоокислення відбувається протягом кількох годин для вільного гемоглобіну та кількох секунд для вільного гему [9]. Рівняння (2) може ініціювати руйнівний та іноді загрозливий для життя каскад окисних реакцій. Незважаючи на кінетичні перешкоди, створені природою для уповільнення процесу аутоокислення, ~1-3% гемоглобіну червоних кров'яних клітин окислюється щодня.

Як показано на рис. 1.3, в активному центрі дезоксигемоглобіну людини пентакоординований Fe²⁺ (високий спин) лежить поза площиною гема (~0,06 нм) через зв'язок з проксимальним гістидином (His) у F-спіралі. Молекула кисню зв'язує гемове залізо через шостий вакантний координаційний центр, утворюючи цим гексакоординований комплекс Fe²⁺ (низький спин). Як було сказано вище, реакція 1 відбувається швидше, Fe²⁺ в гемі не окислюється, але при цьому відбуваються певні зміни в структурі білка: гем стає більш «площинним» і T-конформація змінюється на R.

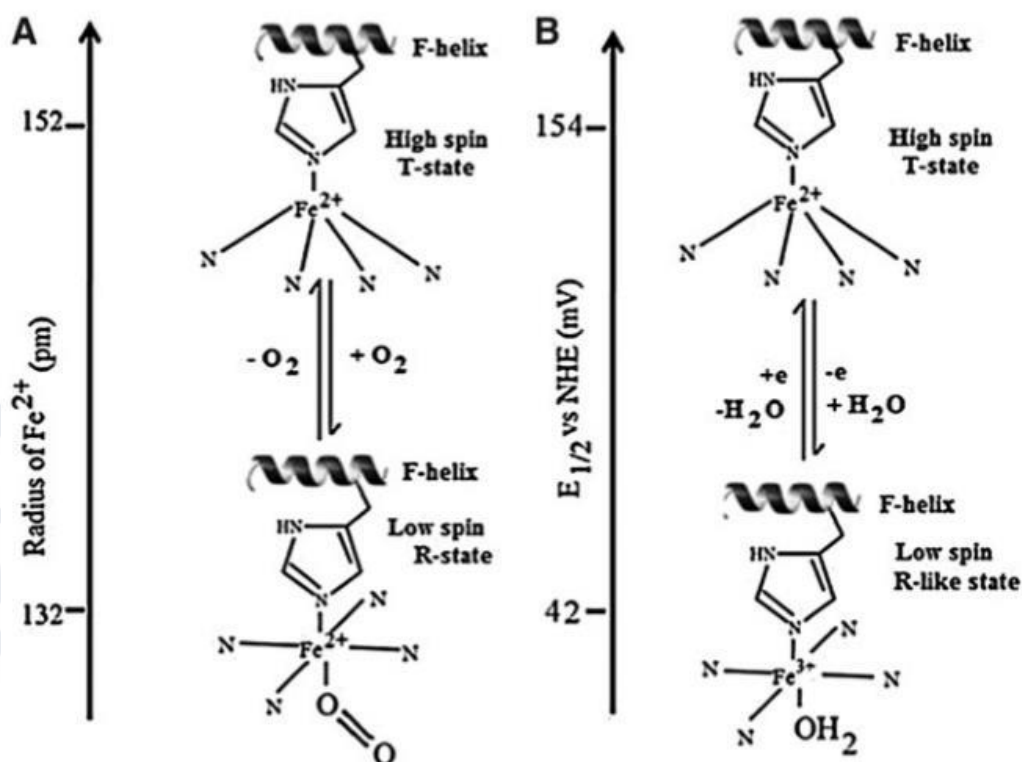


Рис. 1.3. При зв'язуванні атомом гемового заліза кисню відбувається його перехід із непланарної до планарної конфігурації. Перенесення електрона між рівнями e_g і t_g пов'язані з зміною спинового стану, що змінює іонний радіус катіона (вертикальна шкала зліва) заліза і довжину зв'язків метал-ліганд [10].

1.3. Реакції з активними формами кисню – киснем та пероксидом ВОДНЮ

Найпростіший шлях окислення гемового заліза – дисоціація HbO_2 з гетеролітичним розривом зв'язку Fe-O. Якщо при цьому в середовищі немає інших окислювачів, крім молекул кисню, то таке окислення прийнято називати аутоокисленням (атоокисленням). Отже, аутоокислення – термін, що використовується позначення спонтанного окислення Hb, згідно з рівнянням 2, в нормальних аеробних умовах. Аутоокислення Hb ініціює каскад реакцій окисного ушкодження (рис. 1.4) [3, 10]. Механізм та способи контролю мимовільного окислення Hb обговорювалися протягом багатьох років, ряд робіт присвячений дослідженню цього питання (Kiese M. (1974), Suzuki T. (1987), Brantley R. (1993), Shikama K. (2006), Aranda R. (2009)).

Швидкість процесу аутоокислення помітно варіює серед ссавців і, як правило, спостерігається рН- та температурна залежність.

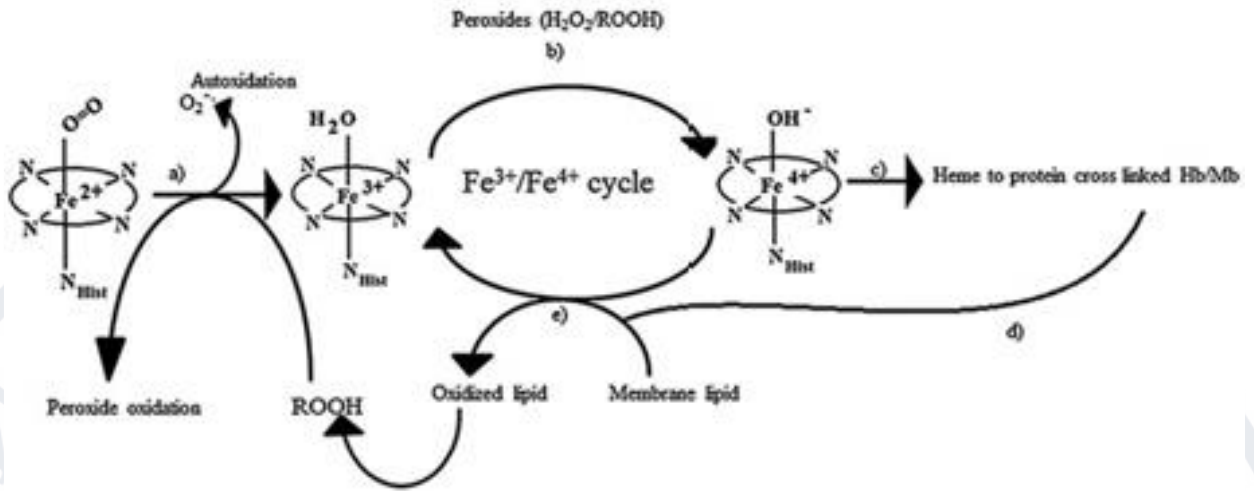


Рис. 1.4. Реакція з O₂: аутоокислення Hb (II). За добу окислюється 3% гемоглобіну [10].

Дослідження швидкості даного процесу показало, що вона залежить від кількох факторів, серед яких тиск кисню, цілісність еритроцитів, рівні внутрішньоклітинних відновників та аніонних ефекторів. Збільшення швидкості аутоокислення гемоглобіну спостерігається при зміщенні рН в кислу область, особливо це стосується оксидативного стресу в природних умовах, оскільки ацидоз часто спостерігається після ішемії реперфузії або будь-яких гемолітичних подій. На рис. 1.5 схематично показані два можливі шляхи відповіді на зміни рівня O₂, що виражаються у збільшенні або зниженні швидкості аутоокислення.

У разі наведених вище можливих шляхів відповіді в обох випадках кінцевим продуктом є тривалентне залізо. При високому рівні кисню, коли активний сайт зайнятий зв'язаним O₂, повільний процес внутрішньомолекулярного перенесення електронів сприяє протонуванню O₂ та його подальшій дисоціації з утворенням нейтрального радикалу HO₂. При низьких концентраціях O₂ здійснюється швидший процес, а саме: O₂ дифундує до активного сайту, в якому він взаємодіє з молекулою води, що

пов'язана з активною ділянкою, що призводить до утворення супероксиданіонрадикалу.

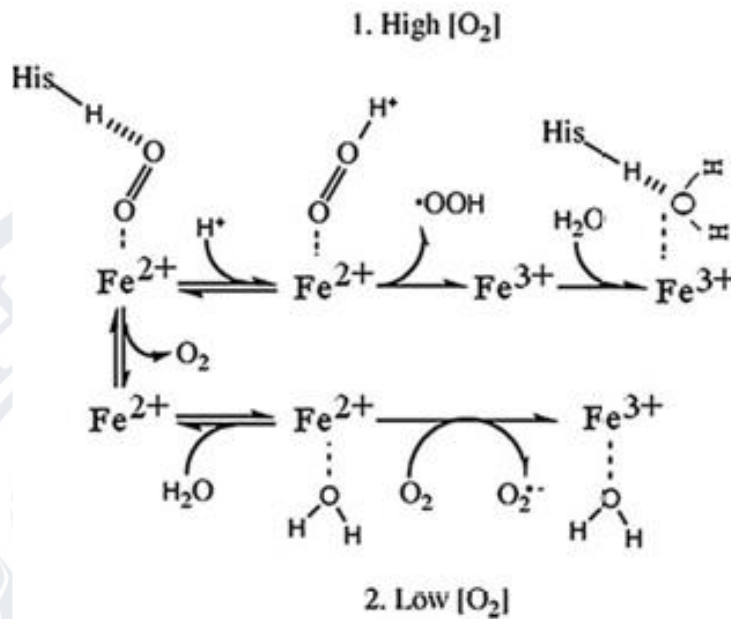


Рис. 1.5. Утворенню супероксиданіон-радикалу сприяє низький тиск кисню. Верхній процес відбувається повільно, при високих концентраціях кисню. Нижній процес відбувається швидко [10].

Якщо говорити ще раз про конформаційне сприяння процесу самоокислення білка, слід зазначити, що аутоокислення гемоглобіну істотно прискорюється для частково оксигемоглобіну (оптимально 60%), оскільки в ньому більш рухлива конформація і гістидин доступний для нуклеофільного заміщення супероксиду. Крім того, в β_2 -ланцюзі відбувається перенесення електрона з супероксиду на β 93-Cys з утворенням тільного радикала та пероксильного гему, система стабілізується. Таким чином у β -ланцюгах окислення відбувається повільніше.

Транспорт кисню червоними кров'яними клітинами включає його оборотне зв'язування з 5 мМ тетрамерної молекули гемоглобіну. У подіях, що призводять до утворення АФК, цей білок посідає центральне місце, як говорилося вище.

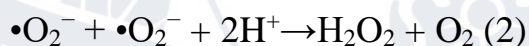
Процес безперервного повільного аутоокислення гемоглобіну при його зв'язуванні з киснем призводить до наступних наслідків: 1) утворенню

супероксиданіон радикалу, а також 2) перетворенню функціонального комплексу HbFe(II) на окислену форму HbFe(III), не здатну до подальшого зв'язування O₂ (рівняння 1) [11]:



Реакція аутоокислення з генерацією супероксидного радикалу за нормоксичними умовами йде повільно ($k = 0,0115 \text{ h}^{-1}$), але в умовах гіпоксії її швидкість істотно зростає [12-15]. Крім того, прискоренню процесу аутоокислення також сприяють різні патології еритроцитів, наприклад, серповидно-клітинна таласемія, недостатність глюкозо-6-фосфату дегідрогенази, метгемоглобінемія, а також клітинне старіння [16]. Крім, аутоокислення Hb як ендogenous джерела супероксиданіон радикалу існує припущення, що він може бути отриманий і з екзогенних джерел, наприклад, ліків (в процесі окислення Hb) [17]. Слід сказати, що через заряд молекули супероксиду концентруються у внутрішньоклітинному просторі [18].

Після того, як утворилася якась кількість супероксидного радикала, один із можливих шляхів його подальшого метаболізму – реакція дисмутації з утворенням H₂O₂ (рівняння 2) [11, 18]:



Процес відбувається спонтанно зі швидкістю близько $3,9 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, прискорення відбувається у присутності супероксиддисмутази (СОД) [18].

Пероксид водню може проникати через клітинні мембрани (важлива функція) майже так само легко, як вода, тоді як заряджений супероксидний радикал може потрапляти у клітини лише через трансмембранні аніонні канали.

Згідно з літературними даними, у крові дорослої людини щодня окислюється приблизно 3% циркулюючого гемоглобіну [19, 20]. При цьому в крові постійно міститься певна частка окисленої форми гемоглобіну - метгемоглобіну, на рівні 1-2%. Ця невелика кількість metHb грає певну фізіологічну роль: зокрема, метгемоглобін активно зв'язує деякі аніони (CN⁻, OCN⁻, SCN⁻ і т. п.), що мають високу спорідненість до заліза (III) і здатні,

зв'язуючись із залізом цитохромів, блокувати дихальний ланцюг мітохондрій [20, 21].

Проте за умов підвищеного стресу частка metHb може збільшитися у багато разів [22]. Залишкові кількості невідновленого metHb мають низьку спорідненість до гему простетичної групи, внаслідок чого утворюється вільний гемін [23]. Гемін взаємодіє з гідропероксидами ліпідів, результат – генерація ліпофільних радикалів.

Незважаючи на те, що основна увага приділяється утворенню супероксиданіон-радикалу та пероксиду водню, важливо враховувати також і можливі вторинні окисні реакції між основними учасниками.

Припускають, що пероксид водню може реагувати з супероксидом та іонами заліза або двовалентної міді з утворенням агресивного і найбільш активного з АФК – гідроксильного радикала (рівняння 3, 4) [24, 25].

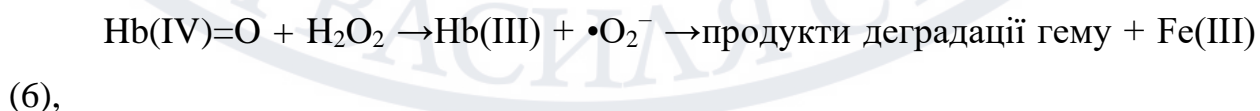


Через високу реакційну здатність гідроксильний радикал може призвести до пошкодження клітин та тканин. Так, даний радикал виявили в еритроцитах при серповидно-клітинній анемії [26]. Однак, точний механізм генерації OH в еритроцитах, ще не зовсім зрозумілий.

Крім того, існує припущення (зустрічається в багатьох роботах з редокс-гемоглобіноміки) про те, що окислення Fe(II)-Hb пероксидом водню (рівняння 5), може призводити до утворення Fe(IV)-ферил Hb [25]:



також показано, що ферил-гемоглобін вступає в реакцію з додатковою молекулою пероксиду водню (рівняння 6):



що призводить до деградації гему та вивільнення флуоресціюючих продуктів, а також іона заліза (3+) [27, 28].

Слід зазначити, що у фізіологічних умовах ймовірність окислення заліза з утворенням метгемоглобіну при зв'язуванні молекули O_2 мінімальна, оскільки ферментні системи еритроцитів відновлюють $MtHb$ до HbO_2 та нейтралізують супероксидний радикал. Навпаки, ймовірність приєднання O_2 до заліза гему з утворенням оксигемоглобіну (оксигенації) велика і залежить від того, чи оксигенований сусідній гем у цій молекулі гемоглобіну. Якщо сусідній гем оксигенований, то ймовірність оксигенації збільшується, а окиснення падає. Швидкість процесу аутоокислення оксигемоглобіну людини зростає у присутності сполук, що містять сульфгідрильні групи [29]. Таким чином, провідна роль у формуванні метгемоглобіну належить дезоксигемоглобіну. Максимальна швидкість окислення гемоглобіну спостерігається при знижених тисках кисню (приблизно приблизно 50 % насичення гемоглобіну киснем). Супероксиддисмутаза та каталаза, зв'язані поперечними зшивками з гемоглобіном, знижують ймовірність утворення метгемоглобіну *in vitro* [8].

1.4. Окиснення глобінів ферриціанідом калію

Однак відомо, що швидкість аутоокислення оксигемоглобіну (HbO_2) людини в нормальних умовах дуже мала [20], що створює суттєві труднощі при використанні реакції аутоокислення HbO_2 та продуктів його модифікування у якості стандартного тесту. Прискорити цю реакцію можна у різний спосіб: підвищенням температури, відхиленням рН середовища у кислу чи лужну область, додаванням денатурантів, зниженням парціального тиску кисню (pO_2). Для активування препарату до окисленої дії молекулярного кисню можна використовувати ферриціанід калію, який, будучи взятим у стехіометричній кількості або в невеликому надлишку, активно окислює гемове залізо, не торкаючись реактивних сульфгідрильних груп гемоглобіну і практично не впливаючі на конформацію білка [8].

Окислення гемоглобіну та міоглобіну фериціанідом калію – звичайний спосіб отримання окислених форм обох гемопротейдів. Незважаючи на це систематичних досліджень кінетики та механізму цих реакцій у хімічній літературі майже немає.

Хоча прийнято вважати, що механізм аутоокислення HbO_2 до кінця не зрозумілий, проте досить точно встановлено, що переходу $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ передує оборотна дисоціація $\text{HbO}_2 \leftrightarrow \text{Hb} + \text{O}_2$. Якщо індивідуальна молекула гемоглобіну в дезоксистані перебуває значно довго (чому, зокрема сприяє зниження $p\text{O}_2$), відбувається конформаційний перехід $\text{R} \rightarrow \text{T}$, у результаті спорідненість гему до кисню істотно знижується. У цьому випадку взаємодія Fe^{2+} -гему з O_2 може призвести не до утворення вихідної системи HbO_2 зі зв'язком $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$, а до окислення заліза в стан Fe^{3+} [2, 3]. Аналогічний дисоціативний механізм встановлений і для окислення HbO_2 фериціанідом [8]. Це дозволило припустити, що фактори, що впливають на стійкість HbO_2 до аутоокислення, можуть аналогічним чином впливати на реакцію окислення HbO_2 фериціанідом.

Фериціанід калію, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, широко використовується для швидкого окислення феропохідних різних білків гемовмісних до феррипoxidних. Вперше механізм окислення дезокси- та оксипoxidних Hb людини та Mb коня фериціанідом вивчали Antonini та ін. методом стоп-флоу [30]. Показано, що один еквівалент $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ окислює один еквівалент білка (з розрахунку на субодиноцю). У присутності надлишку реагенту швидкість окиснення HbO_2 відповідає реакції першого порядку. Вона збільшується в кислій області pH і лінійно зростає із зменшенням концентрації O_2 у розчині. Кінетика окислення дезоксигемоглобіну, HbO_2 , не відповідає простій бімолекулярній реакції. Константа швидкості залежить від pH , становлячи $7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{сек}^{-1}$ при $\text{pH} 6$ і $0.8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{сек}^{-1}$ при $\text{pH} 9.2$. Зазначається, що аналіз кінетичних даних для тетрамерного Hb представляє складне завдання, що пов'язано з редокс неоднорідністю його α - та β -субодиноць, а також з наявністю

конформаційних переходів у тетрамері, індукованих лігандами та рН середовища [30].

Зменшення рН середовища різко збільшує швидкість окислення гемоглобіну за допомогою фериціаніду калію. Це може бути пов'язано з протонуванням дистальної його молекули білка і збільшенням доступності іона заліза гему зовнішнім окислювачам. Оксиформа гемоглобіну стійкіша до окислення, ніж дезоксиформа [8].

Попередня модифікація сульфгідрильних груп Cys-93β здатна зменшувати ефективність окислення оксиНв ферриціанідом, інгібуючи перенесення електрона з Fe²⁺ гему на молекулу фериціаніду. SH-Групи Cys-93 β-ланцюгів оксиНв привертають увагу через можливу функціональну участь у механізмах окислення – відновлення заліза гему β-ланцюгів [8]. Реактивність цих SH-груп, що знаходяться в ділянці α1β1-контакту, пов'язана з міжсуб'єдиничними взаємодіями в білку, і, отже, із спорідненістю білка до кисню [8]. Одночасно можна припустити, що ці доступні SH-групи оксиНв включені у внутрішньомолекулярний електронний ланцюжок, що регулює електронну щільність на іоні заліза гему. Перенесення електрона з радикалу O₂⁻ з гемової кишені назовні, на поверхневий тіол, протікає, ймовірно, через електронну делокалізовану систему проксимального His, який знаходиться в тій же частині α-спіралі, що і Cys-93β, тільки на її протилежній зовнішній стороні. Модифікація SH-груп Cys-93β здатна прискорювати процес аутоокислення оксиНв, підвищуючи його спорідненість до кисню та інгібуючи його окислення фериціанідом. Можливо, модифікація SH-груп перешкоджає взаємодії фериціаніду з Cys-93, що є первинним етапом зв'язування фериціаніду гемопротейном. Передбачаються два шляхи перенесення електрона між просторово – віддаленим іоном заліза гема та малим комплексом металу, наприклад ферриціанідом: 1 – прямий, 2 – центроспецифічне перенесення електрона через білковий матрикс за участю поверхневого амінокислотного залишку Cys-93β. Можна припустити, що

фериціанід спочатку окислює доступні SH-групи Cys-93 β , які згодом відновлюються іоном Fe²⁺ гему.



РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В роботі використовували:

- суспензію еритроцитів у буферному розчині;
- NaCl (М 58,14), чда;
- калій фосфорнокислий однозаміщений KH_2PO_4 (М 136,09), ч, «Китай»;
- натрій фосфорнокислий двозаміщений, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (М 358,14), фарм;
- натрій фосфорнокислий 1-заміщений, NaH_2PO_4 (М 119,98), чда, «Німеччина»;
- феріціанід калію, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN}_6)]$ (М 329,26), ч.д.а.
- соляну кислоту (0,1 н), стандарт-титри, «РІАП, Київ»;
- трихлороцтову кислоту (ТХУ), Cl_3CCOOH (М 163,39), CLARIANT, Німеччина;
- Трилон Б (етилендіамінтетраоцтової кислоти динатрієва сіль 2 водний, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$, «Німеччина»;
- 5,5'-дитіо-біс-(2-нітро-бензойна кислота) (М 396,36), «ЛОВА, Австрія»;
- L-глутатіон відновлений, $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$, (М 307,303), «Германія»;
- трис-(оксиметил)-амінометан, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, (М 121,14), фарм, «Швейцарія»;
- ДДС (додецилсульфат натрію), фірма «Fisher Scientific Co» США;
- набір реактивів для визначення концентрації гемоглобіну в крові;
- деіонизована вода, НВЛ «Гранум».

Склад розчинів, що використовуються в роботі:

Буферні розчини:

1. Буферний розчин 1: Na-фосфатний буфер (0,01 моль, рН 7,4), що містить 0,15 моль NaCl. Використовується в якості середовища для відокремлених від плазми еритроцитів;
2. 0,01 М Na-K-фосфатний буфер (рН 7,4). Використовується для лізису еритроцитів;

3. Буферний розчин трис-НСl 0,2 М, рН 7,2. Для приготування буферу в мірній колбі 25 мл 0,2М трису змішували з 11,25 мл 0,4 моль/л НСl і доводили водою до 100 мл.

4. 0,3 М Na фосфат (рН 9,0), для приготування 26,86 г ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) розчиняли в 250 мл води.

Робочі розчини:

- $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, $3 \cdot 10^{-5}$ моль/л, готовили розтворением навески 0,00494 г вещества в 25 мл буфера трис-НСl 0,2 М, рН 7,2.

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

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

Протокол експериментальної частини дослідження відповідає принципам біологічної етики та погоджений з Локальним етичним комітетом Донецького національного університету імені Василя Стуса, факультету хімії, біології і біотехнологій (м. Вінниця, Україна).

У експериментах використовували периферичну кров практично здорових донорів однієї статі та приблизно одного віку. Еритроцити тричі відмивали центрифугуванням з Na-фосфатним буфером (0.015 моль, рН 7.4), що містив 0.15 моль NaCl. Відмиті від плазми і упаковані еритроцити ресуспендували в цьому ж буфері.

Стан гіпоксії створювали дією низькочастотних механічних коливань в інтервалі 8- 32 Гц, з кроком 4 Гц, постійною амплітудою $0,5 \pm 0,04$ мм. Суспензія еритроцитів піддавалася вібраційному впливу продовж 3-х годин [31].

Вібрацію здійснювали за допомогою вибростенда, розробленого на кафедрі біофізики і фізіології ДонНУ імені Василя Стуса, який складається з

генератора низькочастотних сигналів синусоїдної форми, підсилювача і вібратора, що здійснює коливання у вертикальній площині із заданою частотою та амплітудою. Експериментальна кювета, заповнена суспензією еритроцитів, вертикально закріплюється на рухомій частині вібратора (в цьому випадку механічні коливання передаються в експериментальну кювету з незначними втратами потужності). Через певні проміжки часу із суспензії відбирали 2 мл, еритроцити осаджували. В еритроцитах визначали внутрішньоклітинну рН, загальний вміст -SH-груп, і швидкість аутоокиснення під впливом $K_3[Fe(CN)_6]$.

2.1. Визначення внутрішньоклітинного рН

рН досліджували в гемолізатах еритроцитів до початку експерименту і потім через 20 хвилин у процесі вібраційного впливу. В якості контролю використовували рН гемолізату еритроцитів до дії на них вібрації.

Одержання гемолізату. 2 мл суспензії еритроцитів відбирали пробірку і піддавали центрифугуванню при 3000 об/хв протягом 1 хв. Ретельно відсмоктували супернатант, клітини лізували додаванням 1 мл деіонізованої води.

Визначення рН гемолізату. Вимірювання рН було виконано за допомогою Іономеру лабораторного І-160 МП. В основу роботи приладу покладено потенціометричний метод вимірювання рН та окисно-відновного потенціалу (Еh) контрольованого розчину. При вимірі рН використовується електродна система, що складається з комбінованого електрода (ЕСК-10614/7), що включає виборчий і допоміжний електрод. Електродна система, при зануренні в контрольований розчин (1 мл гемолізату еритроцитів протягом 5 хвилин), розвиває ЕРС, що лінійно залежить від активності іонів і температури розчину [32, 33]. Електролітичний контакт допоміжного електрода з контрольованим розчином здійснюється за допомогою пористої

мембрани (ключа) в торці електрода і забезпечує закінчення насиченого розчину KCl в контрольований розчин.

2.2. Визначення кінетики аутоокислення гемоглобіну

Кожні 15 хвилин відбирали 1 мл суспензії еритроцитів. Еритроцити осаджували центрифугуванням, надосадову рідину збирали, а еритроцити лізували додаванням 1 мл лізуючого буфера. Лізис проводили протягом 15 хв.

Для визначення здатності гемоглобіну до аутоокислення використовували реакцію з фериціанідом калію [34].

Кінетику окислення HbO_2 фериціанідом визначали до початку експерименту (контроль) і потім кожні 15 хв у процесі дії вібрації. Окремо вивчали вплив середовища інкубування стан гемоглобіну еритроцитів. Для цього еритроцити інкубували протягом 3-х годин серед Na-фосфатного буфера і кожні 15 хв визначали швидкість аутоокислення гемоглобіну.

Швидкості аутоокислення гемоглобіну фериціанідом калію визначали так, як у роботі [34].

До 1,8 мл 0,2 М трис-HCl, рН 7,2 додавали 0,2 мл ферицианиду калію, 0,2 мл еритроцитів гемолізату, швидко перемішували і переносили в кювету на 2 мл. Реєстрували зміну оптичної густини при 540 нм протягом 4 хв з інтервалом 1 с в автоматичному режимі. Швидкість окислення гемоглобіну визначали за тангенсом кута нахилу залежності зміни оптичної густини від часу. Константу швидкості реакції аутоокислення гемоглобіну, що становить реакцію першого порядку, визначали за тангенсом кута нахилу залежності $\ln(A)-t$, де A – оптична щільність розчину. Для аналізу впливу низькочастотної вібрації на здатність гемоглобіну еритроцитів до аутоокислення використовували такі залежності:

1) зміна константи швидкості k реакції аутоокислення гемоглобіну від часу дії вібрації;

2) зміна константи швидкості k щодо початкового рівня (контролю) залежно від двох чинників: частоти та часу вібраційного впливу.

2.3. Визначення загального вмісту -SH-груп в білках еритроцитів

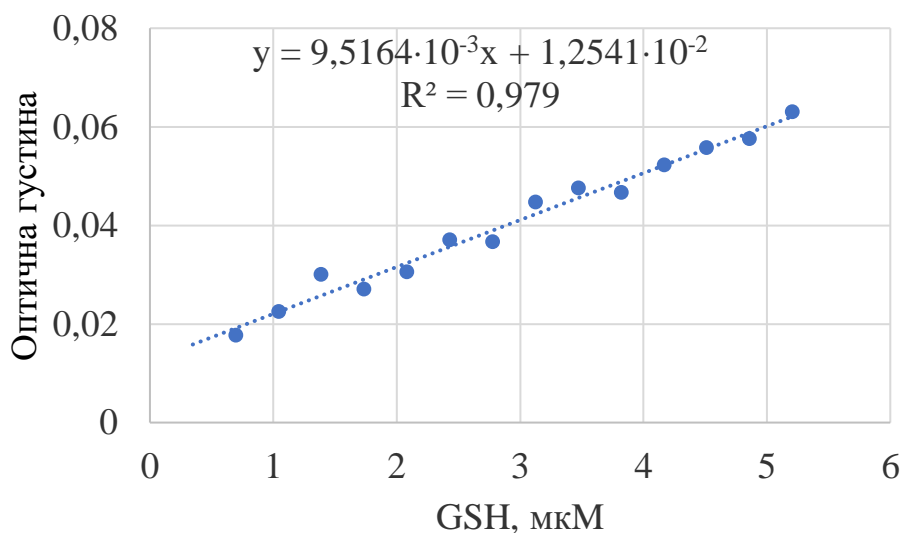
Лізис осаджених еритроцитів проводили шляхом додавання 0,01 М Na-K-фосфатний буфер (рН 7,4) до 0,5 мл загального об'єму розчину. 0,1 мл гемолізату використовували для визначення загальної кількості -SH груп.

Принцип методу визначення загальної кількості -SH груп заснований на взаємодії -SH груп з ДТНБК (5,5'-дитіо-біс-1-нітробензойною кислотою) з утворенням забарвленого в жовтий колір аніону 2-нітро-5-тіобензоату. Збільшення концентрації аніону пофарбованого в жовтий колір в ході даної реакції реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 412 нм [35].

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

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

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



До

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

2.4. Визначення вмісту гемоглобіну в еритроцитарній пасті

Вміст гемоглобіну в еритроцитарній пасті визначали гемігلوبінціанідним уніфікованим методом за стандартними наборами. 0,02 мл вихідної еритроцитарної суспензії вносили в 5 мл трансформуючого реактиву, витримували 15 хв і фотометрували проти трансформуючого реактиву при довжині хвилі 540 нм. Для визначення концентрації гемоглобіну використовували калібрувальну залежність, яка будувалася за стандартними розчинами гемоглобінціаніду.

2.5. Статистичний аналіз результатів експерименту

Усі експерименти поведені у п'яти повторностях. Експериментальні дані були проаналізовані у програмі Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA). Експериментальні дані представлені як $x \pm m$ (x – середнє, m – відносна похибка).

Для оцінки значущості відмінностей двох зв'язаних виборок (показники до і після впливу, або у різні проміжки часу) використовували непараметричний критерій Уїлкоксона ($p < 0,05$).

Для побудови кривих, що відображують тенденцію змінення показника з часом використовували апроксимацію даних за методом найменших квадратів відповідно до рівняння поліноміальної регресії 4-6-го ступеню.

Для представлення отриманих експериментальних даних та виявлення взаємозв'язків між досліджуваними параметрами використовували тривимірні графіки розсіювання. На основі мережі вихідних точок будували поверхню за методом обернено зважених відстаней. Припущення, покладене в основу методу, полягає в тому, що значення атрибута z в довільній точці простору, в якій не проводилися вимірювання, є середнім зваженим по відстані із значень в точках вимірювань, розміщених по сусідству в межах певного радіуса або вікна навкруги цієї точки.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТУ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Моделювання стану гіпоксії шляхом впливу низькочастотної вібрації на суспензію еритроцитів

Еритроцити, що піддавалися вібрації знаходилися у сольовому розчині, насиченому киснем [36]. Сам O_2 разом з іншими газами знаходиться у бульбашках діаметром менше мікрона – нанобульбашках [37, 38] Час життя мікронних бульбашок $\sim 10^{-2}$ с, але їх стабільність підвищується у сольових розчинах за рахунок адсорбції іонів на поверхні міхурця [39]. Термін «бабстон» (аббревіатура від англ. Bubble, stabilized by ions) введена для позначення стабільних нанобульбашок, що спонтанно виникають при нормальних умовах в рідинах, насичених розчиненим газом і містять іонну компоненту [37]. Існування межі розділу газ-рідина відіграє важливу роль у формуванні нанобульбашок, а флуктуації властивостей води можуть бути пов'язані з хаотичними коливаннями концентрації розчиненого у воді повітря і кількості мікробульбашок [41]. Бабстони схильні до коагуляції з утворенням бабстонних кластерів - довготривалих мікронеоднорідностей в водних іонних розчинах [37, 38].

Виявилося, що концентрація нанобульбашок значною мірою зростає після вібраційної обробки води або розчину і визначається частотою та часом вібрації, поза цим, середній розмір наноміхурців поступово збільшується відповідно до тривалості вібрації [42]. Ріст міхурців відбувається за рахунок кавітації, в результаті якої виділяється поверхнева енергія. Експериментально доведено, що нанобульбашки є джерелом активних форм кисню за дії вібрації [43, 44]. Gudkov at al., 2020 [43] показали, що відносна швидкість утворення перекису водню у воді насиченій атмосферними газами становила приблизно 0,8 нМ/хв при впливові з частотою 30 Гц. Було встановлено, що швидкість генерації перекису водню зростає зі збільшенням частоти механічних навантажень пропорційно f^2 . Наслідком подальшого росту мікробульбашок є

дегазація рідини в результаті багаторазово збільшеної сили Архімеда, яка виштовхує мікробульбашки на поверхню розчину. Наявність дегазації підтверджено роботами [44].

Негативний заряд поверхні еритроциту притягує позитивно заряджені «бабстони» до своєї поверхні. Існування бульбашок або їх кластерів на поверхні еритроцита було підтверджено методом лазерної інтерференційної мікроскопії [37]. Роль такої хмари на поверхні еритроцитів не досліджена, але є відомості, що дегазація плазми крові збільшує ШОЕ [40].

3.1.1. Дослідження зміння внутрішньоклітинного рН за дії низькочастотної вібрації

На рис. 3.1, а показано зміння внутрішньоклітинного рН при інкубуванні рН у середовищі Na-фосфатного буфера. Подовж експерименту досліджувана система контактувала з повітрям навколишнього середовища. Бачимо, що внутрішньоклітинна рН, яка була знижена при відмиванні клітин, відновлюється до нормального рівня через 1,5 години інкубування.

При дії вібрації з частотою 8 Гц (рис. 3.1, б) спостерігали зниження рН в перші 60 хвилин і надалі рН не доходить до нормального рівня (7,15-7,2). При дії вібрації з частотою 12 Гц протягом 40 хвилин рН зростала до рівня $7,03 \pm 0,02$, і після 80 хвилин впливу зазнавала зниження до значення рН $6,93 \pm 0,04$. При дії вібрації із частотою 16 Гц (рис.3.1, г) спостерігали початкове зростання значення внутрішньоклітинного рН, яке через 180 хвилин досягало максимального значення $7,04 \pm 0,05$. При дії вібрації з частотою 20 Гц видно, що внутрішньоклітинна рН досягала рівня $7,12 \pm 0,06$ через 60 хвилин впливу і поділі не змінювалась. Не монотонний характер зміни внутрішньоклітинної рН спостерігали при дії вібрації в 24 Гц (рис.3.1, є): протягом 20 хвилин впливу рН знизилася приблизно до $7,0 \pm 0,03$, потім на 60 хвилині зросла до початкового значення, і через 80 хвилин інкубування плавно знижувалася приблизно значення рН $6,87 \pm 0,05$.

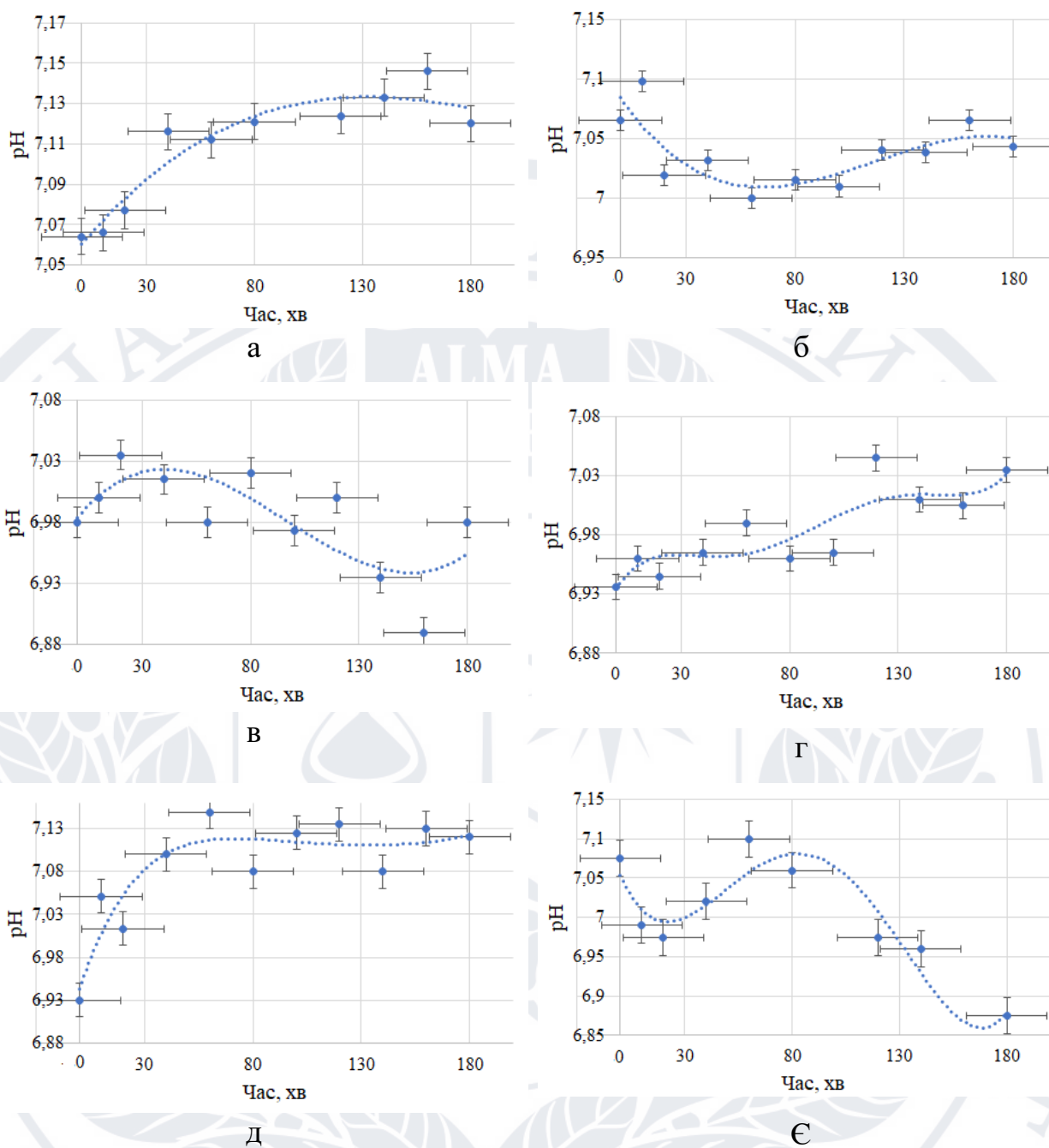


Рис. 3.1. Змінення внутрішньоклітинної рН в середовищі Na-фосфатного буфера, що не містив глюкози. А – без дії вібрації, за дії вібрації 8 Гц- (б), 12 Гц- (в), 16 Гц- (г), 20 Гц- (д), 24 Гц- (е).

При дії вібрації із частотою 28, 32 Гц (рис. 3.2, а, б) спостерігали поступове підвищення занижене значення внутрішньоклітинного рН, проте його рівень не перевищував 7.0 ± 0.05 . Вібрація з частотою 32 Гц (рис 3.2, б)

призвела до збільшення рН через 60 хвилин інкубування (до рівня $7,05 \pm 0,02$), проте подальша вібрація приводила до зниження до $7,0 \pm 0,02$.

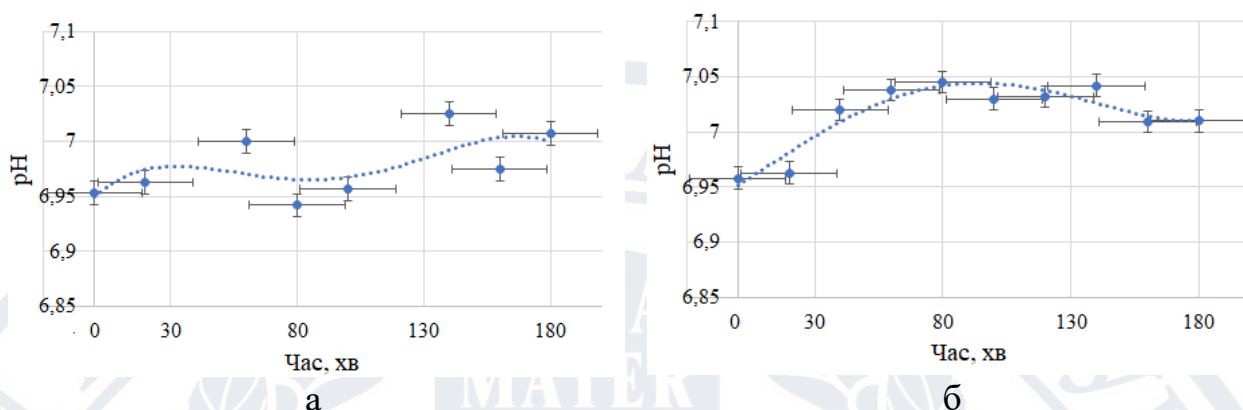


Рис. 3.2. Змінення внутрішньоклітинної рН еритроцитів в середовищі Na-фосфатного буфера за дії вібрації з частотами 28 Гц- (а) та 32 Гц- (б).

На рис 3.3 проаналізований загальний характер впливу вібрації на зменення внутрішньоклітинної рН. Ми не встановили достовірних відмінностей змінення рН від частоти вібраційного впливу, проте показані достовірні відмінності змінення внутрішньоклітинної рН при дії вібрації з контрольним експериментом (вібраційний вплив відсутній).

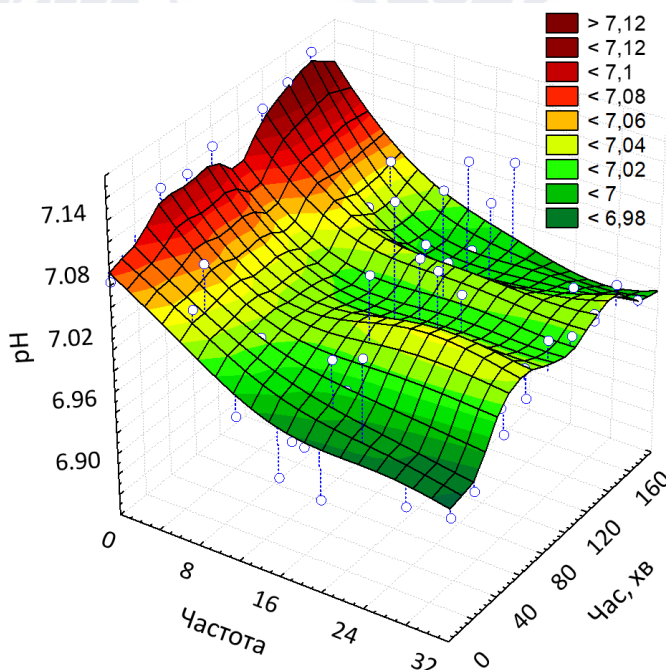


Рис. 3.3. Залежність змінення внутрішньоклітинного рН від двох факторів – частоти і тривалості вібраційного впливу.

Було встановлено, що за дії вібрації відбувається закислення внутрішньоклітинного середовища внаслідок порушення газообміну. Закислення внутрішньоклітинного середовища буде сприяти процесам аутоокислення гемоглобіну киснем, що міститься у середовищі інкубування.

Еритроцити реагують на гіпоксію також через киснево-залежну метаболічну регуляцію, яка включає накопичення 2,3-дифосфогліцерату (2,3-DPG), стабілізацію деоксигенованого стану гемоглобіну та підвищення рівня АТФ і підкислення цитозолу, таким чином, щоб рН гомеостаз сприяв розвантаженню гемоглобіну киснем [45]. Отримані результати свідчать про те, що низькочастотна вібрація сприяє виникненню стану гіпоксії, і може буде використана в модельних експериментах по вивченню впливу гіпоксії на функціонування цих клітин.

3.1.2. Вплив низькочастотної вібрації на вміст SH-груп в білковій фракції еритроцитів

Зміна вмісту SH-груп в білковій фракції, виражена в мкмоль/г гемоглобіну (Hb) у пробі еритроцитів за вібрації в інтервалі частот 8–32 Гц, амплітудою $0,5 \pm 0,04$ мм протягом 3 годин наведено на рис. 3.4 - 3.5.

На рис. 3.4, а показано змінення вмісту SH-груп у білках еритроцитів, що не піддавалися дії вібрації та інкубувалися протягом 3-х годин у середовищі Na-фосфатного буфера. З отриманих даних, видно, що вміст SH-груп у білках еритроцитів протягом 120 хв експерименту достовірно не змінювався і утримувався на рівні контролю, проте в кінці 3-годинного експерименту знижувався в 1,7 рази в порівнянні з початковим рівнем.

При дії вібрації з частотами 8 і 12 Гц вміст SH-груп в еритроцитах поступово зростав і після 20-40 хв впливу збільшується в 1,2-1,3 рази, після чого йде незначне падіння груп і в кінці експерименту SH-групи 1,3 рази перевищують початковий рівень (рис. 3.4, б, в). Вібрація з частотою 16 Гц викликала зростання SH-груп протягом перших 40 хв впливу в 2 рази, після

чого вміст SH-груп у клітині не значно змінювався і в кінці вібраційного впливу в 1,7 раза перевищував рівень контролю (рис. 3.4, г). При дії вібрації з частотою 20 Гц спостерігали приріст SH-груп на початку експерименту, після чого протягом усього експерименту відбувалися слабкі зміни вмісту груп (рис. 3.5, а) і в кінці вібраційного впливу вміст SH-груп утримувався на контрольному рівні.

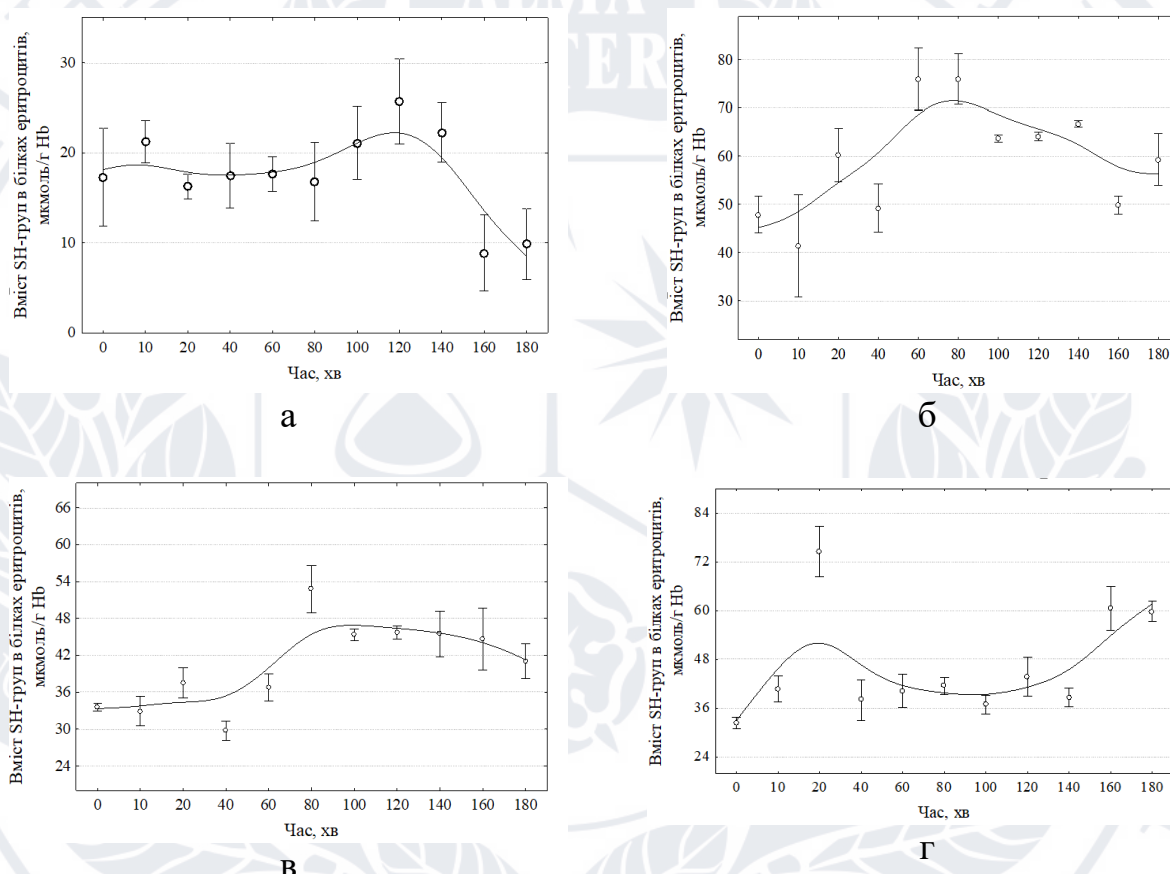


Рис. 3.4. Зміна вмісту SH-груп у білках еритроцитів у мкмоль/г гемоглобіну (Hb). Частота вібрації: А – 0 Гц, Б – 8 Гц, У – 12 Гц, Г – 16 Гц. Амплітуда вібрації – $0,5 \pm 0,04$ мм

При дії з частотою 24 Гц (рис. 3.5, б) вміст SH-груп зменшився після 40 хв експерименту в 1,2 рази, після чого їх вміст в еритроцитах поступово збільшувався і до кінця експерименту вміст SH-груп у 1,5 рази перевищувало початковий рівень. Вібрація з частотою 28 Гц приводила до зростання SH-груп протягом перших 80 хв впливу, після чого вміст SH-груп у клітині знижується до початкового рівня і в кінці вібраційного впливу в 1,6

рази перевищує рівень контролю (рис. 3.5, в). При дії вібрації з частотою 32 Гц (рис. 3.5, г) вміст SH-груп знижувався протягом експерименту та наприкінці вібраційного впливу в 2,3 рази ставав нижчим за рівень контролю.

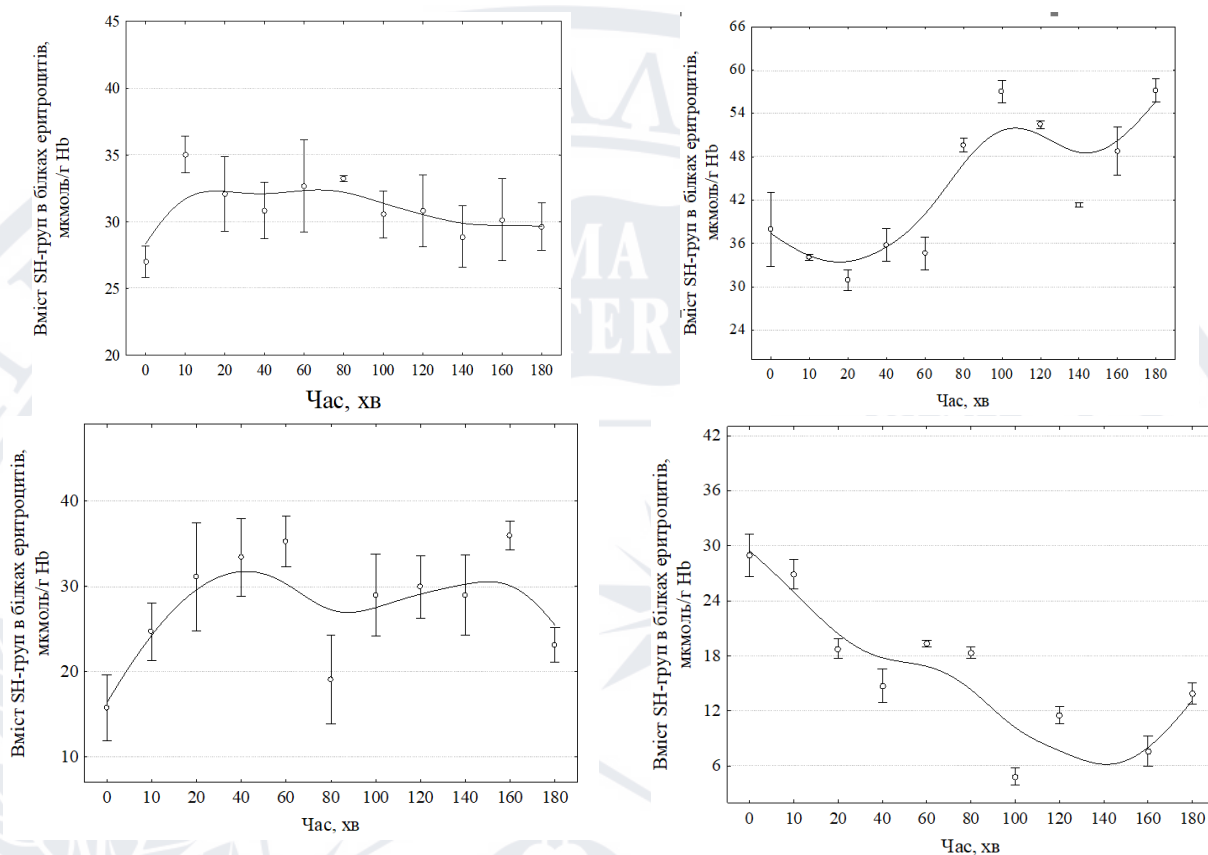


Рис. 3.5. Зміна вмісту SH-груп у білках еритроцитів у мкмоль/г гемоглобіну (Hb). Частота вібрації: А – 20 Гц, Б – 24 Гц, У – 28 Гц, Г – 32 Гц. Амплітуда вібрації – $0,5 \pm 0,04$ мм

Таким чином, при впливі вібрації в інтервалі частот 8-32 Гц, амплітудою $0,5 \pm 0,04$ мм ми фіксуємо зростання SH-груп у білковій фракції еритроцитів. Винятком є вплив вібрації з частотами 28 і 32 Гц, де рівень SH-груп в кінці експерименту знижується.

На рис. 3.6 показано зміну SH-груп у білковій фракції еритроцитів щодо початкового їх рівня залежно від двох факторів: частоти та тривалості вібраційної дії при фіксованій амплітуді $0,5 \pm 0,04$ мм.

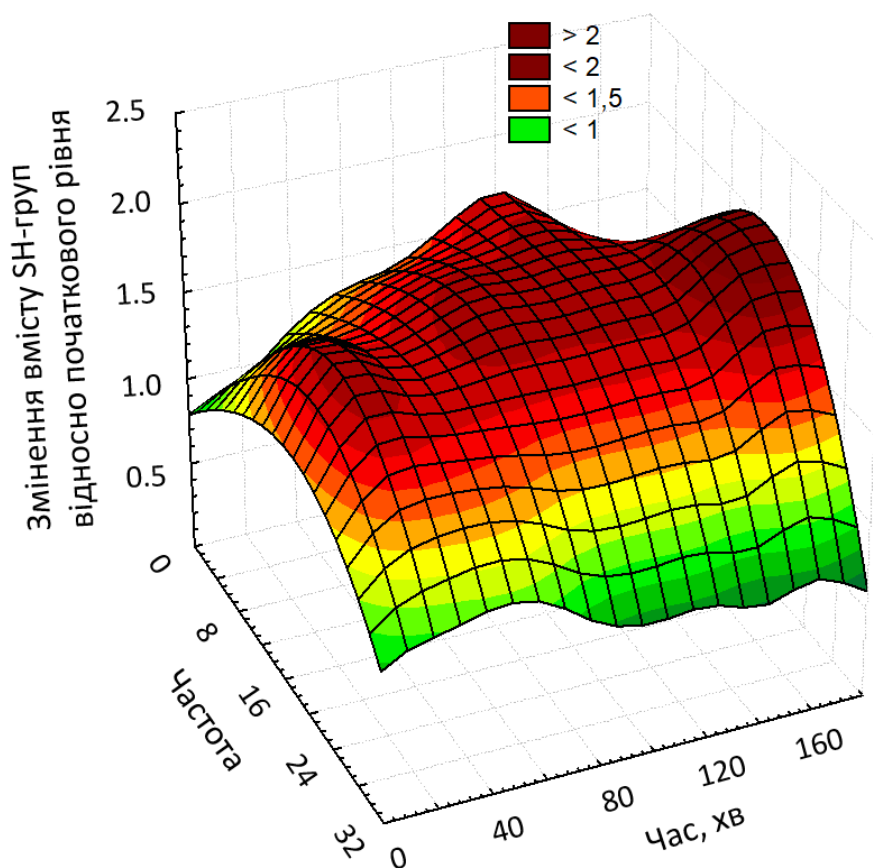


Рис. 3.6. Зміна вмісту SH груп відносно початкового рівня під дією двох факторів: частоти та тривалості вібрації з амплітудою $0,5 \pm 0,04$ мм.

З експериментальних даних видно, що зі збільшенням часу вібраційного впливу в еритроцитах зростає вміст SH груп, у той час як інкубування еритроцитів в середовищі протягом 3-х годин без впливу вібрації призводить до зниження SH груп і в кінці експерименту стає нижчим за початковий рівень в 1,7 рази. Найбільший приріст SH груп фіксується при дії вібрації в інтервалі частот 16 - 24 Гц (рис. 3.6). Їх вміст збільшується на 50-70% щодо початкового рівня. Вірогідно, за цих частот активізуються процеси тіол-дисульфідного обміну і деглутатіонування гемоглобіну, що спостерігається при помірному окисному навантаженні на клітину. А при вібраційному впливі з частотами 28 і 32, особливо в останньому випадку, зменшення SH-груп вказує на посилення процесів аутоокиснення у клітині, наслідком чого є окиснення SH-груп.

При ранньому впливі гіпоксії метаболічні адаптації еритроцитів до гіпоксії *in vivo* призводять до утворення глутатіону (GSH) накопичення та виснаження окисленого глутатіону (GSSG), що відповідає зниженому окислювальному стресу або посиленню біосинтезу *de novo* [45, 46]. В умовах гіпоксії підвищується рівень продукції NO, яка була індукована гіпоксією [45]. Він не тільки має антиоксидантну дію на тіол цистеїну, але також впливає на глутатіон для утворення GSNO, запобігає окисненню GSH до GSSG і підтримує здатність до відновлення GSH. Слід зазначити, що GSNO не тільки знищує вільні радикали, але й захищає клітину за допомогою цГМФ-незалежних дій нітрозилування [45].

3.2. Вивчення впливу низькочастотної вібрації на схильність до гемоглобіну до аутоокислення ферриціанідом

Швидкість реакції аутоокислення гемоглобіну характеризували константою швидкості реакції першого порядку k .

Зміна k реакції аутоокислення гемоглобіну суспензії еритроцитів, що піддаються дії низькочастотної вібрації з частотами 8; 12; 16; 20, 24, 28 і 32 Гц і амплітудою $0,5 \pm 0,04$ мм протягом 3-х годин показано на рис. 3.7., 3.8. На рис. 3.7, а. показано зміну k реакції аутоокислення гемоглобіну суспензії еритроцитів, що інкубували в середовищі Na-фосфатного буфера протягом 3-х годин без вібрації. Видно, що протягом 3-х годин експерименту константа швидкості реакції, що вивчається, знаходиться на початковому рівні, відхилення від рівня контролю незначущі.

Вібраційна дія з частотою 8 Гц (рис. 3.6, б) призвела до поступового зростання k протягом 105 хв експерименту. Приріст k у часовому інтервалі 90–105 хв становив $17,58 \pm 2,91\%$. Подальший вплив призвело до зниження швидкості реакції. До кінця експерименту величина k знизилася на $5,80 \pm 3,95\%$ початкового рівня. При дії вібрації із частотою 12 Гц k реакції аутоокислення також зростає протягом 15 хв експерименту (рис. 3.6, в). При

цьому приріст k становив $13,26 \pm 4,69\%$ від початкового рівня. Подальше вплив призвело до зниження k . У часовому інтервалі 30 – 105 хвилин k знизилася нижче контрольного на $7,97 \pm 6,08\%$, після чого також реєстрували збільшення k до початкового рівня.

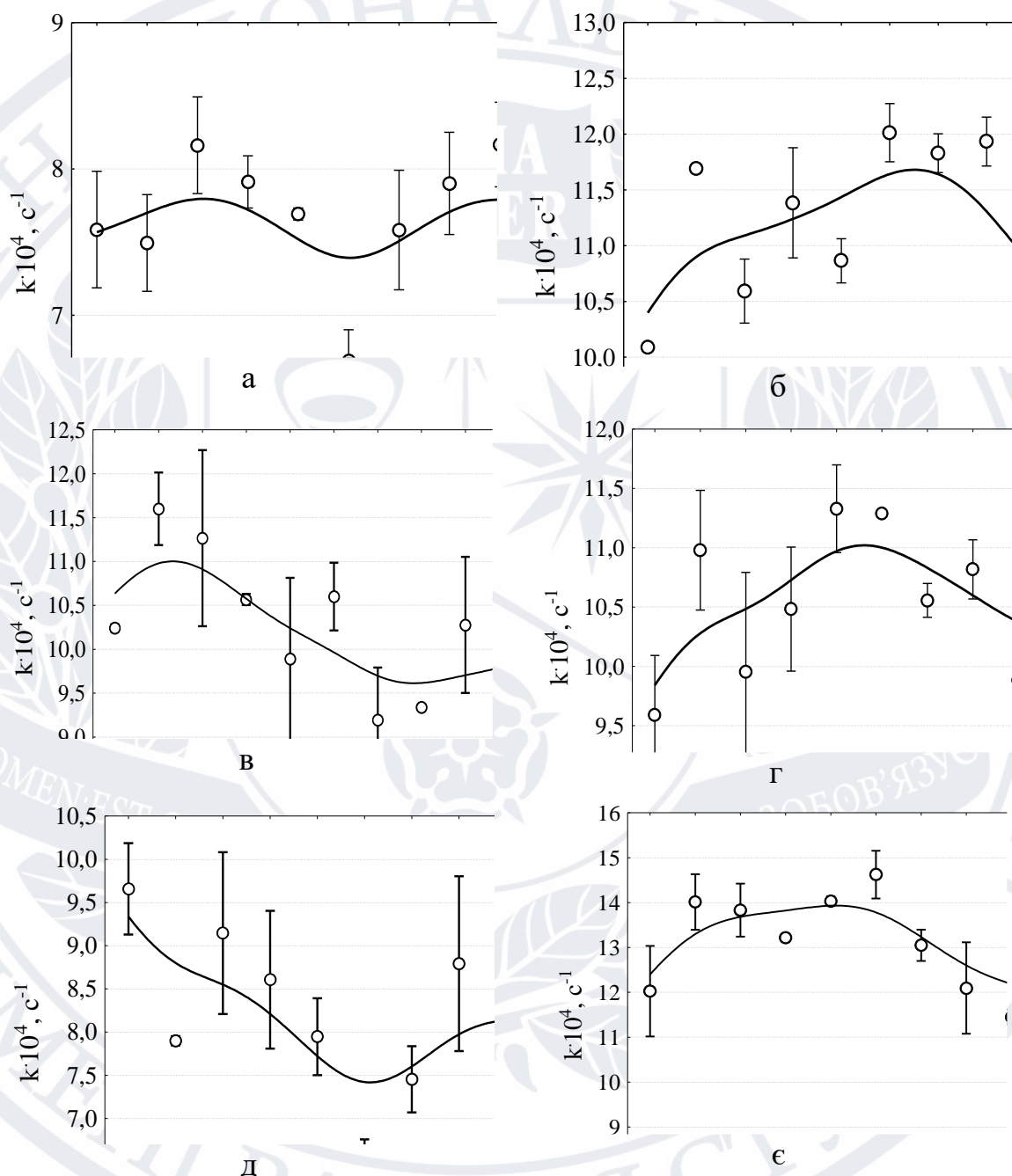


Рис. 3.6. Змінення константи швидкості реакції аутоокиснення гемоглобіну еритроцитів, що піддавалися дії вібрації з частотами а – 0 Гц, б – 8 Гц, в – 12 Гц, г – 16 Гц, д – 20 Гц, е – 24 Гц.

На рис. 3.6, г показано змінення константи швидкості реакції аутоокиснення гемоглобіну в залежності від часу дії вібрації з частотою 16

Гц. Протягом часового інтервалу від 0 до 75 хвилин також спостерігали зростання константи швидкості реакції до $18,21 \pm 7,03\%$ від початкового рівня, після чого також реєстрували зниження k до контрольного рівня.

При вібрації із частотою 20 Гц k реакції аутоокислення знижувалася на початку експерименту (рис. 3.6, д). У часовому проміжку від 0 до 75 хвилин k знизилася до рівня нижче за контрольний на $19,92 \pm 11,82\%$. Подальша дія вібрації призводила до збільшення константи швидкості. До кінця експерименту величина k зросла на $13 \pm 5,51\%$, але залишалася нижче за контрольний.

На рис. 3.6, є — показано зміну константи швидкості реакції аутоокислення гемоглобіну залежно від часу дії вібрації із частотою 24 Гц. У часовому інтервалі від 0 до 75 хвилин спостерігалось зростання константи швидкості щодо контролю, приріст k становив $17,29 \pm 11,8\%$. Подальша дія призвела до поступового зниження величини k і до кінця експерименту k знизилася на $25,65 \pm 9,64\%$ нижче рівня контролю.

При вібрації з частотою 28 Гц величина k у часовому проміжку від 0 до 75 хв знизилася на $13,65 \pm 6,94\%$, нижче за початковий рівень (рис. 3.7, а). Подальше вплив призвело до збільшення k рівня контролю. У часовому проміжку від 105 до 180 хвилин k знизилася до рівня нижче за контрольний на $15,97 \pm 10,78\%$.

При вібрації із частотою 32 Гц спостерігали монотонне зниження k протягом 120 хвилин експерименту (рис 3.7, б). У цьому часовому інтервалі константа швидкості реакції знизилася на $29,64 \pm 21,09\%$ нижче за контрольний рівень. Подальша дія призвела до деякого збільшення k , проте вона залишалася нижче контролю.

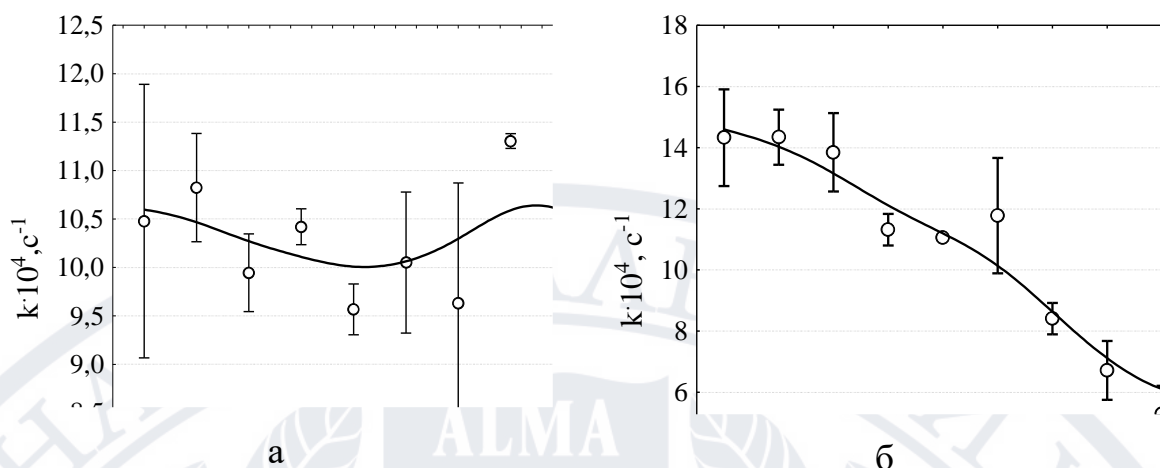


Рис. 3.7. Зміна константи швидкості реакції аутоокислення гемоглобіну еритроцитів, які зазнавали дії вібрації з частотами а – 28 Гц, б – 32 Гц.

На рис. 3.8 показано зміну константи швидкості k щодо початкового рівня (контролю) залежно від 2-х факторів: частоти та часу вібраційної дії. Достовірних змін схильності гемоглобіну до аутоокислення, що ініціює фериціанід, при 3-х годинному інкубуванні еритроцитів у сольовому буфері не спостерігали.

Вібрація в інтервалі частот 8-12 Гц призводить до зростання k на початку експерименту. Часовий інтервал, протягом якого величина k збільшується приблизно на 13% від початкового рівня, становить 105 хв при вібрації з частотою 8 Гц і скорочується до 60 хв при вібраційному впливі в інтервалі частот 12-16 Гц. Збільшення часу дії вібрації на еритроцити викликало поступове зниження величини k . Однак при вібрації з частотами 8 - 20 Гц немає значного зниження аутоокислення.

При дії вібрації із частотою 24 спостерігали приріст k , який досягав 16% від початкового рівня. Найбільше збільшення константи k ми реєстрували при дії з частотою 24 Гц, величина k зростала на 17% протягом 75 хвилин експерименту вище рівня контролю. Після чого величина k знижувалася нижче рівня контролю наприкінці експерименту.

При вібраційному впливі з частотою 32 Гц монотонне зниження протягом 120 хв призвело до максимального зниження к даної амплітуді і становило 30 %.

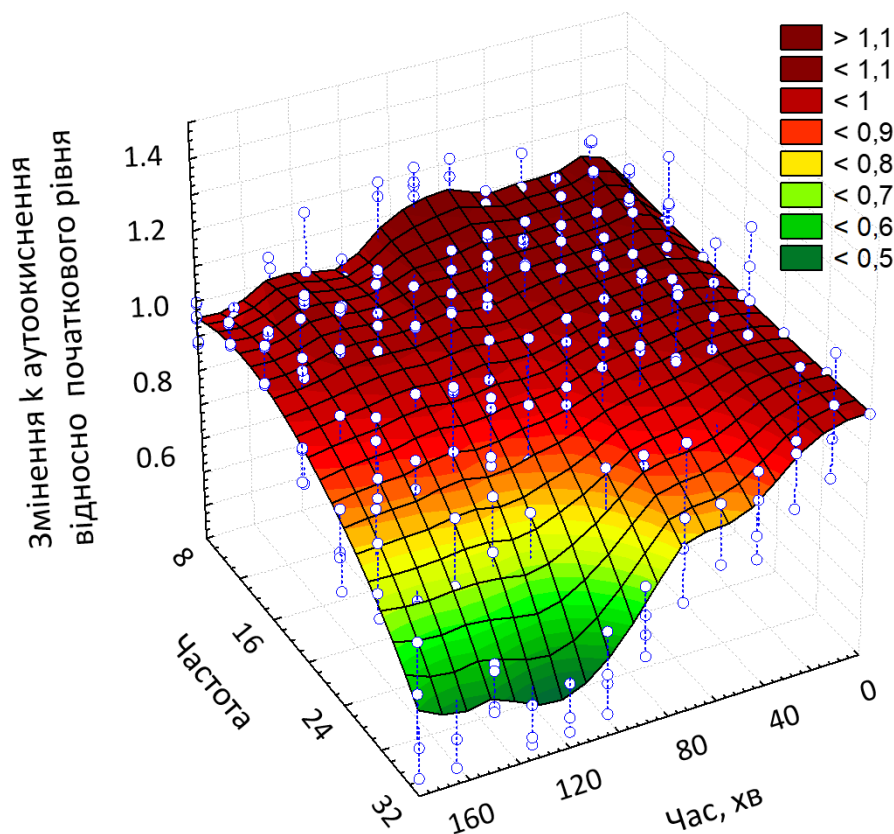


Рис. 3.8. Зміна константи швидкості к щодо початкового рівня (контролю) залежно від 2-х факторів: частоти та часу вібраційної дії.

Практично у всіх випадках вібрація призводила до зростання к реакції аутоокислення гемоглобіну еритроцитів на початку експерименту, після чого реєстрували її зниження. Розмір часового проміжку зростання к залежить від частоти вібрації. Ступінь падіння к наприкінці експерименту також визначалася частотою вібраційної дії. Найбільше зниження зареєстровано за впливом із частотами 24 і 32 Гц.

ВИСНОВКИ

1. Достовірних відмінностей змінення рН від частоти вібраційного впливу не було встановлено, проте показані достовірні відмінності змінення внутрішньоклітинної рН при дії вібрації з контрольним експериментом (вібраційний вплив відсутній).

2. Показано, що за дії вібрації відбувається закислення внутрішньоклітинного середовища внаслідок порушення газообміну. Закислення внутрішньоклітинного середовища буде сприяти процесам аутоокислення гемоглобіну киснем, що міститься у середовищі інкубування.

3. Інкубування еритроцитів в середовищі протягом 3-х годин без впливу вібрації призводить до зниження SH груп і в кінці експерименту стає нижчим за початковий рівень в 1,7 рази.

4. Низькочастотна вібрація в інтервалі 8 - 20 Гц приводить до збільшення вмісту SH груп (на 50-70% щодо початкового рівня) у білках еритроцитів, що вказує на активізацію процесів тіол-дисульфідного обміну і деглутатіонування гемоглобіну, що спостерігається при помірному окисному навантаженні на клітину.

5. При вібраційному впливі з частотами 28 і 32, особливо в останньому випадку, зменшення SH-груп вказує на посилення процесів аутоокиснення у клітині, наслідком чого є окиснення SH-груп.

6. У всіх випадках вібрація призводила до зростання k реакції окислення гемоглобіну феріуанідом на початку експерименту, після чого реєстрували її зниження. Розмір часового проміжку зростання k залежить від частоти вібрації. Ступінь падіння k наприкінці експерименту також визначалася частотою вібраційної дії. Найбільше зниження зареєстровано за впливом вібрації в інтервалі частот 24 - 32 Гц.

ЛІТЕРАТУРА

1. Attia A. M. M., Ibrahim F. A. A., Abd El-Latif N. A., Aziz S. W., Moussa S. A. A. Biophysical study on conformational stability against autoxidation of oxyhemoglobin and erythrocytes oxidative status in humans and rats. // *Wulfenia Journal*.-2015.- 22(12).- 264–281.
2. Winterbourn C.C. Free-radical production and oxidative reactions of hemoglobin. // *Environ Health Perspect*.- 1985.-64.- p.321-330.
3. Faivre B, Menu P, Labrude P, Vigneron C. Hemoglobin autooxidation/oxidation mechanisms and methemoglobin prevention or reduction processes in the bloodstream. Literature review and outline of autooxidation reaction. // *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 1998; 26(1):17-26.
4. Dotsenko O.I., Mischenko A.M., Taradina G.V. Vibration influence on the O₂-dependent processes activity in human erythrocytes. // *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. -2021. -Vol. 12(3).- P. 452-458.
5. Мороз, В.В. Строение и функции эритроцита в норме и при критических состояниях / В. В. Мороз, А.М. Голубев, А.В. Афанасьев, А.Н. Кузовлев, В.А. Сергунова, О.Е. Гудкова, А.М. Черныш // *Общая реаниматология*. – 2012. – Т. 8, № 1. – С. 52-60.
6. Кольман, Я. Наглядная биохимия. / Я. Кольман, К.-Г. Рем. – Москва: Мир, 2000. – 393 с.
7. Кривенцев, Ю.А. Гемоглобины человека / Ю.А. Кривенцев, Р.А. Бисалиева, А.И. Носков // *Вестник АГГУ*. – 2007. – Т. 41, № 6. – С. 34-41.
8. Заводник И.Б., Лапшина Е.А. Процессы окисления гемоглобина человека / Заводник И.Б., Лапшина Е.А. // *Биохимия*. 1996.Т.61 .№1 .С.42-48.
9. Attia AMM, El-Hefnawy A. Conformational stability against autoxidation for mice and human oxyhemoglobins. // *Rom J Biophys*. -2009.- 19(3).- p. 187-198.
10. Bonaventura, C. Molecular controls of the oxygenation and redox reactions of hemoglobin / C. Bonaventura, R. Henkens, A.I. Alayash, S. Banerjee,

A.L. Crumbliss // *Antioxidants & redox signaling*. – 2013. – V. 18, № 17. – P. 2298-2313.

11. Mohanty, J.G. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging / J.G. Mohanty, E. Nagababu, J.M. Rifkind // *Frontiers in physiology*. – 2014. – V. 5. – P. 1-6.

12. Abugo, O.O. Oxidation of hemoglobin and the enhancement produced by nitroblue tetrazolium / O.O. Abugo, J.M. Rifkind // *The Journal of biological chemistry*. – 1994. – V. 269, № 40. – P. 24845-24853.

13. Ajmani, R.S. Oxidative stress and hemorheological changes induced by acute treadmill exercise / R.S. Ajmani, J.L. Fleg, A.A. Demehin, J.G. Wright, F. O'Connor, J.M. Heim, E. Tarien, J.M. Rifkind // *Clinical hemorheology and microcirculation*. – 2003. – V. 28, № 1. – P. 29-40.

14. Balagopalakrishna, C. Production of superoxide from hemoglobin-bound oxygen under hypoxic conditions / C. Balagopalakrishna, P.T. Manoharan, O.O. Abugo, J.M. Rifkind // *Biochemistry*. – 1996. – V. 35, № 20. – P. 6393-6398.

15. Rifkind, J.M. Regulation of oxygen delivery by the reaction of nitrite with RBCs under hypoxic conditions / J.M. Rifkind, M.T. Salgado, Z. Cao // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2012. – V. 737. – P. 183-189.

16. Kanas, T. Mechanism of hemoglobin-induced cellular injury in desiccated red blood cells / T. Kanas, J.P. Acker // *Free radical biology & medicine*. – 2010. – V. 49, № 4. – P. 539-547.

17. Cimen, M.Y. Free radical metabolism in human erythrocytes / M.Y. Cimen // *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. – 2008. – V. 390, № 1-2. – P. 1-11.

18. Hebbel, R.P. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes / R.P. Hebbel, J.W. Eaton, M. Balasingam, M.H. Steinberg // *The Journal of clinical investigation*. – 1982. – V. 70, № 6. – P. 1253-1259.

19. Eder, H.A. Congenital Methemoglobinemia. A Clinical and Biochemical Study of a Case / H. A. Eder, C. Finch, R.W. McKee // *The Journal of clinical investigation*. – 1949. – V. 28, № 2. – P. 265-272.

20. Мышкин, А.Е. Окисление гемоглобина / А.Е. Мышкин, // Успехи химии. – 1984. – Т. 53, № 6. – С. 1045-1068.

21. Keilin, D. Reactions of methaemoglobin and catalase with peroxides and hydrogen donors / D. Keilin, E.F. Hartree // Nature. – 1954. – V. 173, № 4407. – P. 720-723.

22. Arbos, K.A. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts / K.A. Arbos, L.M. Claro, L. Borges, C.A. Santos, A.M. Weffort-Santos // Nutrition research. – 2008. – V. 28, № 7. – P. 457-463.

23. Hargrove, M.S. His64(E7)-->Tyr apomyoglobin as a reagent for measuring rates of hemin dissociation / M.S. Hargrove, E.W. Singleton, M.L. Quillin, L.A. Ortiz, G.N. Phillips, J.S. Olson, A.J. Mathews // The Journal of biological chemistry. – 1994. – V. 269, № 6. – P. 4207-4214.

24. Rifkind, J.M. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging / J.M. Rifkind, E. Nagababu // Antioxidants & redox signaling. – 2013. – V. 18, № 17. – P. 2274-2283.

25. Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Альтернативные и дополнительные функции эритроцитарного гемоглобина // Биохимия.- 2019.- т.84 (1).- С. 3- 23.

26. Hebbel, R.P. Auto-oxidation and a membrane-associated 'Fenton reagent': a possible explanation for development of membrane lesions in sickle erythrocytes / R.P. Hebbel // Clinics in haematology. – 1985. – V. 14, № 1. – P. 129-140.

27. Nagababu, E. Formation of fluorescent heme degradation products during the oxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide / E. Nagababu, J.M. Rifkind // Biochemical and biophysical research communications. – 1998. – V. 247, № 3. – P. 592-596.

28. Rifkind, J.M. The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions / J.M. Rifkind, J.G. Mohanty, E. Nagababu // Frontiers in physiology. – 2014. – V. 5. – P. 1-7.

29. Jensen F.B. Comparative analysis of autoxidation of haemoglobin / Jensen F.B. // J. Experim. Biol. - 2001. - Vol.204. - P.2029-2033.

30. Постникова Г. Б., Шеховцова Е. А. Гемоглобин и миоглобин как восстановительные реагенты в биологических системах. Редокс-реакции глобинов с солями и комплексами меди и железа // Успехи биологической химии.- 2016.- т. 56.- С. 337- 376.

31. O. I. Dotsenko, A. M. Mischenko, G. V. Taradina. Vibration influence on the O₂-dependent processes activity in human erythrocytes // Regul. Mech. Biosyst.- 2021.- 12(3).- 452–458

32. Nishino, T., Yachie-Kinoshita, A., Hirayama, A., Soga, T., Suematsu, M., & Tomita, M. (2013). Dynamic simulation and metabolome analysis of long-term erythrocyte storage in adenine-guanosine solution. PLoS One. 8(8), e71060.

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

34. Мышкин А.Е., Богданова Л.Д. Феррицианидный способ тестирования препаратов гемоглобина // Гематология и трансфузиология. - 1990. –С. 33-34.

35. Разыграев А. В., Арутюнян А. В. Определение глутатионпероксидазной активности в сыворотке крови человека с использованием пероксида водорода и 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной) кислоты // Клинич. лаб. диагностика. – 2006. –№ 6. – С. 13–16.

36. Chwastowski, J., Ciesielski, W., Khachatryan, K., Kołoczek, H., Kulawik, D., Oszczyda, Z., Soroka, J. A., Tomasik, P., Witczak, M. Water of Increased Content of Molecular Oxygen. // Water.- 2020.- 12 (9).- P. 2488–2508.

37. Bunkin, N. F., Ninham, B. W., Ignatiev, P. S., Kozlov, V. A., Shkirin, A. V., Starosvetskij, A. V. Long-living nanobubbles of dissolved gas in aqueous solutions of salts and erythrocyte suspensions. // Journal Biophotonics.-2011.- 4 (3), 150–164.

38. Li, Y., Buckin, V. State of Oxygen Molecules in Aqueous Supersaturated Solutions. // *The Journal of Physical Chemistry B*.-2019. – 123.- 4025–4043.

39. Uchida T., Liu, S., Enari, M., Oshita, S., Yamazaki, K., Gohara, K. Effect of NaCl on the lifetime of micro- and nanobubbles. // *Nanomaterials* (Basel, Switzerland). - 2016.- 6(2).- 31–40.

40. Shatalov V. M. Mechanism of the biological impact of weak electromagnetic fields and the in vitro effects of blood degassing. *Biophysics*, (2012). 57 (6), 808–813.

41. Shatalov V. M. Mechanism of the biological impact of weak electromagnetic fields and the in vitro effects of blood degassing. // *Biophysics*.- 2012.- 57 (6).- P. 808–813.

42. Fang, Z., Wang, X., Zhou, L., Zhang, L., Hu, J. Formation and stability of bulk nanobubbles by vibration. // *Langmuir*.-2020.- 36.- P. 2264–2270.

43. Gudkov S. V., Penkov N. V., Baimler I. V., Lyakhov G. A., Pustovoy V. I., Simakin A. V., Sarimov R. M., Scherbakov I. A. Effect of mechanical shaking on the physicochemical properties of aqueous solutions. *International Journal of Molecular Sciences*.-2020.- 21(21).- P. 8033–8045.

44. Gudkov, S. V., Lyakhov, G. A., Pustovoy, V. I., & Shcherbakov, I. A. Vibration–vortex mechanism of radical-reaction activation in an aqueous solution: physical analogies. // *Physics of Wave Phenomena*.- 2021. - 29(2).- P. 108–113.

45. Zhao Y, Wang X, Noviana M, Hou M. Nitric oxide in red blood cell adaptation to hypoxia. // *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. -2018.-50(7).- P. -621-634.

46. Rogers SC, Said A, Corcuera D, McLaughlin D, Kell P, Doctor A. Hypoxia limits antioxidant capacity in red blood cells by altering glycolytic pathway dominance. // *FASEB J*.- 2009.-23(9).- P. 3159-3170.