Тихонова Людмила Анатольевна

# Токсическое действие бета-амилоидного пептида 25-35 на эритроциты разных возрастных популяций

03.01.04 – биохимия

# АВТОРЕФЕРАТ диссертации на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Работа выполнена в Лаборатории метаболического моделирования и биоинформатики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН г. Пущино и в Учебном центре биофизики и биомедицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пущинский государственный естественно-научный институт» г. Пущино.

Научный руководитель: доктор биологических наук

Косенко Елена Александровна

Официальные оппоненты: Атауллаханов Фазоил Иноятович,

доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГБУН Центр теоретических проблем физико-химической

фармакологии РАН, директор

Ланкин Вадим Зиновьевич,

доктор биологических наук, профессор, ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

руководитель лаборатории

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное

учреждение науки Институт биофизики клетки

Российской академии наук

Защита состоится 8 июня 2017 года в 11:00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.010.01 в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ) по адресу: 119121 Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ и на сайте www.ibmc.msk.ru

bleof

Автореферат разослан « » 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат химических наук

Карпова Е.А.

#### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

#### Актуальность исследования

Бета-амилоидные пептиды (АВ) обнаруживаются во многих тканях и жидкостях организма в нормальных условиях [Curtain et al., 2001], однако их значительное накопление может приводить к повреждению не только клеток, но и органов в целом. Так, например, для болезни Альцгеймера (БА) характерно усиленное образование и накопление Аβ в мозге, которые, согласно амилоидной каскадной гипотезе [Hardy, Higgins, 1992], являются единственными патологическими факторами, повреждающими мозг и приводящими к прогрессирующей потере памяти и необратимому снижению умственных способностей. В настоящее время болезнью охвачено приблизительно 35 миллионов человек в мире, и ожидается, что к 2030 г. их численность удвоится [Fita et al., 2011]. Несмотря на то, что БА считается заболеванием, характеризующимся исключительно повреждением клеток мозга, в последнее время накапливаются данные о том, что при этом заболевании также повреждаются периферические ткани и клетки, в частности эритроциты [Blass et al., 1985; Gibson, Huang, 2002]. В крови пациентов появляются эритроциты атипичной формы [Mohanty et al., 2008, 2010], что свидетельствует об изменениях структуры и целостности мембран клеток [Bosman et al., 1991], что может приводить к их лизису прямо в кровяном русле. Такое предположение подтверждается накоплением в мозге пациентов с БА свободного гемоглобина и железа, которые вызывают развитие окислительного стресса и повреждение нейронов [Wu et al., 2004; Perry et al., 2008]. Механизмы повреждения и лизиса эритроцитов в кровяном русле неизвестны, и их изучение представляет важную медико-биологическую проблему, решение которой выявить роль эритроцитов в развитии патологических процессов, происходящих в мозге при БА. Предполагается, что одним из факторов, вызывающих повреждение эритроцитов в кровотоке, могут быть АВ, которые накапливаются в мелких сосудах мозга при БА (амилоидная ангиопатия) [Perry et al., 2008]. Известно, что *in vitro* Аβ вызывают быстрый лизис эритроцитов [Mattson *et al.*, 1997]. Исследования, проведенные ранее в нашей лаборатории на общей фракции эритроцитов, показали, что в биоактивности и эритротоксичности амилоидов играют важную роль биохимические процессы, происходящие в эритроцитах и, в частности, транспортные процессы, скорость гликолиза и антиокислительный статус клеток [Косенко  $u \partial p$ ., 2008]. Однако популяция эритроцитов неоднородна, и факт наименьшей устойчивости старых эритроцитов к эндогенным и экзогенным патологическим факторам хорошо установлен в литературе [Bonsignore et al., 1964]. Данные о влиянии Аβ на эритроциты разного возраста в настоящее время в литературе отсутствуют и представляют особый интерес, поскольку для пациентов с БА характерно ускоренное старение эритроцитов в кровяном русле [Bosman et al., 1991]. Мы предполагаем, что Аβ, локализованный в сосудах мозга при БА, может являться важным эндогенным фактором, ускоряющим старение клеток. Поскольку в основе старения клеток лежат изменения в энергетическом обмене и антиоксидантном статусе, данная работа посвящена изучению действия Αβ антиокислительного и энергетического обмена в эритроцитах разного возраста.

Кроме известно, биохимических τογο, что одним ИЗ признаков, характеризующих БА, является нарушение аэробного обмена глюкозы в мозге и накопление лактата [Haxby et al., 1986; Liang et al., 2008]. Причины этого нарушения множественны, и одной из них может быть недостаточное поступление кислорода [Ajmani et al., 2000; de la Torre, 2000]. В связи с тем, что при старении эритроцитов происходит нарушение кислород-транспортной функции [Edwards, Rigas, 1967; Schmidt et al., 1987], в работе также изучалось влияние амилоида на концентрацию 2,3дифосфоглицерата (2,3-ДФГ), одного из главных биологических индикаторов гипоксии, которая является одним из характерных признаков БА [Haxby et al., 1986; Liang *et al.*, 2008].

#### Цель работы:

выявление действия  $A\beta_{25-35}$  на показатели энергетического обмена и антиоксидантого статуса в эритроцитах разных возрастных популяций *in vitro*.

#### Задачи исследования:

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

- 1. Охарактеризовать эритроциты разного возраста по показателям антиоксидантного обмена и гликолитического статуса.
- 2. Определить влияние  $A\beta_{25-35}$  на степень лизиса эритроцитов разного возраста.
- 3. Изучить влияние  $A\beta_{25,35}$  на метаболические характеристики эритроцитов:
  - а) на активность  $Na^{+}/K^{+}$ -АТФ-азы,
  - б) на концентрацию АТФ, АДФ, АМФ, 2,3-ДФГ,
  - в) на активность ферментов обмена адениннуклеотидов,
- г) на активность ключевых ферментов гликолиза: гексокиназы, фосфофруктокиназы и пируваткиназы,
- д) на активность ферментов антиоксидантной системы: каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионтрансферазы, супероксиддисмутазы, и фермента пентозофосфатного пути глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.
- 4. Измерить показатели энергетического обмена в эритроцитах пациентов с БА и охарактеризовать эти данные в сравнении с данными, полученными *in vitro*.

#### Научная новизна

В работе проведен расширенный сравнительный количественный анализ показателей энергетического обмена, антиоксидантного статуса при старении эритроцитов крысы. Впервые изучено токсическое действие  $A\beta_{25-35}$  на молодые и старые эритроциты крысы. Впервые описано снижение устойчивости эритроцитов к амилоид-индуцированному лизису при старении клеток. Изучено изменение антиоксидантного и энергетического статуса в эритроцитах разного возраста под действием  $A\beta_{25-35}$ . Показано влияние  $A\beta_{25-35}$  на изменение концентрации 2,3-ДФГ, одного из основных факторов, регулирующих сродство гемоглобина к кислороду. Впервые показано, что под действием  $A\beta_{25-35}$  происходит быстрое старение эритроцитов в условиях *in vitro*. Выявлены возможные причины эритротоксичности  $A\beta$ , что позволит приблизиться к пониманию возникновения патологических процессов в мозге, связанных как с лизисом, так и с нарушением функциональной способности эритроцитов.

#### Практическая значимость

Полученные результаты могут быть использованы для выявления неизвестных ранее механизмов возникновения болезни Альцгеймера и повреждения эритроцитов при этом заболевании, что создаст предпосылки для развития новых фармакологических средств, предназначенных для лечения нейродегенеративных заболеваний.

#### Положения, выносимые на защиту:

- 1. Под воздействием  $A\beta_{25-35}$  происходит гемолиз эритроцитов и в молодой, и в старой популяции клеток, степень которого наиболее выражена в старых клетках.
- 2. При инкубации  $A\beta_{25-35}$  с эритроцитами *in vitro* наблюдается значительное увеличение активности  $Na^+/K^+$ - $AT\Phi$ -азы в обеих популяциях клеток.
- 3. Под воздействием  $A\beta_{25-35}$  происходит нарушение энергетического обмена в молодых и старых эритроцитах, что выражается в снижении активности регуляторных гликолитических ферментов и уменьшении концентрации адениннуклеотидов.
- 4. Инкубация  $A\beta_{25-35}$  с эритроцитами приводит к снижению активности ферментов антиоксидантной защиты клеток.
- 5. Воздействие  $A\beta_{25-35}$  вызывает снижение концентрации ключевого метаболита эритроцитов, определяющего сродство гемоглобина к кислороду, 2,3-ДФГ.
- $6.\ A\beta_{25-35}$  вызывает изменения биохимических показателей в молодых эритроцитах до уровня, характерного для старых клеток.

#### Личный вклад автора

Все экспериментальные исследования, получение и очистка эритроцитов и измерение функциональных и биохимических параметров эритроцитов, а также статистическая обработка результатов, создание рисунков и графиков выполнены автором самостоятельно.

#### Апробация работы

Основные результаты работы докладывались на международных и российских конференциях: XV, XVI, XVII, XVIII Международных Пущинских школах-конференциях молодых ученых «Биология — наука XXI века», Пущино, 2011, 2012, 2013, 2014; «Экспериментальная и теоретическая биофизика», Пущино, 2011, 2014, 2016; VI Всероссийском с международным участием Конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013», Иркутск, 2013.

#### Публикации

По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, из них 6 в ведущих рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

#### Структура и объём работы

Диссертация изложена на 112 страницах машинописного текста, состоит из введения, трех глав (обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения), заключения, выводов, 26 рисунков, 1 таблицы и библиографического списка, содержащего 258 наименований на русском и английском языках.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты на животных были выполнены с соблюдением правил гуманного обращения с животными (Директива 86/609/ЕЕС и обновленная Директива 2010/63/ЕU Совета Европейского Союза). В работе использовались самцы крыс линии Вистар возрастом 3 месяца, массой 240-260 г, выращенные в питомнике-виварии Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН г. Пущино. Условия содержания были стандартными. Для получения суспензии очищенных эритроцитов использовали смешанную кровь, полученную при декапитации. В качестве антикоагулянта применяли 130 мМ Na<sub>3</sub>-цитрат (рН 7,4).

Для удаления лейкоцитов и тромбоцитов кровь пропускали через колонку, заполненную α-целлюлозой и гемикристаллинцеллюлозой тип 50 в соотношении 1:1 и уравновешенную 0,9% NaCl [Beutler et al., 1977]. Эритроциты центрифугированием в течение 10 мин при 1000 д. Плазму удаляли, осадок эритроцитов трижды промывали раствором, состоящим из 10 мМ КH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4; 150 мМ NaCl, 0,05 мМ K-ЭДТА, 0,2 мМ фенилметилсульфонилфторида ( $\Phi$ MC $\Phi$ )/С<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH. После последнего промывания осадок использовали для разделения клеток в градиенте перколла. Для этого клетки ресуспендировали в перколл-буфере (114 мМ NaCl, 76%) перколл, 0,5% глюкозы, 10 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 мМ K-ЭДТА, 0,2 мМ ФМСФ/С<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, рН 7,4) до гематокрита 15% [Lutz et al., 1992]. Суспензию эритроцитов центрифугировали в течение 20 мин при 33000 g, +4°C. После центрифугирования собирали три фракции эритроцитов: верхнюю - молодые эритроциты, среднюю (основной объем клеток промежуточного возраста) и нижнюю – старые клетки. Каждую фракцию трижды промывали раствором, содержащим 10 мМ КН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, рН 7,4, 140 мМ NaCl, 5мМ КСl, 2,8 мМ глюкоза, 0,5 мМ К-ЭДТА (10 мин, +4°C, 1000 g, 1500 g, 2000 g) и суспендировали в этом растворе в соотношении 1:5. Подсчет количества клеток одновременно проводили в камере Горяева и с помощью прибора ВЕСКМАN COULTER ACT8.

Коммерческий  $A\beta_{25-35}$  растворяли в воде для инъекций до конечной концентрации 1,5 ммоль/л, с последующим разведением до концентрации 0,3 ммоль/л. О степени агрегации  $A\beta_{25-35}$  судили по появлению характерного пика в спектре флуоресценции тиофлавина Т при 490 нм [LeVine, 1993]. Для стандартизации метода  $A\beta_{25-35}$  инкубировали в течение 2 часов при 37°C в шейкере (ELMI-ST3) при постоянном перемешивании (200 об/мин).

Эритроциты крысы в концентрации  $15x10^7$  клеток в 1 мл инкубировали в течение разного времени (от 5 до 240 мин) при разной температуре (4; 25 и 37°С) в среде, содержащей 140 мМ NaCl, 5 мМ КCl, 10 мМ КH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4. Для определения активности ферментов по фосфату эритроциты инкубировали в среде, содержащей 150 мМ NaCl, 5 мМ КCl, 10 мМ Трис-HCl, pH 7,4. Опытная проба содержала  $A\beta_{25-35}$  в конечной концентрации 5, 10, 25, 50 мкмоль/л. В качестве контроля использовали нетоксичный фрагмент  $A\beta_{35-25}$  в той же концентрации. После инкубации эритроциты осаждали при 300g (5 мин, +4°С). Супернатант использовали для определения степени лизиса эритроцитов спектрофотометрически при 540 нм. Осадок, полученный после инкубации, лизировали для определения активности ферментов. Для определения концентрации метаболитов осадок эритроцитов экстрагировали в охлажденной (-20°С)

6%HClO<sub>4</sub>/40%C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH в соотношении 1:10, центрифугировали 5 мин, +4°C, 10000g. pH супернатанта доводили до 5-6, используя 30% КОН и сухой КНСО<sub>3</sub>. Осадок перхлората калия удаляли центрифугированием. Прозрачный супернатант использовали для определения концентрации метаболитов.

Активность ферментов и концентрации метаболитов определяли спектрофотометрическими и флуориметрическими методами. Для определения каждого показателя использовали кровь 16 животных.

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.10) проводили в присутствии ксантина и ксантиноксидазы, системы, генерирующей супероксидный радикал, который вызывал восстановление красителя п-нитротетразолиевого синего (НТС) при 550 нм и 25°С [Beauchamp, Fridovich, 1971; Соломадин, 2012]. За 1 единицу активности СОД принимали количество фермента, которое вызывало 50% торможение реакции восстановления НТС.

Активность глутатионпероксидазы (ГПО, КФ 1.11.1.9) определяли по снижению светопоглощения при 340 нм при окислении НАДФН окисленным глутатионом [Lawrence, Burk, 1976].

Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) определяли по снижению величины поглощения при 240 нм и 25°С в реакции с перекисью водорода [Aebi, 1984].

Активность глутатионтрансферазы (ГТ, КФ 2.5.1.18) определяли по скорости связывания восстановленного глутатиона (GSH) с 1-хлор-2,4-динитробензолом (CDNB) при 340 нм [Warholm *et al.*, 1985].

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49) определяли по увеличению светопоглощения при восстановлении НАДФ $^+$  при 340 нм, 37°C [Beutler, 1971].

Активность  $Na^+, K^+$ -АТФ-азы (КФ 3.6.3.9) определяли по высвобождению фосфата в результате гидролиза АТФ в присутствии и отсутствие оуабаина при 700 нм, 37°C [Baginski *et al.*, 1974].

Активность гексокиназы (ГК, КФ 2.7.1.1) определяли по увеличению светопоглощения при 340 нм и 37°C при восстановлении НАДФ<sup>+</sup> [Zammit, Newsholme, 1976].

Активность фосфофруктокиназы (ФФК, КФ 2.7.1.11) измеряли по окислению НАДН при 340 нм и температуре  $37^{\circ}$ С в сопряженной с лактатдегидрогеназой (ЛДГ) и пируваткиназой (ПК) реакции [Ui, Sumi, 1982].

Активность ПК (КФ 2.7.1.40) определяли в сопряженной с ЛДГ реакции по снижению светопоглощения при окислении НАДН при 340 нм и 37°C [Staal *et al.*, 1975].

Активность ЛДГ (КФ 1.1.1.27) определяли по снижению поглощения НАДН в системе, содержащей пируват, при 340 нм и 25°C [Bergmeyer, Bernt, 1974].

Активность 5'-нуклеотидазы (5'-HT, КФ 3.1.3.5) определяли по высвобождению фосфата в лизатах эритроцитов.

Активность АМФ-дезаминазы (КФ 3.5.4.6), аденозиндезаминазы (КФ 3.5.4.4) определяли по снижению поглощения НАДН при 340 нм и  $37^{\circ}$ С в среде, содержащей 0.2 М КН $_2$ РО $_4$ , рН 7.6, 100 мМ КСl, 6.5 мМ  $\alpha$ -кетоглутарат, глутаматдегидрогеназу (0.1)

мкг/мл), 0,16 мМ НАДН, 2 мМ АМФ или 1мМ аденозин для АМФ-дезаминазы или аденозиндезаминазы соответственно.

Активность аденилаткиназы (АК, КФ 2.7.4.3) определяли по снижению поглощения НАДН при 340 нм при  $37^{\circ}$ С в реакции, сопряженной с ПК и ЛДГ.

Концентрацию глюкозы определяли по увеличению флуоресценции при образовании НАДФН ( $\lambda$ =340 нм, 25°C). Реакционная среда состояла из 70 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,7, 4 мМ MgSO<sub>4</sub>, 1,6 мМ НАДФ<sup>+</sup>, 1,6 мМ АТФ, Г6ФДГ (23 мкг/мл), ГК (24 мкг/мл).

Концентрацию АТФ определяли по увеличению флуоресценции при образовании НАДФН ( $\lambda$ =340 нм, 25°C) в реакции, сопряженной с ГК и Г6ФДГ [Trautschold *et al.*, 1985].

Концентрацию АДФ и АМФ определяли по снижению флуоресценции НАДН ( $\lambda$ =340 нм, 25°C). Реакционная среда состояла из 20 мМ Трис-HCl буфера, рН 7,5, содержащего 100 мМ КСl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мкМ НАДН, 0,1 мМ фосфоенолпируват, ЛДГ (50 мкг/мл), ПК (50 мкг/мл), миокиназу (50 мкг/мл).

Концентрацию 2,3-ДФГ определяли с использованием коммерческого набора при 340 нм, 25° С.

Исследования также были проведены на крови пациентов с БА. Эта работа была проведена совместно с Больницей Пущинского научного центра (БПНЦ РАН). В исследовании принимали участие 40 человек. Они были разделены на 3 группы: пациенты с диагнозом БА (12 человек, средний возраст – 75±2,6) и группы контроля: «молодой контроль» – 14 человек возрастом до 45 лет и «пожилой контроль» – 14 человек, по возрасту соответствующие пациентам. Диагноз «Болезнь Альцгеймера» был верифицирован на бюро медико-социальной экспертизы психоневрологического диспансера г.Серпухов с использованием стандартных критериев, разработанных мировым сообществом ученых и врачей [McKhann et al., 1984, 2011]. Люди контрольных групп, пациенты или их родственники давали письменное согласие на использование крови для проведения клинического и биохимического анализов. Отбор крови производили в БПНЦ РАН. Венозную кровь отбирали натощак в специальную пробирку, содержащую 130 мМ Na<sub>3</sub>-цитрат (рН 7,4). Пробы переносили при +4°C. обработка проводилась в Лаборатории метаболического Дальнейшая крови моделирования и биоинформатики. Процедуры и методы измерения были идентичны тем, которые использовались при работе с эритроцитами крысы.

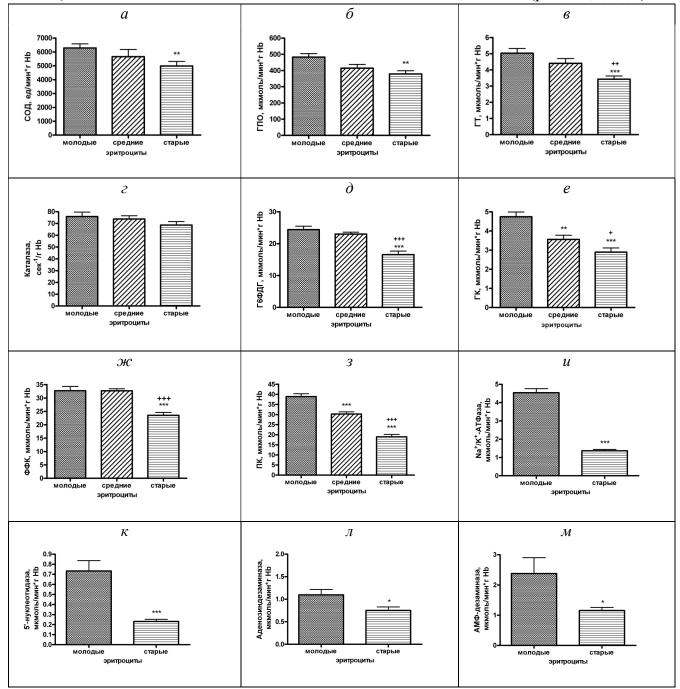
Статистическую обработку данных проводили с помощью программы GraphPad Prizm 5.0. Результаты выражали в виде: среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Нормальность распределения переменных подтвердили с помощью критерия Колмогорова—Смирнова. Различия между группами анализировали t-тестом Стьюдента для определения статистической значимости.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 1. Сравнительная характеристика эритроцитов разного возраста

Для определения устойчивости эритроцитов разного возраста к воздействию амилоидных пептидов первоначально была проведена сравнительная характеристика клеток по показателям энергетического обмена и антиоксидантной системы.

Было обнаружено, что по мере старения эритроцитов происходило достоверное снижение активности ГПО (на 24,5%), СОД (на 20,7%), ГТ (на 31,8%) и Г6ФДГ (на 32,2%), тогда как активность каталазы статистически не изменялась (рис. 1 а,б,в,г,д).



**Рисунок 1.** Активность СОД (*a*), ГПО (*б*), ГТ (*в*), каталазы (*г*), Г6ФДГ (д), ГК (*е*), ФФК ( $\mathcal{H}$ ), ПК ( $\mathcal{H}$ ), Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазы (*u*), 5'-нуклеотидазы ( $\mathcal{H}$ ), аденозиндезаминазы ( $\mathcal{H}$ ), АМФ-дезаминазы ( $\mathcal{H}$ ) в лизатах разных фракций эритроцитов крысы. СОД — супероксиддисмутаза, ГПО — глутатионпероксидаза, ГТ — глутатионтрансфераза, Г6ФДГ — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, ГК — гексокиназа, ФФК — фосфофруктокиназа, ПК — пируваткиназа, НЬ — гемоглобин. По оси ординат указана активность ферментов. За 1 единицу активности СОД принимали количество фермента, которое вызывало 50% торможение реакции восстановления п-нитротетразолиевого синего. Активность остальных ферментов, кроме каталазы, выражена в мкмоль/мин\*г Нb. Активность каталазы выражена в сек<sup>-1</sup>/г Hb. N=16.

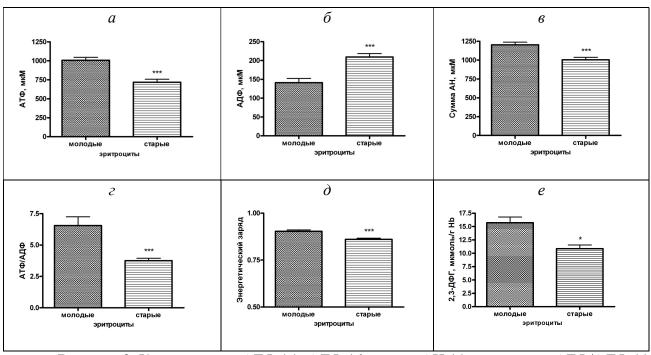
<sup>\*-</sup> p<0,05, \*\*- p<0,01, \*\*\*- p<0,001 по сравнению с молодыми эритроцитами.

<sup>+++-</sup> p<0,0001 по сравнению с эритроцитами среднего возраста.

Активность ключевых ферментов гликолиза также достоверно снижалась с возрастом эритроцитов: ГК на 39%, ФФК на 28%, ПК на 51% (рис. 1 е, ж, з), тогда как активность  $Na^+/K^+$ -АТФ-азы — фермента, регулирующего объем эритроцитов, уменьшалась почти на 70% (рис. 1 и). Кроме того, при старении эритроцитов наблюдалось значительное уменьшение активности ферментов обмена адениннуклеотидов 5'-НТ на 68%, АМФ-дезаминазы на 51% и аденозиндезаминазы на 31% (рис. 1 к, л, м).

В соответствии со снижением активности гликолитических ферментов, с возрастом эритроцитов происходило достоверное снижение концентрации АТФ (на 29%) и увеличение концентрации АДФ (на 48%), что приводило к почти двукратному падению отношения АТФ/АДФ, хотя энергетический заряд клетки снижался незначительно, но достоверно (рис. 2). Несмотря на значительное увеличение концентрации АДФ в старых эритроцитах, сумма адениннуклеотидов была снижена на 17 %.

Помимо этого, старение клеток сопровождалось значительным снижением концентрации метаболита, определяющего сродство гемоглобина к кислороду, 2,3- $Д\Phi\Gamma$  на 30%.



**Рисунок 2.** Концентрация АТФ (*a*), АДФ (*б*), сумма АН (*в*), отношение АТФ/АДФ (*г*) и энергетический заряд клетки (*д*), концентрация 2,3ДФГ (*е*) в экстрактах разных фракций эритроцитов крысы. АН – адениннуклеотиды, 2,3-ДФГ – 2,3-дифосфоглицерат, Нь – гемоглобин. Энергетический заряд (ЭЗ) рассчитывали по уравнению Аткинсона ЭЗ=(АТФ+0,5АДФ)/(АТФ+АДФ+АМФ) [Atkinson, 1968]. Концентрация 2,3-ДФГ выражена в мкмоль/г Нь. Концентрация всех остальных измеряемых показателей выражена в мкмоль/л (мкМ). N = 16.

\*-p<0.05, \*\*\*-p<0.0001 по сравнению с молодыми эритроцитами.

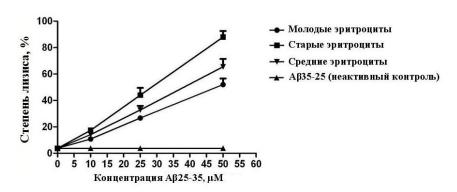
Полученные результаты находятся в соответствии с литературными данными, указывающими на то, что для старых эритроцитов характерно ослабление энергетического обмена и антиокислительной защиты. Эти данные были важны для

проведения последующих исследований, посвященных выявлению эритротоксического действия  $A\beta_{25-35}$ , поскольку указывали на то, что в эритроцитах разного возраста в момент их контакта с амилоидом эндогенные биохимические/энергетические «стартовые условия» были различны.

#### 2.Аβ-индуцируемый лизис в эритроцитах разного возраста

Ранее было показано, что  $A\beta_{25-35}$  вызывал быстрый лизис общей популяции эритроцитов человека *in vitro*, который значительно усиливался в присутствии ингибиторов гликолиза и антиокислительных ферментов [Косенко *и др.*, 2008; Соломадин, 2012]. Это указывало на то, что биоактивность и эритротоксичность  $A\beta_{25-35}$  зависит от процессов, происходящих в эритроцитах, в частности, от функционирования антиоксидантной и гликолитической систем.

Для того чтобы определить, могут ли старые эритроциты, обладающие сниженной концентрацией  $AT\Phi$ , активностью ферментов гликолиза и антиокислительной защиты, в равной степени с молодыми клетками противостоять лизирующему действию амилоида, мы инкубировали эритроциты разного возраста с разными концентрациями  $A\beta_{25-35}$ . На рис.3 показано, как изменяется степень лизиса эритроцитов в зависимости от их возраста и концентрации  $A\beta_{25-35}$ .



**Рисунок 3.** Зависимость степени лизиса разных возрастных популяций эритроцитов крысы от концентрации  $A\beta_{25-35}$ . Эритроциты в концентрации  $15\times10^7$  кл/мл инкубировались в течение 30 минут при 25°C в среде, содержащей 140 мМ NaCl, 10мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5мМ KCl, pH 7,4. Контролем служили клетки, инкубированные с нетоксичным  $A\beta_{35-25}$ . В связи с тем, что разные концентрации  $A\beta_{35-25}$  незначительно и в одинаковой степени влияли на степень лизиса эритроцитов разного возраста (менее 4%), на графике была приведена одна кривая для всех типов клеток. Степень лизиса эритроцитов определяли спектрофотометрически при 540 нм и выражали в процентах. За 100% было принято поглощение гемоглобина, высвободившегося из такого же количества клеток при их лизисе в воде. N=16

Можно видеть, что при инкубации эритроцитов с амилоидом с обратной последовательностью аминокислот  $A\beta_{35-25}$  (контроль) клетки были стабильны, причем лизис не развивался при более длительной (в течение 2-х часов, не показано) инкубации в присутствии всех используемых концентраций контрольного амилоида. При добавлении  $A\beta_{25-35}$  в среду инкубации почти сразу наблюдался лизис эритроцитов, и, хотя степень лизиса клеток зависела от концентрации амилоида, старые клетки оказались более чувствительными к его лизирующему действию, чем молодые и клетки среднего возраста. Так,  $A\beta_{25-35}$  в концентрации 10 мкМ и 25 мкМ вызывал лизис

 $10.85\pm0.72\%$  и  $26.98\pm1.47\%$  молодых клеток,  $14.11\pm1,48\%$  и  $32.81\pm3.11\%$  клеток среднего возраста и  $18.46\pm1.68\%$  и  $44,05\pm4.51\%$  старых клеток соответственно. Концентрация А $\beta_{25-35}$ , вызывающая 50% лизис клеток составляла 28, 33 и 48 мкмоль/л для старых, средних и молодых эритроцитов.

Полученные результаты согласуются с нашими ранними результатами, полученными на общей популяции эритроцитов человека, и свидетельствуют о том, что степень повреждения клеток в присутствии амилоидного пептида, приводящая к лизису, зависит от состояния энергетического обмена и антиокислительной защиты эритроцитов.

Известно, что амилоидные пептиды образуют каналы в клеточной мембране эритроцита [Маttson et~al., 1997]. Кроме того, амилоидные пептиды и порообразующие белки имеют структурную гомологию, что дает возможность предположить сходный механизм их действия [Yoshiike et~al., 2007]. Согласно литературным данным, токсичность каналообразующих белков изменяется в зависимости от температуры [Rowe, Welch, 1994]. Было обнаружено (рис.4), что инкубация с  $A\beta_{25-35}$  даже при температуре 4°C вызывает лизис эритроцитов, причем степень лизиса старых эритроцитов несколько выше, чем молодых эритроцитов (17% и 23% соответственно молодые и старые клетки). С повышением температуры происходит дальнейшее усиление гемолиза клеток, причем при температуре 37°C количество лизировавших старых эритроцитов почти в 2 раза выше, чем молодых. О том, что лизис вызывался действием  $A\beta_{25-35}$ , а не собственно температурой, говорит тот факт, что в присутствии контрольного амилоида с обратной последовательностью аминокислот  $A\beta_{35-25}$ , клетки обоих типов были стабильны и почти не лизировали при тех же экспериментальных условиях.

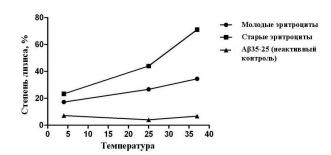


Рисунок 4. Зависимость степени лизиса молодых и старых эритроцитов крысы от температуры в присутствии 25 мкМ А $\beta_{25-35}$ . На рисунке представлены результаты типичного эксперимента. Остальные условия идентичны тем, которые приводятся в подписи к рисунку 3.

# 3. Влияние $A\beta_{25-35}$ на активность $Na^+/K^+$ - $AT\Phi$ -азы в эритроцитах разного возраста

Для того, чтобы обнаружить предлизисные изменения в эритроцитах, происходящие при их контакте с  $A\beta_{25-35}$  и, в частности, изменения в обмене адениннуклеотидов, глюкозы, и фермента  $Na^+/K^+$ -АТФ-азы, исследования проводились с использованием фиксированной концентрации пептида, равной 25 мкМ, поскольку при воздействии данной концентрации не происходило полного гемолиза клеток. Для предотвращения спонтанного разрушения АТФ в клетках независимо от действия амилоидных пептидов инкубацию проводили при 25°C.

Основным ферментом, обеспечивающим поддержание объема и формы клеток, является  $\mathrm{Na}^+/\mathrm{K}^+$ -AT $\Phi$ -аза. Как уже было сказано, амилоидный пептид при

взаимодействии с мембраной эритроцита образует поры/каналы, через которые в клетку могут поступать катионы  $Na^+$ , было предположено, что в ответ на усиленное поступление этого катиона в клетку должна увеличиваться активность  $Na^+/K^+$ -АТФ-азы. Действительно, под воздействием  $A\beta_{25-35}$  активность этого фермента увеличивалась и в молодых, и в старых клетках на 25% и 90% соответственно (рис.5).

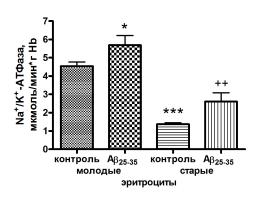


Рисунок 5. Активность  $Na^+/K^+$ -АТФазы в молодых и старых эритроцитах крысы под воздействием 25 мкМ  $A\beta_{25-35}$ . Эритроциты в концентрации  $15 \times 10^7$  кл/мл инкубировались в течение 30 минут при 25°C в среде, содержащей 0,9% NaCl, 10мМ Трис, 5мМ КСl, pH 7,4. Контролем служили клетки, инкубированные с  $A\beta_{35-25}$ . Нb — гемоглобин. Активность выражена в мкмоль/мин\*г Hb. N=16.

\* — p<0,05, \*\*\* — p<0,0001 по сравнению с контрольными молодыми эритроцитами;

++ – p<0,01 по сравнению с контрольными старыми эритроцитами.

При этом значительное повышение активности  $Na^+/K^+$ - $AT\Phi$ -азы в старых эритроцитах не достигало уровня, характерного для контрольных молодых клеток.

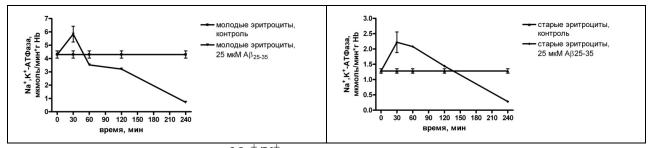
Хорошо известно, что для работы  $Na^+/K^+$ - $AT\Phi$ -азы необходима энергия  $AT\Phi$ , источником образования которой является глюкоза. Однако было обнаружено (рис. в диссертации), что увеличение концентрации глюкозы в инкубационной среде до 10 мM не приводило к дополнительному увеличению активности этого фермента в клетках, что свидетельствует о том, что глюкоза в данных экспериментальных условиях не лимитирует активность  $Na^+/K^+$ - $AT\Phi$ -азы.

По-видимому, одним из основных факторов, лимитирующих активность фермента в старых клетках в присутствии амилоида, может быть уменьшение количества копий фермента на поверхности мембраны при старении клеток [Wiley, Shaller, 1977; Hentschel *et al.*, 1986]. Это дополнительно подтверждается более низкой активностью этого фермента в нативных старых клетках.

Согласно литературным данным, активность  $Na^+/K^+$ -ATФ-азы также зависит от присутствия в мембране фосфатидилсерина [Roelofsen, van Deenen, 1973], который локализован на внутренней поверхности мембраны. Наличие положительного заряда и гидрофобных аминокислот в молекуле  $A\beta_{25-35}$  позволяет амилоиду взаимодействовать с отрицательно заряженным фосфатидилсерином и его гидрофобными участками [Chang et al., 2011], что может приводить к нарушению взаимодействия фосфатидилсерина с  $Na^+/K^+$ -ATФ-азой и в результате снижать ее активность. Однако исследования показали, что подобное взаимодействие, по-видимому, может возникать только при длительном контакте амилоида с мембраной эритроцитов. На рис. 6 показано, как изменяется активность  $Na^+/K^+$ -ATФ-азы при инкубации эритроцитов с  $A\beta_{25-35}$  в течение 4 часов.

Можно видеть, что тенденция к уменьшению активности фермента начинает проявляться через 60 мин, тогда как максимальное торможение происходит через 4 ч.

Это согласуется с данными о том, что нарушение структуры мембраны, связанное, в частности, с инверсией фосфатидилсерина на внешнюю сторону мембраны, наблюдается только после многочасовой инкубации амилоидов с эритроцитами [Nicolay *et al.*, 2007], что может приводить к усилению амилоид-индуцированного лизиса эритроцитов. Действительно, мы обнаружили, что почти двукратное усиление лизиса наблюдается только после 4-часовой инкубации  $A\beta_{25-35}$  с эритроцитами (42% и 74% для молодых и старых клеток соответственно).



**Рисунок 6.** Активность  $Na^+/K^+$ -АТФ-азы в молодых и старых эритроцитах крысы под воздействием 25 мкМ  $A\beta_{25-35}$ . Эритроциты в концентрации  $15 \times 10^7$  кл/мл инкубировались в течение 30-240 минут при  $25^{\circ}$ С в среде, содержащей 0,9% NaCl, 10 мМ Трис, 5мМ KCl, 5-10 мМ глюкозу, pH 7,4. Контролем служили клетки, инкубированные с  $A\beta_{35-25}$ . Активность выражена в мкмоль/мин\*г Hb. Hb – гемоглобин. N=16.

Полученные данные свидетельствуют о том, что активность  $Na^+/K^+$ -АТФ-азы в эритроцитах под действием  $A\beta_{25-35}$  изменяется бифазно. Уменьшение активности, которое наблюдается при длительной инкубации эритроцитов с амилоидами, может быть связано с нарушением взаимодействия  $Na^+/K^+$ -АТФазы с фосфатидилсерином [Roelofsen, van Deenen, 1973], что вызывает нарушение структуры мембраны и усиление лизиса клеток.

Таким образом, степень лизиса эритроцитов под действием  $A\beta_{25-35}$  зависит от времени его контакта с клетками и от активности  $Na^+/K^+$ - $AT\Phi$ -азы, поддерживающей ионный баланс по обе стороны мембраны и регулирующей объем клеток. Это согласуется с данными о том, что при торможении  $Na^+/K^+$ - $AT\Phi$ -азы оуабаином степень амилоид-зависимого лизиса эритроцитов значительно увеличивается [Соломадин  $u \ \partial p$ ., 2008].

#### 4. Изменение концентрации адениннуклеотидов под действием А $\beta_{25-35}$

Основным источником образования АТФ в эритроцитах является анаэробный гликолиз. Стационарная концентрация АТФ поддерживается балансом между процессами ее образования и процессами ее потребления. Как было показано выше, стационарная концентрация АТФ снижается при старении клеток. Следует отметить, что в настоящее время имеются единичные данные об амилоид-индуцированном изменении концентрации адениннуклеотидов в эритроцитах общей популяции [Engström et al., 1995; Соломадин, 2012], тогда как изменение их концентрации в эритроцитах разного возраста вообще в литературе не освещено. Поэтому мы изучили, как изменяется концентрация АТФ, АДФ и АМФ при инкубации эритроцитов разных возрастных популяций с  $\Lambda$ 

происходило снижение концентрации АТФ на 31% и 51% в молодых и старых клетках соответственно, что сопровождалось повышением концентрации АДФ и АМФ в молодых эритроцитах на 41% и 46% и в старых эритроцитах на 29% и 71% соответственно. Это приводило к незначительному, но достоверному снижению энергетического заряда клеток и резкому снижению отношения АТФ/АДФ. Однако, несмотря на значительное увеличение концентрации АДФ и АМФ, сумма адениннуклеотидов достоверно уменьшалась на 26% и 32% в молодых и старых клетках соответственно.

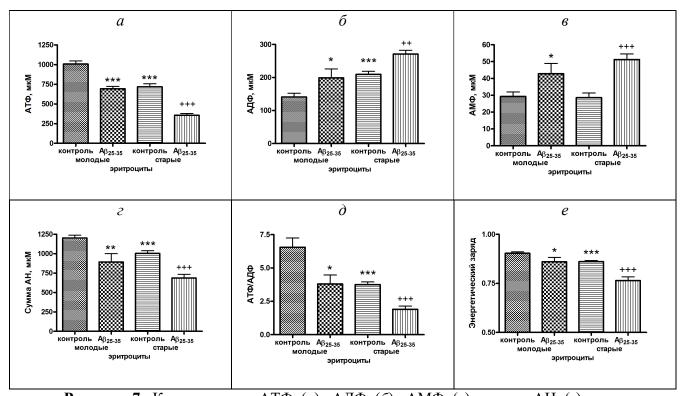


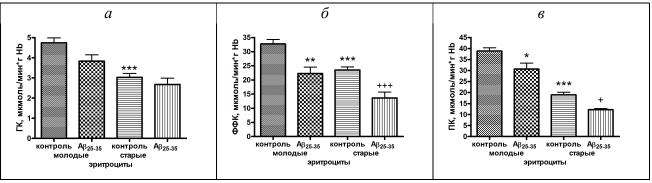
Рисунок 7. Концентрация  $AT\Phi$  (a),  $AД\Phi$  (б),  $AM\Phi$  (в), сумма AH (г), отношение  $AT\Phi/AД\Phi$  (д) и энергетический заряд (e) в экстрактах молодых и старых эритроцитов крысы под воздействием 25 мкМ  $A\beta_{25-35}$ . Эритроциты в концентрации  $15 \times 10^7$  кл/мл инкубировались в течение 30 минут при 25°С в среде, содержащей 0,9% NaCl, 10мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5мМ KCl, pH 7,4. Контролем служили клетки, инкубированные с нетоксичным А $\beta_{35-25}$ . АН – адениннуклеотиды. Энергетический заряд (33)рассчитывали ПО Аткинсона уравнению  $\Theta = (AT\Phi + 0.5A\Pi\Phi)/(AT\Phi + A\Pi\Phi + AM\Phi)$  [Atkinson, 1968]. Концентрация всех измеряемых показателей выражена в мкмоль/л (мкМ). N=16. \* - p < 0.05, \*\* - p < 0.01, \*\*\* - p < 0.0001 по сравнению с контрольными молодыми эритроцитами; ++ – p<0,01, +++ – p<0,0001 по сравнению с контрольными старыми эритроцитами.

В эритроцитах сумма адениннуклеотидов зависит от активности аденилаткиназы (АК), которая поддерживает концентрационный баланс между АТФ, АДФ и АМФ [Baranowska-Bosiacka *et al.*, 2004]. При энергодефиците активность этого фермента увеличивается, что дает возможность поддерживать концентрацию АТФ в клетках. Однако активация этой реакции приводит к образованию АМФ, который удаляется реакциями, катализируемыми АМФ-дезаминазой и 5'-нуклеотидазой (5'-НТ), что в свою очередь может приводить к снижению энергетического заряда и суммы

адениннуклеотидов [Mahnke, Sabina, 2005]. Однако мы обнаружили, что достоверного изменения активности ферментов АК, 5'-HT, АМФ-дезаминазы и аденозиндезаминазы в эритроцитах при их контакте с  $A\beta_{25-35}$  не происходит. Это свидетельствует о том, что в данных экспериментальных условиях аденилаткиназная реакция играет незначительную роль в восстановлении концентрации  $AT\Phi$ .

### 5. Влияние Аβ<sub>25-35</sub> на активность гликолитических ферментов в эритроцитах

Для обнаружения возможной роли отдельных стадий гликолиза в снижении концентрации АТФ, мы определили активность регуляторных ферментов гликолиза в эритроцитах. Данные показаны на рис. 8. Видно, что под воздействием А $\beta_{25-35}$  и в молодых, и в старых эритроцитах происходило снижение ФФК на 32% в молодых и на 42% в старых клетках, ПК на 21% и 35%, тогда как активность ГК уменьшалась незначительно.



**Рисунок 8**. Активность ГК (*a*), ФФК (*б*), ПК (*в*) в лизатах молодых и старых эритроцитов крысы под воздействием 25 мкМ А $\beta_{25-35}$ . Эритроциты в концентрации  $15 \times 10^7$  кл/мл инкубировались в течение 30 минут при  $25^{\circ}$ С в среде, содержащей 0,9% NaCl, 10мМ КН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5мМ КСl, pH 7,4. Контролем служили клетки, инкубированные с нетоксичным А $\beta_{35-25}$ . ГК – гексокиназа, ФФК – фосфофруктокиназа, ПК – пируваткиназа, Нb – гемоглобин. Активность выражена в мкмоль/мин\*г Hb. N=16.

\*-p<0.05, \*\*-p<0.01, \*\*\*-p<0.0001 по сравнению с контрольными молодыми эритроцитами; +-p<0.01, +++-p<0.0001 по сравнению с контрольными старыми эритроцитами.

Несмотря на то, что механизмы регуляции активности гликолитических ферментов хорошо описаны в литературе, в настоящее время не имеется данных о том, насколько сильно должна затормозиться активность ферментов, чтобы это привело к заметному снижению концентрации  $AT\Phi$  в эритроцитах. Однако наши предварительные исследования показали, что под действием  $A\beta_{25-35}$  происходит значительное снижение скорости образования лактата в эритроцитах, наиболее выраженное в старых клетках. Поэтому можно предполагать, что обнаруженная нами степень торможения регуляторных ферментов может вносить определенный вклад в снижение концентрации  $AT\Phi$ , которое мы наблюдали в экспериментальных условиях.

# 6. Концентрация 2,3-ДФГ в молодых и старых эритроцитах под воздействием А $\beta_{25-35}$

Одним из главных метаболитов в эритроцитах, определяющих сродство гемоглобина к кислороду, является 2,3-ДФГ, концентрация которого зависит от состояния гликолитической системы [Travis et al., 1978; van Wijk, van Solinge, 2005]. Поскольку мы обнаружили, что под воздействием А $\beta_{25-35}$  происходит снижение активности гликолитических ферментов, что могло бы повлиять на содержание 2,3-ДФГ, мы проверили, как изменяется концентрация этого метаболита под воздействием  $A\beta_{25-35}$  (рис. 9). Было обнаружено, что при контакте  $A\beta_{25-35}$  с клетками происходит достоверное уменьшение уровня 2,3-ДФГ вне зависимости от возраста клеток, причем суммарное уменьшение этого метаболита в старых клетках под воздействием А $\beta_{25-35}$  по отношению к интактным молодым эритроцитам достигало почти 50%. Низкая этого метаболита ослабляет способность эритроцитов отдавать концентрация кислород, что может приводить к тканевой гипоксии. Поэтому уменьшение концентрации этого метаболита под воздействием амилоидного пептида имеет особое значение именно применительно к БА, поскольку гипоксия является характерным признаком этого заболевания. Кроме 2,3-ДФГ, на сродство гемоглобина к кислороду могут влиять и другие факторы, например, pH, концентрация  $CO_2$ ,  $Cl^-$ ,  $HPO_4^{2-}$  [Perutz, 1979; Samaja et al., 2003], однако взаимосвязь между уровнем 2,3-ДФГ в эритроцитах и возникновением тканевой гипоксии установлена при многочисленных заболеваниях [Resnick et al., 1994; Nakamura et al., 1995; Papassotiriou et al., 1998], в частности, при некоторых энзимопатий, характеризующихся сниженной типах гликолитических ферментов в эритроцитах [Valentine et al., 1985; McCully et al., 1999].

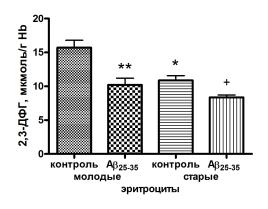


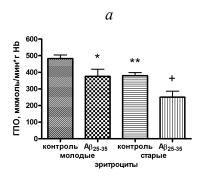
Рисунок 9. Концентрация 2,3-ДФГ в экстрактах молодых и старых эритроцитов крысы под воздействием 25 мкМ А $\beta_{25-35}$ . Эритроциты в концентрации 15 ×  $10^7$  кл/мл инкубировались в течение 30-240 минут при 25°С в среде, содержащей 0,9% NaCl, 10мМ КН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5мМ КСl, pH 7,4. Контролем служили клетки, инкубированные с нетоксичным А $\beta_{35-25}$ . 2,3-ДФГ — 2,3-дифосфоглицерат, Hb — гемоглобин. Концентрация выражена в мкмоль/г Hb. N=16.

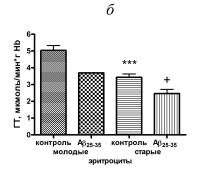
- \* p<0,05, \*\* p<0,01 по сравнению с контрольными молодыми эритроцитами;
- + p<0,05 по сравнению со старыми контрольными эритроцитами.

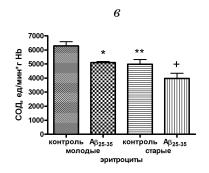
# 7. Активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах разного возраста под действием бета-амилоидных пептидов

В связи с тем, что имеется прямая взаимосвязь между активностью гликолитической системы и способностью противостоять постоянно образующимся в эритроцитах свободным кислородным радикалам, следующим этапом нашей работы было выяснение действия  $A\beta_{25-35}$  на систему антиоксидантной защиты клеток.

Было обнаружено (рис. 10), что  $A\beta_{25-35}$  ингибирует основные антиокислительные ферменты, причем торможение в основном усиливалось с возрастом клеток. Так, активность ГПО снижалась на 22% в молодых и на 34% в старых эритроцитах, активность ГТ изменялась в равной степени в клетках разных популяций, активность СОД уменьшалась на 19% и на 24% в молодых и старых клетках соответственно. Наиболее выраженному изменению активности подвергалась  $\Gamma 6\Phi \Pi \Gamma$ , фермент пентозофосфатного пути (снижение на 33% в молодых и 38% в старых эритроцитах), регулирующий концентрацию НАДФН, который участвует в реакциях, катализируемых глутатионредуктазой и ГПО.







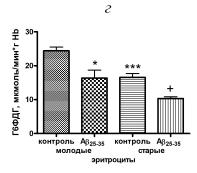


Рисунок 10. Активность ГПО (*a*), ГТ (*б*), СОД (*в*) и Г6ФДГ (*г*) в лизатах молодых и старых эритроцитов крысы под воздействием 25 мкМ А $\beta_{25-35}$ . Эритроциты в концентрации  $15 \times 10^7$  кл/мл инкубировались в течение 30 минут при  $25^{\circ}$ С в среде, содержащей 0,9% NaCl, 10мМ КН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5мМ КСl, pH 7,4. Контролем служили клетки, инкубированные с нетоксичным А $\beta_{35-25}$ . N=16.

ГПО — глутатионпероксидаза, ГТ — глутатионтрансфераза, СОД — супероксиддисмутаза, Г6ФДГ — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, Нb — гемоглобин. За 1 единицу активности СОД принимали количество фермента, которое вызывало 50% торможение реакции восстановления пнитротетразолиевого синего. Активность остальных ферментов выражена в мкмоль/мин $^*$ г Hb.

\*-p<0.05, \*\*-p<0.01, \*\*\*-p<0.0001 по сравнению с контрольными молодыми эритроцитами;

+- p<0,05 по сравнению с контрольными старыми эритроцитами.

Ранее нами было показано, что эритроциты пациентов с БА характеризуются сниженной антиокислительной активностью, что приводило к значительному накоплению перекиси водорода и гидроперекисей. В целом, эти данные показывают, что в клетках происходят однотипные изменения в системе антиокислительной защиты, которые указывают на возможное развитие окислительного стресса и под воздействием  $A\beta_{25-35}$  in vitro, и в эритроцитах пациентов in vivo.

В совокупности, полученные нами данные свидетельствуют о том, что инкубация эритроцитов с амилоидными пептидами вызывает изменения, характерные для старения клеток (рис 5-10): снижение активности ключевых ферментов гликолиза,

антиоксидантной системы и концентрации метаболитов энергетического обмена. Эти результаты соответствуют литературным данным о том, что для пациентов с БА характерно ускоренное старение эритроцитов в кровяном русле [Bosman *et al.*, 1991].

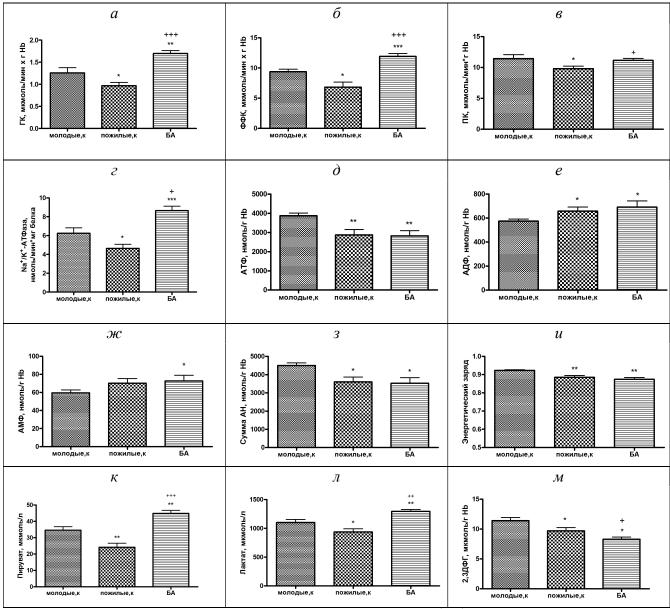
### 8. Изменение некоторых показателей энергетического обмена в эритроцитах пациентов с БА

Следующим этапом нашей работы стало выявление изменения показателей энергетического обмена в эритроцитах пациентов с БА. Данные представлены на рис.11.

Видно, что активность регуляторных ферментов гликолиза ГК, ФФК и ПК (рис.11а-в) достоверно снижается при старении человека, но резко возрастает в эритроцитах пациентов того же возраста. Причем активность ГК и ФФК превышает значения, характерные для эритроцитов молодых людей контрольной группы, что в совокупности свидетельствует об ускорении гликолиза. Аналогичным образом изменяется активность Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATФ-азы (рис. 11 г). Видно, что по отношению к активности, обнаруженной в эритроцитах людей пожилого возраста, у пациентов с БА ее активность увеличивается в 2 раза. Характерным признаком БА является наличие в кровотоке пациентов эритроцитов с измененной формой [Моhanty *et al.*, 2008, 2010], и усиление входа Na<sup>+</sup> в эритроциты [Diamond *et al.*, 1983]. По-видимому, активацию Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATФ-азы и усиление гликолиза, происходящие в эритроцитах пациентов, следует рассматривать как адаптивную реакцию, направленную на поддержание ионного гомеостаза и предотвращения усиленного входа Na<sup>+</sup> и воды в клетки [Сumberbatch *et al.*, 1981].

Однако при активации  $Na^+/K^+$ -АТФ-азы происходит значительное потребление АТФ, и усиление гликолиза, обнаруженное в эритроцитах пациентов, давало возможность предположить, что превышение расхода АТФ при активации  $Na^+/K^+$ -АТФ-азы над его синтезом в эритроцитах пациентов происходить не должно. Для проверки этого предположения мы измерили концентрацию АТФ и продуктов его гидролиза АДФ, АМФ, а также конечных метаболитов гликолиза, лактата и пирувата, в эритроцитах лиц всех обследуемых групп (рис. 11 д-л).

Видно, что эритроциты пожилых людей контрольной группы при сравнении с молодым контролем характеризуются достоверно сниженным содержанием АТФ (около 30%, р <0,05) и увеличенным содержанием АДФ и АМФ, и что эти показатели дополнительно не изменяются при БА. Аналогичным способом изменяются суммарное содержание аденинуклеотидов и энергетический заряд, что свидетельствует о том, что при естественном старении организма в эритроцитах замедляется синтез АТФ (что подтверждается также сниженной активностью измеренных ферментов гликолиза и сниженной концентрацией пирувата и лактата) и что катаболизм АТФ преобладает над процессом его синтеза. Такое же «подавленное» энергетическое состояние в эритроцитах сохраняется и при БА, несмотря на значительное усиление гликолиза.



**Рисунок 11.** Активность ГК (*a*), ФФК (*б*), ПК (*в*), Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATФ-азы (*г*), концентрация АТФ (*д*), АДФ (*е*), АМФ ( $\mathcal{M}$ ), сумма АН (*з*), энергетический заряд (*u*), концентрация пирувата ( $\kappa$ ), лактата ( $\pi$ ), 2,3ДФГ ( $\pi$ ) в эритроцитах пациентов и людей контрольных групп. Молодые, к – контрольная группа людей молодого возраста (33,3±3,3 года), пожилые, к – контрольная группа людей пожилого возраста (76,8±3,0 лет), БА – пациенты с болезнью Альцгеймера (75±2,6 лет). АН – адениннуклеотиды, ГК – гексокиназа, ФФК – фосфофруктокиназа, ПК – пируваткиназа, 2,3ДФГ – 2,3-дифосфоглицерат. Нь – гемоглобин. Концентрация АТФ, АДФ и сумма АН выражены в нмоль/г Нь, концентрация лактата и пирувата – в мкмоль/л, 2,3ДФГ – в мкмоль/г Нь. Активность Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-AТФ-азы выражена в нмоль/мин\*мг белка, активность остальных ферментов – в мкмоль/мин\*г Нь.

- \*-p<0,05, \*\*-p<0,01, \*\*\*-p<0,001 по сравнению с молодым контролем;
- +- p<0,05, ++ p<0,01, +++ p<0,0001 по сравнению с пожилым контролем.

Полученные данные указывают на то, что хроническое подавление энергетического обмена в эритроцитах, характерное для людей пожилого возраста создает определенный фактор риска именно для нарушения функциональной способности клеток, а адаптационная активация  $Na^+/K^+$ -AT $\Phi$ -азы в эритроцитах

пациентов с БА, требующая усиленного образования АТФ, значительно снижает «порог» для проявления указанного фактора риска.

Также было обнаружено, что с возрастом человека в эритроцитах происходит снижение концентрации 2,3-ДФГ, одного из главных регуляторов сродства гемоглобина к кислороду [Brewer, 1974], а при БА наблюдается дополнительное его снижение (рис.11м) более чем на 30 % по сравнению со значением, полученным на эритроцитах молодых людей.

В совокупности, результаты, полученные на эритроцитах пациентов с БА, указывают на то, что хроническое усиление активного транспорта катионов в эритроциты [Ronquist, Waldenström, 2003] приводящее к адаптивному ускорению Na/K-ATФ-азы и последующему усиленному гидролизу АТФ и 2,3-ДФГ может увеличивать сродство гемоглобина к кислороду, нарушать адекватное снабжение тканей кислородом и быть одним из важных факторов развития гипоксии мозга [Aliev *et al.*, 2004], приводящей к гипометаболизму глюкозы и развитию деменции.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хотя БА известна уже более 100 лет, до сих пор не существует системы ранней диагностики и эффективной терапии, позволяющих предотвратить или хотя бы ослабить симптомы этого заболевания. БА рассматривается исключительно как нейродегенеративное заболевание, хотя показано, что аналогичные патологические изменения происходят и в периферических тканях и клетках, в частности, в кровеносных сосудах и эритроцитах [Blass et al., 1985; Gibson, Huang, 2002], что указывает на системность этого заболевания [Cattabeni et al., 2004]. Механизмы повреждения периферических тканей и клеток неизвестны. Однако показано, что при БА амилоиды накапливаются не только в мозге, но в сосудах мозга, что приводит к их повреждению (амилоидная ангиопатия), сужению и нарушению гемодинамики. Амилоиды, локализованные в сосудах, способны контактировать с форменными элементами крови, и особенно с эритроцитами [Ravi et al., 2004], и вызывать их лизис, что подтверждается накоплением свободного гемоглобина и железа в мозге пациентов с БА [Wu et al., 2004; Perry et al., 2008]. Последствия лизиса эритроцитов для мозга хорошо изучены на животных [Xi et al., 1998]. Показано, что появление в мозге свободного гемоглобина приводит к быстрому разрушению гемато-энцефалического барьера, фрагментации ДНК, усилению перекисного окисления липидов и глобальному окислительному стрессу, развитию воспалительного процесса, сужению сосудов, гипоперфузии, атрофии мозга [Alexander, LoVerme, 1980], нарушению памяти и смерти [Hackett, Anderson, 2000]. Учитывая вышесказанное, нами было предположено, что именно постоянный контакт эритроцитов с амилоидами может вызывать не только изменение повреждение мембранных структур, нарушать метаболический/энергетический обмен в эритроцитах, лежащий в основе целостности и функциональной способности клеток. Такое предположение не противоречит известному патологическому следствию амилоидной ангиопатии, связанному с повреждением эндотелия [Michaud et al., 2013], миоцитов [Vonsattel et al., 1991], мембран сосудов [Wisniewski et al., 2000], нарушением гемато-энцефалического барьера [Wisniewski et al., 1997], окклюзией капилляров, нарушающей кровообращение

мозга [Thal et al., 2008], и кровоизлиянием в мозг. Напротив, оно указывает на существование дополнительных, учтенных механизмов, ограничивающих снабжение мозга кислородом и глюкозой, а, следовательно, участвующих в развитии гипоксии и нейродегенеративных процессов, характерных для БА [Thal et al., 2009]. В работе показано, что при контакте с эритроцитами АВ вызывает существенное нарушение энергетического обмена и антиокислительного статуса в клетках. Как уже говорилось, популяция эритроцитов гетерогенна и факт о том, что наименьшая устойчивость к гемолитическим агентам старых клеток in vivo связана со сниженной скоростью метаболических, энергетических путей, хорошо известен [Bonsignore *et al.*, 1964; Shinozuka *et al.*, 1994]. Подобная взаимосвязь между возрастом эритроцитов, их сниженной метаболической активностью и отсутствием резистентности к эндогенным патологическим факторам имеет особое значение для пациентов с БА, для которых характерно ускоренное старение эритроцитов и их лизис прямо в кровяном русле [Perry et al., 2008].

Результаты проведенных исследований показали, что амилоидный пептид является мощным гемолитическим агентом для эритроцитов всех популяций, но в большей степени для старых клеток, поскольку было обнаружено, что при всех испытанных условиях старые эритроциты более восприимчивы к токсическому действию  $A\beta_{25-35}$  и лизируют в большей степени, чем молодые. Основным ферментом, регулирующим объем эритроцитов, является  $Na^+/K^+$ -AT $\Phi$ -аза. Мы установили, что активность этого фермента под воздействием  $A\beta_{25-35}$  изменяется бифазно. В первые минуты инкубации происходит увеличение активности в эритроцитах обеих популяций. Однако почти двукратное увеличение активности Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATФ-азы в старых клетках не достигало уровня, характерного для интактных молодых клеток. Помимо этого, А $\beta_{25-35}$  вызывал снижение концентрации АТФ, в большей степени выраженное в старых клетках. Это, по-видимому, обусловлено усиленным ее расходом в реакции, катализируемой  $Na^+/K^+$ -AT $\Phi$ -азой, который не компенсировался вследствие торможения регуляторных ферментов гликолиза. При более длительном контакте  $A\beta_{25-35}$  с эритроцитами активность  $Na^+/K^+$ - $AT\Phi$ -азы падала в эритроцитах обоих типов и достигала минимума к четвертому часу инкубации, что сопровождалось значительным увеличением степени лизиса клеток.

Мы обнаружили, что по мере старения эритроцитов происходит достоверное снижение концентрации 2,3-ДФГ, одного из главных регуляторов сродства гемоглобина к кислороду, что соответствует сниженному содержанию  $AT\Phi$  и сниженной активности гликолитических ферментов, которая дополнительно уменьшается под воздействием  $A\beta_{25-35}$ . Кроме этого, действие  $A\beta_{25-35}$  сопровождалось значительным ингибированием антиокислительных ферментов, причем торможение в основном усиливалось с возрастом клеток.

При сравнении результатов, полученных на эритроцитах крысы *in vitro* и на эритроцитах пациентов с БА, была выявлена однотипность изменений в системе антиокислительной защиты и некоторых показателей энергетического обмена, что указывает на возможное развитие окислительного стресса и под воздействием А $\beta_{25-35}$  *in vitro*, и в эритроцитах пациентов *in vivo*. Это позволяет предположить, что подобные изменения в эритроцитах пациентов могут происходить из-за взаимодействия клеток с

амилоидными пептидами, локализованными в сосудах мозга. Быстрое «старение» клеток, которое мы наблюдали под воздействием  $A\beta_{25-35}$ , характеризующееся подавлением гликолиза и активности ферментов-антиоксидантов, может лежать в основе ускоренного старения эритроцитов у пациентов с BA, а снижение концентрации  $AT\Phi$  и 2,3- $A\Phi\Gamma$  может вызывать существенное нарушение функциональной способности эритроцитов, приводящее к неадекватному снабжению тканей кислородом, что характерно для мозга пациентов с BA и приводит к торможению аэробного обмена глюкозы [Aliev *et al.*, 2004].

В целом, полученные данные подтверждают известную точку зрения о том, что БА является системным заболеванием и свидетельствуют о том, что показатели энергетического и антиоксидантного статуса эритроцитов могут служить прижизненными маркерами риска возникновения тканевой гипоксии и поэтому должны обязательно изучаться не только в научно-исследовательских лабораториях, но и в клинических условиях, и могут создать основу для разработки новой стратегии диагностики и терапии.

#### **ВЫВОДЫ**

- 1. Степень лизиса эритроцитов обеих популяций зависит от концентрации амилоидного пептида 25-35, температуры инкубационной среды и времени инкубации. При всех условиях инкубации старые эритроциты более восприимчивы к токсическому действию  $A\beta_{25-35}$  и лизируют в большей степени, чем молодые.
- 2. При контакте  $A\beta_{25-35}$  с эритроцитами *in vitro* активность  $Na^+/K^+$ -АТФ-азы изменяется бифазно. При кратковременном контакте наблюдается увеличение активности  $Na^+/K^+$ -АТФ-азы в обеих популяциях клеток, но старые клетки характеризуются более выраженным увеличением активности фермента. При более длительной инкубации (до 4 часов) активность фермента резко снижается почти в равной степени в клетках обоих типов.
- 3. Под воздействием  $A\beta_{25-35}$  происходит нарушение энергетического обмена в молодых и старых эритроцитах, что выражается в снижении активности гликолитических ферментов, уменьшении концентрации  $AT\Phi$ , суммы адениннуклеотидов, аденилатного энергетического заряда.
- 4. Воздействие  $A\beta_{25-35}$  вызывает снижение концентрации 2,3-ДФГ, в большей степени выраженное в старых эритроцитах.
- 5. Инкубация  $A\beta_{25-35}$  с эритроцитами приводит к снижению активности антиоксидантных ферментов.
- 6. Молодые эритроциты под воздействием  $A\beta_{25-35}$  быстро стареют, что определяется по степени нарушений показателей энергетического обмена и антиокислительной системы.
- 7. В эритроцитах пациентов с БА наблюдается усиленный гликолиз, что выявляется по повышению активности регуляторных ферментов и концентрации лактата и пирувата, увеличение активности  $Na^+/K^+$ -AT $\Phi$ -азы и снижение концентрации 2,3-Д $\Phi\Gamma$ .

#### ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

# Статьи, опубликованные по теме диссертации в журналах из списка рекомендованных ВАК РФ

- 1. Kosenko E.A., Aliev G., **Tikhonova L.A.**, Li Y., Poghosyan A.C., Kaminsky Yu.G. Antioxidant Status and Energy State of Erythrocytes in Alzheimer Dementia: probing for markers. // CNS&Neurologocal Disorders Drug Targets. 2012. V.11. P.926-932.
- 2. Косенко Е.А., **Тихонова Л.А.**, Погосян А.С., Каминский Ю.Г. Антиоксиданты в эритроцитах при старении и деменции. // Биомедицинская химия. -2013. Т. 59, № 4. С. 443-451.
- 2a. Kosenko E.A., **Tikhonova L.A.**, Poghosyan A.S., Kaminsky Y.G. Erythrocyte antioxidants in aging and dementia. // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2012. V. 6, № 3. P. 273-277.
- 3. **Тихонова Л.А.**, Каминский Ю.Г., Косенко Е.А. Действие β-амилоидного пептида Аβ25-35 на гликолитические и антиокислительные ферменты в эритроцитах разного возраста. // Известия РАН, сер. Биол. − 2014. − № 4. − С. 341-347.
- 3a. **Tikhonova L.A.**, Kaminskii Y.G., Kosenko E.A. Effects of amyloid-beta peptide A beta(25-35) on glycolytic and antioxidant enzymes in erythrocytes of different ages. // Biology bulletin. − 2014. − V. 41, № 4. − P. 312-317.
- 4. Kosenko E.A., Solomadin I.N., **Tikhonova L.A.**, Reddy V.P., Aliev G., Kaminsky Yu.G. Pathogenesis of Alzheimer Disease: Role of Oxidative Stress, Amyloid-β Peptides, Systemic Ammonia and Erythrocyte Energy Metabolism. // CNS&Neurologocal Disorders Drug Targets. 2014. V.13. P. 112-119.
- 5. **Tikhonova L.A.**, Kaminsky Y.G., Reddy V.P., Li Y., Solomadin I.N., Kosenko E.A., Aliev G. Impact of Amyloid β25-35 on Membrane Stability, Energy Metabolism, and Antioxidant Enzymes in Erythrocytes. // Am J Alzheimers Dis Other Demen. 2014. V. 29, № 8. P. 685-95.
- 6. Kaminsky Y.G., **Tikhonova L.A.**, Kosenko E.A. Critical analysis of Alzheimer's amyloid-beta toxicity to mitochondria. // Front Biosci (Landmark Ed). 2015. V. 20. P. 173-97.

#### Материалы научных конференций

- 7. Косенко Е.А., Погосян А.С., **Тихонова Л.А.,** Каминский Ю.Г. Дефицит кислорода в патогенезе болезни Альцгеймера и деменции других типов. // 7-й Рос. Науч.-образоват. форум «Мир людей с инвалидностью». М., 18-19.11.2010г. С.28.
- 8. Рахматуллина Д.С., **Тихонова Л.А.,** Каминский Ю.Г., Косенко Е.А. В эритроцитах при болезни Альцгеймера исчезает, возможно, мембранный белок. // 7-й Рос. Науч.-образоват. форум «Мир людей с инвалидностью». М., 18-19.11.2010г. С. 45.
- 9. **Тихонова Л.А.,** Рахматуллина Д.С., Косенко Е.А., Каминский Ю.Г. Изменения в ферментах эритроцитов пациентов при болезни Альцгеймера. // 7-й Рос. Науч.-образоват. форум «Мир людей с инвалидностью». М., 18-19.11.2010г. С. 53.
- 10. Тихонова Л.А., Белоушко Е.Е., Каминский Ю.Г., Косенко Е.А. Активность гексокиназы, фосфофруктокиназы, лактатдегидрогеназы и Na,K-ATФазы в

- эритроцитах при болезни Альцгеймера. // 15-я Междунар. Пущинская школа-конф. молодых ученых «Биология наука XXI века». Пущино. 18-22.04.2011г. С. 89.
- 11. **Тихонова Л.А.,** Белоушко Е.Е., Косенко Е.А. Антиоксидантный статус в эритроцитах пациентов при болезни Альцгеймера. // Конф. «Экспериментальная и теоретическая биофизика'11». Пущино, 20-21.10.2011. Пущино, Фотон-век. 2011. С. 21-22.
- 12. **Тихонова Л.А.,** Белоушко Е.Е., Косенко Е.А., Каминский Ю.Г. Активность ферментов шунта Рапопорта-Люберинга и концентрация 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах пациентов с болезнью Альцгеймера. // Сборник тезисов 16 Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология наука XXI века». 2012. С.200.
- 13. **Тихонова Л.А.,** Косенко Е.А., Каминский Ю.Г. Изменения в гликолитических и антиокислительных ферментах в эритроцитах разного возраста под действием бета-амилоидного пептида. // Сборник тезисов 17 Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология наука XXI века». 2013. С.287.
- 14. **Тихонова Л.А.**, Каминский Ю.Г., Косенко Е.А. Энергетический обмен и антиоксиданты в эритроцитах разного возраста. Влияние альцгеймеровских амилоидных пептидов. // Сборник тезисов VI Всероссийского с международным участием Конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013». 2013. С.377.
- 15. **Тихонова Л.А.**, Каминский Ю.Г., Косенко Е.А. Действие амилоидного пептида на эритроциты разного возраста. // Сборник тезисов 18 Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология наука XXI века». 2014. С.367.
- 16. **Тихонова Л.А**. Влияние бета-амилоидного пептида на энергетический обмен в молодых и старых эритроцитах старых крыс. // Экспериментальная и теоретическая биофизика'14. Сборник тезисов. Пущино: типография Fix-Print. 2014. C.122-123.
- 17. **Тихонова Л.А.**, Косенко Е.А., Каминский Ю.Г. Влияние бета-амилоидных пептидов на показатели энергетического обмена и концентрацию 2,3-дифосфоглицерата в разной популяции эритроцитов крыс. // Экспериментальная и теоретическая биофизика. Сборник тезисов. Пущино. 2016. С.5.