

Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт теоретической и экспериментальной биофизики
Российской академии наук

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
Пушкинский государственный естественно-научный институт

На правах рукописи

Тихонова Людмила Анатольевна

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

Специальность 03.01.04 – биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Косенко Елена Александровна

Пушино – 2017

Оглавление

Список используемых в работе сокращений	4
Введение	6
Глава 1. Обзор литературы	11
1.1. Амилоидные пептиды: образование, строение, свойства и функции. Роль APP.....	11
1.2. Гипотезы возникновения БА.....	15
1.3. Эритроциты – переносчики кислорода в организме.....	18
1.3.1. Na ⁺ /K ⁺ -АТФ-аза и поддержание ионного гомеостаза эритроцитов.....	19
1.3.2. АТФ как NO-зависимый вазодилататор.....	20
1.3.3. Регуляторные ферменты гликолиза.....	21
1.3.4. 2,3-дифосфоглицерат и его образование в шунте Рапопорта-Люберинга.....	23
1.3.5. Антиоксидантная система эритроцитов.....	26
1.3.6. Старение эритроцитов.....	29
1.3.7. Эритроциты и болезнь Альцгеймера.....	32
Глава 2. Материалы и методы.....	35
2.1. Реактивы.....	35
2.2. Животные.....	35
2.3. Выделение и очистка эритроцитов крысы.....	35
2.4. Разделение эритроцитов крысы по фракциям в градиенте перколла.....	36
2.5. Подсчет количества клеток.....	37
2.6. Определение концентрации гемоглобина.....	37
2.7. Агрегирование коммерческого препарата β-амилоидного пептида, фрагмент 25-35.....	37
2.8. Инкубация эритроцитов крысы с β-амилоидным пептидом.....	37
2.9. Пациенты, отбор крови, получение эритроцитов.....	38

2.10. Получение лизатов эритроцитов для определения активности ферментов.....	39
2.11. Получение экстрактов эритроцитов.....	40
2.12. Получение мембран эритроцитов.....	40
2.13. Определение активности ферментов.....	40
2.14. Определение концентрации метаболитов.....	47
2.15. Статистическая обработка данных.....	49
Глава 3. Результаты и обсуждение.....	50
3.1. Сравнительная характеристика эритроцитов разного возраста.....	50
3.2. А β -индуцируемый лизис в эритроцитах разного возраста.....	56
3.3. Влияние А β ₂₅₋₃₅ на активность Na ⁺ /K ⁺ -АТФ-азы в эритроцитах разного возраста.....	59
3.4. Изменение концентрации адениннуклеотидов под действием А β ₂₅₋₃₅	64
3.5. Влияние А β ₂₅₋₃₅ на активность гликолитических ферментов в эритроцитах.....	69
3.6. Концентрация 2,3-ДФГ в молодых и старых эритроцитах под воздействием А β ₂₅₋₃₅	70
3.7. Активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах разного возраста под действием А β ₂₅₋₃₅	72
3.8. Изменение некоторых показателей энергетического обмена в эритроцитах пациентов с БА.....	76
Заключение.....	82
Выводы.....	86
Список литературы.....	87

Список используемых в работе сокращений

2,3-ДФГ – 2,3-дифосфоглицерат

5'-НТ – 5'-нуклеотидаза

APP – amyloid precursor protein (белок-предшественник амилоида)

CDNB – 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (2,4-динитрохлорбензол)

Hb – гемоглобин

A β – бета-амилоидный пептид

A β ₂₅₋₃₅ – бета-амилоидный пептид, фрагмент 25-35

АПАД – 3-ацетилпиридинадениндинуклеотид

АДФ – аденозин-5'-дифосфорная кислота

АК – аденилаткиназа

АКМ – активные кислородсодержащие метаболиты

АМФ – аденозин-5'-монофосфорная кислота

АТФ – аденозин-5'-трифосфорная кислота

БА – болезнь Альцгеймера

Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

ГАФДГ – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

ГК – гексокиназа

ГПО – глутатионпероксидаза

ГТ – глутатионтрансфераза

ИМФ – инозин-5'-монофосфат

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

НАД⁺ – никотинамидадениндинуклеотид

НАДН – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный

НАДФ⁺ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный

ПК – пируваткиназа

СОД – супероксиддисмутаза

ТЭА – триэтаноламин

ФЕП – фосфоенолпируват

ФМСФ – фенилметилсульфонилфторид

ЦАА – церебральная амилоидная ангиопатия

ЭГТА – этиленгликоль-бис (2-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N' -тетрауксусная кислота

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

Введение

Бета-амилоидные пептиды (A β) обнаруживаются в нормальных условиях во многих тканях и жидкостях организма [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 A β 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 [Fişa *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.*, 1991a], 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 позволит выявить роль эритроцитов в развитии патологических процессов, происходящих в мозге при БА. Предполагается, что одним из факторов, вызывающих повреждение эритроцитов в кровотоке, могут быть A β , которые накапливаются в мелких сосудах мозга при БА (амилоидная ангиопатия) [Perry *et al.*, 2008]. Известно, что *in vitro* A β вызывают быстрый лизис эритроцитов [Mattson, 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 *и др.*, 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 А β 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.*, 1991b]. Мы предполагаем, что А β , 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 [Seaman *et al.*, 1980; Glass, Gershon, 1984], данная работа посвящена изучению действия А β на показатели антиокислительного и энергетического обмена в эритроцитах разного возраста.

Кроме того, известно, что одним из биохимических признаков, характеризующих БА, является нарушение аэробного обмена глюкозы в мозге и накопление лактата [Нахбу *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 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ), одного из главных биологических индикаторов гипоксии, которая является одним из характерных признаков БА [Нахбу *et al.*, 1986; Liang *et al.*, 2008].

Целью данной работы являлось выявление действия А β_{25-35} на показатели энергетического обмена и антиоксидантного статуса в эритроцитах разных возрастных популяций *in vitro*.

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^+ -АТФ-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 измерения 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: 15-й Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушино, 18 – 22 апреля, 2011; Конференции «Экспериментальная и теоретическая биофизика'11», Пушино, 20-21 октября 2011; 16-й Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушино, 16 - 21 апреля, 2012; 17-й Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушино, 21 – 26 апреля, 2013; VI Всероссийском с международным участием Конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013», Иркутск, 19-23 августа, 2013; 18-й Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушино, 21 – 25 апреля, 2014; Международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика'14», Пушино, 27-29 октября, 2014; XVI Всероссийской конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика», Пушино, 1-3 ноября, 2016.

Публикации

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

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Амилоидные пептиды: образование, строение, свойства и функции.

Роль APP

β -Амилоидные пептиды (A β) - это низкомолекулярные белковые фрагменты с бета-складчатой структурой. A β являются обычными клеточными компонентами, которые содержатся в организме человека повсеместно: в ткани мозга, спинномозговой жидкости, плазме крови, а также в других органах, тканях, клетках здоровых людей [Haass *et al.*, 1992; Shoji *et al.*, 1992; Seubert *et al.*, 1993]. В настоящее время механизмы физиологического действия A β до конца не выявлены, однако показано, что A β могут участвовать в регуляции метаболизма холестерина, синтеза фосфолипидов, транскрипции генов, ответственных за синтез эндотелиального фактора роста и фактора, индуцируемого гипоксией, гомеостаза кальция в клетке, в модуляции синаптической пластичности и передачи нервного импульса [Pearson, Peers, 2006; Кудинов и др., 2012]. Согласно современным данным, нейрональная активность, наблюдаемая в дневной период, всегда сопряжена с увеличением образования A β [Mormino *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2013], тогда как во время сна, напротив, активируются реакции, ответственные за распад амилоидов и уменьшение их концентрации [Ooms *et al.*, 2014].

A β могут находиться в организме в двух различных состояниях: α -спирали и β -складчатой структуры [Glenner, 1980] и переходить из одного состояния в другое при действии неизвестных факторов, образовывать скопления и ассоциаты [Lambert *et al.*, 1998]: различные типы олигомеров [Walsh *et al.*, 2002; Bitan *et al.*, 2003; Kirkitadze *et al.*, 2001], мицеллы [Lomakin *et al.*, 1996; Soreghan *et al.*, 1994], протофибриллы и фибриллы [Walsh *et al.*, 1997; Harper *et al.*, 1997; Serpell, 2000].

В плазме крови и спинномозговой жидкости человека встречаются A β_{2-14} , A β_{1-17} , A β_{1-18} , A β_{1-33} , A β_{1-34} , A β_{1-37} , A β_{1-38} , A β_{1-39} [Maddalena *et al.*, 2004]. Но преобладающими у всех видов животных являются две формы A β -пептида с разными COOH-концами: A β_{1-40} , A β_{1-42} . Равновесие между ними в

спинномозговой жидкости и в крови регулируется динамически в основном двумя трансмембранными рецепторами, находящимися в эндотелии сосудов мозга, которые переносят пептиды через гемато-энцефалический барьер [Rózga *et al.*, 2007]. Считается, что LRP-рецептор (белок, связанный с рецептором липопротеинов низкой плотности, low-density lipoprotein receptor related protein 1) переносит А β -пептиды из спинномозговой жидкости в кровотоки, а RAGE-рецептор (рецептор конечных продуктов гликозилирования, the receptor for advanced end glycation products) отвечает за перемещение периферического А β в мозг [Deane *et al.*, 2004]. Кроме того, в транспорте амилоидных пептидов принимают участие аполипопротеины Е [DeMattos *et al.*, 2004].

Считается, что А β являются продуктами протеолитического расщепления белка-предшественника амилоида (APP). APP – трансмембранный белок, который экспрессируется во многих клетках, например, нейронах, микроглии, сосудах мозга, периферических тканях, таких как сердце, печень, поджелудочная железа, кожа, кишечник, тромбоциты, лейкоциты [Joachim *et al.*, 1989; Golde *et al.*, 1990; Shoji *et al.*, 1990; Nordstedt *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1998; Kuo *et al.*, 2000]. Роль APP в клетке многообразна. В частности, он регулирует образование и рост нейронов, их дифференциацию и миграцию, участвует в регуляции синаптической активности [Nicolas, Hassan, 2014], защищает нейроны от повреждений [Priller *et al.*, 2006; Turner *et al.*, 2003]. Изоформа APP периферических тканей содержит вставку ингибитора сериновой протеазы и может регулировать факторы свертывания крови [Evin, Weidemann, 2002].

Ген человеческого APP кодирует 3 основные изоформы белка – APP695, APP751 и APP770. APP695, состоящий из 695 аминокислотных остатков, преобладает в нейронах, APP751 и 770, состоящие из 751 и 770 остатков аминокислот соответственно, – экспрессируются в не-нейрональных тканях, в частности, APP751 – в лимфоцитах, а APP770 – в эндотелиальных клетках сосудов [Каминский, Косенко, 2009; Kitazume *et al.*, 2010].

Схематическая структура APP770 показана на рисунке 1.

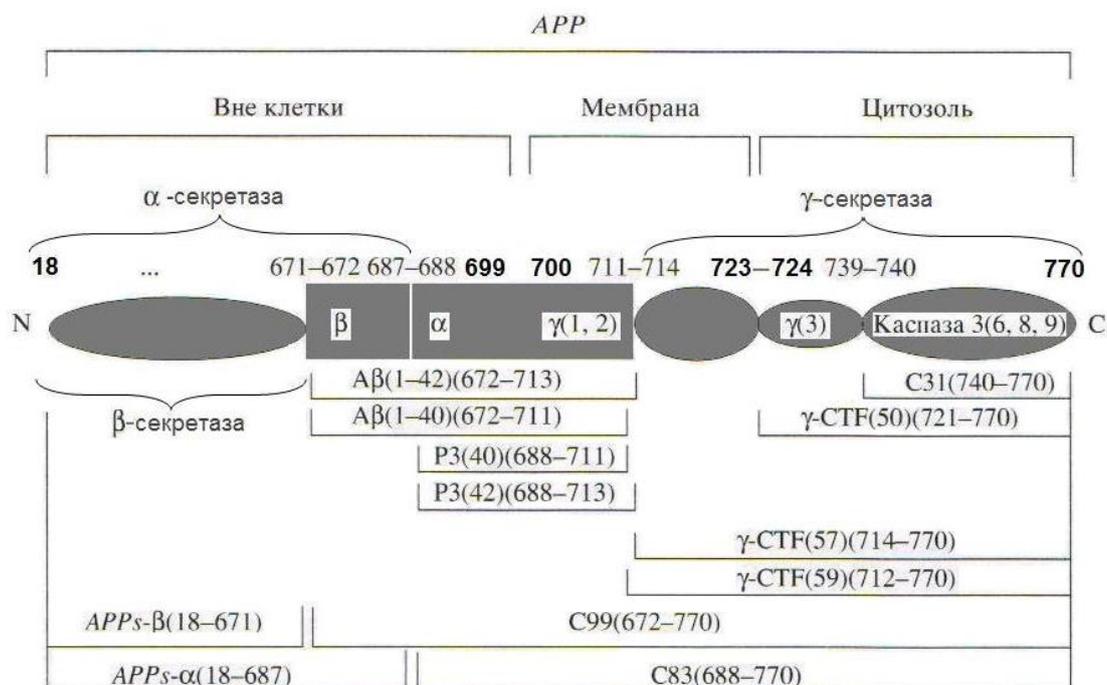


Рисунок 1. Схематическая структура APP770, его внутренних фрагментов и пептидных связей, расщепляемых α-, β- и γ-секретазами. Числа в скобках у обозначения пептида означают его размер (в аминокислотных остатках), а интервал между числами – положение пептидного фрагмента вдоль последовательности APP. Другие обозначения: CTF – С-концевой фрагмент; α, β, и γ – α-, β-, и γ-секретазы; С83 и С99 – мембраносвязанные С-концевые фрагменты APP, отщепляемые α- и β-секретазами соответственно; APPs-α и APPs-β – растворимые N-концевые фрагменты APP, отщепляемые α- и β-секретазами соответственно; γ-CTF – С-концевой фрагмент, отщепляемый γ-секретазой. Числа в аминокислотных остатках означают их номера в полипептидной цепи APP [Kaminsky *et al.*, 2010].

APP770 состоит из 770 аминокислотных остатков, из которых 699 остатков находятся вне клетки (N-конец). Аминокислотные остатки 700-723 находятся в мембране, а 724-770 находятся в цитозоле, образуя С-конец. APP может расщепляться тремя секретазами: α, β и γ. В физиологических условиях α-секретаза отщепляет от N-конца аминокислоты от 18 до 687 порядкового номера. Этот фрагмент нетоксичен и существует в нервных клетках в норме. β-секретаза отщепляет от N-конца более короткий фрагмент (18-671). Если после β-секретазы в процесс вовлекается γ-секретаза, то она отщепляет от С-конца APP фрагмент 714-770, в результате образуется Аβ₁₋₄₂. Если отщепляется фрагмент 712-770, то образуется Аβ₁₋₄₀. Оба фрагмента токсичны *in vitro*, причем они могут

самоассоциироваться в нерастворимые фибриллы, что может усиливать их токсичность [Каминский, Косенко, 2009, Kaminsky *et al.*, 2010].

Кроме того, APP может расщепляться каспазами 3, 6, 8, 9 (см. рис. 1) с образованием цитотоксического пептида C31, который тоже вовлекается в гибель нейрона при БА [Каминский, Косенко, 2009; Kaminsky *et al.*, 2010].

Считается, что $A\beta_{1-42}$ преимущественно локализован в мозге, а $A\beta_{1-40}$ – в кровеносных сосудах мозга [Weller *et al.*, 2009]. Стационарная концентрация $A\beta$ поддерживается совместным действием протеаз, таких, как неприлизин, инсулин-разрушающий фермент, эндотелин-превращающий фермент и плазмин [Turner *et al.*, 2004]. Так, например, из $A\beta_{1-40}$ может образовываться короткий фрагмент $A\beta_{25-35}$ [Kubo *et al.*, 2002, 2003], который является токсичным для нейронов *in vitro*, поскольку способствует увеличению проницаемости мембран [Chang *et al.*, 2011].

В связи с тем, что $A\beta_{25-35}$ просто синтезировать и он не требует длительного времени для агрегации [Pike *et al.*, 1995], в отличие от целого пептида $A\beta_{1-40}$, и образует фибриллы сразу после солюбилизации [Hensley *et al.*, 1994], этот пептид чаще, чем другие, используют в исследованиях *in vivo* и *in vitro*. $A\beta_{25-35}$ состоит из 11 аминокислот:

H_3N^+ -Глицин-серин-аспарагин-лизин-глицин-аланин-изолейцин-изолейцин-глицин-лейцин-метионин- COO^- .

Молекула имеет суммарный положительный заряд и состоит из двух частей: первую часть образуют четыре полярных аминокислотных остатка с N-конца молекулы, включая положительно заряженный лизин, которые обуславливают способность амилоидных пептидов взаимодействовать с отрицательно заряженными мембранами, вторая часть состоит из семи преимущественно гидрофобных остатка с C-конца пептида, которые способствуют взаимодействию с гидрофобными участками. То есть структура амилоидного пептида обуславливает его взаимодействие с мембраной путем электростатических и гидрофобных взаимодействий [Del Mar Martínez-Senac *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2011]. Некоторые исследователи показали, что амилоидные пептиды

встраиваются в липидный бислой, образуя поры/каналы, проницаемые для ионов, а отрицательно заряженные липиды способствуют повышению скорости образования каналов [Chang *et al.*, 2011]. Кроме того, было высказано предположение о том, что поры/каналы могут быть образованы в мембране путем агрегации $A\beta_{25-35}$ в бета-складчатые структуры (трубки) [Chang *et al.*, 2011].

1.2. Гипотезы возникновения БА

Первой гипотезой, объясняющей причины повреждения когнитивных функций при БА, была каскадная амилоидная гипотеза, согласно которой амилоидные пептиды, накапливающиеся в мозге, являлись главными и единственными патогенетическими факторами, ответственными за возникновение и развитие этого заболевания [Hardy, Higgins, 1992]. При этом считалось, что нерастворимые β -складчатые структуры, обнаруженные в составе внеклеточных сенильных бляшек, вызывают медленную дегенерацию нейронов при БА [Shoji *et al.*, 1992; Robakis, 1994]. Было предложено несколько возможных молекулярных механизмов цитотоксического действия $A\beta$, основанных на исследованиях, проводимых *in vitro*:

1. Агрегированные формы $A\beta$ изменяют количество внутриклеточного кальция и нарушают гомеостаз ионов Ca^{2+} , что опосредовано гиперактивацией глутаматных рецепторов [Goodman *et al.*, 1994].

2. Под действием $A\beta$ происходит нарушение функционального состояния митохондрий. Нейродегенерация в мозге сопряжена с постепенным нарушением функций митохондрий и усилением окислительного повреждения [Cardoso *et al.*, 2001; Casley *et al.*, 2002].

3. Развитие окислительного стресса и накопление активированных кислородных метаболитов [Harris *et al.*, 1995; Akama *et al.*, 1998; Hirai *et al.*, 1998].

Однако в дальнейшем было обнаружено, что плотность амилоидных пептидов в мозге не коррелирует со степенью повреждения памяти [Lue *et al.*, 1999]. Кроме того, амилоидные пептиды накапливаются в мозге не только при

БА, но и при других заболеваниях человека [Masters *et al.*, 1981; Pearlman *et al.*, 1988; Glenner, Murphy, 1989], у пожилых людей, не имеющих проблем с памятью [Tomlinson *et al.*, 1968; Dayan, 1970], после черепно-мозговой травмы [Smith *et al.*, 2003], при общем наркозе [Xie *et al.*, 2006], а также у детей при остром воспалении мозга [Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2008]. Также следует отметить, что неоднократно проведенная многими центрами Америки и Европы попытка связать амилоиды в мозге антиамилоидными препаратами приводила к быстротечному менингоэнцефалиту и гибели пациентов [Nicoll *et al.*, 2003]. Появление этих данных стимулировало создание новых гипотез, которые могли бы объяснить нейродегенеративные процессы и повреждение памяти у пациентов с БА. Так, несмотря на то, что каскадная амилоидная гипотеза все еще является доминирующей, на смену ей были выдвинуты метаболическая и сосудистая гипотезы.

В основе метаболической гипотезы возникновения БА лежит тот факт, что одним из характерных биохимических признаков при БА является нарушение аэробного метаболизма глюкозы [Hoyer, 1988; Mielke *et al.*, 1992; Meier-Ruge *et al.*, 1994, Hoyer, 1996] и усиление анаэробного гликолиза в мозге. Глюкоза – основной источник энергии в мозге, и недостаточное ее поступление хотя бы в течение несколько минут приводит к необратимому повреждению нейронов. Считается, что основными причинами в повреждении утилизации глюкозы в мозге могут быть снижение чувствительности рецептора к инсулину [Hoyer, 2000], нарушение работы переносчика глюкозы [Kalaria *et al.*, 1989; Simpson *et al.*, 1994], снижение активности ферментов гексокиназы [Marcus *et al.*, 1989; 1997], фосфофруктокиназы [Meier-Ruge *et al.*, 1984], пируватдегидрогеназы [Perry *et al.*, 1980], гипоксия [Ajmani *et al.*, 2000; de la Torre, 2000]. Предполагается, что именно эти нарушения лежат в основе развития нейродегенерации [Iqbal, Grundke-Iqbal, 2005]. Согласно этой гипотезе, образование амилоидных пептидов считается физиологическим компенсаторным механизмом, замедляющим дальнейшее повреждение нейронов [Smith, Perry, 1998; Smith *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2006].

Кроме того, многочисленные исследования, проводимые на пациентах, свидетельствуют о том, что нейродегенеративные заболевания, в том числе и БА, ассоциированы с дисфункцией микрососудов мозга [De Jong *et al.*, 1999; de la Torre, 2000], нарушением функционирования гемато-энцефалического барьера [Zlokovic, 2008]. Дисфункция мелких сосудов мозга снижает кровоток и, соответственно, снабжение мозга кислородом и энергетическими субстратами [de la Torre, 2000; Aliev *et al.*, 2003; Zlokovic, 2011]. Масса мозга составляет всего около 2% от всей массы тела, он потребляет 20% всего кислорода и 25% глюкозы, используемой в организме. Согласно сосудистой гипотезе [de la Torre, Mussivand, 1993; de la Torre, 2002, 2004], именно нарушение микроциркуляции крови в некоторых отделах мозга приводит к недостатку глюкозы и кислорода, что вызывает необратимые изменения и гибель нейронов. Нарушение гемато-энцефалического барьера, в свою очередь, может приводить к проникновению в мозг сывороточных белков и очаговым кровоизлияниям с поступлением эритроцитов в мозг (рис. 2). Эритроциты, разрушаясь, высвобождают гемоглобин, который является источником железа, катализирующего образование активных кислородных метаболитов, которые опосредуют повреждение нейронов. Кроме того, нарушение гемато-энцефалического барьера способствует проникновению в мозг нейротоксичных белков, например, плазмина, тромбина и фибрина. Альбумин способствует развитию отека, приводящего к гипоперфузии и гипоксии нервной ткани, которое вызывает дальнейшее повреждение нейронов [Zlokovic, 2011].

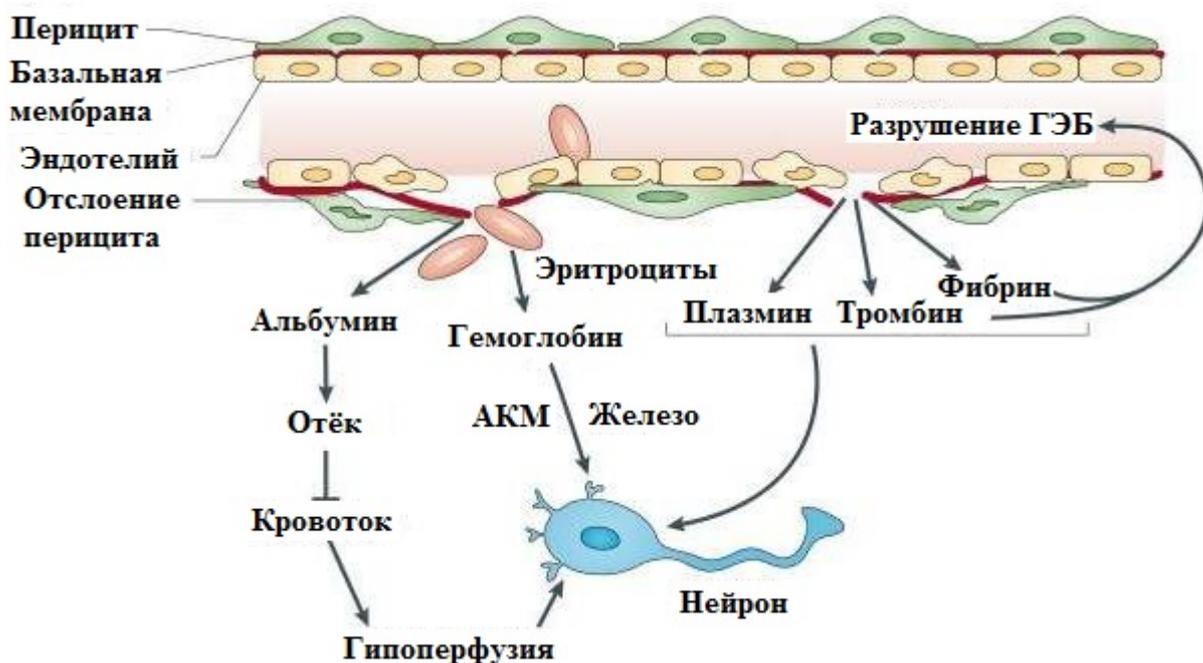


Рисунок 2. Нарушение гемато-энцефалического барьера [Zlokovic, 2011]. ГЭБ – гемато-энцефалический барьер, АКМ – активные кислородные метаболиты.

Другим важным фактором в развитии гипоксии является нарушение адекватного снабжения тканей кислородом, что зависит от способности эритроцитов связывать, транспортировать и отдавать кислород тканям, что в свою очередь определяется состоянием энергетического обмена и антиоксидантного статуса клеток. Однако взаимосвязь между нарушением метаболического/энергетического состояния эритроцитов и возникновением гипоксии, приводящей к нарушению аэробного окисления глюкозы в мозге, при БА не определена.

1.3. Эритроциты – переносчики кислорода в организме

Эритроциты – высокоспециализированные клетки, основная функция которых – транспорт кислорода, и эти клетки оптимально приспособлены к ее выполнению. Двояковогнутая форма эритроцитов, поддерживаемая цитоскелетом, обеспечивает большую поверхность, что усиливает газообмен между клеткой и внеклеточной средой. Одним из характерных признаков

эритроцитов является их способность к деформации, которая позволяет этим клеткам проникать в мелкие капилляры. Поддержание формы и деформируемость эритроцитов зависит от многих строго регулируемых связанных между собой факторов, в том числе от рН, содержания кальция и АТФ [Deuticke, 1968], активности Na^+/K^+ -АТФ-азы, уровня оксигенации гемоглобина [Uyuklu *et al.*, 2009], взаимодействия между мембранными, периферическими и цитоскелетными белками [de Oliveira *et al.*, 2008], антиоксидантного статуса [Yanai *et al.*, 2008]. Изменение одного лишь компонента регуляторной системы может привести не только к дисбалансу и потере функции эритроцитов, но и их повреждению и полному разрушению в кровяном русле [Косенко, 2014].

1.3.1. Na^+/K^+ -АТФ-аза и поддержание ионного гомеостаза эритроцитов

Основным ферментом, обеспечивающим поддержание объема эритроцитов и ионных градиентов, является Na^+/K^+ -АТФ-аза, локализованная в мембране [Атауллаханов *и др.*, 2009]. Известно, что концентрация ионов K^+ в цитозоле эритроцитов в физиологических условиях составляет примерно 110 ммоль/л, тогда как в плазме крови она равна 3 мМ. В то же время концентрация Na^+ в плазме крови достигает 140 мМ, а внутри эритроцитов – 4 мМ. Для поддержания столь высоких трансмембранных концентрационных градиентов требуется энергия АТФ. При активации Na^+/K^+ -АТФ-азы происходит гидролитическое расщепление АТФ до АДФ и фосфата, и высвободившаяся при этом энергия используется для транспорта ионов K^+ из окружающей среды внутрь эритроцитов, а ионов Na^+ из клетки наружу. На каждую молекулу гидролизованного АТФ из клетки выводятся 3 иона Na^+ и поступает в эритроцит 2 иона K^+ [Blanco, Mercer, 1998].

Таким образом, активность Na^+/K^+ -АТФ-азы служит маркером сохранения ионного баланса по обе стороны мембраны, который лежит в основе сохранения формы, объема и функциональной способности эритроцитов. Показано, что при различных патологиях происходит значительное накопление Na^+ в клетках, что

приводит к повышению активности Na^+/K^+ -АТФ-азы [Kawamoto *et al.*, 2005; Shahid *et al.*, 2008]. Напротив, снижение активности этого фермента ухудшает способность клеток к деформации, увеличивая их объем [Kowluru *et al.*, 1989; Kucukatay *et al.*, 2009], что в конечном итоге может приводить к повреждению мембраны и лизису эритроцитов [Косенко *и др.*, 2008].

1.3.2. АТФ как NO-зависимый вазодилататор

АТФ является главным энергетическим субстратом в клетке, концентрация которого поддерживается балансом между процессами ее образования в гликолизе и процессами ее потребления, включающими активный транспорт и поддержание ионного градиента по обе стороны мембраны. При снижении концентрации АТФ происходит потеря эритроцитом воды, ионов калия, повреждение спектрин-актинового цитоскелета, что приводит в дальнейшем к изменению мембраны эритроцитов и образованию на ней выростов, при этом форма клеток меняется с дисковидной на эхиноцитарную [Bukowska, Zatorska, 2003]. Помимо этого, снижение концентрации АТФ взаимосвязано со старением клеток и их жизнеспособностью в кровяном русле [Nakao *et al.*, 1962].

Кроме того, известно, что АТФ является NO-зависимым вазодилататором, способствующим расслаблению гладкомышечных клеток в капиллярах [Wan *et al.*, 2011], необходимому для проникновения эритроцитов в узкие капилляры. Это обеспечивается выходом эндогенного АТФ из эритроцитов и его взаимодействием с эндотелиальными клетками сосудов [Sprague *et al.*, 1996]. При снижении парциального давления кислорода и pH выброс АТФ из эритроцитов усиливается [Ellsworth *et al.*, 1995; Sprague *et al.*, 2001], что дает возможность для связывания АТФ с P2Y-рецепторами (подкласс пуриnergических рецепторов для АТФ и АДФ), расположенными на люминальной поверхности эндотелия сосудов (рис. 3). Это в свою очередь индуцирует синтез и высвобождение NO, который инициирует вазомоторный эффект, позволяющий проникать эритроцитам в узкие

капилляры и увеличивать поток крови в ткани и доставку в них кислорода [McCullough *et al.*, 1997; Collins *et al.*, 1998; Wan *et al.*, 2011].

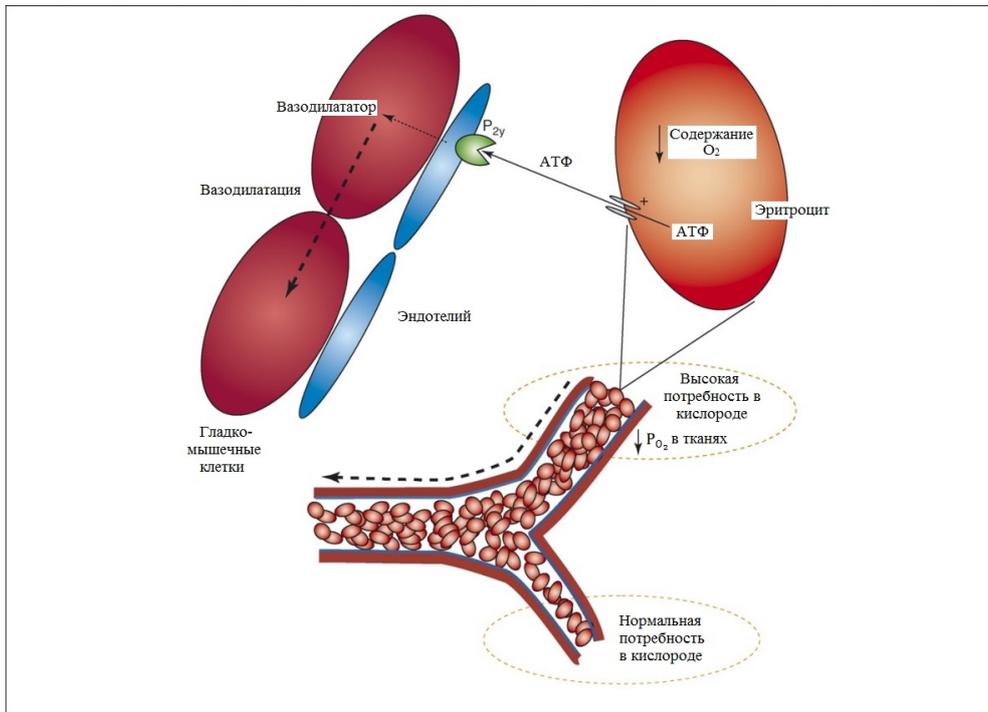


Рисунок 3. Каскад событий, инициированный поступлением эритроцитов в область со сниженным парциальным давлением кислорода [Sprague *et al.*, 2007].

1.3.3. Регуляторные ферменты гликолиза

Основным источником АТФ в эритроцитах является анаэробный гликолиз. Важно отметить, что частичное или полное отсутствие гликолитических ферментов в эритроцитах приводит к анемиям, которые характеризуются лизисом, а также к снижению времени жизни эритроцитов [McMullin, 1999; van Wijk, van Solinge, 2005]

Гексокиназа (ГК) катализирует первую и скорость-лимитирующую реакцию фосфорилирования глюкозы с образованием глюкозо-6-фосфата. Известно, что активность этого фермента значительно выше в ретикулоцитах по сравнению со зрелыми эритроцитами [van Wijk, van Solinge, 2005].

Вторым ключевым ферментом гликолиза является фосфофруктокиназа (ФФК), катализирующая фосфорилирование фруктозо-6-фосфата, используя АТФ в качестве источника энергии. ФФК – один из немногих ферментов гликолиза, имеющих двойную локализацию. Она может быть связана с внутренней мембраной эритроцитов и быть локализованной в цитоплазме [Jenkins *et al.*, 1984; Косенко, 2014]. Предполагается, что взаимодействие ФФК с цитоплазматическим доменом белка полосы 3 мембраны эритроцита приводит к постепенному ингибированию фермента [Low *et al.*, 1995]. Кроме того, ФФК ингибируется АТФ и 2,3-дифосфоглицератом (2,3-ДФГ) [van Wijk, van Solinge, 2005]. Существуют данные, полученные в исследованиях *in vitro*, свидетельствующие о том, что взаимодействие ФФК с белком полосы 3 снимает аллостерическое ингибирование АТФ и 2,3-ДФГ [Karadsheh, Uyeda, 1977; Jenkins *et al.*, 1984]. Кроме того, активность ФФК эритроцитов человека регулируется катионами Ca^{2+} . Было показано, что увеличение концентрации Ca^{2+} в эритроцитах, индуцируемое иономицином, вызывало падение уровня АТФ с последующим увеличением активности ФФК и усилением гликолиза. Однако более длительная инкубация эритроцитов с Ca^{2+} приводила к высвобождению фермента из мембраны, что сопровождалось усиленным лизисом эритроцитов [Assouline-Cohen, Beitner, 1999]. Таким образом, ФФК не только регулирует метаболизм глюкозы, но и является одним из основных ферментов, от активности которого зависит целостность эритроцитов.

Пируваткиназа (ПК) катализирует необратимую реакцию превращения фосфоенолпирувата в пируват. ПК играет ключевую роль в метаболизме эритроцита, так как в ходе реакции, катализируемой этим ферментом, происходит образование АТФ. Реакция протекает в присутствии ионов K^+ , Mn^{2+} и Mg^{2+} . ПК – гомотетрамер, у млекопитающих известно 4 изоформы ПК (M_1 , M_2 , L и R). В эритроцитах находится R-форма фермента. При недостаточности ПК наблюдается нехватка АТФ, что приводит к снижению жизнеспособности эритроцита. Кроме того, дефицит этого фермента приводит к накоплению промежуточных продуктов гликолиза и ингибированию гексокиназы. ПК аллостерически активируется

фруктозо-1,6-дифосфатом и ингибируется АТФ [McMullin, 1999; Zanella *et al.*, 2005].

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) не относится к регуляторным ферментам гликолиза. Она катализирует обратимую реакцию восстановления пирувата в лактат, поставляя НАД^+ для реакции, катализируемой глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой (ГАЗФДГ), обеспечивая самоподдерживаемость гликолиза.

1.3.4. 2,3-дифосфоглицерат и его образование в шунте Рапопорта-Люберинга

Образование 2,3-ДФГ в эритроцитах осуществляется в уникальном шунте Рапопорта-Люберинга, который является ответвлением гликолиза и обходит реакцию, катализируемую фосфоглицераткиназой. Схема этого процесса представлена на рис. 4.

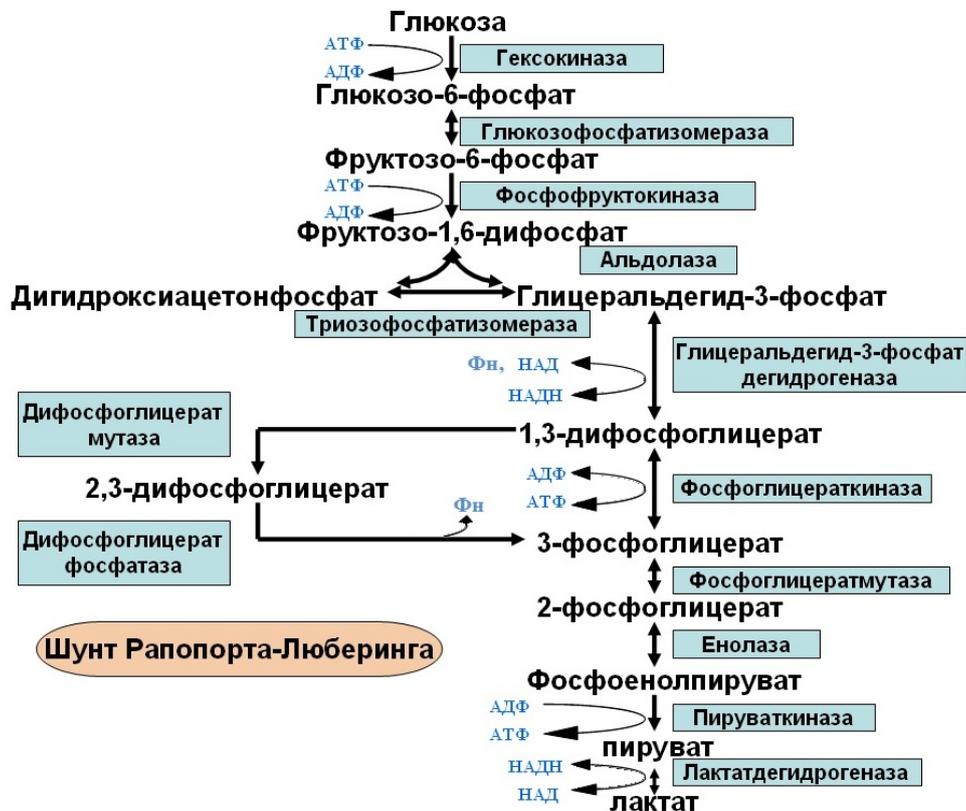


Рисунок 4. Гликолиз и шунт Рапопорта-Люберинга в эритроцитах человека (по [Travis *et al.*, 1978]).

При этом 1,3-дифосфолицерат, образуемый в результате реакции, катализируемой ГАФДГ, необратимо превращается в 2,3-ДФГ при участии фермента 2,3-дифосфолицератмутаза. Гидролиз 2,3-ДФГ до 3-фосфолицерата осуществляется дифосфолицератфосфатазой [Travis *et al.*, 1978]. Предполагается, что дифосфолицератмутаза может обладать и фосфатазной активностью, и что и образование, и распад 2,3-ДФГ осуществляется под действием одного фермента [van Wijk, van Solinge, 2005].

2,3-ДФГ является одним из главных метаболитов в эритроцитах, определяющих сродство гемоглобина к кислороду [Benesch *et al.*, 1969], способствуя более полной отдаче кислорода в ткани. Известно, что тетрамерная молекула гемоглобина может находиться в двух состояниях: Т-состоянии, «напряженном», с низким сродством к кислороду, и R-состоянии, «расслабленном», с высоким сродством к кислороду. Молекула гемоглобина состоит из двух α - и двух β -субъединиц. Центр связывания 2,3-ДФГ расположен в полости между β -субъединицами гемоглобина, образованной между N-концевыми аминокислотными группами β -субъединиц, которая выстлана положительно заряженными группами аминокислот (рис. 5). Отрицательно заряженная молекула 2,3-ДФГ по своей величине и конфигурации соответствует размеру углубления на молекуле гемоглобина в Т-состоянии и образует ионные связи с положительно заряженными группами гемоглобина. Каждый тетрамер гемоглобина может присоединять одну молекулу 2,3-ДФГ. Считается, что связывание 2,3-ДФГ обеспечивается наличием в полости двух α -аминогрупп β -цепей гемоглобина и имидазольными остатками гистидинов, которые взаимодействуют с фосфатными группами молекулы 2,3-ДФГ, в то время как карбоксильная группа находится в пределах связывания ϵ -аминогруппы лизина одной из β -цепей [Bunn, 1971]. При этом 2,3-ДФГ стабилизирует молекулу гемоглобина путем образования «солевых мостиков», которые обеспечивают перекрестное сшивание двух β -субъединиц [Scott *et al.*, 1977].

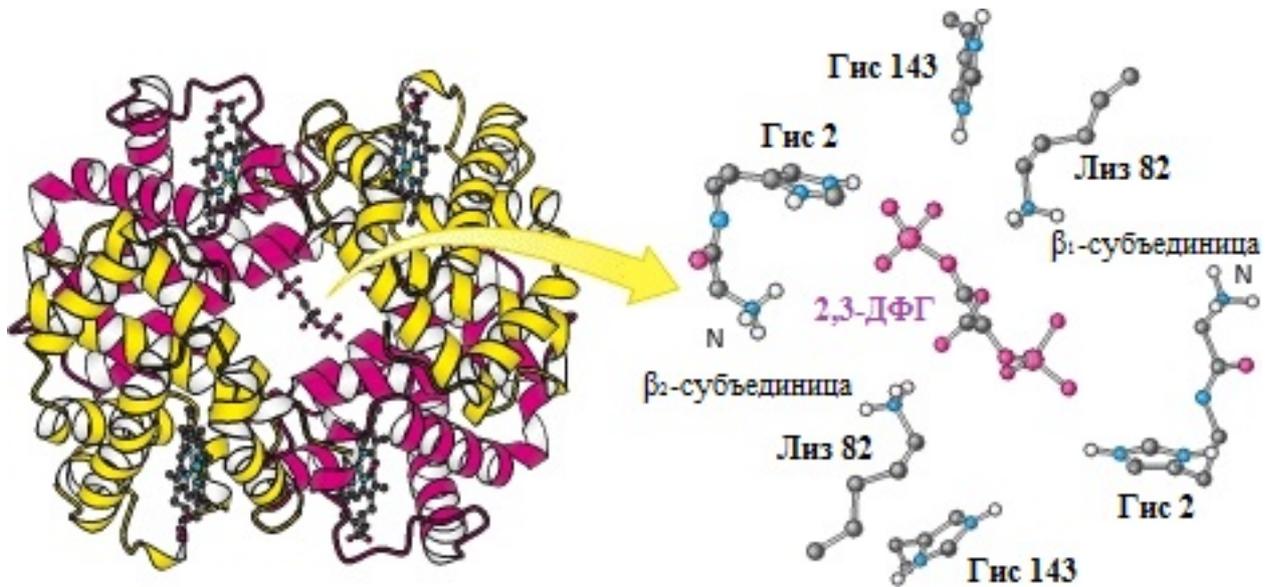


Рисунок 5. Связывание 2,3-ДФГ с гемоглобином.

2,3-ДФГ связывается в центральной полости дезоксигемоглобина, где он взаимодействует с тремя положительно заряженными группами каждой β -субъединицы. Розовым цветом выделены α -субъединицы, желтым цветом – β -субъединицы. Из [Berg, Tymoczko, Stryer. Biochemistry, 2002]

Стационарная концентрация 2,3-ДФГ в эритроцитах, как уже было сказано, зависит от состояния гликолитической системы [Travis *et al.*, 1978; van Wijk, van Solinge, 2005]. Известно, что дефекты ферментов проксимального участка гликолиза, таких как фосфоглицераткиназа и ПК, приводят к накоплению 2,3-ДФГ, что способствует снижению сродства гемоглобина к кислороду, то есть более легкому переносу кислорода тканям. Напротив, относительный дефицит ферментов, катализирующих начальные реакции гликолиза (ГК, глюкозофосфатизомераза, ФФК, альдолаза и триозофосфатизомераза) является причиной недостаточного синтеза 2,3-ДФГ [van Wijk, van Solinge, 2005]. На изменение сродства гемоглобина к кислороду также влияют ионы магния, которые, связываясь с 2,3-ДФГ, снижают его взаимодействие с гемоглобином [Васильева, 2005].

Долговременное нарушение энергетического обмена и изменение активности ферментов в эритроцитах снижает концентрацию 2,3-ДФГ [van Wijk, van Solinge, 2005], способствуя повышению сродства гемоглобина к кислороду,

что может быть одной из причин развития тканевой гипоксии [McCully *et al.*, 1999].

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, в частности, при некоторых типах энзимопатий [Valentine *et al.*, 1985; McCully *et al.*, 1999], при диабетической нейропатии [Nakamura *et al.*, 1995], у недоношенных новорожденных [Tsirka *et al.*, 1990; Cholevas *et al.*, 2008], у пациентов с гемоглобинопатией [Papassotiriou *et al.*, 1998], гипертензией [Resnick *et al.*, 1994], гипофосфатемией [Larsen *et al.*, 1996], а также у людей пожилого возраста [Purcell, Brozović, 1974].

1.3.5. Антиоксидантная система эритроцитов

Как уже было сказано, эритроциты являются высокоспециализированными клетками, основной функцией которых является перенос кислорода от лёгких к органам и тканям. Поскольку в эритроцитах постоянно протекают процессы оксигенации – дезоксигенации гемоглобина, эти клетки характеризуются высокой скоростью образования активированных кислородных метаболитов (АКМ) [Меньщикова и др., 1994].

Под АКМ подразумевается широкий класс соединений радикальной и нерадикальной природы, содержащих кислород [Владимиров, Проскурнина, 2009]. К ним относятся супероксидный анион-радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$), перекись водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал ($\text{OH}\cdot$), гидроперекисный радикал ($\text{HO}_2\cdot$), нитроксид (NO), пероксинитрит (ONOO^-), которые обладают высокой реакционной способностью и коротким временем жизни в биологических объектах. АКМ образуются в животной клетке в процессе нормальной жизнедеятельности и играют важную роль в многих клеточных процессах, таких

как клеточная пролиферация, регуляция тонуса сосудов, поддержание иммунного гомеостаза [Меньщикова *и др.*, 1994].

Известно, что $O_2^{\cdot -}$ и другие АКМ в эритроцитах образуются в результате аутоокисления гемоглобина, происходящего при его постоянном взаимодействии с кислородом [Misra *et al.*, 1972]. $O_2^{\cdot -}$ – относительно малоактивный радикал, но, поскольку является нуклеофильным соединением, окисляет фосфолипиды мембран [Cathcart *et al.*, 1989], что может приводить к разрушению эритроцитов [Weiss, 1980].

Гидроксильный радикал OH^{\cdot} является наиболее реакционным из АКМ [Меньщикова *и др.*, 1994]. Его основным источником в эритроцитах служит реакция Фентона, протекающая с участием металлов переменной валентности [Bast *et al.*, 1991], в частности, Fe^{2+} :



Обратное восстановление Fe^{3+} возможно в реакции с $O_2^{\cdot -}$:



При наличии в среде $O_2^{\cdot -}$ и H_2O_2 может протекать реакция Хабера-Вайса [Ланкин *и др.*, 2001]:



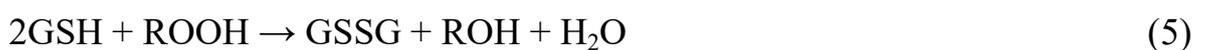
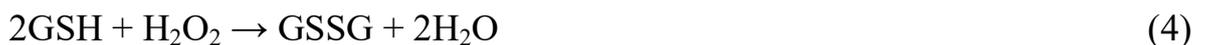
Постоянное образование АКМ в организме уравнивается их утилизацией защитными системами, которые представлены ферментативными и неферментативными антиоксидантами. Когда скорость образования свободных радикалов в клетке превышает систему антиоксидантной защиты, возникает окислительный стресс [Меньщикова *и др.*, 1994].

К ферментативным антиоксидантам относятся супероксиддисмутаза (СОД), которая катализирует реакцию дисмутации $O_2^{\cdot -}$ в перекись водорода, каталаза, расщепляющая H_2O_2 , глутатион-зависимые пероксидазы и трансферазы, удаляющие органические перекиси [Меньщикова *и др.*, 1994]. Известно, что у млекопитающих длительность жизни эритроцитов в значительной степени коррелирует с активностью некоторых антиоксидантных ферментов, в частности, СОД и глутатионпероксидаза (ГПО), а также с концентрацией глутатиона [Kurata

et al., 1993], что свидетельствует о важности антиокислительных ферментов в поддержании жизнедеятельности эритроцитов.

СОД впервые описана Маккордом [McCord *et al.*, 1969]. Этот фермент обнаружен в клетках всех аэробных организмов. Существует несколько изоформ СОД, которые отличаются строением активного центра [Меньщикова *и др.*, 1994]. В зрелых эритроцитах млекопитающих, лишенных митохондрий, обнаружена только одна изоформа, медь-цинковая (Cu,Zn-СОД) [Kurata *et al.*, 1993]. Цинк, по-видимому, необходим для стабилизации фермента, в то время как для ферментативной активности необходимы атом меди и аминокислотный остаток гистидина [Cimen, 2008]. СОД утилизирует супероксидный радикал, тем самым предотвращая образование метгемоглобина. Ингибитором фермента является перекись водорода в микромолярной концентрации.

Глутатионпероксидаза (ГПО) состоит из четырех идентичных субъединиц с молекулярной массой около 19 кДа, каждая из которых содержит по 1 атому селена, входящему в состав селено-цистеиновых остатков; на тетрамере имеется 2 активных GSH-связывающих центра [Sunde, Hoekstra, 1980, Меньщикова *и др.*, 1994]. ГПО катализирует реакцию восстановления перекиси водорода (4) и перекиси липидов (5):



Обратное восстановление глутатиона происходит в реакции, катализируемой глутатионредуктазой [Ланкин *и др.*, 2001]:



Важную роль в антиоксидантной системе эритроцита играет ключевой регуляторный фермент пентозофосфатного пути глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ), поскольку в ходе реакции, катализируемой этим ферментом, происходит восстановление НАДФ⁺, необходимого для глутатионредуктазы. Известно, что дефекты в Г6ФДГ приводят к снижению времени жизни эритроцитов, а при недостатке этого фермента происходит гемолиз эритроцитов [McMullin, 1999].

Каталаза – гемсодержащий фермент, представляет собой тетрамер с молекулярной массой 250 кДа. Каталаза человека содержит 4 прочно связанные молекулы НАДФН, который снижает чувствительность фермента к малым концентрациям субстрата, H_2O_2 . Каталаза может функционировать как регуляторный белок, высвобождая НАДФ⁺, когда клетка находится в состоянии окислительного стресса. Этот выброс усиливает удаление перекиси водорода механизмом «глутатионредуктаза – глутатионпероксидаза» [Kirkman *et al.*, 1984].

В физиологических условиях активность каталазы из клеток млекопитающих выше, чем активность ГПО. Каталаза является ферментом, длительно сохраняющим свою высокую активность, почти не требующим энергии активации, ее скорость реакции лимитируется лишь скоростью диффузии субстрата к активному центру. В эритроцитах, печени, почках человека и животных обнаружено максимальное содержание каталазы [Меньщикова *и др.*, 1994].

1.3.6. Старение эритроцитов

Продолжительность жизни эритроцитов человека составляет 80-120 дней, тогда как эритроциты лабораторных животных (грызунов) по данным разных авторов живут в кровяном русле от 37 до 65 дней [Derelanko, 1987; Lurie, Danon, 1992]. Обычно в кровотоке присутствуют клетки разного возраста: молодые эритроциты – ретикулоциты, представляющие собой безъядерные клетки с большим количеством РНК и рибосом, и поэтому еще способны к синтетическим процессам. Однако в процессе трансформации ретикулоцита в зрелый эритроцит утрачивается способность к синтезу белка, гема, липидов, фосфолипидов, а также способность к дыханию в связи с инактивацией флавиновых ферментов и цитохромоксидазы, нарушается цикл трикарбоновых кислот [Волкова, Боровков, 2013]. В норме трансформация ретикулоцитов в зрелые клетки происходит в кровотоке в течение суток, и общее содержание молодых клеток в крови не превышает 2%, что приблизительно соответствует проценту старых клеток,

находящихся в циркуляции. Основное количество клеток представлено зрелыми эритроцитами, которые со временем претерпевают значительные морфологические и биохимические изменения, лежащие в основе их старения. Это приводит, в частности, к снижению объема [Matovcik *et al.*, 1986; Bosman *et al.*, 2008], площади поверхности, диаметра клеток, но увеличению плотности и толщины эритроцита [Shinozuka, 1994]. Одновременно происходит снижение способности мембраны к деформации [Shinozuka, 1994], снижение уровня АТФ [Cohen *et al.*, 1976; Shinozuka *et al.*, 1988], 2,3-ДФГ [Bernstein, 1959; Cohen *et al.*, 1976], глутатиона [Sass *et al.*, 1965]. Происходит повышение концентрации ионов натрия в цитоплазме клеток с одновременным снижением концентрации калия [Cohen *et al.*, 1976]. В старых эритроцитах активность внутриклеточных ферментов, таких как Г6ФДГ [Sass *et al.*, 1965; Walls *et al.*, 1975; Shinozuka *et al.*, 1988], ПК [Gattegno *et al.*, 1976], холинэстераза [Gattegno *et al.*, 1976; Choy *et al.*, 1979], аспаратаминотрансфераза [Sass *et al.*, 1965; Seaman *et al.*, 1977], значительно ниже, чем в молодых. Показано, что при старении эритроцитов происходит увеличение количества метгемоглобина, сопровождающееся снижением активности цитохром b5-редуктазы и ее кофактора, цитохрома b5 [Takeshita *et al.*, 1983]. Старые клетки также характеризуются сниженной устойчивостью к окислительному стрессу [Glass, Gershon, 1984; Shinozuka, 1994], в основе которого может лежать сниженная активность антиокислительных ферментов, в том числе глутатионтрансферазы, участвующей в детоксикации ксенобиотиков [Fazi *et al.*, 1991].

Таким образом, старение эритроцитов связано с нарушениями во всех звеньях метаболизма (энергетический обмен, антиоксидантный статус, транспортная система) [Белевич *и др.*, 2014], что приводит в конечном итоге к гибели клеток, то есть к эриптозу [Lang *et al.*, 2005]. Считается, что эриптоз может инициироваться нарушенным гомеостазом кальция, связанным с его усиленным транспортом в клетку [Lang *et al.*, 2002, 2003]. Увеличение концентрации цитозольного Ca^{2+} активирует скрамблазу, регулирующую нормальное распределение фосфолипидов в клеточной мембране (рис.6). Это приводит к

инверсии фосфатидилсерина с внутренней поверхности мембраны на внешнюю. Нарушение асимметрии, вызванное скрамблазой, может быть усилено церамидом, который образуется из сфингомиелина под действием сфингомиелиназы [Lang *et al.*, 2005]. Инверсия фосфатидилсерина на внешнюю поверхность мембраны является сигналом для макрофагов, которые имеют рецепторы к фосфатидилсерину и связывают эритроциты при помощи лиганд-рецепторного взаимодействия [Boas *et al.*, 1998] и удаляются для разрушения в селезенке, печени и костном мозге [Seaman *et al.*, 1977; Косенко, 2014].

Таким образом, в нормальных условиях старые клетки в основном не разрушаются в кровяном русле, а распознаются макрофагами и удаляются из кровотока.

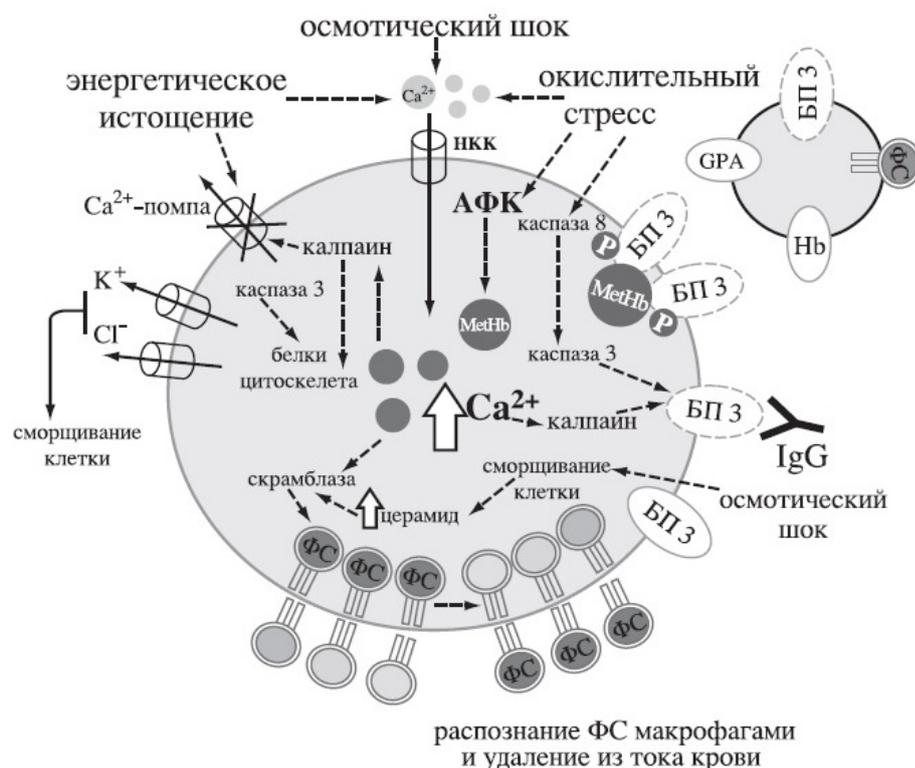


Рисунок 6. Механизмы, участвующие в запрограммированной гибели эритроцитов. АФК – активные формы кислорода; НКК – неселективный катионный канал; БП 3 – белок полосы 3; GRA – гликофорин А; ФС – фосфатидилсерин; Hb – гемоглобин; MetHb – метгемоглобин [Белевич *и др.*, 2014].

1.3.7. Эритроциты и болезнь Альцгеймера

Известно, что в 97-100% случаях БА сопровождается церебральной амилоидной ангиопатией (ЦАА) [Jellinger, 2010], которая представляет собой заболевание сосудов мозга вследствие накопления в них амилоидных пептидов [Coria *et al.*, 1988]. Это заболевание чаще всего встречается в пожилом возрасте и является причиной рецидивирующих кровоизлияний в мозг и когнитивных нарушений [Фатеева *и др.*, 2013]. А β , в основном А β_{1-40} , обнаруживаются в лептоменингеальных и корковых артериях, артериолах, венах, венулах и капиллярах [Thal *et al.*, 2002; Weller *et al.*, 2009], а также в кровеносных сосудах, снабжающих кровью гиппокамп [Masuda *et al.*, 1988]. При этом его локальная концентрация в сосудах может достигать 150 мкмоль/л [Shinkai *et al.*, 1995]. Поскольку А β локализуется в разных структурах сосудов [Wisniewski, Wegiel, 1994], они могут соприкасаться с клетками (миоциты, перициты), образующими гемато-энцефалический барьер (рис. 7), и вызывать их повреждение [Vonsattel *et al.*, 1991; Dalkara *et al.*, 2011]. Это может приводить к разрыву сосудов, кровоизлиянию [Thanvi, Robinson, 2006], разрушению эритроцитов, отеку мозга [Xi *et al.*, 2006], локальной гибели нервных клеток и повреждению памяти [Pfeifer *et al.*, 2002]. Однако, несмотря на то, что ЦАА наблюдается почти у всех пациентов с БА, кровоизлияние в мозг обнаруживается лишь в 20-25% случаев [Urbach, 2011]. Это свидетельствует о том, что, помимо разрушения сосудов с последующим выходом их содержимого в мозг, гибель нейронов могут вызывать и другие факторы. Например, значительное накопление А β в сосудах мозга может стать причиной их окклюзии, вызывая нарушение кровотока и снабжения мозга кислородом и глюкозой [de la Torre, Stefano, 2000], что в конечном итоге приведет к дегенерации нейронов и нарушению когнитивных функций [Thal *et al.*, 2008, 2009].

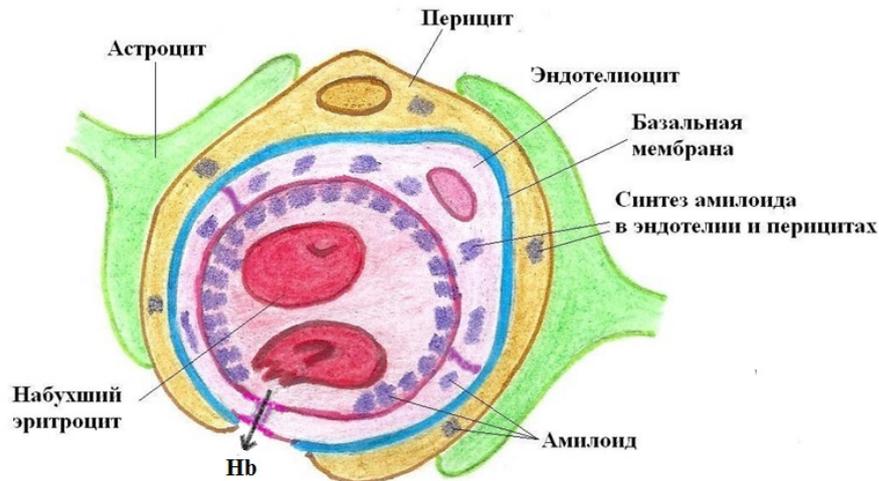


Рисунок 7. Накопление амилоидных пептидов в разных клеточных структурах сосудов мозга.

Другим повреждающим фактором может служить постоянное взаимодействие $A\beta$ с клетками крови, в частности, с эритроцитами (рис. 7), что может приводить к их адгезии к эндотелиальным клеткам [Nakagawa *et al.*, 2011], а также к повреждению и лизису [Куо *et al.*, 2000; Косенко *и др.*, 2008]. Многочисленные исследования показали, что при БА происходит увеличение объема эритроцитов [Chang *et al.*, 2007], появляются эритроциты удлинённой формы [Mohanty *et al.*, 2008], повышается их способность к агрегации клеток, снижается способность к деформации [Chang *et al.*, 2007], происходят изменения в структурных белках мембран [Bosman *et al.*, 1991b], а также снижается эффективность транспорта кислорода [Chang *et al.*, 2007]. В связи с тем, что изменение морфологических признаков эритроцитов наблюдается *in vitro* при их инкубации с $A\beta$ [Соломадин *и др.*, 2008, Mohanty *et al.*, 2008], мы предположили, что одним из главных факторов, инициирующим не только изменение морфологических признаков эритроцитов, но и их ускоренное старение и гибель прямо в кровяном русле при БА, являются $A\beta$, которые локализованы в сосудах мозга у подавляющего большинства пациентов с БА [Esiri, Wilcock, 1986; Attems, 2005]. Эти данные подтверждаются накоплением значительных количеств

свободного гемоглобина и продуктов его распада 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 гематоэнцефалического барьера, фрагментации ДНК, усилению перекисного окисления липидов и глобальному окислительному стрессу, развитию воспалительного процесса, сужению сосудов, гипоперфузии, атрофии мозга [Alexander, LoVerme, 1980; Werring *et al.*, 2004; Wang, Doré, 2007], нарушению памяти и смерти [Hackett, Anderson, 2000].

Механизм повреждения эритроцитов при контакте с амилоидными пептидами неизвестен. Однако, как уже было сказано, 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]. Поскольку пропорция старых клеток в крови пациентов при БА увеличена [Vosman *et al.*, 1991b; Vosman *et al.*, 1998], представляется интересным выяснить, будут ли старые клетки, которые характеризуются сниженной метаболической активностью, проявлять большую чувствительность к цитотоксическому действию амилоида.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Реактивы

В работе были использованы следующие реактивы: НАД⁺, НАДН, НАДФ⁺, АТФ, АДФ, ПК, ЛДГ, ГбФДГ, набор для определения концентрации 2,3-ДФГ – фирмы Roche (Австрия); Tris – фирмы Serva (Германия); ксантинооксидаза, каталаза, глутатионредуктаза, ксантин, п-нитротетразолиевый синий, глутатион восстановленный, глутатион окисленный, пируват натрия, карбонат натрия, глюкоза, НАДФН, α-целлюлоза, гемикристаллинцеллюлоза тип 50, сапонин, ЭГТА, ЭДТА, ФМСФ, ТЭА, CDNB, фосфоенолпируват, фруктозо-6-фосфат натрия, глюкозо-6-фосфат, малеимид, цистеин, глицеральдегид-3-фосфат, гистидин, оуабаин, Аβ₂₅₋₃₅, Аβ₃₅₋₂₅ – фирмы Sigma (США); Percoll – Pharmacia Fine Chemicals (Швеция). Все остальные реагенты были отечественного производства квалификации особо чистые и химически чистые.

2.2. Животные

Эксперименты на животных были выполнены с соблюдением правил гуманного обращения с животными (Директива 86/609/ЕЕС и обновленная Директива 2010/63/ЕУ Совета Европейского Союза). В работе использовались самцы крыс линии Вистар массой 240 - 260 г, выращенные в питомнике-виварии Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН г. Пущино. Условия содержания были стандартными.

2.3. Выделение и очистка эритроцитов крысы

Для получения суспензии очищенных эритроцитов использовали смешанную кровь самцов крысы линии Вистар, полученную при декапитации. В качестве антикоагулянта применяли 130 мМ 3Na-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]. Кровь элюировали раствором, содержащим 10 мМ KH_2PO_4 , pH 7,4; 150 мМ NaCl. Процедуру проводили при комнатной температуре. Элюат собирали в охлажденную центрифужную пробирку, содержащую 10 мМ KH_2PO_4 , pH 7,4; 150 мМ NaCl, 10 мМ К-ЭДТА в соотношении 1:5. Дальнейшие процедуры проводили при +4°C. Эритроциты осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 1000g. Плазму удаляли, осадок эритроцитов трижды промывали раствором, состоящим из 10 мМ KH_2PO_4 , pH 7,4; 150 мМ NaCl, 0,05 мМ К-ЭДТА, 0,2 мМ фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ)/ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ [Косенко *и др.*, 2009]. После третьего промывания осадок использовали для разделения клеток в градиенте перколла.

2.4. Разделение эритроцитов крысы по фракциям в градиенте перколла

Осадок эритроцитов после промывания ресуспендировали в Percoll-буфере (114 мМ NaCl, 76% Percoll, 0,5% глюкоза, 10 мМ KH_2PO_4 , 0,5 мМ К-ЭДТА, 0,2 мМ ФМСФ/ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, pH 7,4) до гематокрита 15% (на 1 мл эритроцитов 4,3 мл Percoll-буфера) [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) и нижнюю – старые клетки. Каждую фракцию трижды промывали раствором, содержащим 10 мМ KH_2PO_4 , pH 7,4, 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2,8 мМ глюкозу, 0,5 мМ К-ЭДТА (10 мин, +4°C, 1000 g, 1500 g, 2000 g) и суспендировали в этом растворе в соотношении 1:5.

Для определения активности ферментов по фосфату эритроциты промывали буферными растворами, в которых 10 мМ KH_2PO_4 заменяли на 10 мМ Трис-HCl. Для сохранения осмолярности концентрацию NaCl увеличивали до 150 мМ.

2.5. Подсчет количества клеток

Подсчет количества клеток проводили в камере Горяева. Суспензию эритроцитов разводили в 200 раз 3% NaCl, считали количество клеток в 5 больших квадратах по диагонали, полученное число умножали на 10000 – это количество клеток в 1 мм³ суспензии. Количество клеток в отмытом осадке эритроцитов находилось в пределах (9 – 12) x 10⁶ клеток в 1 мкл. Подсчет количества клеток проводили одновременно с помощью прибора BECKMAN COULTER ACT8.

2.6. Определение концентрации гемоглобина

Концентрацию гемоглобина в суспензии эритроцитов определяли с помощью прибора BECKMAN COULTER ACT8.

2.7. Агрегирование коммерческого препарата β-амилоидного пептида, фрагмент 25-35

Коммерческий Aβ₂₅₋₃₅ растворяли в воде для инъекций до конечной концентрации 1,5 ммоль/л, с последующим разведением до концентрации 0,3 ммоль/л. О степени агрегации Aβ₂₅₋₃₅ судили по появлению характерного пика в спектре флуоресценции тиофлавина T при 490 нм [LeVine, 1993]. Для стандартизации метода Aβ₂₅₋₃₅ инкубировали в течение 2 часов при 37°C в шейкере (ELMI-ST3) при постоянном перемешивании (200 об/мин).

2.8. Инкубация эритроцитов крысы с β-амилоидным пептидом

Эритроциты крысы в концентрации 15x10⁷ клеток в 1 мл инкубировались в течение разного времени (от 5 до 240 мин) при разной температуре (4; 25 и 37°C) в среде, содержащей 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM KH₂PO₄, pH 7,4. Для

определения активности ферментов по фосфату эритроциты инкубировали в среде, содержащей 150 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 10 мМ Трис-HCl, pH 7,4. Опытная проба содержала $A\beta_{25-35}$ в конечной концентрации 5, 10, 25, 50 мкмоль/л. Контрольная проба – нетоксичный фрагмент $A\beta_{35-25}$ в той же концентрации. После инкубации эритроциты осаждали при 300g (5 мин, +4°C). Полученный осадок эритроцитов лизировали, и в лизате определяли активность ферментов, или экстрагировали для определения концентрации метаболитов, а супернатант использовали для определения степени лизиса эритроцитов под действием $A\beta_{25-35}$. 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.

2.9. Пациенты, отбор крови, получение эритроцитов

Исследования были проведены 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 – $75\pm 2,6$) и группы контроля: «молодой контроль» – 14 человек возрастом от 25 до 45 лет и «пожилой контроль» – 14 человек, по возрасту соответствующие больным. Испытуемые контрольных групп в момент обследования не принимали никакие лекарственные препараты и были здоровы. Диагноз «Болезнь Альцгеймера» был верифицирован на БМСЭ (бюро медико-социальной экспертизы) психоневрологического диспансера города Серпухов с использованием стандартных критериев, разработанных мировым сообществом ученых и врачей [McKhann *et al.*, 1984, 2011]. Отбор пациентов осуществлялся на основе нормального индекса массы тела (норма – от 20 до 25 кг/м²) и анализа крови, показатели которой находились в пределах нормы. Показатель СОЭ варьировал в каждой группе от 2 до 20 мм/ч, то есть находился в пределах нормы. Концентрация С-реактивного белка (белок острой фазы воспаления) в плазме крови пациентов с БА изменялась в широких пределах, но не выходила за

пределы нормы (< 8 мг/л), что свидетельствовало об отсутствии воспалительных процессов у испытуемых. Пациенты, имеющие хронические системные и другие неврологические заболевания, из исследования были исключены. 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_3 -цитрат (рН 7,4). Пробы переносили при $+4^\circ\text{C}$. Дальнейшая обработка крови проводилась в Лаборатории метаболического моделирования и биоинформатики.

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. Кровь элюировали 0,9% NaCl. Процедуру проводили при комнатной температуре. Элюат собирали в охлажденную центрифужную пробирку, содержащую небольшое количество 0,9% NaCl. Дальнейшие процедуры проводили при $+4^\circ\text{C}$. Эритроциты осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 1000g. Плазму удаляли, осадок эритроцитов трижды промывали раствором, состоящим из 10 мМ KH_2PO_4 , рН 7,4; 3,5 мМ KCl; 1,5 мМ MgCl_2 ; 145 мМ NaCl и 6 мМ глюкозы и суспендировали в этой же среде в соотношении 1:5 [Косенко *и др.*, 2009]. Процедуры приготовления лизатов и экстрактов и методы измерения активности ферментов и концентрации метаболитов были идентичны тем, которые использовались при работе с эритроцитами крысы.

2.10. Получение лизатов эритроцитов для определения активности ферментов

Эритроциты лизировали смесью гипоосмотического буфера (50 мМ ТЭА, рН 7,4/0,15 мМ К-ЭГТА, 3 мМ β -меркаптоэтанол), содержащего 0,2% сапонин и

воду, в объемном соотношении 1:0,7:0,3:1. Лизаты эритроцитов использовали для определения активности ферментов.

2.11. Получение экстрактов эритроцитов

Отмытые, несуспандированные эритроциты смешивали с холодной смесью (-20°C) 6% HClO_4 /40% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ в соотношении 1:10. Центрифугировали 5 мин при температуре +4°C при 10000g. Осадок удаляли, рН супернатанта доводили до 5-6, используя 30% КОН и сухой KHCO_3 , и центрифугировали при тех же режимах для удаления осадка перхлората калия. Прозрачный супернатант использовали для определения концентрации метаболитов.

2.12. Получение мембран эритроцитов

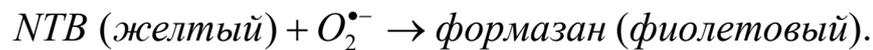
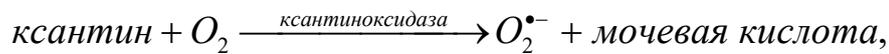
Мембраны эритроцитов людей получали по методу Стека [Steck *et al.*, 1974]. Осадок несуспандированных эритроцитов лизировали 40-кратным объемом охлажденного 5 мМ Na-фосфатного буфера (NaH_2PO_4 и Na_2HPO_4), рН 8,0 (лизирующий буфер) и выдерживали 10-15 мин во льду. Лизаты центрифугировали при 20000g (30 минут, +4°C). Осадок многократно промывали лизирующим буфером до получения мембран белого цвета. Очищенные мембраны суспендировали в небольшом объеме лизирующего буфера, который содержал ингибиторы протеаз (1 мМ апротинин, 0,5 мМ ФМСФ, 0,25 мМ ЭДТА- K^+ , 1 мМ ДТТ, 10 мкМ леупептин и 1,5 мкМ пепстатин) и хранили при -20°C.

Концентрацию белка в полученных пробах измеряли методом Лоури [Lowry *et al.*, 1951].

2.13. Определение активности ферментов

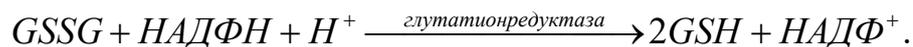
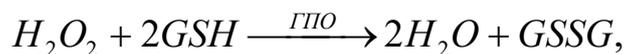
Активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) определяли спектрофотометрически по снижению скорости восстановления красителя п-

нитротетразолиевого синего (НТВ) в ксантин-ксантинооксидазной системе при 550 нм и 25°C [Beauchamp and Fridovich, 1971; Соломадин, 2012]. Реакции имели следующий вид:



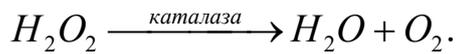
Реакционная смесь объемом 2 мл содержала 50мМ карбонат натрия (рН 10,2), 0,1 мМ ЭДТА, 62,5 мкМ НТВ, 20 единиц каталазы, 0,5 мМ ксантин, 150 мкг Нв в пробе. Реакцию запускали добавлением 0,03 ед/мл ксантинооксидазы. За 1 единицу активности принимали количество фермента, которое вызывало 50% торможение реакции восстановления НТВ.

Активность глутатионпероксидазы (ГПО, КФ 1.11.1.9) определяли спектрофотометрически по снижению светопоглощения при 340 нм и 25°C при окислении НАДФН окисленным глутатионом [Lawrence and Burk, 1976]. Реакции при определении:



Реакционная среда состояла из буфера, содержащего 50 мМ Na₂HPO₄, 50 мМ KH₂PO₄, рН 7,0, в который добавляли KN₃ (конечная концентрация 1 мМ), Na-ЭДТА (1 мМ), GSH (5 мМ), глутатионредуктазу (0,4 ед/мл); 200 мкМ НАДФН; 180 мкМ H₂O₂. Реакцию запускали добавлением пробы, содержащей 25 мкг гемоглобина на 1 мл реакционной смеси. Активность фермента выражали в мкмоль/мин•г Нв.

Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) определяли по снижению величины поглощения при 240 нм в реакции с перекисью водорода [Aebi, 1984, Соломадин, 2012]:



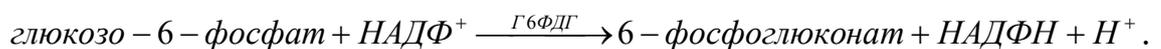
Реакционная смесь содержала фосфатный буфер (50 мМ Na₂HPO₄, 50 мМ KH₂PO₄, pH 7,0), в который добавляли перекись водорода до конечной концентрации 30 мМ. Реакцию запускали добавлением лизата эритроцитов с количеством гемоглобина 150 мкг. Измерение проводили при 25°C. Активность фермента выражали в величинах константы скорости реакции первого порядка (сек⁻¹/г Hb).

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].



Измерения проводили при 25°C. Реакционная среда содержала 50 мМ NaH₂PO₄, pH 6,5, 1 мМ GSH, 1 мМ Na-ЭДТА, 1 мМ CДNB/C₂H₅OH. Реакцию запускали добавлением пробы (300 мкг гемоглобина). Активность фермента выражали в мкмоль/мин•г Hb.

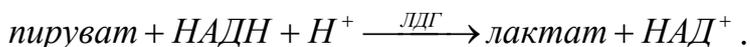
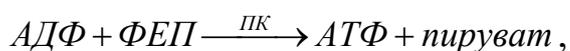
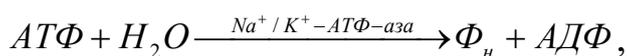
Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49) определяли спектрофотометрически по увеличению светопоглощения при восстановлении НАДФ⁺ при 340 нм, 37°C [Beutler, 1971] в среде, содержащей 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 10 мМ MgCl₂, 5 мМ малеимид, 0,5 мМ Na-ЭДТА, 1 мМ НАДФ⁺.



На 1 мл реакционной смеси добавляли лизат эритроцитов, содержащий 300 мкг гемоглобина. Реакцию запускали добавлением глюкозо-6-фосфата в конечной концентрации 1,5 мМ. Активность фермента выражали в мкмоль/мин•г гемоглобина.

Активность Na^+/K^+ -АТФ-азы (КФ 3.6.3.9) в лизатах эритроцитов крысы определяли по высвобождению фосфата при оубаин-чувствительном гидролизе АТФ [Baginski *et al.*, 1974; Соломадин, 2012]. Пробы инкубировались 20 мин при 37°C в буфере (30 мМ гистидин, рН 7,2, 130 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 4 мМ MgCl₂, 3 мМ АТФ), содержащем или не содержащем 1 мМ оубаин. Реакцию останавливали добавлением охлажденной трихлоруксусной кислоты, содержащей аскорбиновую кислоту, в конечной концентрации 7% и 1,4% соответственно. Затем пробы охлаждали и центрифугировали при 3000 g 5 мин при +4°C. К супернатанту в соотношении 1:0,5:1 добавляли 1% молибдат аммония и раствор, содержащий 2% арсенит натрия, 2% цитрат натрия, 2% CH₃COOH. Через 15 минут после добавления растворов спектрофотометрически определяли количество фосфата, образуемого в единицу времени, по поглощению фосфомолибденового комплекса при 700 нм. Активность Na^+/K^+ -АТФ-азы рассчитывали по разнице оптической плотности комплекса, измеренной в присутствии и в отсутствие оубаина, и выражали в мкмоль/мин•г Нв.

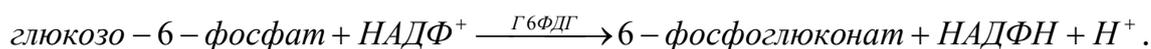
Активность Na^+/K^+ -АТФ-азы в мембранах эритроцитов человека определяли по количеству АДФ, образуемой в результате гидролиза аденозинтрифосфата в сопряженной реакции с ПК и ЛДГ [Nørby, 1988]. Реакции имели следующий вид:



Индикаторной реакцией служила реакция, катализируемая ЛДГ. Степень окисления НАДН определяли спектрофотометрически при 340 нм при 37°C. Вначале определялась общая АТФ-азная активность пробы, затем измерение повторялось в присутствии оубаина – ингибитора Na^+/K^+ -АТФ-азы. К буферному раствору (30 мМ гистидин, рН 7,2, 130 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 4 мМ MgCl₂, 3 мМ АТФ, 1 мМ ФЕП, 0,2 мМ ЭГТА, 25 мкг/мл ПК и ЛДГ), содержащему или не содержащему 1 мМ оубаин, добавляли НАДН до 70-80% шкалы. Смесь

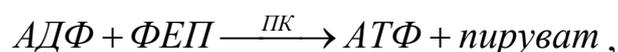
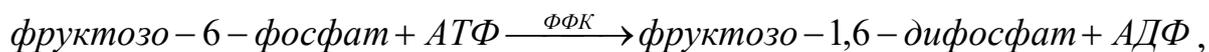
инкубировали 2 минуты в кювете для исключения неспецифического окисления НАДН компонентами реакционной смеси. Реакцию запускали добавлением мембран эритроцитов (0,05 мг/мл), которые предварительно были преинкубированы 2 минуты в сапонине (конечная концентрация 0,02%). Активность фермента определяли как разницу между значениями, полученными в присутствии и в отсутствие оуабаина. Активность фермента выражали в нмоль/мин•мг белка.

Активность гексокиназы (ГК, КФ 2.7.1.1) определяли спектрофотометрически по увеличению светопоглощения при 340 нм и 37°C при восстановлении НАДФ [Zammit and Newsholme, 1976]. Реакции имели вид:



Реакционная среда состояла из 50 мМ Трис-НСl буфера, рН 8,0, содержащего 10 мМ MgCl₂, 1 мМ НАДФ, 2 мМ АТФ, 20 мМ глюкозу и лизат эритроцитов (400 мкг Нб/мл среды). Реакцию запускали добавлением Г6ФДГ (12,5 мкг/мл). Активность фермента выражали в мкмоль/мин•г Нб.

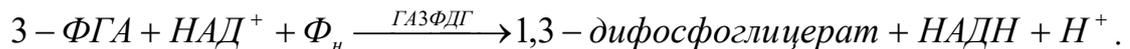
Активность фосфофруктокиназы (ФФК, КФ 2.7.1.11) измеряли по окислению НАДН при 340 нм и температуре 37°C в реакции, сопряженной с лактатдегидрогеназой и пируваткиназой [Ui and Sumi, 1982]:



Реакционная смесь объемом 2 мл состояла из буфера, содержащего 70 мМ Трис, рН 7,0, в который добавляли 1,4 мМ MgSO₄, 4,5 мМ KCl, 0,71 мМ ФЕП, 1,1 мМ АТФ, 10 мМ меркаптоэтанол, 0,2 мМ НАДН, 8 мкг/мл ЛДГ и ПК. Проба, добавляемая в реакционную смесь, содержала 600 мкг гемоглобина. Реакцию

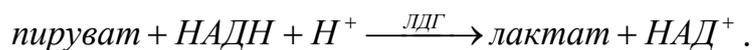
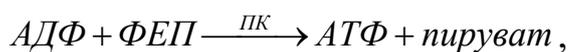
запускали добавлением фруктозо-6-фосфата натрия в конечной концентрации 1,8 мМ. Активность фермента выражали в мкмоль/мин•г Нв.

Активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАЗФДГ, КФ 1.2.1.12) определяли спектрофотометрически по увеличению светопоглощения при восстановлении НАД⁺ при 340 нм, температура определения 37°C [Steck *et al.*, 1974]. Реакция:



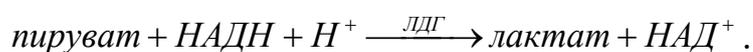
Реакционная смесь объемом 0,9 мл состояла из буфера, рН 8,4 (25 мМ пирогосфат натрия, 0,8 мМ цистеин), 13,3 мМ арсената натрия, 1 мМ НАД⁺, 1,7 мМ 3-ФГА (3-фосфоглицериновый альдегид), лизата (75 мкг Нв/мл реакционной смеси). Активность фермента выражали в мкмоль/мин•г Нв.

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



Реакционная среда содержала 20 мМ Трис-НСl буфер, рН 7,5, 0,5 мМ Na-ЭДТА, 100 мМ КСl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ β-меркаптоэтанол, ЛДГ (5 мкг/мл), 1 мМ НАДН, 5 мМ ФЕП, 1,5 мМ АДФ. Реакцию запускали добавлением лизата эритроцитов с количеством гемоглобина 300 мкг. Активность фермента выражали в мкмоль/мин•г Нв.

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



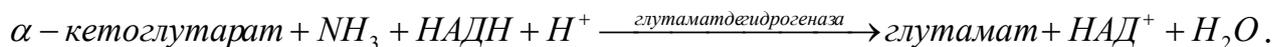
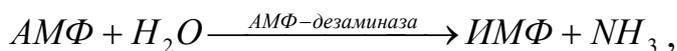
Реакционная среда содержала 50 мМ K₃PO₄, рН 7,4; 1 мМ пирувата натрия,

0,2 мМ НАДН. Реакцию запускали добавлением пробы с количеством гемоглобина 75 мкг. Активность фермента выражали в мкмоль/мин•г Нв.

Активность 5'-нуклеотидазы (5'-НТ, КФ 3.1.3.5) определяли по высвобождению фосфата в лизатах эритроцитов [Baginski *et al.*, 1974]. Пробу инкубировали в течение 20 мин при 37°C в буфере, содержащем 66,5 мМ Трис-НСl буфер, рН 7,4, 13,3 мМ MgCl₂, 2,5 мМ ИМФ. Реакцию останавливали добавлением раствора охлажденной трихлоруксусной кислоты, содержащей аскорбиновую кислоту, в конечной концентрации 7% и 1,4% соответственно. Затем пробы охлаждали и центрифугировали при 3000 g 5 мин при +4°C. К супернатанту в соотношении 1:0,5:1 добавляли 1% молибдат аммония и раствор, содержащий 2% арсенит натрия, 2% цитрат натрия, 2% СН₃СООН. Количество фосфата, образуемого в единицу времени, определяли спектрофотометрически по поглощению фосфомолибденового комплекса при 700 нм через 15 минут после добавления раствора, содержащего 2% арсенит натрия, 2% цитрат натрия, 2% СН₃СООН. Активность 5'-НТ выражали в мкмоль/мин•г Нв.

Активность АМФ-деаминазы (КФ 3.5.4.6) определяли спектрофотометрически по снижению поглощения НАДН при 340 нм при 37°C.

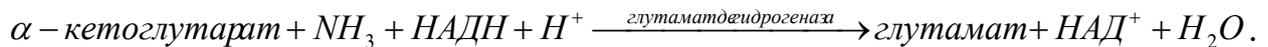
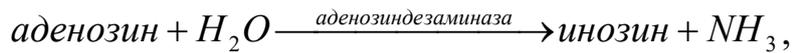
Реакции при определении:



Реакционная среда объемом 1 мл содержала 0,2 М КН₂РО₄ - буфер, рН 7,6, 100 мМ КСl, 6,5 мМ α-кетоглутарат, глутаматдегидрогеназу (0,1 мкг/мл), 0,16 мМ НАДН, 2 мМ АМФ. Реакцию запускали добавлением лизата эритроцитов с количеством гемоглобина 500 мкг. Активность фермента выражали в мкмоль/мин•г Нв.

Активность аденозиндеаминазы (КФ 3.5.4.4) определяли спектрофотометрически по снижению поглощения НАДН при 340 нм при 37°C.

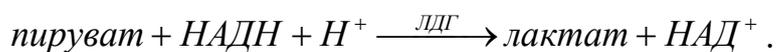
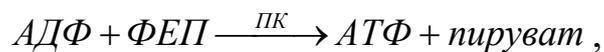
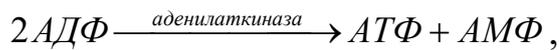
Реакции:



Реакционная среда объемом 1 мл содержала 0,2 М KH_2PO_4 - буфер, рН 7,6, 6,5 мМ α -кетоглутарат, глутаматдегидрогеназу (0,1 мкг/мл), 0,16 мМ НАДН, 1 мМ аденозин. Реакцию запускали добавлением лизата эритроцитов с количеством гемоглобина 500 мкг. Активность фермента выражали в мкмоль/мин•г Нб.

Активность аденилаткиназы (АК, КФ 2.7.4.3) определяли спектрофотометрически по снижению поглощения НАДН при 340 нм при 37°C в реакции, сопряженной с ПК и ЛДГ.

Реакции:



Реакционная среда объемом 1 мл содержала 70 мМ Трис-НСl буфер, рН 8,0; 4,5 мМ КСl, 5 мМ MgCl_2 , 0,71 мМ ФЕП, 1,1 мМ АТФ, 0,16 мМ НАДН, ПК (8 мкг/мл), ЛДГ (8 мкг/мл), лизат эритроцитов (150 мкг Нб). Реакцию запускали добавлением АМФ в конечной концентрации 1 мМ. Активность фермента выражали в мкмоль/мин•г Нб.

2.14. Определение концентрации метаболитов

Концентрацию глюкозы определяли по увеличению флуоресценции при образовании НАДФН ($\lambda=340$ нм, 25°C). Реакционная среда объемом 3 мл состояла из 70 мМ Na_2HPO_4 , рН 7,7, 4 мМ MgSO_4 , 1,6 мМ НАДФ^+ , 1,6 мМ АТФ, в который добавляли экстракт (25 мкл) эритроцитов, Г6ФДГ (23 мкг/мл). Реакцию запускали добавлением ГК (24 мкг/мл).

Концентрацию АТФ определяли по увеличению флуоресценции при образовании НАДФН ($\lambda=340$ нм, 25°C) [Trautschold *et al.*, 1985]. Реакционная среда объемом 3 мл состояла из 20 мМ Трис-НСl буфера, рН 7,5, содержащего 100 мМ КСl, 5 мМ MgCl_2 , 5 мМ глюкозу, 0,3 мМ НАДФ⁺, экстракт (25 мкл) эритроцитов, Г6ФДГ (23 мкг/мл). Реакцию запускали добавлением ГК (24 мкг/мл).

Концентрацию АДФ и АМФ определяли по снижению флуоресценции НАДН ($\lambda=340$ нм, 25°C). Реакционная среда объемом 3 мл состояла из 20 мМ Трис-НСl буфера рН 7,5, содержащего 100 мМ КСl, 5 мМ MgCl_2 , в который добавляли НАДН до конечной концентрации 2 мкМ, экстракт (50 мкл) эритроцитов, 0,1 мМ ФЕП, ЛДГ (50 мкг/мл). Для определения концентрации АДФ реакцию запускали добавлением ПК (50 мкг/мл). Для определения концентрации АМФ после ПК добавляли миокиназу (50 мкг/мл).

Концентрацию 2,3-ДФГ определяли с использованием коммерческого набора (Roche 10 148 334 001). Реакционная среда содержала 48 мМ триэтаноламиновый буфер, рН 7,6; 5,2 мМ ЕДТА, 5,3 мМ MgCl_2 , 100 мкМ гликолат-2-фосфат, 0,124 мМ НАДН, 0,518 мМ АТФ, 0,26 ед/мл фосфоглицератмутаза, 17,4 ед/мл фосфоглицераткиназа, 0,26 ед/мл ГАЗФДГ, 9,25 ед/мл триозофосфатизомеразы, 2,4 ед/мл глицерол-3-фосфатдегидрогеназы. Реакцию запускали добавлением 4 ед/мл фосфоглицератмутаза. Реакцию проводили при 340 нм и 25°C .

Концентрацию пирувата определяли по снижению флуоресценции НАДН при 340 нм при 25°C . Реакционная среда объемом 2,3 мл содержала 20 мМ Трис-НСl буфер, рН 7,5, 4 мкМ НАДН, экстракт (50 мкл) эритроцитов. Реакцию запускали добавлением ЛДГ (45 мкг/мл).

Концентрацию лактата определяли по увеличению флуоресценции при образовании АПАД при 340 нм, 25° С. Реакционная среда объемом 2,5 мл состояла из 100 мМ глицина, рН 9,4, 1,2 мМ АПАД, ЛДГ (60 мкг/мл). Реакцию запускали добавлением экстракта (100 мкл) эритроцитов.

2.15. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 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.

Глава 3. Результаты и обсуждение.

В экспериментах, проведенных ранее в нашей лаборатории, показано, что β -амилоидный пептид при инкубации с эритроцитами общей популяции вызывает лизис, степень которого зависит от времени инкубации, концентрации $A\beta$ и количества эритроцитов [Косенко *и др.*, 2008; Соломадин, 2012]. Однако популяция эритроцитов неоднородна, и факт наименьшей устойчивости старых эритроцитов к эндогенным и экзогенным патологическим факторам хорошо установлен в литературе [Bonsignore *et al.*, 1964]. Известно, что у пациентов с болезнью Альцгеймера в крови количество старых эритроцитов увеличено [Bosman *et al.*, 1998]. Механизмы ускоренного старения клеток при этом заболевании неизвестны, поэтому представляется интересным выяснить, будут ли старые клетки проявлять большую чувствительность к цитотоксическому действию амилоида.

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

3.1. Сравнительная характеристика эритроцитов разного возраста

На рис.8 и рис.9 показано, как изменяется активность ГПО, ГТ, СОД, каталазы и Г6ФДГ при старении клеток. Видно, что с возрастом эритроцита происходит достоверное снижение активности ГПО (на 24,5%), СОД (на 20,7%), ГТ (на 31,8%) (рис.8 а,б,в), тогда как активность каталазы (рис.8 г) изменяется недостоверно. Старение клеток сопровождается снижением активности и фермента пентозофосатного пути Г6ФДГ (на 32,2%) (рис.9).

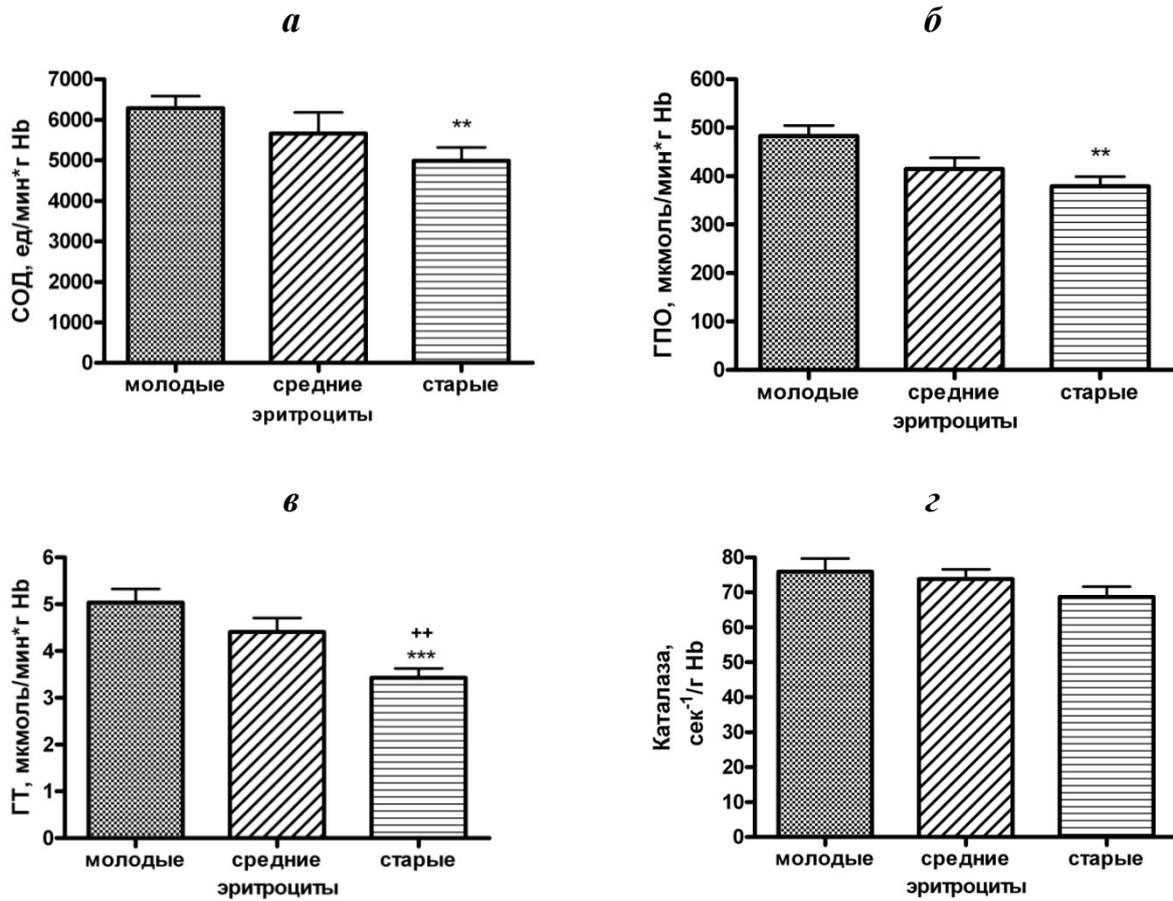


Рисунок 8. Активность СОД (*a*), ГПО (*б*), ГТ (*в*), каталазы (*г*) в разных возрастных фракциях эритроцитов крысы. СОД – супероксиддисмутаза, ГПО – глутатионпероксидаза, ГТ – глутатионтрансфераза. Нб – гемоглобин.

По оси ординат указана активность ферментов. За 1 единицу активности СОД принимали количество фермента, которое вызывало 50% торможение реакции восстановления п-нитротетразолиевого синего. Активность каталазы выражена в сек⁻¹/г Нб. Активность остальных ферментов выражена в мкмоль/мин*г Нб. N=16.

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,0001$ по сравнению с молодыми эритроцитами, ++ – $p < 0,001$ по сравнению с эритроцитами среднего возраста.

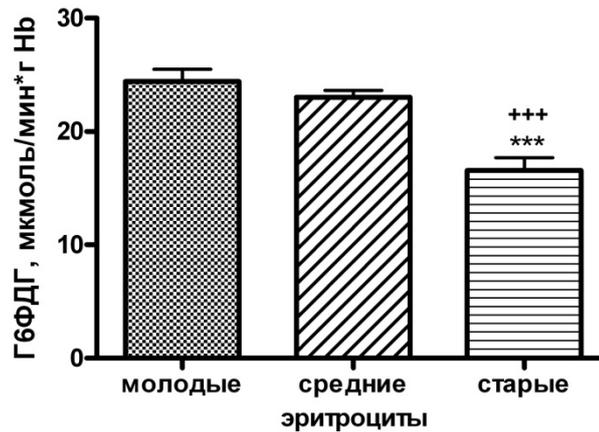


Рисунок 9. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) в разных возрастных фракциях эритроцитов крысы. Нб – гемоглобин. По оси ординат указана активность фермента, в мкмоль/мин*г Нб. N=16.

*** – $p < 0,0001$ по сравнению с молодыми эритроцитами,

+++ – $p < 0,0001$ 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.10 а, б, г), тогда как активность ГАЗФДГ и ЛДГ (рис.10 в, д) достоверно не изменялась. Кроме того, активность Na^+/K^+ -АТФ-азы в старых клетках уменьшалась почти на 70% (рис 10 е).

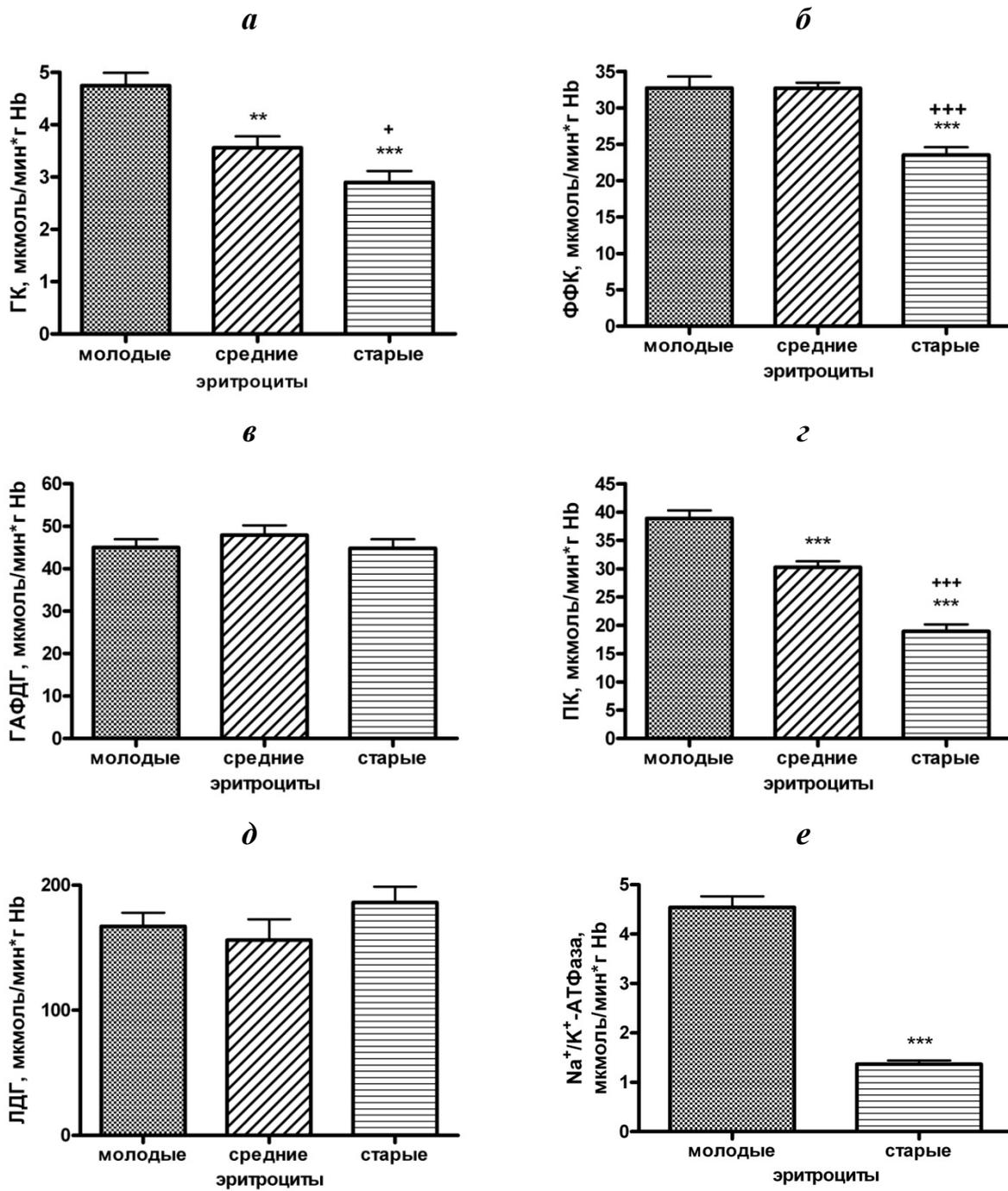


Рисунок 10. Активность ГК (а), ФФК (б), ГАФДГ (в), ПК (г), ЛДГ (д), Na⁺/K⁺-АТФазы (е) в разных возрастных фракциях эритроцитов крысы. ГК – гексокиназа, ФФК – фосфофруктокиназа, ГАФДГ – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, ПК – пируваткиназа, ЛДГ – лактатдегидрогеназа, Hb – гемоглобин. N=16.

По оси ординат указана активность ферментов, выраженная в мкмоль/мин*г Hb.

** – p<0,01, *** – p<0,0001 по сравнению с молодыми эритроцитами,

+ – p<0,05, +++ – p<0,0001 по сравнению с эритроцитами среднего возраста.

Старение эритроцитов сопровождалось значительным уменьшением активности ферментов обмена адениннуклеотидов 5'-НТ на 68%, АМФ-

дезаминазы на 51% и аденозиндезаминазы на 31%, тогда как активность аденилаткиназы снижалась недостоверно (рис. 11).

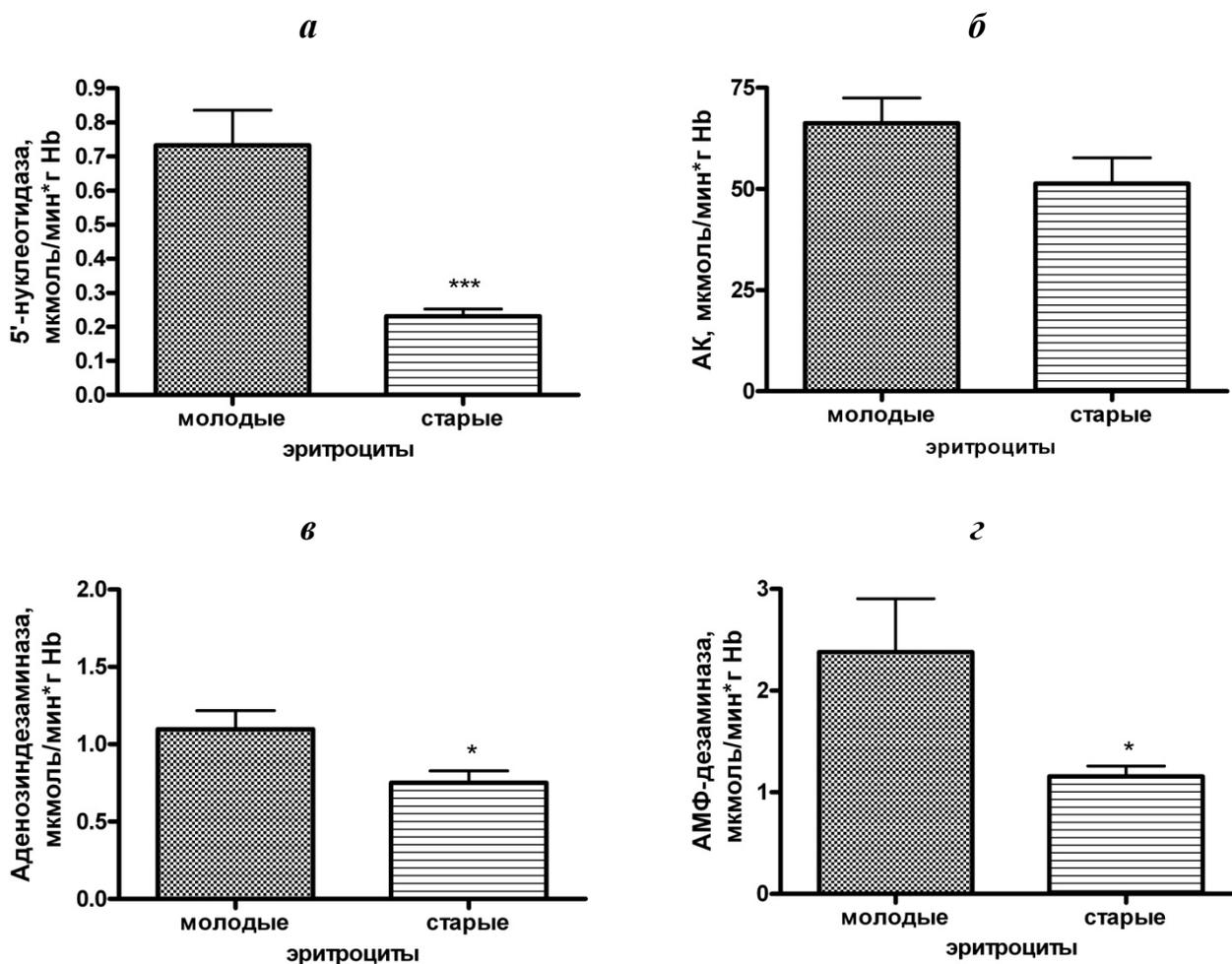


Рисунок 11. Активность 5'-нуклеотидазы (а), АК (б), аденозиндезаминазы (в), АМФ-дезаминазы (г) в разных возрастных фракциях эритроцитов крысы. АК – аденилаткиназа, Hb – гемоглобин. По оси ординат указана активность ферментов, выраженная в мкмоль/мин*г Hb. N=16.

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,0001$ по сравнению с молодыми эритроцитами.

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. 12). Несмотря на то, что концентрация АМФ не изменялась, сумма адениннуклеотидов была снижена на 17 % (рис. 12).

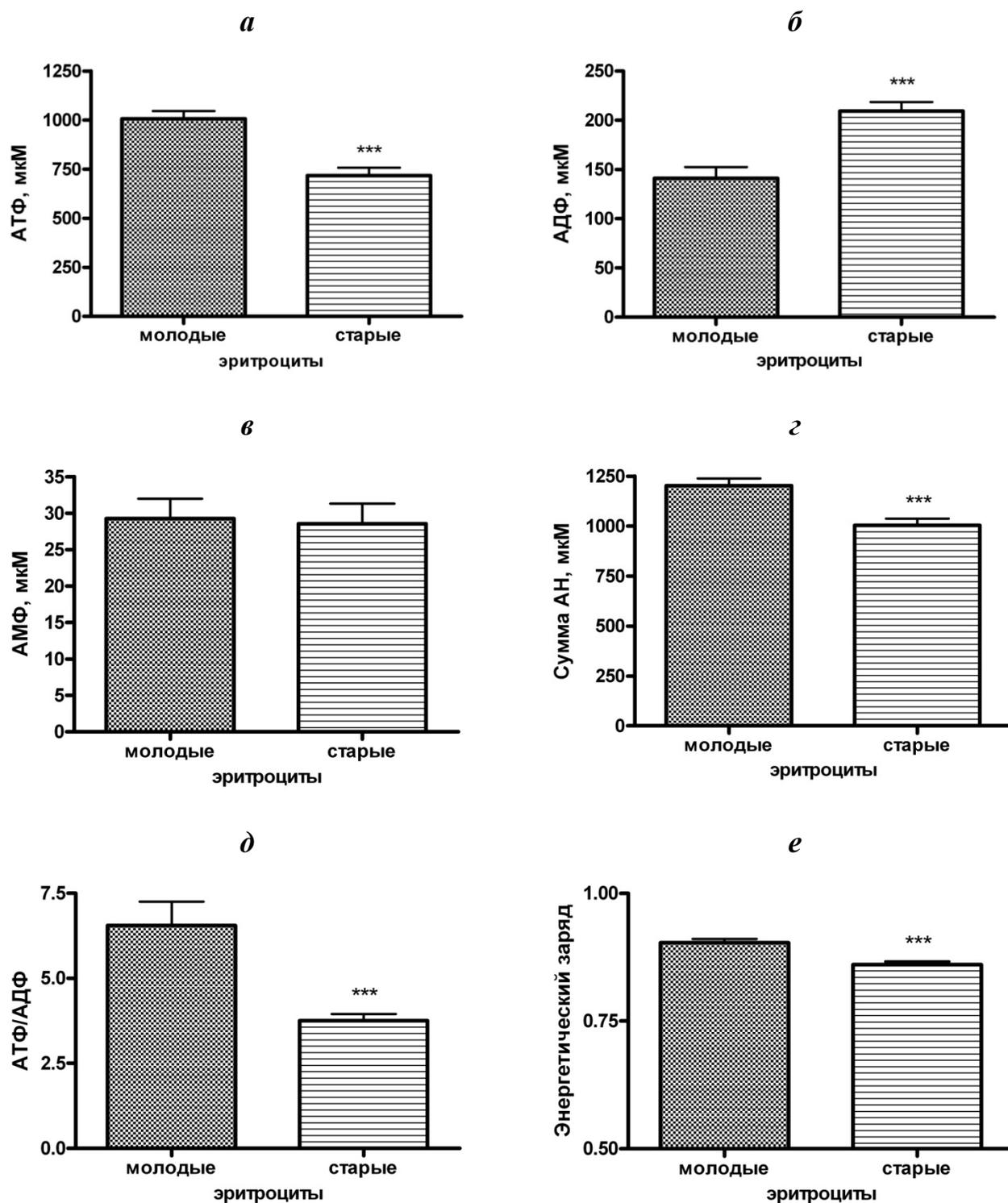


Рисунок 12. Концентрация АТФ (а), АДФ (б), АМФ (в), сумма АН (г), отношение АТФ/АДФ (д) и энергетический заряд клетки (е) в разных возрастных популяциях эритроцитов крысы. АН – адениннуклеотиды. Энергетический заряд (ЭЗ) рассчитывали по уравнению Аткинсона $\text{ЭЗ} = (\text{АТФ} + 0,5\text{АДФ}) / (\text{АТФ} + \text{АДФ} + \text{АМФ})$ [Atkinson, 1968]. Концентрация измеряемых показателей выражена в μM . N=16.

* – $p < 0,05$, *** – $p < 0,0001$ по сравнению с молодыми эритроцитами.

Помимо этого, старение клеток сопровождалось значительным снижением концентрации метаболита, определяющего сродство гемоглобина к кислороду, 2,3-ДФГ на 30% (рис. 13).

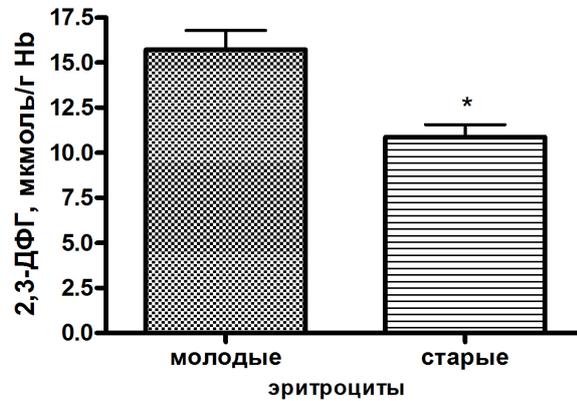


Рисунок 13. Концентрация 2,3-ДФГ (2,3-дифосфоглицерата) в молодых и старых эритроцитах крысы. Концентрация выражена в мкмоль/г Нб. Нб – гемоглобин. N=16.

* – $p < 0,05$ 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 [Nakao *et al.*, 1962; Seaman *et al.*, 1980; Glass, Gershon, 1984; Stocchi *et al.*, 1987; Fazi *et al.*, 1991]. 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.

3.2. $A\beta$ -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 АТФ, 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. 14 показано, как изменяется степень лизиса эритроцитов в зависимости от их возраста и концентрации $A\beta_{25-35}$.

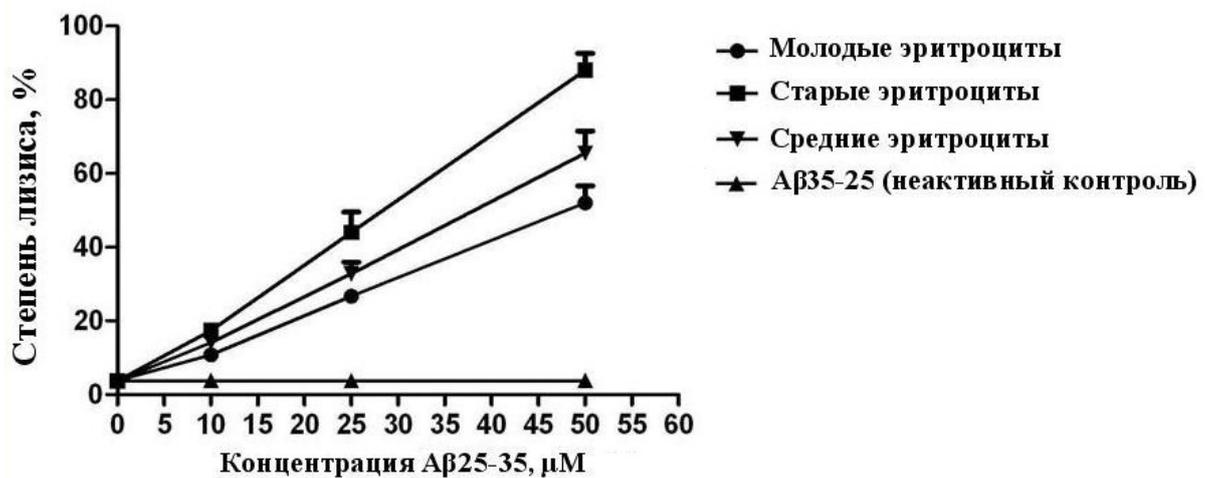


Рисунок 14. Зависимость степени лизиса разных возрастных популяций эритроцитов крысы от концентрации $A\beta_{25-35}$. Эритроциты в концентрации 15×10^7 кл/мл инкубировались в течение 30 минут при 25°C в среде, содержащей 140 мМ NaCl, 10 мМ $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, 5 мМ KCl, pH 7,4. 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 наиболее 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 $10.85\pm 0.72\%$ и $26.98\pm 1.47\%$ молодых клеток, $14.11\pm 1.48\%$ и $32.81\pm 3.11\%$ клеток среднего возраста и $18.46\pm 1.68\%$ и $44.05\pm 4.51\%$ старых клеток соответственно. Концентрация $A\beta_{25-35}$, 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 [Mattson *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. 15), 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.

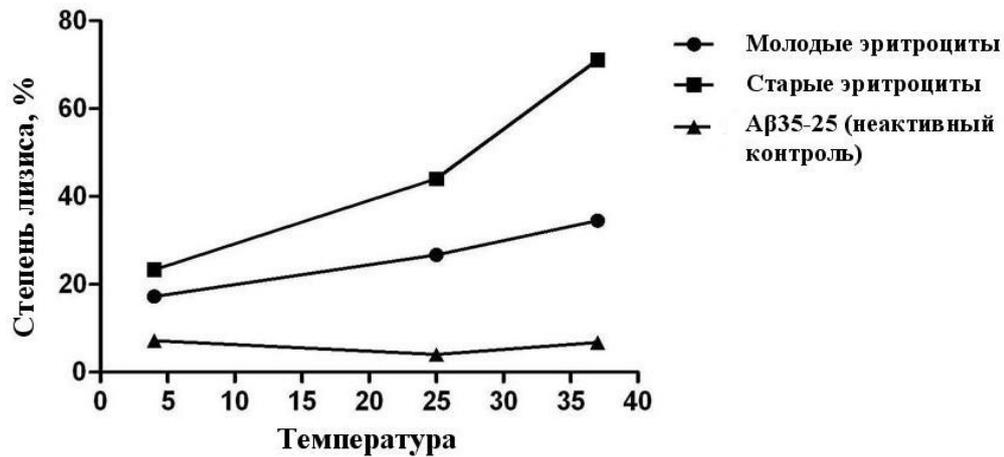


Рисунок 15. Зависимость степени лизиса молодых и старых эритроцитов крысы от температуры в присутствии 25мкМ Aβ₂₅₋₃₅. На рисунке представлены результаты типичного эксперимента. Остальные условия идентичны тем, которые приводятся в подписи к рисунку 14.

Для того, чтобы обнаружить предлизисные изменения в эритроцитах, происходящие при их контакте с Aβ₂₅₋₃₅ 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.

3.3. Влияние Aβ₂₅₋₃₅ на активность Na⁺/K⁺-АТФ-азы в эритроцитах разного возраста

Основным ферментом, обеспечивающим поддержание объема и формы клеток, является Na⁺/K⁺-АТФ-аза. Как уже было сказано, амилоидный пептид при взаимодействии с мембраной эритроцита образует поры/каналы, через которые в клетку могут поступать катионы Na⁺, поэтому было предположено, что в ответ на усиленное поступление этого катиона в клетку будет увеличиваться и активность Na⁺/K⁺-АТФ-азы. Действительно, под воздействием Aβ₂₅₋₃₅ активность этого

фермента увеличивалась и в молодых, и в старых клетках на 25% и 90% соответственно (рис. 16).

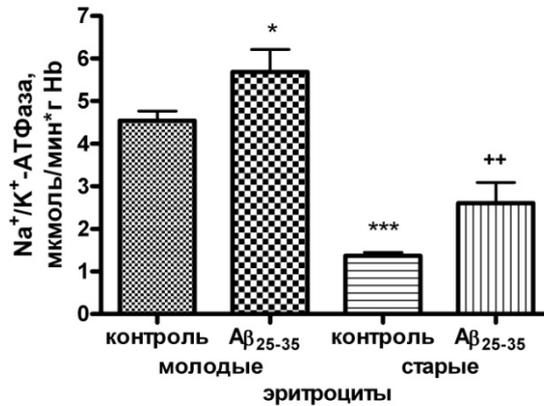


Рисунок 16. Активность Na⁺/K⁺-АТФазы в молодых и старых эритроцитах крысы под воздействием 25 мкМ Aβ₂₅₋₃₅. Эритроциты в концентрации 15×10^7 кл/мл инкубировались в течение 30 минут при 25 С в среде, содержащей 0,9% NaCl, 10мМ Трис, 5мМ KCl, рН 7,4. Контролем служили клетки, инкубированные с Aβ₃₅₋₂₅. Активность выражена в мкмоль/мин*г Hb. Hb – гемоглобин. 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⁺-АТФ-азы в старых эритроцитах не достигало уровня, характерного для контрольных молодых клеток.

Хорошо известно, что для работы Na⁺/K⁺-АТФ-азы необходима энергия АТФ, источником образования которой является глюкоза. Однако было обнаружено (рис. 17), что увеличение концентрации глюкозы в инкубационной среде до 10 мМ 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⁺-АТФ-азы.

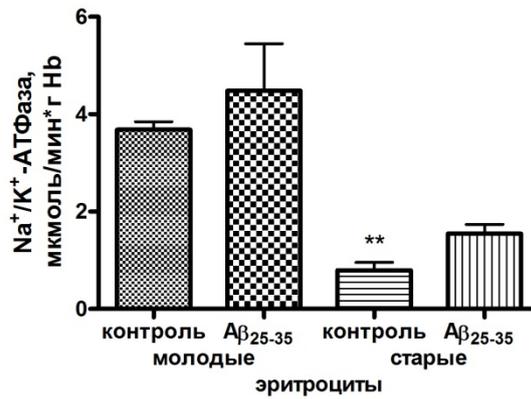


Рисунок 17. Активность Na⁺,K⁺-АТФ-азы в молодых и старых эритроцитах крысы под воздействием 25 мкМ Aβ₂₅₋₃₅. Эритроциты в концентрации 15 × 10⁷ кл/мл инкубировались в течение 30 минут при 25°С в среде, содержащей 0,9% NaCl, 10мМ Трис, 5мМ KCl, 5-10 мМ глюкозу, рН 7,4. Контролем служили клетки, инкубированные с нетоксичным Aβ₃₅₋₂₅. Активность выражена в мкмоль/мин*г Нб. Нб – гемоглобин. N=16.

** – p<0,01 по сравнению с контрольными молодыми эритроцитами.

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⁺-АТФ-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 Aβ₂₅₋₃₅ 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⁺-АТФ-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. 18 показано, как изменяется активность Na⁺/K⁺-АТФ-азы при инкубации эритроцитов с Aβ₂₅₋₃₅ в течение 4 часов.

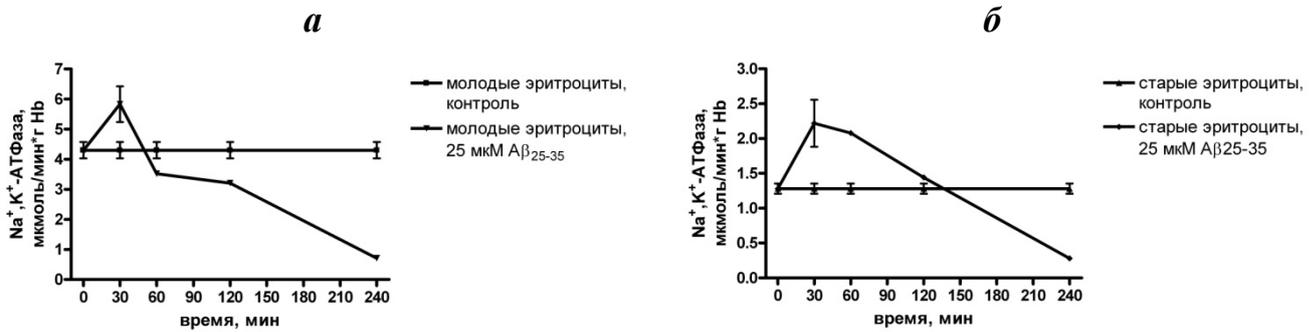


Рисунок 18. Активность Na^+/K^+ -АТФ-азы в молодых (а) и старых (б) эритроцитах крысы под воздействием 25 мкМ $\text{A}\beta_{25-35}$. Эритроциты в концентрации 15×10^7 кл/мл инкубировались в течение 30-240 минут при 25°C в среде, содержащей 0,9% NaCl , 10 мМ Трис, 5мМ KCl , 5 мМ глюкозу, рН 7,4. Контролем служили клетки, инкубированные с $\text{A}\beta_{35-25}$. Активность выражена в мкмоль/мин*г Нб. Нб – гемоглобин. N=16

Можно видеть, что тенденция к уменьшению активности фермента начинает проявляться через 60 мин, тогда как максимальное торможение происходит через 4 ч. Это согласуется с литературными 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 $\text{A}\beta_{25-35}$ с эритроцитами (42% и 74% для молодых и старых клеток соответственно, рис. 19).

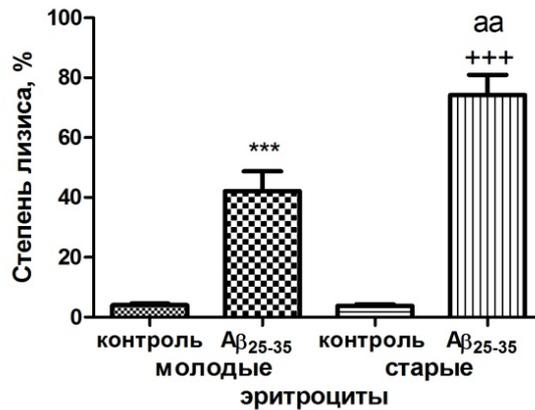


Рисунок 19. Степень лизиса молодых и старых эритроцитов крысы при инкубации с 25 мкМ Aβ₂₅₋₃₅ в течение 4 ч. Эритроциты в концентрации 15×10^7 кл/мл инкубировались при 25°C в среде, содержащей 140 мМ NaCl, 10мМ KН₂PO₄, 5мМ KCl, 5 мМ глюкозу, рН 7,4. Контролем служили клетки, инкубированные с нетоксичным Aβ₃₅₋₂₅. Степень лизиса эритроцитов определялась при $\lambda = 540$ нм. За 100% было принято поглощение гемоглобина, высвободившегося из такого же количества клеток при их лизисе в воде. N=16.

* – $p < 0,05$, *** – $p < 0,0001$ по сравнению с контрольными молодыми эритроцитами, ++ – $p < 0,01$, +++ – $p < 0,0001$ по сравнению с контрольными старыми эритроцитами, aa – $p < 0,01$ по сравнению с молодыми эритроцитами, инкубированными с Aβ₂₅₋₃₅.

Полученные данные свидетельствуют о том, что активность Na⁺/K⁺-АТФ-азы в эритроцитах под действием Aβ₂₅₋₃₅ изменяется бифазно. Уменьшение активности, которое наблюдается при длительной инкубации эритроцитов с амилоидами, может быть связано с нарушением взаимодействия Na⁺/K⁺-АТФ-азы с фосфатидилсерином [Roelofsen, van Deenen, 1973], что вызывает нарушение структуры мембраны и усиление лизиса клеток.

Таким образом, степень лизиса эритроцитов под действием Aβ₂₅₋₃₅ зависит от времени его контакта с клетками и от активности Na⁺/K⁺-АТФ-азы, поддерживающей ионный баланс по обе стороны мембраны и регулирующей объем клеток. Это согласуется с данными о том, что при торможении Na⁺/K⁺-АТФ-азы оубаином степень амилоид-зависимого лизиса эритроцитов значительно увеличивается [Соломадин и др., 2008].

3.4. Изменение концентрации адениннуклеотидов под действием $A\beta_{25-35}$

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 $A\beta_{25-35}$. Можно видеть (рис. 20), что под воздействием $A\beta_{25-35}$ 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.

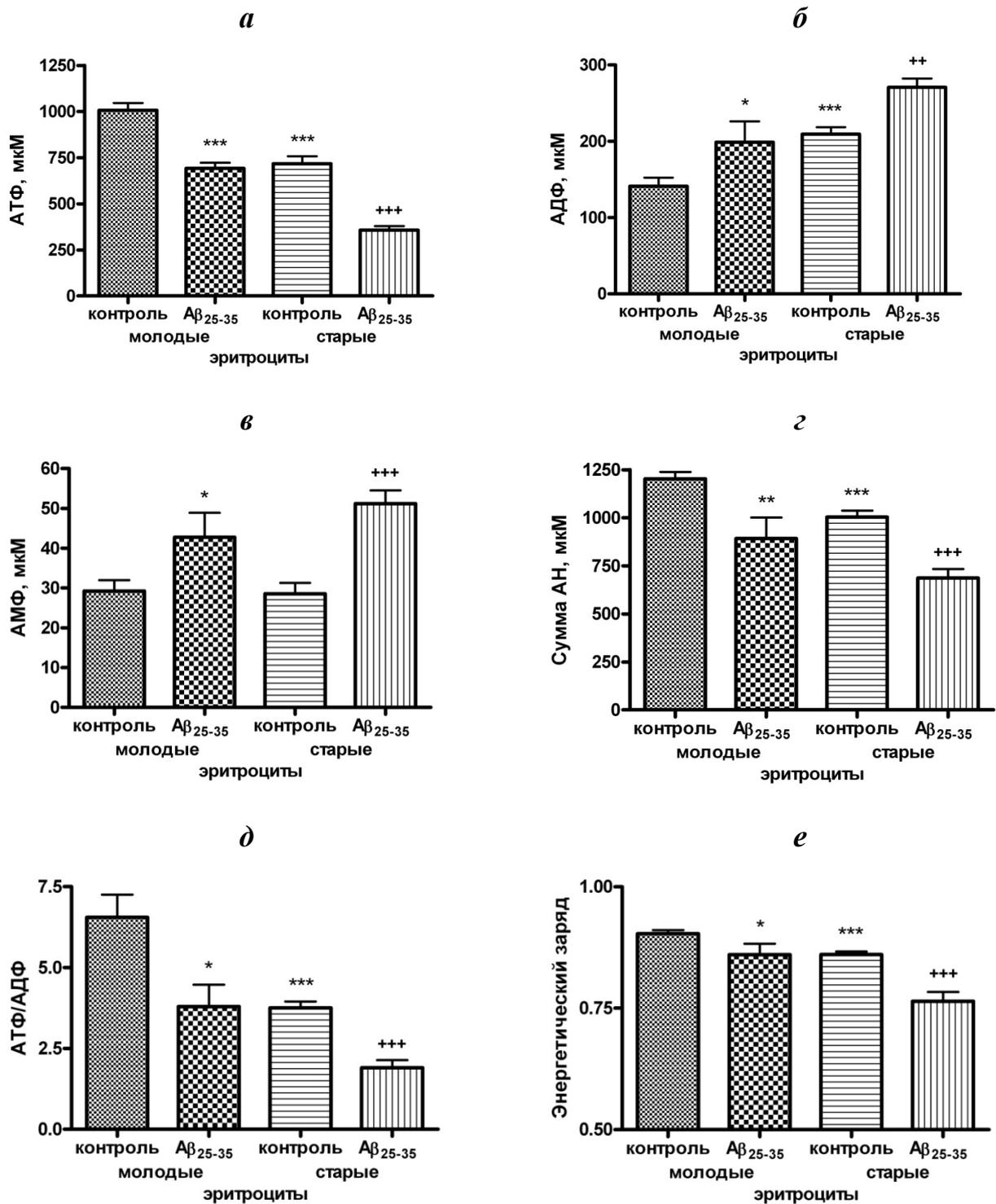


Рисунок 20. Концентрация АТФ (а), АДФ (б), АМФ (в), сумма АН (г), отношение АТФ/АДФ (д) и энергетический заряд (е) в молодых и старых эритроцитах крысы под воздействием 25 мкМ $A\beta_{25-35}$. Эритроциты в концентрации 15×10^7 кл/мл инкубировались в течение 30 минут при 25 °С в среде, содержащей 0,9% NaCl, 10мМ KH_2PO_4 , 5мМ KCl, pH 7,4. Контролем служили клетки, инкубированные с нетоксичным $A\beta_{35-25}$. АН – адениннуклеотиды. Энергетический заряд (ЭЗ) рассчитывали по уравнению Аткинсона $ЭЗ = (АТФ + 0,5АДФ) / (АТФ + АДФ + АМФ)$ [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.

Аденилатный энергетический заряд клетки (ЭЗ) – важный индикатор метаболического состояния клетки. Его значение находится в пределах от 0, когда общий пул нуклеотидов представлен исключительно АМФ, до 1, когда все нуклеотиды присутствуют в форме АТФ. Гомеостаз энергетического заряда строго контролируется, в норме его значение составляет 0,8 – 0,9. Снижение ЭЗ свидетельствует о влиянии негативных факторов, индуцирующих расход энергии, направленный на поддержание работы защитных механизмов [Baranowska-Bosiacka *et al.*, 2004]. Обнаруженное снижение энергетического заряда под воздействием $A\beta_{25-35}$ в клетках обоих типов, но более выраженное в старых клетках, свидетельствует о том, что в старых клетках катаболические процессы под влиянием $A\beta_{25-35}$ усиливаются в большей степени.

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]. Чтобы определить вклад вышеупомянутых ферментов в поддержание соотношения адениннуклеотидов, мы определили активность АК, 5'-НТ, АМФ-дезаминазы и аденозиндезаминазы в эритроцитах разного возраста при их контакте с $A\beta_{25-35}$. Однако мы обнаружили, что достоверного изменения активности данных ферментов в эритроцитах при их взаимодействии с $A\beta_{25-35}$ не происходит (рис. 21). Это свидетельствует о том, что в данных экспериментальных условиях аденилаткиназная реакция играет незначительную роль в восстановлении концентрации АТФ.

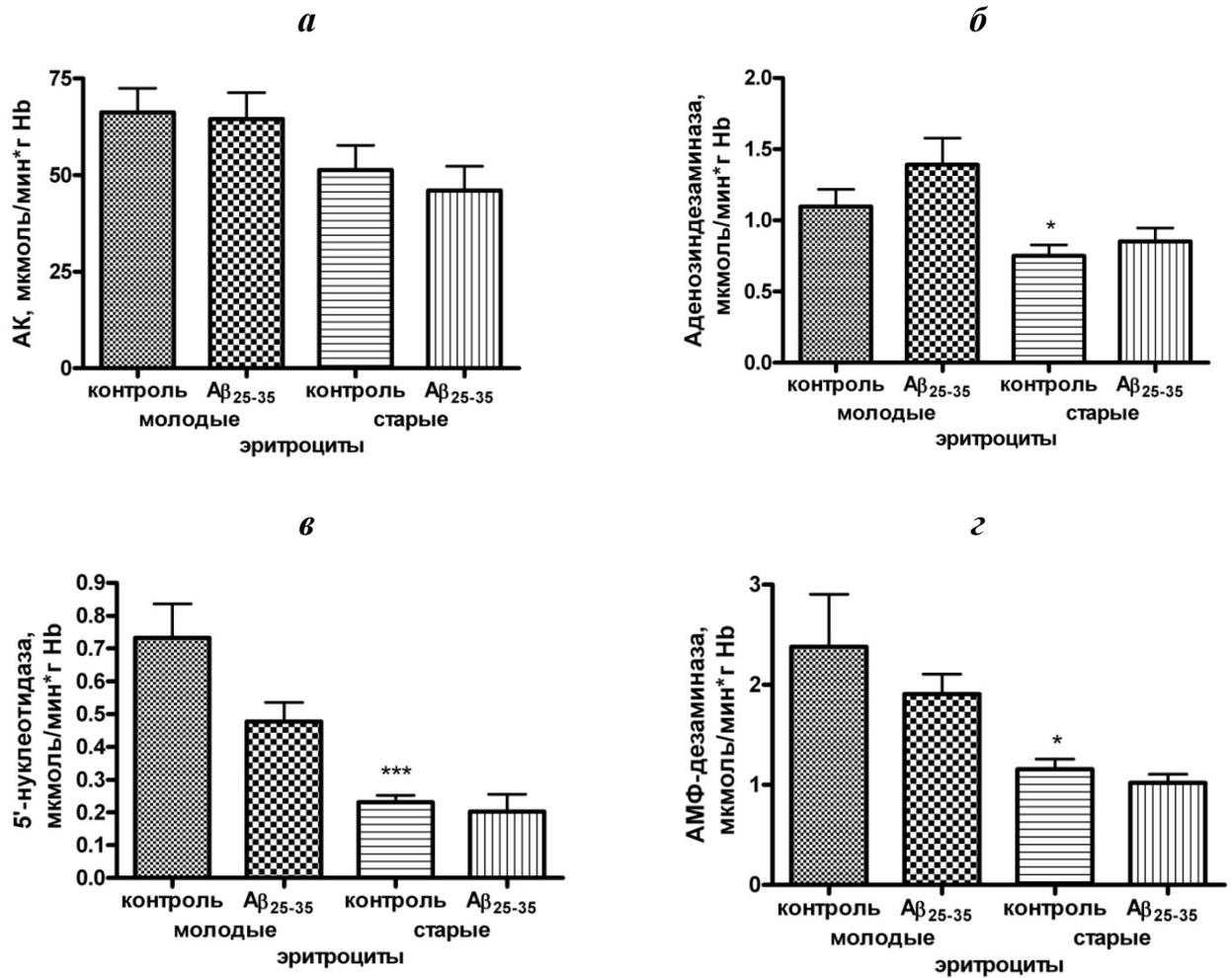


Рисунок 21. Активность АК (а), аденозиндезаминазы (б), 5'-нуклеотидазы (в), АМФ-дезаминазы (г) в молодых и старых эритроцитах крысы под воздействием 25 мкМ Aβ₂₅₋₃₅. Эритроциты в концентрации 15×10^7 кл/мл инкубировались в течение 30 минут при 25°C в среде, содержащей 0,9% NaCl, 10мМ KН₂PO₄, 5мМ KCl, pH 7,4. Контролем служили клетки, инкубированные с нетоксичным Aβ₃₅₋₂₅. Активность ферментов выражена в мкмоль/мин*г Hb. АК – аденилаткиназа, Hb – гемоглобин. N=16.

* – $p < 0,05$, *** – $p < 0,0001$ по сравнению с контрольными молодыми эритроцитами.

Известно, что от концентрации АТФ зависит форма эритроцитов, и уменьшение ее концентрации под воздействием амилоидного пептида может быть одной из причин потери клетками дисковидной формы и возникновения аномальных шиповидных выростов на мембране [Соломадин *и др.*, 2008]. Механизм образования эритроцитов аномальной формы под воздействием амилоидных пептидов доподлинно неизвестен. Однако показано, что при снижении концентрации АТФ в клетке происходит дефосфорилирование полифосфоинозитидов эритроцитарной мембраны, которое нарушает взаимодействия между гликофоорином и белком полосы 4.1, и способствует

появлению шиповидных отростков на мембране [Smith, 1987]. Если происходит восстановление концентрации АТФ, полифосфоинозитиды рефосфорилируются и клетка принимает нормальную дисковидную форму. Шиповидные выросты также могут формироваться при увеличении концентрации кальция в цитоплазме эритроцитов [Smith, 1987], что также согласуется с тем фактом, что взаимодействие амилоидных пептидов с эритроцитами может приводить к увеличению концентрации кальция и увеличению активности Ca^{2+} -АТФазы в клетках [Engström *et al.*, 1995]. Кальций активирует фосфолипазу С, которая расщепляет полифосфоинозитиды. Поскольку эритроциты не могут их синтезировать *de novo*, этот процесс вызывает постоянную потерю фосфоиноzitола и необратимую в конечном итоге утрату нормальной формы эритроцита [Smith, 1987].

Кроме того, эритроциты способны выделять в плазму АТФ, которая, связываясь с P2Y-рецепторами (подкласс пуринергических рецепторов для АТФ и АДФ) на поверхности эндотелиальных клеток и активируя их, вызывает образование и высвобождение оксида азота (NO). NO – вазодилататор и способствует расслаблению окружающих гладкомышечных клеток. Это приводит к увеличению диаметра капилляров и возрастанию кровотока [Wan *et al.*, 2011], следовательно, к увеличению снабжения тканей кислородом. Напротив, снижение концентрации АТФ затрудняет проникновение эритроцитов в капилляры, что может быть одной из причин возникновения гипоксии в тканях.

Таким образом, обнаруженное нами амилоид-индуцированное снижение концентрации АТФ в эритроцитах может приводить к различным патологическим последствиям как для самой клетки, так и для организма в целом, и в частности, к неадекватному снабжению тканей кислородом.

3.5. Влияние $A\beta_{25-35}$ 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. 22. Видно, что под воздействием $A\beta_{25-35}$ 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% соответственно, тогда как активность ГК уменьшалась незначительно, а активность ЛДГ, фермента заключительной стадии анаэробного гликолиза, достоверно не изменялась.

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 АТФ 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 АТФ в эритроцитах, которое мы наблюдали в экспериментальных условиях.

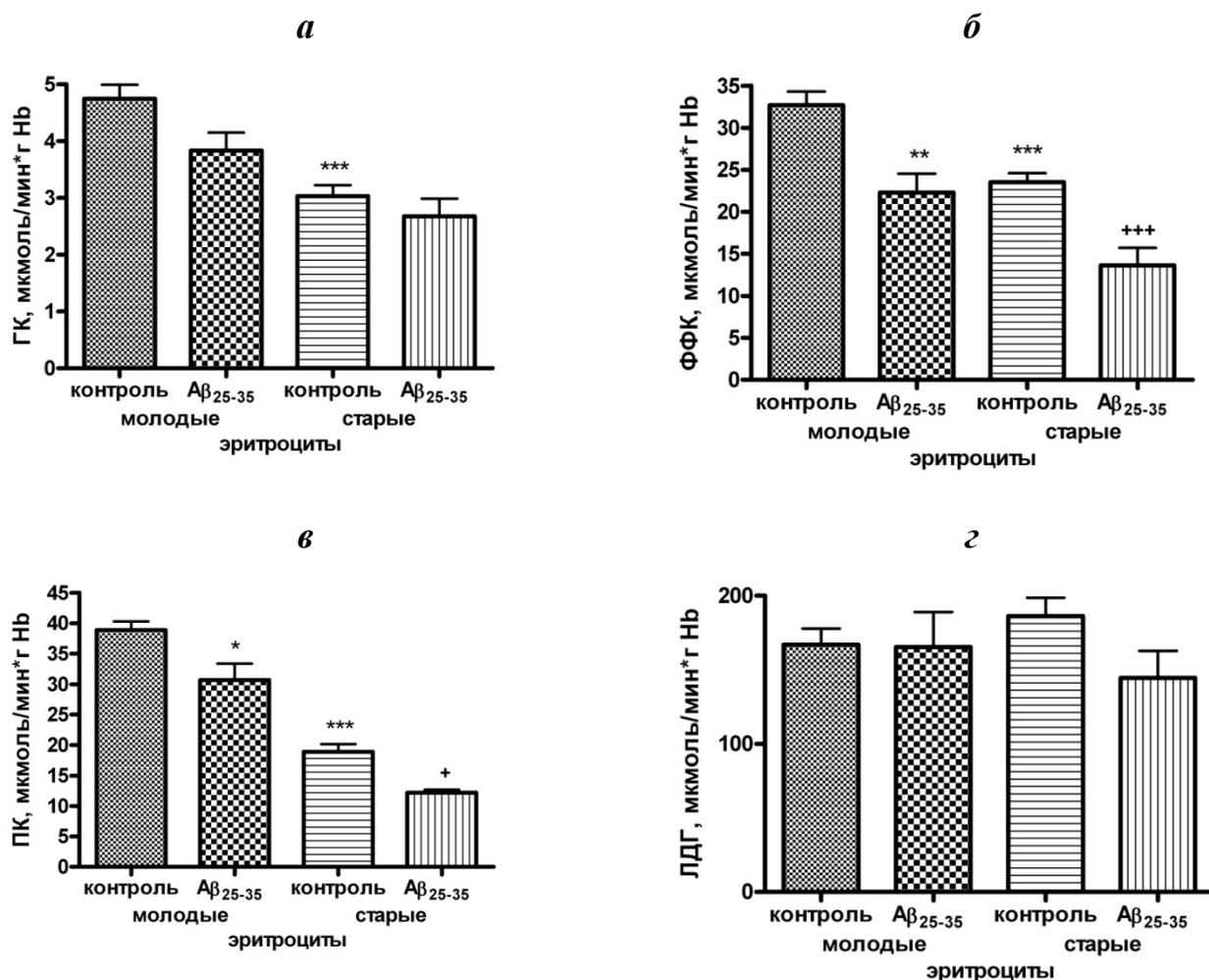


Рисунок 22. Активность ГК (а), ФФК (б), ПК (в), ЛДГ (г) в молодых и старых эритроцитах крысы под воздействием 25 мкМ Aβ₂₅₋₃₅. Эритроциты в концентрации 15×10^7 кл/мл инкубировались в течение 30 минут при 25°C в среде, содержащей 0,9% NaCl, 10мМ KН₂РO₄, 5мМ KCl, рН 7,4. Контролем служили клетки, инкубированные с нетоксичным Aβ₃₅₋₂₅. ГК – гексокиназа, ФФК – фосфофруктокиназа, ПК – пируваткиназа, ЛДГ – лактатдегидрогеназа. Активность выражена в мкмоль/мин*г Hb. Hb – гемоглобин. 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.

3.6. Концентрация 2,3-ДФГ в молодых и старых эритроцитах под воздействием Aβ₂₅₋₃₅

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 Aβ₂₅₋₃₅ 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. 23). Было обнаружено, что при контакте $A\beta_{25-35}$ с клетками происходит достоверное уменьшение уровня 2,3-ДФГ вне зависимости от возраста клеток, причем уменьшение этого метаболита в старых клетках под воздействием $A\beta_{25-35}$ по отношению к интактным молодым эритроцитам достигало почти 50%. Низкая концентрация этого метаболита ослабляет способность эритроцитов отдавать кислород, что может приводить к тканевой гипоксии [McCully *et al.*, 1999]. Поэтому уменьшение концентрации этого метаболита под воздействием амилоидного пептида имеет особое значение именно применительно к БА, поскольку гипоксия является характерным признаком этого заболевания [Liang *et al.*, 2008; Naхby *et al.*, 1986]. Кроме 2,3-ДФГ, на сродство гемоглобина к кислороду могут влиять и другие факторы, например, рН, 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 типах энзимопатий, характеризующихся сниженной активностью гликолитических ферментов в эритроцитах [Valentine *et al.*, 1985; McCully *et al.*, 1999].

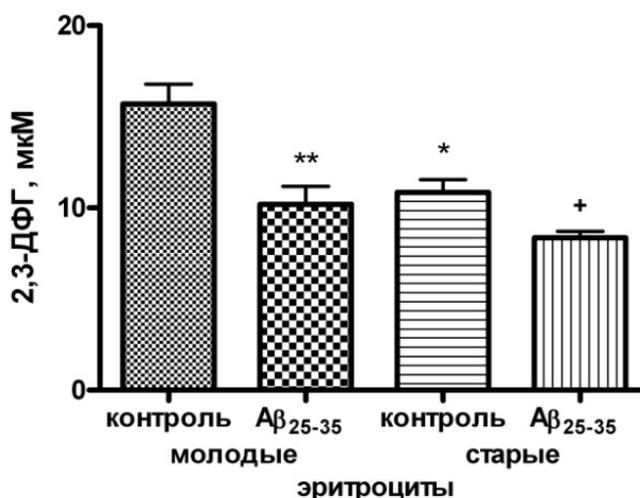


Рисунок 23. Концентрация 2,3-ДФГ в молодых и старых эритроцитах крысы под воздействием 25 мкМ Aβ₂₅₋₃₅. Эритроциты в концентрации 15×10^7 кл/мл инкубировались в течение 30-240 минут при 25°C в среде, содержащей 0,9% NaCl, 10мМ КН₂РО₄, 5мМ КСl, рН 7,4. Контролем служили клетки, инкубированные с нетоксичным Aβ₃₅₋₂₅. 2,3-ДФГ – 2,3-дифосфоглицерат. Концентрация выражена в мкмоль/г Нб. Нб – гемоглобин. N=16.

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по сравнению с контрольными молодыми эритроцитами;

+ – $p < 0,05$ по сравнению со старыми контрольными эритроцитами.

3.7. Активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах разного возраста под действием Aβ₂₅₋₃₅

В связи с тем, что имеется прямая взаимосвязь между активностью гликолитической системы и образованием кофакторов, необходимых для поддержания активности основных антиокислительных ферментов в клетках, следующим этапом нашей работы было выяснение действия Aβ₂₅₋₃₅ на систему антиоксидантной защиты клеток.

Было обнаружено (рис. 24), что Aβ₂₅₋₃₅ ингибирует основные антиокислительные ферменты, причем торможение в основном усиливалось с возрастом клеток.

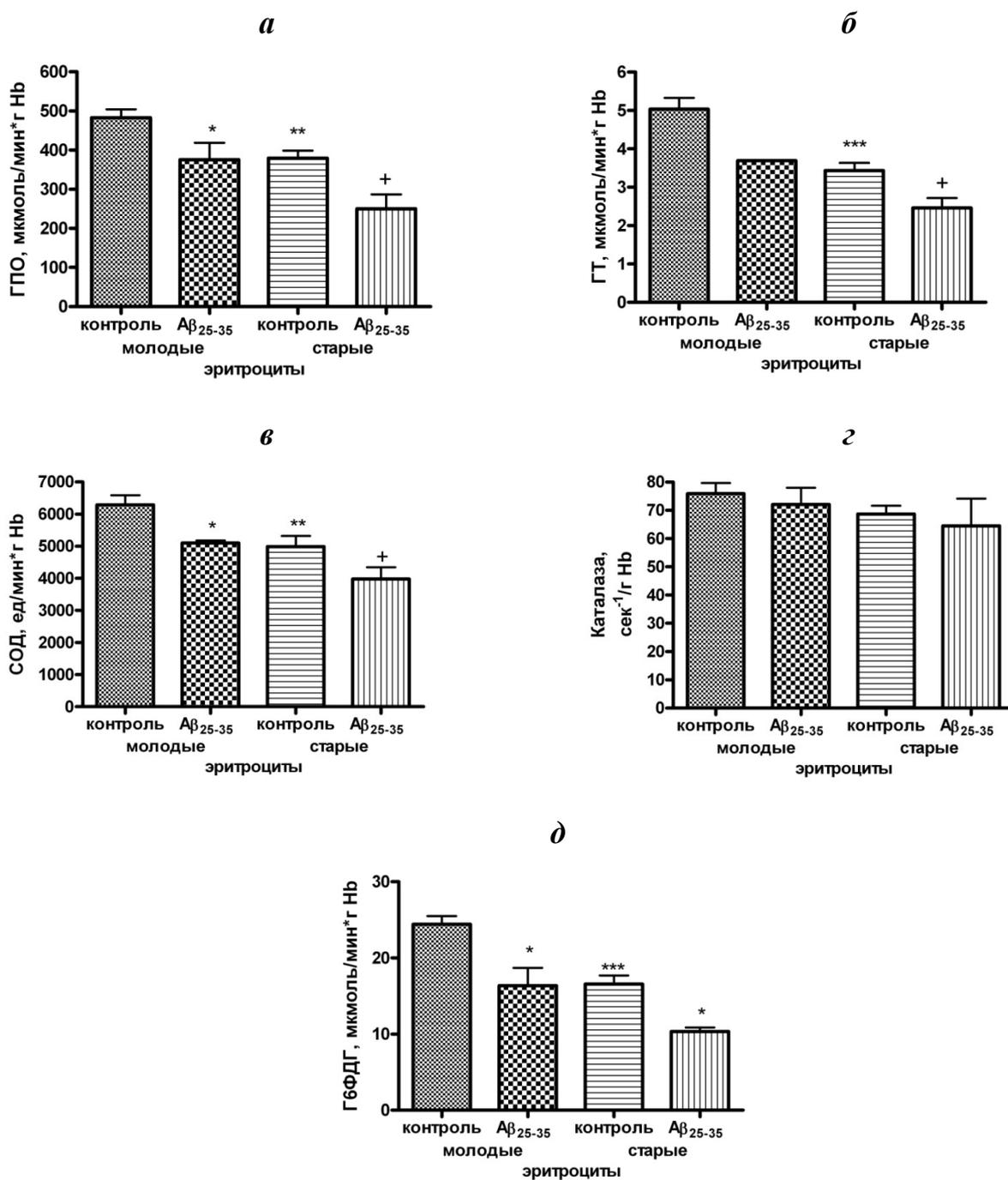


Рисунок 24. Активность ГПО (а), ГТ (б), СОД (в), каталазы (г) и Г6ФДГ (д) молодых и старых эритроцитах крысы под воздействием 25 мкМ Aβ₂₅₋₃₅. Эритроциты в концентрации 15×10^7 кл/мл инкубировались в течение 30 минут при 25°С в среде, содержащей 0,9% NaCl, 10мМ КН₂РО₄, 5мМ КСl, рН 7,4. Контролем служили клетки, инкубированные с нетоксичным Aβ₃₅₋₂₅.

ГПО – глутатионпероксидаза, ГТ – глутатионтрансфераза, СОД – супероксиддисмутаза, Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа. За 1 единицу активности СОД принимали количество фермента, которое вызывало 50% торможение реакции восстановления п-нитротетразолиевого синего. Активность каталазы выражена в сек⁻¹/г Нб. Активность остальных ферментов выражена в мкмоль/мин*г Нб. Нб – гемоглобин. N=16.

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,0001$ по сравнению с контрольными молодыми эритроцитами;

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

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 ГбФДГ, фермент пентозофосфатного пути (33% в молодых и 38% в старых эритроцитах), регулирующий концентрацию НАДФН, участвующего в реакциях, катализируемых глутатионредуктазой и ГПО.

Ранее нами было показано, что эритроциты пациентов с БА характеризуются сниженной антиокислительной активностью, что приводило к значительному накоплению перекиси водорода и гидроперекисей. Совместно наши данные показывают, что в эритроцитах 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*.

Возникновение окислительного стресса в клетках может приводить к многочисленным нарушениям в эритроцитах, в частности, к повреждению цитоскелета эритроцитов, стабильности мембраны, нарушению способности к деформации, инверсии фосфатидилсерина на внешнюю поверхность мембраны [Mandal *et al.*, 2002], к старению эритроцитов и их преждевременному удалению из кровяного русла [Smith, 1987].

Действительно, как показывают наши данные, контакт молодых эритроцитов с амилоидом даже в течение короткого времени приводит к изменениям, характерным для старых клеток. Так, взаимодействие амилоида с молодыми клетками вызывает снижение концентрации АТФ до уровня, характерного для старых интактных клеток (рис. 20 а). Аналогичным образом выравнивается концентрация АДФ (рис. 20 б), сумма адениннуклеотидов (рис. 20 г), отношение АТФ/АДФ (рис. 20 д), энергетический заряд (рис. 20 е), концентрация 2,3ДФГ (рис. 23). Активность ферментов гликолиза и ферментов-антиоксидантов в молодых эритроцитах под воздействием $A\beta_{25-35}$ также уменьшается до активности, обнаруженной в старых интактных клетках.

Например, такое изменение характерно для ФФК (рис. 22 б), ГПО (рис. 24 а), ГТ (рис. 24 б), СОД (рис. 24 в) и Г6ФДГ (рис. 24 д).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что молодые эритроциты при контакте с амилоидом быстро стареют, что определяется по степени нарушений показателей энергетического обмена и антиокислительной системы, которые становятся соизмеримыми с нарушениями, характерными для старых контрольных эритроцитов.

Эти данные находятся в полном соответствии с известными данными о том, что для пациентов с БА характерно ускоренное старение эритроцитов в кровотоке [Bosman *et al.*, 1991б].

Наши исследования показали также, что эритротоксичность амилоида в значительной степени зависит от метаболических / энергетических процессов, протекающих в эритроцитах. Нативные старые клетки, характеризующиеся сниженной метаболической активностью (уменьшение активности ключевых ферментов гликолиза и других метаболических путей, ферментов-антиоксидантов, снижение суммы адениннуклеотидов, энергетического заряда, концентрации 2,3-ДФГ), оказались наиболее чувствительными к токсическому действию амилоида. Так, при любых используемых условиях инкубации (разная концентрация $A\beta_{25-35}$, время инкубации, температура) степень лизиса старых клеток в 1,5-2 раза была выше, по сравнению с молодыми эритроцитами. При этом происходило более выраженное изменение концентрации АТФ (рис. 20 а), АМФ (рис. 20 в), суммы адениннуклеотидов (рис. 20 г), активности ФФК (рис. 22 б), ПК (рис. 22 в), ГПО (рис. 24 а) и других показателей. Учитывая литературные данные о том, что наименьшая устойчивость старых клеток *in vivo* к эндогенным патологическим факторам связана со сниженной скоростью метаболических, энергетических путей [Bonsignore *et al.*, 1964; Shinozuka *et al.*, 1994], можно предположить, что амилоидный пептид является мощным гемолитическим агентом для эритроцитов всех популяций, но в большей степени для старых клеток.

3.8. Изменение некоторых показателей энергетического обмена в эритроцитах пациентов с БА

Следующий этап работы был выполнен на эритроцитах пациентов с БА и людей контрольных групп. Исследование было проведено совместно с Больницей Пущинского Научного Центра РАН (БПНЦ РАН). В таблице 1 представлены результаты клинического и биохимического анализов крови пациентов и лиц контрольных групп. Можно видеть, что все показатели крови в группе БА не отличаются от данных, полученных на крови людей контрольных групп молодого (МК) и пожилого (ПК) возраста. Показатели, относящиеся непосредственно к эритроцитам: средний объем эритроцитов, средняя концентрация гемоглобина в эритроците, СОЭ (не показано), количество эритроцитов, гематокрит, концентрация гемоглобина в крови, также не отличались между участниками всех исследуемых групп. Эти данные, в основном, совпадают с литературными данными [Razay, Wilcock, 1994; Bourdel-Marchasson et al., 2001; Wang et al., 2004; Chang et al., 2007] и свидетельствуют о том, что по клиническому и биохимическому анализу крови, как правило, сложно выявить достоверные отличия между показателями здоровых людьми и пациентов с деменцией.

Таблица 1. Клинические и биохимические параметры обследуемых людей. Данные были получены в клинико-диагностической лаборатории БПНЦ РАН.

Клинические параметры	«Молодой контроль»	«Пожилой контроль»	Пациенты с БА
Средний возраст, годы	33,3±3,3	76,8±3,0	75±2,6
Соотношение полов (Ж:М)	10:4	10:4	7:5
Индекс массы тела, кг/м ²	24,65±1,065	22,39±0,909	21,35±0,906
Глюкоза, мМ	4,08±0,153	5,14±0,239	4,82±0,270
Мочевина, мМ	6,23±0,414	6,33±0,461	7,66±0,911
Креатинин, мкМ	74,4±5,490	81,3±3,432	83,7±6,525
Общий холестерин, мМ	3,50±0,24	4,98±0,60	5,04±0,39
Количество эритроцитов, 10 ¹² кл/л	4,51±0,07	4,44±0,22	4,73±0,21
Количество лейкоцитов, 10 ⁹ кл/л	6,73±1,2	6,43±0,9	6,72±0,8
Гемоглобин, г/л	142±3	139±7	147±9
Гематокрит, %	40,9±0,9	41,1±1,5	42,2±2,0
Аспартатамино-трансфераза, ед/л	20±3	22,4±4,1	16,2±3,1
Аланинамино-трансфераза, ед/л	22,2±3,4	17,9±4,7	18,8±4,7

Исследования, проведенные нами на эритроцитах пациентов с БА, напротив, позволили выявить неизвестные ранее изменения, характеризующие состояние энергетического обмена клеток и ответственные за поддержание их функционального состояния. Так, на рисунке 25 показано, как изменяется активность регуляторных ферментов гликолиза в эритроцитах человека с возрастом и при БА. Видно, что активность ГК, ФФК и ПК 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^+/K^+ -АТФ-азы (рис. 25 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 [Mohanty *et al.*, 2008, 2010], и усиление входа Na^+ в эритроциты [Diamond *et al.*, 1983]. По-видимому, активацию Na^+/K^+ -АТФ-азы и усиление гликолиза, происходящие в эритроцитах пациентов, следует рассматривать как адаптивную реакцию, направленную на поддержание ионного гомеостаза и предотвращения усиленного входа Na^+ и воды в клетки [Cumberbatch *et al.*, 1981].

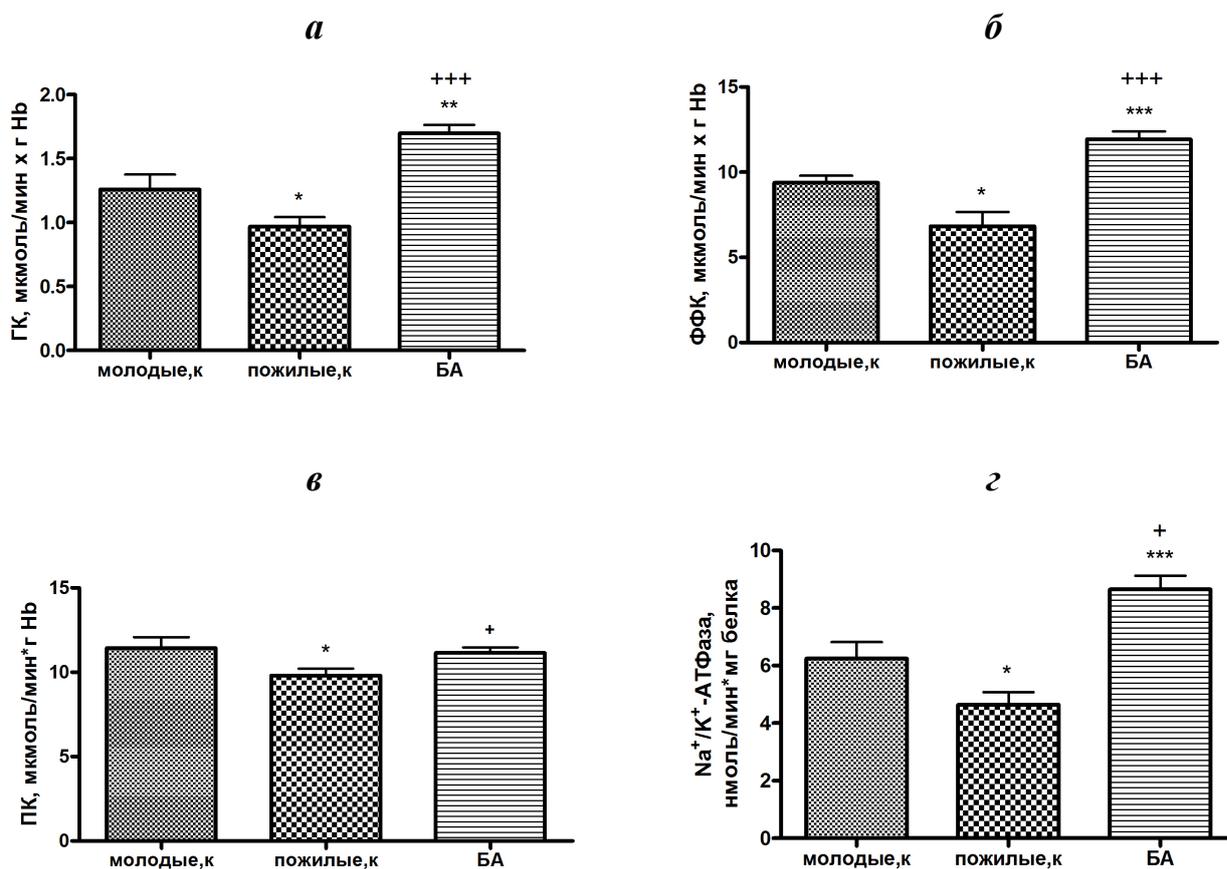


Рисунок 25. Активность ГК (а), ФФК (б), ПК (в) и Na^+/K^+ -АТФ-азы (г) в эритроцитах пациентов и людей контрольных групп. Молодые,к – контрольная группа людей молодого возраста ($33,3 \pm 3,3$ года), пожилые,к – контрольная группа людей пожилого возраста ($76,8 \pm 3,0$ лет), БА – пациенты с болезнью Альцгеймера ($75 \pm 2,6$ лет). ГК – гексокиназа, ФФК – фосфофруктокиназа, ПК – пируваткиназа. Активность Na^+/K^+ -АТФ-азы выражена в нмоль/мин*мг белка, активность остальных ферментов – в мкмоль/мин*г Hb. Hb – гемоглобин.

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,0001$ по сравнению с молодым контролем;

+ – $p < 0,05$, +++ – $p < 0,0001$ по сравнению с пожилым контролем.

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. 26 а-ж).

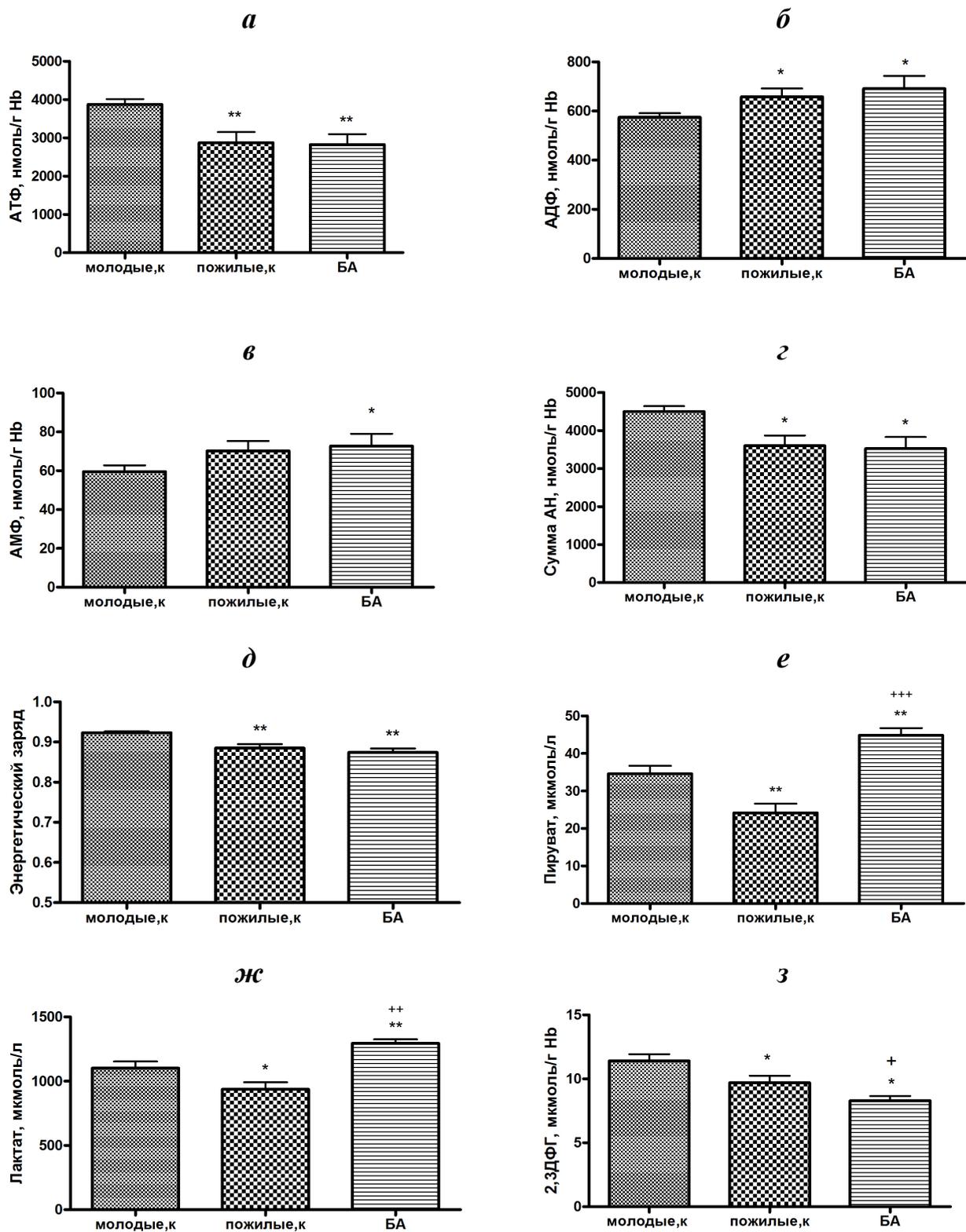


Рисунок 26. Концентрация АТФ (а), АДФ (б), АМФ (в), сумма АН (г), энергетический заряд (д), концентрация пирувата (е), лактата (ж), 2,3ДФГ (з) в эритроцитах пациентов и людей контрольных групп. Молодые,к – контрольная группа людей молодого возраста ($33,3 \pm 3,3$ года), пожилые,к – контрольная группа людей пожилого возраста ($76,8 \pm 3,0$ лет), БА – пациенты с болезнью Альцгеймера ($75 \pm 2,6$ лет). АН – адениннуклеотиды, 2,3-ДФГ – 2,3-дифосфоглицерат. Концентрация АТФ, АДФ, АМФ и сумма АН выражены в нмоль/г Нб, концентрация 2,3-ДФГ – в мкмоль/г Нб, концентрация лактата и пирувата – в мкмоль/л. Нб – гемоглобин.

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по сравнению с молодым контролем,

+ – $p < 0,05$, ++ – $p < 0,01$, +++ – $p < 0,0001$ по сравнению с пожилым контролем.

Видно, что эритроциты пожилых людей контрольной группы при сравнении с молодым контролем характеризуются достоверно сниженным содержанием АТФ (около 30%, $p < 0,05$) 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.

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^+ -АТФ-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. 26 з) 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^+ -АТФ-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 и повреждение мембранных структур, но и 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 возможное существование дополнительных, не 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 А β 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 А β_{25-35} и лизируют в большей степени, чем молодые. Основным ферментом, регулирующим объем эритроцитов, является Na⁺/K⁺-АТФ-аза. Мы установили, что активность этого фермента под воздействием А β_{25-35} изменяется бифазно. В первые минуты инкубации происходит увеличение активности в эритроцитах обеих популяций. Однако почти двукратное увеличение активности Na⁺/K⁺-АТФ-азы в старых клетках не достигало уровня, характерного для интактных молодых клеток. Помимо этого, А β_{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⁺-АТФ-азой, который не компенсировался вследствие торможения регуляторных ферментов гликолиза. При более длительном контакте Аβ₂₅₋₃₅ с эритроцитами активность Na⁺/K⁺-АТФ-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 АТФ и сниженной активности гликолитических ферментов, которая дополнительно уменьшается под воздействием Аβ₂₅₋₃₅. Кроме этого, действие Аβ₂₅₋₃₅ 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 Аβ₂₅₋₃₅ *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 Аβ₂₅₋₃₅, характеризующееся подавлением гликолиза и активности ферментов-антиоксидантов, может лежать в основе ускоренного старения эритроцитов у пациентов с БА, а снижение концентрации АТФ и 2,3-ДФГ может вызывать существенное нарушение функциональной способности эритроцитов, приводящее к неадекватному снабжению тканей кислородом, что характерно для мозга пациентов с БА 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 АТФ, 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^+ -АТФ-азы и снижение концентрации 2,3-ДФГ.

Список литературы

1. Атауллаханов Ф.И., Корунова Н.О., Спиридонов И.С., Пивоваров И.О., Калягина Н.В., Мартынов М.В. Как регулируется объем эритроцита, или что могут и чего не могут математические модели в биологии. // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. – 2009. – Т. 26, № 3. – С. 163-179.
2. Белевич Е. И., Костин Д. Г., Слобожанина Е. И. Эриптоз – запрограммированная гибель эритроцитов. // Успехи современной биологии. – 2014. – Т. 134, № 2. – С. 149–157.
3. Васильева Е.М. Биохимические особенности эритроцита. Влияние патологии. // Биомедицинская химия. – 2005. – Т. 51, вып. 2. – Т. 118-126.
4. Владимиров Ю. А., Проскурнина Е. В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 341–388.
5. Волкова С.А., Боровков Н.Н. Основы клинической гематологии: учебное пособие/ Н. Новгород: Издательство Нижегородской гос. медицинской академии. – 2013. – 400 с.
6. Косенко Е.А. Энергетический обмен в норме и при патологии. Роль возбуждающих нейромедиаторов. – М.: ЛЕНАНД. – 2014. – 304 с.
7. Косенко Е.А., Соломадин И.Н., Каминский Ю.Г. Влияние β -амилоидного пептида A β 25-35 и фуллерена C60 на активность ферментов в эритроцитах. // Биоорганическая химия. – 2009. – Т.35, №2 – С. 172-177.
8. Косенко Е.А., Соломадин И.Н., Маров Н.В., Венедиктова Н.И., Погосян А.С., Каминский Ю.Г. Роль гликолиза и антиокислительных ферментов в токсическом действии β -амилоидного пептида A β 25-35 на эритроциты. // Биоорганическая химия. – 2008. – Т.34. – С.654-660.
9. Кудинов А.Р., Кудинова Н.В., Кезля Е.В., Козырев К.М., Медведев А.Е., Березов Т.Т. Компенсаторные механизмы обеспечения нейропластичности ткани мозга при альцгеймеровской нейродегенерации. I. Роль изменения

- биохимических свойств белка амилоид-бета. // Биомедицинская химия. – 2012. – Т. 58, вып. 4. – С. 385-399.
- 10.Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Свободнорадикальные процессы в норме и при заболеваниях сердечно-сосудистой системы. Москва. – 2001. – 78 с.
- 11.Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Шергин С.М. Биохимия окислительного стресса. Оксиданты и антиоксиданты. Новосибирск. – 1994. – 203 с.
- 12.Соломадин И.Н. Механизмы токсического действия бета-амилоидных пептидов на эритроциты и клетки мозга. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – Пушкино, 2012. – 99 с. : ил
- 13.Соломадин И.Н., Маров Н.В., Венедиктова Н.И., Косенко Е.А., Каминский Ю.Г. Токсическое действие $A\beta_{25-35}$ и фуллерена C_{60} на эритроциты. // Известия РАН. Серия Биологическая. – 2008. – №4. – С.507-512.
- 14.Фатеева В., Неменова Е., Воробьева О. Церебральная амилоидная ангиопатия как причина спонтанных рецидивирующих кровоизлияний в мозг. // Врач. – 2013. – №5. – С.40-43
- 15.Aebi H.E. Catalase // In Bergmeyer H.U., ed., Methods of Enzymatic Analysis. – 1984. – V.3. – P. 273-286.
- 16.Ajmani R.S., Metter E.J., Jaykumar R., Ingram D.K., Spangler E.L., Abugo O.O., Rifkind J.M. Hemodynamic changes during aging associated with cerebral blood flow and impaired cognitive function. // Neurobiol Aging. –2000. – V. 21, №2. – P. 257-269.
- 17.Akama K.T., Albanese C., Pestell R.G., Van Eldik L.J. Amyloid beta – peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NFkappaB – dependent mechanism. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – V.95, №10. – P. 5795-5800.
- 18.Alexander M.P., LoVerme S.R. Jr. Aphasia after left hemispheric intracerebral hemorrhage. // Neurology. – 1980. – V. 30, №11. – P. 1193-202.
- 19.Aliev G., Obrenovich M.E., Smith M.A., Perry G. Hypoperfusion, Mitochondria Failure, Oxidative Stress, and Alzheimer Disease. // J Biomed Biotechnol. – 2003. – V. 2003, № 3. – P. 162-163.

20. Aliev G., Smith M.A., de la Torre J.C., Perry G. Mitochondria as a primary target for vascular hypoperfusion and oxidative stress in Alzheimer's disease. // *Mitochondrion*. – 2004. – V. 4, № 5-6. – P. 649-63.
21. Assouline-Cohen M., Beitner R. Effects of Ca²⁺ on erythrocyte membrane skeleton-bound phosphofructokinase, ATP levels, and hemolysis. // *Mol Genet Metab*. – 1999. – V. 66, № 1. – P. 56-61.
22. Atkinson D.E. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. // *Biochemistry*. – 1968. – V. 7, № 11. – P. 4030-4.
23. Attems J. Sporadic cerebral amyloid angiopathy: pathology, clinical implications, and possible pathomechanisms. // *Acta Neuropathol*. – 2005. – V. 110, № 4. – P. 345-59.
24. Baginski E.S., Pappas J., Marie S.S. Determination of serum 5'-nucleotidase // *Z Klin Chem Klin Biochem*. – 1974. – V. 12, № 5. – P. 241
25. Baranowska-Bosiacka I., Hlynczak A.J., Wiszniewska B., Marchlewicz M. Disorders of Purine Metabolism in Human Erythrocytes in the State of Lead Contamination. // *Polish Journal of Environmental Studies*. – 2004. – V. 13, № 5. – P. 467-476
26. Bast A., Haenen G.R., Doelman C.J. Oxidants and antioxidants: state of the art. // *Am J Med*. – 1991. – V. 91(3C). – P. 2S-13S.
27. Beauchamp C., Fridovich I. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. // *Anal. Biochem*. – 1971. – V. 44. – P. 276-287.
28. Benesch R.E., Benesch R., Yu C.I. The oxygenation of hemoglobin in the presence of 2,3-diphosphoglycerate. Effect of temperature, pH, ionic strength, and hemoglobin concentration. // *Biochemistry*. – 1969. – V. 8, № 6. – P. 2567-71.
29. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. *Biochemistry*. 5th edition. Section 10.2, Hemoglobin Transports Oxygen Efficiently by Binding Oxygen Cooperatively. New York: W H Freeman. – 2002.
30. Bergmeyer H.U., Bernt E. Lactate dehydrogenase. // *Methods of Enzymatic Analysis*. V.2/Ed. Bergmeyer H.U. Weinheim: Verlag Chemie. – 1974. – V. 2. – P. 574-579.

31. Bernstein R.E. Alterations in metabolic energetics and cation transport during aging of red cells. // *J Clin Invest.* – 1959. – V.38. – P.572-86.
32. Beutler E. *Red Cell Metabolism.* // Grune & Stratton, New York. – 1971. – P.62-64.
33. Beutler E., Blume K.G., Kaplan J.C., Löhr G.W., Ramot B., Valentine W.N. International Committee for Standardization in Haematology: recommended methods for red-cell enzyme analysis. // *Br J Haematol.* – 1977. – V.35, №2. – P.331-40.
34. Bitan G., Kirkitadze M.D., Lomakin A., Vollers S.S., Benedek G.B., Teplow D.B. Amyloid β -protein ($A\beta$) assembly: $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ oligomerize through distinct pathways. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – V.100. – P.330-335.
35. Blanco G., Mercer R.W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. // *Am J Physiol.* – 1998. – V.275(5 Pt 2) – P.F633-50.
36. Blass J.P., Hanin I., Barclay L., Kopp U., Reding M.J. Red blood cell abnormalities in Alzheimer disease. // *J Am Geriatr Soc.* – 1985. – V.33, №6. – P.401-5.
37. Boas F.E., Forman L., Beutler E. Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – V.95, №6. – P.3077-81.
38. Bonsignore A., Fornaini G., Fantoni A., Leoncini G., Segni P. Relationship between age and enzymatic activities in human erythrocytes from normal and fava bean-sensitive subjects. // *J Clin Invest.* – 1964. – V.43 – P.834-42.
39. Bosman G.J., Bartholomeus I.G., de Grip W.J. Alzheimer's disease and cellular aging: membrane-related events as clues to primary mechanisms. // *Gerontology.* – 1991a. – V.37, №1-3. – P.95-112.
40. Bosman G.J., Bartholomeus I.G., de Man A.J., van Kalmthout P.J., de Grip W.J. Erythrocyte membrane characteristics indicate abnormal cellular aging in patients with Alzheimer's disease. // *Neurobiol Aging.* – 1991b; – V.12, № 1. – P.13-8.
41. Bosman G.J., Van der Linden P.A., Bartholomeus I.G., De Man A.J., De Grip W.J., Van Kalmthout P.J. Erythrocyte aging in the demented elderly: a fluctuating process? // *Mech Ageing Dev.* – 1998. – V.100, № 1. – P. 53-8.

42. Bosman G.J., Werre J.M., Willekens F.L., Novotný V.M. Erythrocyte ageing *in vivo* and *in vitro*: structural aspects and implications for transfusion. // *Transfus Med.* – 2008. – V.18, №6 – P.335-47.
43. Bourdel-Marchasson I, Delmas-Beauvieux MC, Peuchant E, Richard-Harston S, Decamps A, Reignier B, Emeriau JP, Rainfray M. Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. // *Age Ageing.* – 2001. – V.30, №3. –P. 235-41.
44. Brewer G.J. 2,3-DPG and erythrocyte oxygen affinity. // *Annu Rev Med.* –1974. – V.25 – P.29-38.
45. Bukowska B., Zatorska A. The prehemolytical changes in human erythrocytes 1 treated with 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D). // *Current Topics in Biophysics.* – 2003. – V.27, № 1-2. – P.11-15
46. Bunn H.F. Differences in the interaction of 2,3-diphosphoglycerate with certain mammalian hemoglobins. // *Science.* – 1971. – V.172, № 3987. – P.1049-50.
47. Calderón-Garcidueñas L., Solt A.C., Henríquez-Roldán C., Torres-Jardón R., Nuse B., Herritt L., Villarreal-Calderón R., Osnaya N., Stone I., García R. *et al.* Long-term air pollution exposure is associated with neuroinflammation, an altered innate immune response, disruption of the blood-brain barrier, ultrafine particulate deposition, and accumulation of amyloid beta-42 and alpha-synuclein in children and young adults. // *Toxicol Pathol.* – 2008. – V.36, №2. – P. 289-310.
48. Cardoso S.M., Santos S., Swerdlow R.H., Oliveira C.R. Functional mitochondria are required for amyloid beta-mediated neurotoxicity. // *FASEB J.* – 2001. – V.15, №8. – P.1439-1441.
49. Casley C.S., Land J.M., Sharpe M.A., Clark J.B., Duchon M.R., Canevari L. Beta-amyloid fragment 25-35 causes mitochondrial dysfunction in primary cortical neurons. // *Neurobiol. Dis.* – 2002. – V.10, №3. – P.258-267.
50. Cathcart M.K., McNally A.K., Morel D.W., Chisolm G.M. 3rd. Superoxide anion participation in human monocyte-mediated oxidation of low-density lipoprotein and conversion of low-density lipoprotein to a cytotoxin. // *J Immunol.* – 1989. – V.142, № 6. – P.1963-9.

51. Cattabeni F., Colciaghi F., Di Luca M. Platelets provide human tissue to unravel pathogenic mechanisms of Alzheimer disease. // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. – 2004. – V.28, №5. – P.763-70.
52. Chang C.Y., Liang H.J., Chow S.Y., Chen S.M., Liu D.Z. Hemorheological mechanisms in Alzheimer's disease. // *Microcirculation*. – 2007. – V.14, №6. – P.627-34.
53. Chang Z., Luo Y., Zhang Y., Wei G. Interactions of A β 25-35 β -barrel-like oligomers with anionic lipid bilayer and resulting membrane leakage: an all-atom molecular dynamics study. // *J Phys Chem B*. – 2011. – V.115, №5. – P.1165-74.
54. Cholevas V., Challa A., Lapatsanis P.D., Andronikou S. Changes in red cell phosphate metabolism of preterm and fullterm infants with perinatal problems during their first month of life. // *Eur J Pediatr*. – 2008. – V.167, №2. – P.211-8.
55. Choy Y.M., Wong S.L., Lee C.Y. Changes in surface carbohydrates of erythrocytes during *in vivo* aging. // *Biochem Biophys Res Commun*. – 1979. – V.91, №2. – P.410-5.
56. Cimen M.Y. Free radical metabolism in human erythrocytes. // *Clin Chim Acta*. – 2008. – V.390, №1-2. – P. 1-11.
57. Cohen N.S., Ekholm J.E., Luthra M.G., Hanahan D.J. Biochemical characterization of density-separated human erythrocytes. // *Biochim Biophys Acta*. – 1976. – V.419, №2. – P.229-42.
58. Collins D.M., McCullough W.T., Ellsworth M.L. Conducted vascular responses: communication across the capillary bed. // *Microvasc Res*. – 1998. – V.56. – P.43-53.
59. Coria F., Prelli F., Castaño E.M., Larrondo-Lillo M., Fernandez-Gonzalez J., van Duinen S.G., Bots G.T., Luyendijk W., Shelanski M.L., Frangione B. Beta-protein deposition: a pathogenetic link between Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathies. // *Brain Res*. – 1988. – V.463, №1 – P.187-91.
60. Cumberbatch M., Zareian K., Davidson C., Morgan D.B., Swaminathan R. The early and late effects of digoxin treatment on the sodium transport, sodium content and Na⁺K⁺-ATPase or erythrocytes. // *Br J Clin Pharmacol*. – 1981. – V.11, №6. – P.565-70.
61. Curtain C.C., Ali F., Volitakis I., Cherny R.A., Norton R.S., Beyreuther K., Barrow C.J., Masters C.L., Bush A.I., Barnham K.J. Alzheimer's disease amyloid-beta binds

- copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits. // *J Biol Chem.* – 2001. – V.276, №23. – P.20466-73.
- 62.Dalkara T., Gursoy-Ozdemir Y., Yemisci M. Brain microvascular pericytes in health and disease. // *Acta Neuropathol.* – 2011. – V.122, №1. – P.1-9.
- 63.Dayan A.D. Quantitative histological studies on the aged human brain. I. Senile plaques and neurofibrillary tangles in "normal" patients. // *Acta Neuropathol.* –1970. –V.16, №2. – P.85-94.
- 64.Deane R., Wu Z., Zlokovic B.V. RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. // *Stroke.* – 2004. –V. 35(11 Suppl 1). –P.2628-31.
- 65.Del Mar Martínez-Senac M., Villalaín J., Gómez-Fernández J.C. Structure of the Alzheimer beta-amyloid peptide (25-35) and its interaction with negatively charged phospholipid vesicles. // *Eur J Biochem.* – 1999. –V.265, №2. –P.744-53.
- 66.DeMattos R.B., Cirrito J.R., Parsadanian M., May P.C., O'Dell M.A., Taylor J.W., Harmony J.A., Aronow B.J., Bales K.R., Paul S.M., Holtzman D.M. ApoE and clusterin cooperatively suppress Abeta levels and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular Abeta metabolism *in vivo*. // *Neuron.* – 2004. –V.41, №2. – P.193-202.
- 67.Derelanko M.J. Determination of erythrocyte life span in F-344, Wistar, and Sprague-Dawley rats using a modification of the [3H]diisopropylfluorophosphate ([3H]DFP) method. // *Fundam Appl Toxicol.* – 1987. – V.9, №2. – P.271-6.
- 68.Deuticke B. Transformation and restoration of biconcave shape of human erythrocytes induced by amphiphilic agents and changes of ionic environment. // *Biochim biophys Acta.* – 1968. – V.163, №4. – P.494-500.
- 69.Diamond J.M., Matsuyama S.S., Meier K., Jarvik L.F. Elevation of erythrocyte countertransport rates in Alzheimer's dementia. // *N Engl J Med.* – 1983. –V. 309, №17. –P. 1061-2.
- 70.Edwards M.J., Rigas D.A. Electrolyte-labile increase of oxygen affinity during *in vivo* aging of hemoglobin. // *J Clin Invest.* – 1967. –V. 46, №10. – P. 1579-88.

71. Ellsworth M.L., Forrester T., Ellis C.G., Dietrich H.H. The erythrocyte as a regulator of vascular tone. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 1995. – V.269. – P.2155-2161.
72. Engström I., Ronquist G., Pettersson L., Waldenström A. Alzheimer amyloid beta-peptides exhibit ionophore-like properties in human erythrocytes. // *Eur J Clin Invest.* – 1995. – V.25, №7. – P.471-6.
73. Esiri M.M., Wilcock G.K. Cerebral amyloid angiopathy in dementia and old age. // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* – 1986. – V.49, №11. – P.1221-6.
74. Evin G., Weidemann A. Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease A β amyloid peptides. // *Peptides.* – 2002. – V.23, №7. – P.1285-97.
75. Fazi A., Accorsi A., Piatti E., Magnani M. Cell age dependent decay of human erythrocytes glutathione S-transferase. // *Mech Ageing Dev.* – 1991. – V.58, №2-3 – P.255-266.
76. Fița I.G., Enciu A.M., Stănoiu B.P. New insights on Alzheimer's disease diagnostic. *Rom J Morphol Embryol.* – 2011. – V.52 (3 Suppl). – P.975-9.
77. Gattegno L., Bladier D., Garnier M., Cornillot P. Changes in carbohydrate content of surface membranes of human erythrocytes during ageing. // *Carbohydr Res.* – 1976. – V.52. – P.197-208.
78. Gibson G.E., Huang H.M. Oxidative processes in the brain and non-neuronal tissues as biomarkers of Alzheimer's disease. // *Front Biosci.* – 2002. – V.7. – P.d1007-15.
79. Glass G.A., Gershon D. Decreased enzymic protection and increased sensitivity to oxidative damage in erythrocytes as a function of cell and donor aging. // *Biochem J.* – 1984. – V.218, №2. – P.531-537.
80. Glenner G.G., Murphy M.A. Amyloidosis of the nervous system. // *J Neurol Sci.* – 1989. – V.94, №1-3. – P.1-28.
81. Glenner G.G. Amyloid deposits and amyloidosis. The beta-fibrilloses (first of two parts). // *N Engl J Med.* – 1980. – V.302, №23. – P.1283-92.
82. Glenner G.G. Amyloid deposits and amyloidosis: the β -fibrilloses (second of twoparts). // *New Engl. J. Med.* – 1980. – V.302. – P.1333–43.

83. Golde T.E., Estus S., Usiak M., Younkin L.H., Younkin S.G. Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR. // *Neuron*. –1990. –V.4, № 2. – P.253-67.
84. Goodman Y., Mattson M.P. Secreted forms of β -amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid β -peptide-induced oxidative injury. // *Exp. Neurol.* –1994. – V.128. – P.1-12.
85. Haass C., Schlossmacher M., Hung A.Y., Vigo – Pelfrey C., Mellon A., Ostaszewski B., Lieberburg I., Koo E.H., Schenk D., Teplow D., Selkoe D.J. Amyloid – β peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. // *Nature*. – 1992. – V.359. – P.322-325.
86. Hackett M.L., Anderson C.S. Health outcomes 1 year after subarachnoid hemorrhage: An international population-based study. The Australian Cooperative Research on Subarachnoid Hemorrhage Study Group. // *Neurology*. – 2000. – V.55, №5. – P.658-62.
87. Hardy J.A., Higgins G.A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. // *Science*. – 1992. – V.256, №5054. – P.184-5.
88. Harper J.D., Wong S.S., Lieber C.M., Lansbury P.T. Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy. // *Chem Biol*. – 1997. – V.4, №2. – P.119-25.
89. Harris M.E., Hensley K., Butterfield D.A., Leedle R.A., Carney J.M. Direct evidence of oxidative injury produced by the Alzheimer's beta – amyloid peptide (1-40) in cultured hippocampal neurons. // *Exp. Neurol.* –1995. –V.131. –P.193-202.
90. Haxby J.V., Grady C.L., Duara R., Schlageter N., Berg G., Rapoport S.I. Neocortical metabolic abnormalities precede nonmemory cognitive defects in early Alzheimer's-type dementia. // *Arch Neurol*. –1986. – V.43, №9. –P.882-5.
91. Hensley K., Carney J.M., Mattson M.P., Aksenova M., Harris M., Wu J.F., Floyd R.A., Butterfield D.A. A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1994. – V.91, №8. –P.3270-4.

92. Hentschel W.M., Wu L.L., Tobin G.O., Anstall H.B., Smith J.B., Williams R.R., Ash K.O. Erythrocyte cation transport activities as a function of cell age. // *Clin Chim Acta*. –1986. – V.157, №1. – P.33-43.
93. Hirai K., Hayako H., Kato K., Miyamoto M. Idebenone protects hippocampal neurons against amyloid beta-peptide-induced neurotoxicity in rat primary cultures. // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 1998. –V.358, № 5. – P.582-585
94. Hoyer S. Brain glucose and energy metabolism abnormalities in sporadic Alzheimer disease. Causes and consequences: an update. // *Exp Gerontol.* –2000. – V.35, № 9-10. – P.1363-1372.
95. Hoyer S. Glucose and related brain metabolism in dementia of Alzheimer type and its morphological significance. // *Age.* – 1988. – V.11. – P.158-166
96. Hoyer S. Oxidative metabolism deficiencies in brains of patients with Alzheimer's disease. // *Acta Neurol Scand Suppl.* – 1996. – V.165. –P.18-24.
97. Iqbal K., Grundke-Iqbal I. Metabolic/signal transduction hypothesis of Alzheimer's disease and other tauopathies. // *Acta Neuropathol.* –2005. –V.109, №1. –P.25-31.
98. Jellinger K.A. Prevalence and impact of cerebrovascular lesions in Alzheimer and lewy body diseases. // *Neurodegener Dis.* – 2010. –V.7, №1-3. –P.112-5.
99. Jenkins J.D., Madden D.P., Steck T.L. Association of phosphofructokinase and aldolase with the membrane of the intact erythrocyte. // *J Biol Chem.* –1984. – V.259, №15. –V.9374-8.
100. Joachim C.L., Mori H., Selkoe D.J. Amyloid beta-protein deposition in tissues other than brain in Alzheimer's disease. // *Nature.* –1989. –V.341, №6239.–P.226-30.
101. De Jong G.I., Farkas E., Stienstra C.M., Plass J.R., Keijser J.N., de la Torre J.C., Luiten P.G. Cerebral hypoperfusion yields capillary damage in the hippocampal CA1 area that correlates with spatial memory impairment. // *Neuroscience.* –1999. – V.91, №1. –P.203-10.
102. Kalaria R.N., Harik S.I. Reduced glucose transporter at the blood-brain barrier and in cerebral cortex in Alzheimer disease. // *J Neurochem.* – 1989. – V.53, №4.– P.1083-88.

103. Kaminsky Y.G., Marlatt M.W., Smith M.A., Kosenko E.A. Subcellular and metabolic examination of amyloid- β peptides in Alzheimer disease pathogenesis: Evidence for A β ₂₅₋₃₅. // *Experimental Neurology*. – 2010. – V.221. – P.26-37.
104. Karadsheh N.S., Uyeda K. Changes in allosteric properties of phosphofructokinase bound to erythrocyte membranes. // *J Biol Chem*. – 1977. – V.252, №21. – P.7418-20.
105. Kawamoto E.M., Munhoz C.D., Glezer I., Bahia V.S., Caramelli P., Nitrini R., Gorjão R., Curi R., Scavone C., Marcourakis T. Oxidative state in platelets and erythrocytes in aging and Alzheimer's disease. // *Neurobiol Aging*. – 2005. – V.26, №6. – P.857-64.
106. Kirkitadze M.D., Condrón M.M., Teplow D.B. Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid β -protein fibrillogenesis. // *J. Mol. Biol.* – 2001. – V.312. – P.1103–1119.
107. Kirkman H.N., Gaetani G.F. Catalase: A tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1984. – V.81. – P.4343-47.
108. Kitazume S., Tachida Y., Kato M., Yamaguchi Y., Honda T., Hashimoto Y., Wada Y., Saito T., Iwata N., Saido T., Taniguchi N. Brain endothelial cells produce amyloid {beta} from amyloid precursor protein 770 and preferentially secrete the O-glycosylated form. // *J Biol Chem*. – 2010. – V.285, №51. – P.40097-103.
109. Kowluru R., Bitensky M.W., Kowluru A., Dembo M., Keaton P.A., Buican T. Reversible sodium pump defect and swelling in the diabetic rat erythrocyte: effects on filterability and implications for microangiopathy. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1989. – V.86, №9. – P.3327-31.
110. Kubo T., Nishimura S., Kumagae Y., Kaneko I. *In vivo* conversion of racemized beta-amyloid ([D-Ser 26]A beta 1-40) to truncated and toxic fragments ([D-Ser 26]A beta 25-35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients. // *J Neurosci Res*. – 2002. – V.70, №3. – P.474-83.
111. Kubo T., Kumagae Y., Miller C.A., Kaneko I. Beta-amyloid racemized at the Ser26 residue in the brains of patients with Alzheimer disease: implications in the

- pathogenesis of Alzheimer disease. // *J Neuropathol Exp Neurol.* –2003. – V.62, №3. – P.248-259.
112. Kucukatay V., Erken G., Bor-Kucukatay M., Kocamaz E. Effect of sulfite treatment on erythrocyte deformability in young and aged rats. // *Toxicol Mech Methods.* – 2009. – V.19, №1. – P.19-23.
113. Kuo Y.M., Kokjohn T.A., Kalback W., Luehrs D., Galasko D.R., Chevallier N., Koo E.H., Emmerling M.R., Roher A.E. Amyloid-beta peptides interact with plasma proteins and erythrocytes: implications for their quantitation in plasma. // *Biochem Biophys Res Commun.* –2000. – V.268, №3. – P.750-6.
114. Kurata M., Suzuki M., Agar N.S. Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. // *Comp Biochem Physiol B.* –1993. –V.106, №3. – P.477-87.
115. Lambert M.P., Barlow A.K., Chromy B.A., Edwards C., Freed R., Liosatos M., Morgan T.E., Rozovsky I., Trommer B., Viola K.L. *et al.* Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1–42 are potent central nervous system neurotoxins. // *Proc Natl Acad Sci USA.* –1998. – V.95. – P.6448–6453.
116. Lang K.S., Durantou C., Poehlmann H., Myssina S., Bauer C., Lang F., Wieder T., Huber S.M. Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. // *Cell Death Differ.* – 2003. – V.10, №2. – P.249-56.
117. Lang K.S., Lang P.A., Bauer C., Durantou C., Wieder T., Huber S.M., Lang F. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. // *Cell Physiol Biochem.* –2005. –V.15, №5. –P.195-202.
118. Lang K.S., Roll B., Myssina S., Schittenhelm M., Scheel-Walter H.G., Kanz L., Fritz J., Lang F., Huber S.M., Wieder T. Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. // *Cell Physiol Biochem.* –2002. –V.12, №5-6. – P.365-72.
119. Larsen V.H., Waldau T., Gravesen H., Siggaard-Andersen O. Erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate depletion associated with hypophosphatemia detected by routine arterial blood gas analysis. // *Scand J Clin Lab Invest Suppl.*–1996. –V.224.–P.83-7.
120. Lawrence R.A., Burk R.F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver//*Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1976. – V.71. – P.952-958.

121. Lee H.G., Casadesus G., Zhu X., Takeda A., Perry G., Smith M.A. Challenging the amyloid cascade hypothesis: senile plaques and amyloid-beta as protective adaptations to Alzheimer disease. // *Ann N Y Acad Sci.* – 2004. – V.1019. –P.1-4.
122. LeVine H. 3rd. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. // *Protein Sci.* – 1993. –V.2, №3. – P.404-10.
123. Li Q.X., Whyte S., Tanner J.E., Evin G., Beyreuther K., Masters C.L. Secretion of Alzheimer's disease A β amyloid peptide by activated human platelets. // *Lab Invest.* –1998. –V.78, №4. – P.461-9.
124. Liang W.S., Reiman E.M., Valla J., Dunckley T., Beach T.G., Grover A., Niedzielko T.L., Schneider L.E., Mastroeni D., Caselli R. *et al.* Alzheimer's disease is associated with reduced expression of energy metabolism genes in posterior cingulate neurons. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* –2008. –V.105, №11. – P.4441-6.
125. Lim AS, Kowgier M, Yu L, Buchman AS, Bennett DA. Sleep Fragmentation and the Risk of Incident Alzheimer's Disease and Cognitive Decline in Older Persons.// *Sleep.* – 2013. – V.36, №7. –P.1027-1032.
126. Lomakin A., Chung D.S., Benedek G.B., Kirschner D.A., Teplow D.B. On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1996. – V.93, №3. – P.1125-9.
127. Low P.S., Kiyatkin A., Li Q., Harrison M.L. Control of erythrocyte metabolism by redox-regulated tyrosine phosphatases and kinases. // *Protoplasma.* –1995. – V. 184, I.1. – P.196-202
128. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. // *J. Biol. Chem.* – 1951. – V.193. – P.265-275.
129. Lue L.F., Kuo Y.M., Roher A.E., Brachova L., Shen Y., Sue L., Beach T., Kurth J.H., Rydel R.E., Rogers J. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. // *Am J Pathol.* – 1999. – V.155, №3. – P.853-62.

130. Lurie S., Danon D. Life span of erythrocytes in late pregnancy. // *Obstet Gynecol.* –1992. – V.80, №1. –P.123-6.
131. Lutz H.U., Stammler P., Fasler S., Ingold M., Fehr J. Density separation of human red blood cells on self forming Percoll gradients: correlation with cell age. // *Biochim Biophys Acta.* –1992. –V.1116, №1. – P.1-10.
132. Maddalena A.S., Papassotiropoulos A., Gonzalez-Agosti C., Signorell A., Hegi T., Pasch T., Nitsch R.M., Hock C. Cerebrospinal fluid profile of amyloid beta peptides in patients with Alzheimer's disease determined by protein biochip technology. // *Neurodegener Dis.* – 2004. –V.1, №4-5. – P.231-5.
133. Mahnke D.K., Sabina R.L. Calcium activates erythrocyte AMP deaminase [isoform E (AMPD3)] through a protein-protein interaction between calmodulin and the N-terminal domain of the AMPD3 polypeptide. // *Biochemistry.* – 2005. –V.44, №14. – P.5551-9.
134. Mandal D, Moitra PK, Saha S, Basu J. Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. // *FEBS Lett.* – 2002. –V.513, №2-3. –P.184-8.
135. Marcus D.L., de Leon M.J., Goldman J., Logan J., Christman D.R., Wolf A.P., Fowler J.S., Hunter K., Tsai J., Pearson J. Altered glucose metabolism in microvessels from patients with Alzheimer's disease. // *Ann Neurol.* –1989. – V.26, №1. – P.91-94.
136. Marcus D.L., Freedman M.L. Decreased brain glucose metabolism in microvessels from patients with Alzheimer's disease. // *Ann N Y Acad Sci.* –1997. – V.826. – P.248-253.
137. Masters C.L., Gajdusek D.C., Gibbs C.J.Jr. Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Sträussler syndrome with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies. // *Brain.* – 1981. – V.104, №3. –P.559-88.
138. Masuda J., Tanaka K., Ueda K., Omae T. Autopsy study of incidence and distribution of cerebral amyloid angiopathy in Hisayama, Japan. // *Stroke.* – 1988. – V.19, №2. – P.205-10.

139. Matovcik L.M., Chiu D., Lubin B., Mentzer W.C., Lane P.A., Mohandas N., Schrier S.L. The aging process of human neonatal erythrocytes. // *Pediatr Res.* – 1986. – V.20, №11. – P.1091-6.
140. Mattson M.P., Begley J.G., Mark R.J., Furukawa K. Abeta25-35 induces rapid lysis of red blood cells: contrast with Abeta1-42 and examination of underlying mechanisms. // *Brain Res.* – 1997. – V.771, №1. – P.147-53.
141. McCord J.M., Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). // *J. Biol. Chem.* – 1969. – V.244. – P.6049-6055.
142. McCullough W.T., Collins D.M., Ellsworth M.L. Arteriolar responses to extracellular ATP in striated muscle. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 1997. – V.272. – P.1886-1891.
143. McCully K., Chance B., Giger U. *In vivo* determination of altered hemoglobin saturation in dogs with M-type phosphofructokinase deficiency. // *Muscle Nerve.* – 1999. – V.22, №5. – P.621-7.
144. McKhann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D., Stadlan E.M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. // *Neurology.* – 1984. – V.34, №7. – P.939-44.
145. McKhann G.M., Knopman D.S., Chertkow H., Hyman B.T., Jack C.R. Jr, Kawas C.H., Klunk W.E., Koroshetz W.J., Manly J.J., Mayeux R. *et al.* The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. // *Alzheimers Dement.* – 2011. – V.7, №3. – P.263-9.
146. McMullin M.F. The molecular basis of disorders of red cell enzymes. // *J Clin Pathol.* – 1999. – V.52. – P.241-244.
147. Meier-Ruge W., Bertoni-Freddari C., Iwangoff P. Changes in brain glucose metabolism as a key to the pathogenesis of Alzheimer's disease. // *Gerontology.* – 1994. – V.40. – P.246-252.

148. Meier-Ruge W., Iwangoff P., Reichlmeier K. Neurochemical enzyme changes in Alzheimer's and Pick's disease. // Arch Gerontol Geriatr. –1984. –V.3, №2. – P.161-165
149. Michaud J.P., Bellavance M.A., Préfontaine P., Rivest S. Real-time *in vivo* imaging reveals the ability of monocytes to clear vascular amyloid beta. // Cell Rep. – 2013. – V.5, №3. –P.646-53.
150. Mielke R., Herholz K., Grond M., Kessler J., Weiss W.D. Differences of regional cerebral glucose metabolism between presenile and senile dementia of Alzheimer type. // Neurobiol. Aging. – 1992. – V.13, – P.93-98.
151. Misra H.P., Fridovich I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. // J Biol Chem. –1972. – V.247. – P.6960-62.
152. Mohanty J.G., Eckley D.M., Williamson J.D., Launer L.J., Rifkind J.M. Do red blood cell-beta-amyloid interactions alter oxygen delivery in Alzheimer's disease? // Adv Exp Med Biol. –2008. – V.614. – P.29-35.
153. Mohanty J.G., Shukla H.D., Williamson J.D., Launer L.J., Saxena S., Rifkind J.M. Alterations in the red blood cell membrane proteome in alzheimer's subjects reflect disease-related changes and provide insight into altered cell morphology. // Proteome Sci. – 2010. – V.8. – P.11.
154. Moreira P.I., Zhu X., Liu Q., Honda K., Siedlak S.L., Harris P.L., Smith M.A., Perry G. Compensatory responses induced by oxidative stress in Alzheimer disease. // Biol Res. – 2006. –V.39, №1. – P.7-13.
155. Mormino E.C., Brandel M.G., Madison C.M., Marks S., Baker S.L., Jagust W.J. A β Deposition in aging is associated with increases in brain activation during successful memory encoding. // Cereb Cortex. – 2012. – V.22, №8. –P.1813-23.
156. Nakagawa K., Kiko T., Kuriwada S., Miyazawa T., Kimura F., Miyazawa T. Amyloid β induces adhesion of erythrocytes to endothelial cells and affects endothelial viability and functionality. // Biosci Biotechnol Biochem. – 2011. – V.75, №10. –P.2030-3.
157. Nakamura J., Koh N., Sakakibara F., Hamada Y., Wakao T., Hara T., Mori K., Nakashima E., Naruse K., Hotta N. Polyol pathway, 2,3-diphosphoglycerate in

- erythrocytes and diabetic neuropathy in rats. // Eur J Pharmacol. –1995. –V.294, №1. – P.207-14.
158. Nakao K., Wada T., Kamiyama T., Nakao M., Nagano K. A direct relationship between adenosine triphosphate-level and *in vivo* viability of erythrocytes. // Nature. – 1962. – V.194. – P.877-8.
159. Nicolas M., Hassan B.A. Amyloid precursor protein and neural development. // Development. – 2014. – V.141, №13. – P.2543-8.
160. Nicolay J.P., Gatz S., Liebig G., Gulbins E., Lang F. Amyloid induced suicidal erythrocyte death. // Cell Physiol Biochem. – 2007. – V.19, №1-4. – P.175-84.
161. Nicoll J.A., Wilkinson D., Holmes C., Steart P., Markham H., Weller R.O. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. // Nat Med. – 2003. – V.9, №4. – P.448-52.
162. Nørby J.G. Coupled assay of Na⁺,K⁺-ATPase activity. // Methods in Enzymology. – 1988. – V.156. – P.116-119.
163. Nordstedt C., Näslund J., Thyberg J., Messamore E., Gandy S.E., Terenius L. Human neutrophil phagocytic granules contain a truncated soluble form of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein (APP). // J Biol Chem. – 1994. – V.269, №13. – P.9805-10.
164. de Oliveira S., Silva-Herdade A.S., Saldanha C. Modulation of erythrocyte deformability by PKC activity. // Clin Hemorheol Microcirc. –2008. –V.39, №1-4. – P.363-373.
165. Ooms S, Overeem S, Besse K, Rikkert MO, Verbeek M, Claassen JA. Effect of 1 night of total sleep deprivation on cerebrospinal fluid β -amyloid 42 in healthy middle-aged men: a randomized clinical trial. // JAMA Neurol. – 2014. – V.71, №8. – P. 971-7.
166. Papassotiriou I., Kister J., Griffon N., Abraham D.J., Kanavakis E., Traeger-Synodinos J., Stamoulakatou A., Marden M.C., Poyart C. Synthesized allosteric effectors of the hemoglobin molecule: a possible mechanism for improved erythrocyte oxygen release capability in hemoglobinopathy H disease. // Exp Hematol. –1998. –V.26, №10. – P. 922-6.

167. Pearlman R.L., Towfighi J., Pezeshkpour G.H., Tenser R.B., Turel A.P. Clinical significance of types of cerebellar amyloid plaques in human spongiform encephalopathies. // *Neurology*. –1988. – V.38, №8. – P.1249-54.
168. Pearson H.A., Peers C. Physiological roles for amyloid beta peptides. // *J Physiol*. –2006. – V.575 (Pt 1). – P.5-10.
169. Perry E.K., Perry R.H., Tomlinson B.E., Blessed G., Gibson P.H. Coenzyme A-acetylating enzymes in Alzheimer's disease: possible cholinergic 'compartment' of pyruvate dehydrogenase. // *Neurosci Lett*. – 1980. – V.18, №1. – P.105-110.
170. Perry R.T., Gearhart D.A., Wiener H.W., Harrell L.E., Barton J.C., Kutlar A., Kutlar F., Ozcan O., Go R.C., Hill W.D. Hemoglobin binding to A beta and HBG2 SNP association suggest a role in Alzheimer's disease. // *Neurobiol Aging*. –2008. – V.29, №2. – P.185-93.
171. Perutz M.F. Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron. // *Annu Rev Biochem*. –1979. – V.48. – P.327-86.
172. Pfeifer L.A., White L.R., Ross G.W., Petrovitch H., Launer L.J. Cerebral amyloid angiopathy and cognitive function: the HAAS autopsy study. // *Neurology*. –2002. – V.58, №11 – P.1629-34.
173. Pike C.J., Walencewicz-Wasserman A.J., Kosmoski J., Cribbs D.H., Glabe C.G., Cotman C.W. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. // *J Neurochem*. – 1995. – V.64, №1. – P.253-65.
174. Priller C., Bauer T., Mitteregger G., Krebs B., Kretschmar H.A., Herms J. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. // *J Neurosci*. –2006. – V.26, №27. – P.7212-7221
175. Purcell Y., Brozović B. Red cell 2,3-diphosphoglycerate concentration in man decreases with age. // *Nature*. – 1974. – V.251, №5475. –P.511-2.
176. Ravi L.B., Mohanty J.G., Chrest F.J., Jayakumar R., Nagababu E., Usatyuk P.V., Natarajan V., Rifkind J.M. Influence of beta-amyloid fibrils on the interactions between red blood cells and endothelial cells. // *Neurol Res*. –2004. –V.26, №5. – P.579-585.

177. Razay G., Wilcock G.K. Hyperinsulinaemia and Alzheimer's disease. // *Age Ageing*. –1994. – V.23, №5. – P.396-9.
178. Resnick L.M., Gupta R.K., Barbagallo M., Laragh J.H. Is the higher incidence of ischemic disease in patients with hypertension and diabetes related to intracellular depletion of high energy metabolites? // *Am J Med Sci*. –1994. – V.307 Suppl 1. – P.S66-9.
179. Robakis N.K. β -Amyloid and amyloid precursor protein: chemistry, molecular biology, and neuropathology. *Alzheimer's Disease*, Terry R., Kattmann R., Bicke E., eds. N.Y., Raven Press. – 1994. – P. 317-326.
180. Roelofsen B., van Deenen L.L. Lipid requirement of membrane-bound ATPase. Studies on human erythrocyte ghosts.// *Eur J Biochem*.–1973.–V.40, №1.–P.245-57.
181. Ronquist G, Waldenström A. Imbalance of plasma membrane ion leak and pump relationship as a new aetiological basis of certain disease states. // *J Intern Med*. – 2003. – V.254, №6. – P.517-26.
182. Rowe G.E., Welch R.A. Assays of hemolytic toxins. // *Methods Enzymol*. –1994. – V.235. – P.657-67.
183. Rózga M., Kłoniecki M., Jabłonowska A., Dadlez M., Bal W. The binding constant for amyloid Abeta40 peptide interaction with human serum albumin. // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2007. – V.364, №3. – P.714-8.
184. Samaja M., Crespi T., Guazzi M., Vandegriff K.D. Oxygen transport in blood at high altitude: role of the hemoglobin-oxygen affinity and impact of the phenomena related to hemoglobin allosterism and red cell function. // *Eur J Appl Physiol*. – 2003. – V.90, №3-4. – P.351-9.
185. Sass M.D., Caruso C.J., O'connell D.J. Decreased glutathione in aging red cells. // *Clin Chim Acta*. – 1965. – V.11. – P.334-40.
186. Schmidt W., Böning D., Braumann K.M. Red cell age effects on metabolism and oxygen affinity in humans. // *Respir Physiol*. – 1987. –V.68, №2. –P.215-25.
187. Scott A.F., Bunn H.F., Brush A.H. The phylogenetic distribution of red cell 2,3 diphosphoglycerate and its interaction with mammalian hemoglobins. // *J Exp Zool*. – 1977. –V.201, №2. – P.269-88.

188. Seaman C., Wyss S., Piomelli S. The decline in energetic metabolism with aging of the erythrocyte and its relationship to cell death. // *Am. J. Hematol.* – 1980. – V. 8. – P. 31–42.
189. Seaman G.V., Knox R.J., Nordt F.J., Regan D.H. Red cell aging. I. Surface charge density and sialic acid content of density-fractionated human erythrocytes. // *Blood.* –1977. – V.50, №6. – P.1001-11.
190. Serpell L.C. Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. // *Biochim Biophys Acta.* – 2000. – V.1502, №1. – P. 16-30.
191. Seubert P., Oltersdorf T., Lee M.G., Barbour R., Blomquist C., Davis D.L., Bryant K., Fritz L.C., Galasko D., Thal L.J., Lieberburg I., Schenk D.B. Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. // *Nature.* – 1993. – V.361. – P.260-263.
192. Shahid S.M., Mahboob T. Electrolytes and NA(+)-K(+)-ATPase: potential risk factors for the development of diabetic nephropathy. // *Pak J Pharm Sci.* – 2008. – V.21, №2. – P.172-9.
193. Shinkai Y., Yoshimura M., Ito Y., Odaka A., Suzuki N., Yanagisawa K., Ihara Y. Amyloid beta-proteins 1-40 and 1-42(43) in the soluble fraction of extra- and intracranial blood vessels. // *Ann Neurol.* –1995. – V.38, №3. – P.421-8.
194. Shinozuka T. Changes in human red blood cells during aging *in vivo*. // *Keio J Med.* –1994. – V.43, №3. – P.155-63.
195. Shinozuka T., Miyamoto T., Hirazono K., Ebisawa K., Murakami M., Kuroshima Y., Ito H., Shinoda R., Akatsuka Y., Osamura Y. Follow-up laparoscopy in patients with ovarian cancer. // *Tokai J Exp Clin Med.* –1994. – V.19, №1-2. – P.53-9.
196. Shinozuka T., Takei S., Yanagida J., Watanabe H., Ohkuma S. Comparative study on the main membrane-surface sialoglycopeptides released from young and old human erythrocytes with trypsin. // *Comp Biochem Physiol B.* –1988. – V.89, №2. – P.309-15.
197. Shoji M., Hirai S., Harigaya Y., Kawarabayashi T., Yamaguchi H. The amyloid beta-protein precursor is localized in smooth muscle cells of leptomeningeal vessels. // *Brain Res.* –1990. – V.530, №1. – P.113-6.

198. Shoji M., Golde T.E., Ghiso J., Cheung T.T., Estus S., Shaffer L.M., Cai X.D., McKay D.M., Tintner R., Frangione B., Younkin S.G. Production of the Alzheimer amyloid beta prtein by normal proteolytic processing. // *Science*. – 1992. – V.258, №5079. – P.126-129.
199. Simpson I.A., Chundu K.R., Davies-Hill T., Honer W.G., Davies P. Decreased concentrations of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in the brains of patients with Alzheimer's disease. // *Ann Neurol*. – 1994. – V.35, №5. – P.546-551.
200. Smith D.H., Chen X.H., Iwata A., Graham D.I. Amyloid beta accumulation in axons after traumatic brain injury in humans. // *J Neurosurg*. – 2003. – V.98, №5. – P.1072-7.
201. Smith J.E. Erythrocyte membrane: structure, function, and pathophysiology. // *Vet Pathol*. – 1987. – V.24, №6. – P.471-6.
202. Smith M.A., Joseph J.A., Perry G. Arson. Tracking the culprit in Alzheimer's disease. // *Ann N Y Acad Sci*. – 2000. – V.924. – P.35-8.
203. Smith M.A., Perry G. What are the facts and artifacts of the pathogenesis and etiology of Alzheimer disease? // *J Chem Neuroanat*. –1998. – V.16, №1. – P.35-41.
204. Soreghan B., Kosmoski J., Glabe C. Surfactant properties of Alzheimer's A beta peptides and the mechanism of amyloid aggregation. // *J Biol Chem*. – 1994. – V.269, №46. – P.28551-4.
205. Sprague R.S., Ellsworth M.L., Stephenson A.H., Lonigro A.J. ATP: The red blood cell link to NO and local control of the pulmonary circulation. // *Am J Physiol*. –1996. – V.271. – P.2717-2722.
206. Sprague R.S., Ellsworth M.L., Stephenson A.H., Lonigro A.J. Participation of cAMP in a signal-transduction pathway relating erythrocyte deformation to ATP release. // *Am J Physiol Cell Physiol*. –2001. – V.281. – P.1158-1164.
207. Sprague R.S., Stephenson A.H., Ellsworth M.L. Red not dead: signaling in and from erythrocytes. // *Trends Endocrinol Metab*. – 2007. – V.18, №9. – P.350-5.
208. Staal G.E.J., Koster J.F., Veeger C. Human Erythrocyte Pyruvate Kinase. // *Methods in Enzymol*. – 1975. – V.42. – P.182-186.

209. Steck T.L., Kant J.A. Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. // *Methods Enzymol.* – 1974. – V.31.–P.172-80.
210. Stocchi V., Kolb N., Cucchiarini L., Segni M., Magnani M., Fornaini G. Adenine and pyridine nucleotides during rabbit reticulocyte maturation and cell aging. // *Mech Ageing Dev.* – 1987. – V.39, №1. – P.29-44.
211. Sunde R.A., Hoekstra W.G. Structure, synthesis and function of glutathione peroxidase. // *Nutr Rev.* –1980. –V.38, №8. – P.265-73.
212. Takeshita M., Tamura M., Yubisui T., Yoneyama Y. Exponential decay of cytochrome b5 and cytochrome b5 reductase during senescence of erythrocytes: relation to the increased methemoglobin content. // *J Biochem.* – 1983. – V.93, №3. – P.931-4.
213. Thal D.R., Capetillo-Zarate E., Larionov S., Staufenbiel M., Zurbruegg S., Beckmann N. Capillary cerebral amyloid angiopathy is associated with vessel occlusion and cerebral blood flow disturbances. // *Neurobiol Aging.* – 2009. –V.30, №12. – P.1936-48.
214. Thal D.R., Ghebremedhin E., Rüb U., Yamaguchi H., Del Tredici K., Braak H. Two types of sporadic cerebral amyloid angiopathy. // *J Neuropathol Exp Neurol.* – 2002. – V.61, №3. – P.282-93.
215. Thal D.R., Griffin W.S., Braak H. Parenchymal and vascular A β -deposition and its effects on the degeneration of neurons and cognition in Alzheimer's disease. // *J Cell Mol Med.* – 2008. – V.12 (5B). – P.1848-62.
216. Thanvi B., Robinson T. Sporadic cerebral amyloid angiopathy--an important cause of cerebral haemorrhage in older people. // *Age Ageing.* –2006. – V.35, №6. – P.565-71.
217. Tomlinson B.E., Blessed G., Roth M. Observations on the brains of non-demented old people. // *J Neurol Sci.* – 1968. –V.7, №2. – P.331-56.
218. de la Torre J.C. Alzheimer's disease is a vasocognopathy: a new term to describe its nature. // *Neurol Res.* – 2004. – V.26, №5. – P.517-24.

219. de la Torre J.C. Cerebral hypoperfusion, capillary degeneration, and development of Alzheimer disease. // *Alzheimer Dis Assoc Disord.* – 2000. – V.14 Suppl 1. – P. S72-81.
220. de la Torre J.C. Impaired cerebromicrovascular perfusion. Summary of evidence in support of its causality in Alzheimer's disease. // *Ann N Y Acad Sci.* – 2000. – V.924. – P.136-152.
221. de la Torre J.C. Vascular basis of Alzheimer's pathogenesis. // *Ann N Y Acad Sci.* – 2002. – V.977. – P.196-215.
222. de la Torre J.C., Mussivand T. Can disturbed brain microcirculation cause Alzheimer's disease? // *Neurol Res.* – 1993. – V.15, №3. – P. 146-53.
223. de la Torre J.C., Stefano G.B. Evidence that Alzheimer's disease is a microvascular disorder: the role of constitutive nitric oxide. // *Brain Res Brain Res Rev.* – 2000. – V.34, №3. – P. 119-36.
224. Trautschold I., Lamprecht W., Schweitzer G. Adenosine 5'-triphosphate: UV method with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. // *In Methods of Enzymatic Analysis*, H.U.Bergmeyer, ed. Weinheim, Verlag Chemie. – 1985. – V.7. – P.346-357.
225. Travis S.F., Martinez J., Garvin J.Jr., Atwater J., Gillmer P. Study of a kindred with partial deficiency of red cell 2,3-diphosphoglycerate mutase (2,3-DPGM) and compensated hemolysis. // *Blood.* – 1978. – V.51, №6. – P.1107-16.
226. Tsirka A., Challa A., Lapatsanis P.D. Red cell phosphate metabolism in preterm infants with idiopathic respiratory distress syndrome. // *Acta Paediatr Scand.* – 1990. – V.79, №8-9. – P.763-8.
227. Turner A.J., Fisk L., Nalivaeva N.N. Targeting amyloid-degrading enzymes as therapeutic strategies in neurodegeneration. // *Ann N Y Acad Sci.* – 2004. – V.1035. – P.1-20.
228. Turner P.R., O'Connor K., Tate W.P., Abraham W.C. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. // *Prog Neurobiol.* – 2003. – V.70, №1. – P.1-32.

229. Ui M., Sumi T. Phosphofructokinase from Ehrlich ascites tumor. // *Methods in Enzymology*. – 1982. – V.90. – P.35-38.
230. Urbach H. Comment on: Brain Microbleeds and Alzheimer's Disease: Innocent Observation or Key Player? : Cordonnier C, van der Flier WM. *Brain*. 2011;134:335-44. // *Clin Neuroradiol*. – 2011. – V.21, №1. – P.43-4.
231. Uyklu M., Meiselman H.J., Baskurt O.K. Effect of hemoglobin oxygenation level on red blood cell deformability and aggregation parameters. // *Clin Hemorheol Microcirc*. – 2009. – V.41, №3. – P.179-188.
232. Valentine W.N., Tanaka K.R., Paglia D.E. Hemolytic anemias and erythrocyte enzymopathies. // *Ann Intern Med*. – 1985. – V.103, №2. – P.245-57.
233. Vonsattel J.P., Myers R.H., Hedley-Whyte E.T., Ropper A.H., Bird E.D., Richardson E.P.Jr. Cerebral amyloid angiopathy without and with cerebral hemorrhages: a comparative histological study. // *Ann Neurol*. –1991. –V.30, №5. – P.637-49.
234. Walls R., Kumar K.S., Hochstein P. Aging human erythrocytes. Differential sensitivity of young and old erythrocytes to hemolysis induced by peroxide in the presence of thyroxine. // *Arch Biochem Biophys*. – 1976. – V.174, №2. – P.463-8.
235. Walsh D.M, Lomakin A., Benedek G.B., Condron M.M., Teplow D.B. Amyloid β -protein fibrillogenesis: detection of a protofibrillar intermediate. // *J. Biol. Chem*. 1997. – V.272. – P.22364–72.
236. Walsh D.M., Klyubin I., Fadeeva J.V., Cullen W.K., Anwyl R., Wolfe M.S., Rowan M.J., Selkoe D.J. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. // *Nature*. –2002. – V. 416. – P. 535–539.
237. Wan J., Forsyth A.M., Stone H.A. Red blood cell dynamics: from cell deformation to ATP release. // *Integr Biol (Camb)*. – 2011. – V.3, №10. – P.972-81.
238. Wang J., Doré S. Inflammation after intracerebral hemorrhage. // *J Cereb Blood Flow Metab*. –2007. – V.27, №5. – P.894-908.

239. Wang P.N., Yang C.L., Lin K.N., Chen W.T., Chwang L.C., Liu H.C. Weight loss, nutritional status and physical activity in patients with Alzheimer's disease. A controlled study. // *J Neurol.* –2004. – V.251, №3. – P.314-20.
240. Warholm M., Guthenberg C., von Bahr C., Mannervik B. Glutathione Transferases from Human Liver//*Methods in Enzymology.* – 1985. – V.113. – P.499-504.
241. Weiss S.J. The role of superoxide in the destruction of erythrocyte targets by human neutrophils. // *J Biol Chem.* –1980. – V.255, №20. – P.9912-7.
242. Weller R.O., Boche D., Nicoll J.A. Microvasculature changes and cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease and their potential impact on therapy. // *Acta Neuropathol.* – 2009. – V.118, №1. – P.87-102.
243. Werring D.J., Frazer D.W., Coward L.J., Losseff N.A., Watt H., Cipolotti L., Brown M.M., Jäger H.R. Cognitive dysfunction in patients with cerebral microbleeds on T2*-weighted gradient-echo MRI. // *Brain.* – 2004. – V.127(Pt 10) – P.2265-75.
244. van Wijk R., van Solinge W.W. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. // *Blood.* – 2005. – V.106, №13. – P.4034-42.
245. Wiley J.S., Shaller C.C. Selective loss of calcium permeability on maturation of reticulocytes. // *J Clin Invest.* – 1977. – V.59, №6. – P.1113-9.
246. Wisniewski H.M., Vorbrodt A.W., Wegiel J. Amyloid angiopathy and blood-brain barrier changes in Alzheimer's disease. // *Ann N Y Acad Sci.* – 1997. – V.826. – P.161-72.
247. Wisniewski H.M., Wegiel J. Beta-amyloid formation by myocytes of leptomeningeal vessels. // *Acta Neuropathol.* – 1994. – V.87, №3.– P.233-41.
248. Wisniewski H.M., Wegiel J., Vorbrodt A.W., Mazur-Kolecka B., Frackowiak J. Role of perivascular cells and myocytes in vascular amyloidosis. // *Ann N Y Acad Sci.* –2000. – V.903. – P.6-18.
249. Wu C.W., Liao P.C., Yu L., Wang S.T., Chen S.T., Wu C.M., Kuo Y.M. Hemoglobin promotes A β oligomer formation and localizes in neurons and amyloid deposits. // *Neurobiol Dis.* – 2004. – V.17, №3. – P.367-77.

250. Xi G., Keep R.F., Hoff J.T. Erythrocytes and delayed brain edema formation following intracerebral hemorrhage in rats. // *J Neurosurg.* –1998. – V.89, №6. – P.991-6.
251. Xi G., Keep R.F., Hoff J.T. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. // *Lancet Neurol.* –2006. – V.5, №1. – P.53-63.
252. Xie Z., Dong Y., Maeda U., Alfile P., Culley D.J., Crosby G., Tanzi R.E. The common inhalation anesthetic isoflurane induces apoptosis and increases amyloid beta protein levels. // *Anesthesiology.* – 2006. – V.104, №5. – P.988-94.
253. Yanai N., Shiotani S., Hagiwara S., Nabetani H., Nakajima M. Antioxidant combination inhibits reactive oxygen species mediated damage. // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2008. – V.72, №12. – P.3100-3106.
254. Yoshiike Y., Kaye R., Milton S.C., Takashima A., Glabe C.G. Pore-forming proteins share structural and functional homology with amyloid oligomers. // *Neuromolecular Med.* –2007. – V.9, №3. – P.270-5.
255. Zammit V.A., Newsholme E.A. The Maimum Activities of Hexokinase, Phosphorylase, Phosphofructokinase, Glycerol Phosphate Dehydrogenases, Lactate Dehydrogenase, Octopine Dehydrogenase, Phosphoenolpyruvate Carboxykinase, Nucleoside Diphosphatekinase, Glutamate-Oxaloacetate Transaminase and Arginine Kinase in Relation to Carbohydrate Utilization in Muscles from Marine Invertebrates. // *Biochem. J.* –1976. –V.160. – P.447-462.
256. Zanella A., Fermo E., Bianchi P., Valentini G. Red cell pyruvate kinase deficiency: molecular and clinical aspects. // *Br J Haematol.* – 2005. – V.130, №1. – P.11-25.
257. Zlokovic B.V. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. // *Nat Rev Neurosci.* – 2011. –V.12, №12. – P.723-38.
258. Zlokovic B.V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. // *Neuron.* –2008. – V.57, №2. – P.178-201.