

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова  
Российской Академии Наук

Научный доклад об основных результатах подготовленной  
научно-квалификационной работы (диссертации)

**Исследование механизмов повреждения и восстановления  
эритроцитов при остром отравлении параоксоном**

Хмелевской Денис Александрович

06.06.01 - Биологические науки

03.01.04 - биохимия

Научный руководитель

д.б.н. Гончаров Николай Васильевич

ИЭФБ РАН  
Санкт-Петербург  
2019

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Эритроциты - высокоспециализированные клетки, которые переносят кислород от лёгких к тканям и диоксид углерода из тканей к альвеолам лёгких. Большое содержание кислорода в эритроцитах определяет высокую скорость образования активных форм кислорода (АФК), причем гемоглобин (Hb) является одним из основных источников АФК (Martin-Ventura et al., 2012). Избыток кислорода и АФК может привести к повышению редокс-потенциала, который находится под контролем редокс-пар – глутатиона GSH/GSSG, пиридиновых нуклеотидов NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> и тиоредоксина (Borlinghaus et al., 2014). Эритроциты содержат ферментативные системы, предотвращающие токсическое действие АФК и разрушение мембран эритроцитов. Иногда, если системы защиты не срабатывают, а также при естественном старении эритроциты погибают путем эриптоза - эритроцитарного апоптоза (Lang, Lang, 2015). Эриптоз может предшествовать и препятствовать гемолизу, но также может стать причиной анемии и нарушения микроциркуляции вследствие повышенной ригидности эритроцитов, вступивших на путь эриптоза.

Общим механизмом действия фосфорорганических соединений (ФОС) является ингибирование сериновых эстераз, но основной причиной летального эффекта ФОС считается ингибирование ацетилхолинэстеразы (АХЭ) нервно-мышечных и нейрональных синапсов. Помимо синапсов, на внешней поверхности эритроцитов находится Н-изоформа АХЭ, заякоренная в мембране жирной кислотой (Daniels, 2007), ингибирование которой может нарушить структурно-функциональные свойства эритроцитов. Однако характер этих нарушений практически не изучен, а немногочисленные работы в этой области не лишены методических недостатков. Например, в работе (Officioso et al., 2016) показано, что бромфенвинфос в концентрации  $\geq 100$  мкМ вызывает оксидативный стресс в эритроцитах и индуцирует их «суицидную» гибель через 2 суток. Однако авторы этой работы использовали очень высокую концентрацию ФОС, при которой, помимо ингибирования АХЭ, возможны другие эффекты. Так, авторы работы (Szatkowska et al., 2011) не обнаружили изменений скорости гемолиза, изменений уровня метгемоглобина (metHb), формы и размера эритроцитов человека после их инкубации в течение 1 ч с бромфенвинфос в диапазоне концентраций от 0.5 до 250 мкМ, однако обнаружили влияние примесей исследуемого соединения - дибромо-бромфенвинфос (влияет на форму и размер эритроцитов) и 2,4-дихлорфенацилбромид (кроме влияния на морфологию, примеси индуцируют гемолиз и повышают уровень metHb). Примеси (в особенности 2,4-

дихлорфенацил и его производные) активируют перекисное окисление липидов (ПОЛ), снижают активность каталазы, не влияя на активность супероксиддисмутазы (СОД) эритроцитов (Sosnowska et al., 2015). С учетом вышесказанного, важно проводить исследования действия ФОС на эритроциты при низких, токсикологически релевантных концентрациях, сопоставимых с их уровнем в крови при токсическом воздействии. При этом необходимо учитывать влияние растворителей. Так, DMSO в качестве растворителя ионофора A23187 в концентрации 280 мкМ не позволил получить ожидаемого эффекта и даже способствовал повышению внеклеточной концентрации ионов кальция, натрия и калия (Santos et al., 2002). Кроме того, в модельных экспериментах необходимо учитывать вероятность и последствия сочетанных эффектов веществ эндогенного и экзогенного происхождения. При интоксикации ФОС в организме развиваются вторичные процессы, в том числе генерация активных форм кислорода (АФК) нейтрофилами, эндотелиальными клетками, самими эритроцитами, поэтому важно понимать, какое воздействие оказывают АФК на эритроциты, у которых ингибирована АХЭ (Гончаров и др., 2010; Надеев и др., 2014). Оксидативный стресс эритроцитов обусловлен системными эффектами, при которых наблюдается окисление гемоглобина (Hb, Fe<sup>2+</sup>) с образованием метгемоглобина (metHb, Fe<sup>3+</sup>) и гемихрома (Fe<sup>4+</sup>). Помимо окисления Hb, оксидативный стресс ускоряет гибель эритроцитов, вызывая структурные изменения этих клеток с проявлением маркерных признаков апоптоза (активация каспазы 3, экстернализация фосфатидилсерина) (Mandal et al., 2002; Iuchi, 2012; Миндукшев и др., 2013). Предшествующая гибели трансформация клеток изменяет их эластичные свойства, которые могут быть оценены в гипоосмотических тестах. Тест осмотической устойчивости эритроцитов используют при диагностике ряда гематологических заболеваний, обусловленных оксидативным стрессом (Iuchi, 2012), таких как врожденный сфероцитоз или эллиптоцитоз, недостаточность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, серповидно-клеточной анемия, талассемия, а также для оценки состояния больных с уремией и диабетом. Низкая осмотическая устойчивость может привести к внутрисосудистому гемолизу; с другой стороны, повышение осмотической устойчивости (ригидности) может привести к ухудшению деформационных характеристик эритроцитов и нарушению микроциркуляции (Walski et al., 2014).

В токсикологии, особенно при изучении механизмов действия ФОС и разработке средств терапии отравлений, главной биохимической особенностью крыс, которую необходимо принимать во внимание, является наличие в плазме крови карбоксилэстеразной активности. В отличие от грызунов и зайцеобразных, в плазме крови

человека, обезьян и полорогих парнокопытных нет карбоксилэстераз (КЭ) (Li et al., 2005). Подавление активности КЭ плазмы крови грызунов может в значительной степени повысить адекватность экспериментальных моделей при изучении механизма действия и разработки новых антидотов против таких высокотоксичных ФОС как зоман, зарин, табун, параоксон (Maxwell et al., 1987; Maxwell, 1992; Duysen et al., 2012).

### **Цель и задачи исследования**

**Цель:** выяснить характер влияния параоксона на эритроциты крысы *in vitro* при токсикологически релевантных концентрациях в условиях оксидативного стресса, а также *in vivo* при однократном остром отравлении крыс на фоне ингибирования карбоксилэстераз плазмы крови.

### **Задачи:**

- 1) Исследовать действие параоксона и трет-бутилгидропероксида (tBH) на уровень АФК и активность эстераз в эритроцитах.
- 2) Исследовать действие параоксона и tBH на осмотическую устойчивость эритроцитов.
- 3) Исследовать действие параоксона и tBH на экстернализацию фосфатидилсерина в эритроцитах.
- 4) Исследовать биохимический статус эритроцитов крысы на разных сроках после острого отравления параоксоном с предварительным ингибированием карбоксилэстераз плазмы крови.

### **Положения, выносимые на защиту**

- 1) Параоксон не вызывает изменение спектральных характеристик гемоглобина, не индуцирует образование АФК и не увеличивает их уровень при оксидативном стрессе, вызванном tBH.
- 2) Осмотическая устойчивость эритроцитов повышается через сутки после воздействия параоксона лишь в максимальных токсикологически релевантных концентрациях, но параоксон в меньших концентрациях усиливает действие оксидативного стресса на осмотическую устойчивость эритроцитов.
- 3) Усиление осмотической устойчивости эритроцитов параоксоном в условиях оксидативного стресса является кальций-зависимым процессом.
- 4) Параоксон не индуцирует развитие апоптоза эритроцитов (эриптоза), но усиливает экстернализацию фосфатидилсерина в условиях оксидативного стресса.

- 5) Острое отравление крыс параоксоном обуславливает максимальные отклонения в системе антиоксидантной защиты эритроцитов.
- 6) Специфическое ингибирование карбоксилэстеразы плазмы крови крыс обуславливает более значительные изменения уровня или активности исследованных биохимических показателей эритроцитов.

### **Научная новизна**

Впервые проведено исследование влияния высокотоксичного фосфорорганического соединения параоксона на развитие оксидативного стресса в эритроцитах, изменение их ригидности и характер гибели клеток. Установлено, что параоксон не влияет на соотношение окисленных и восстановленных форм гемоглобина и активность внутриклеточных эстераз, слабо влияет на осмотическую устойчивость эритроцитов, но усиливает ригидность клеток и развития в них апоптоза в условиях оксидативного стресса; этот эффект параоксона зависит от наличия ионов  $Ca^{2+}$  во внеклеточной среде. Важность исследования оксидативного стресса в эритроцитах после острого отравления ФОС доказана в экспериментах *in vivo*, в которых установлены максимальные отклонения в системе антиоксидантной защиты эритроцитов.

### **Теоретическое и практическое значение работы**

Полученные данные свидетельствуют о слабом неспецифическом влиянии параоксона на эритроциты, которое усиливается в условиях оксидативного стресса. Теоретическое значение выявленных эффектов состоит в том, что получены сведения о наличии молекулярных механизмов, связывающих активность Н изоформы ацетилхолинэстеразы эритроцитов и кальций-зависимых процессов эритроцитоза; тем самым положено начало более глубокому исследованию этих механизмов и их взаимосвязи с механизмами оксидативного стресса. Практическое значение полученных в настоящей работе данных состоит в очевидной необходимости разработки или совершенствования адьювантной терапии с использованием антиоксидантов, снижающих неспецифические эффекты ФОС, повышая тем самым выживаемость организма при остром отравлении и/или снижающих вероятность развития отставленной патологии. Кроме того, исследования последствий острой интоксикации на фоне специфического ингибирования карбоксилэстеразы плазмы крови крыс вносят существенный вклад в развитие трансляционной медицины, основная задача которой – обеспечить адекватную интерпретацию данных, полученных в экспериментах на животных, применительно к человеку.

## **Апробация работы**

Результаты исследований доложены на IX Международной конференции "Биоантиоксидант" (Москва, 2015 г.) и на международных конференциях «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2015 и 2017 гг).

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Реактивы.** Трет-бутилгидропероксид (tBH, Sigma), хелатор двухвалентных катионов EGTA (этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N'-тетрауксусная кислота, Sigma), параоксон (этил-параоксон, Sigma), диметилсульфоксид (DMSO, Sigma), 2-(о-крезил)-4Н-1,3,2-бензодиафосфорин-2-оксид (2-(O-cresyl)-4Н-1,3,2-benzodioxaphosphorin-2-oxide, CBDP, синтезирован в НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России). Флуоресцентные красители: аннексин-V-FITC (BD Pharmingen), эозин-5-малеимид (5-малеимид-эозин, Sigma), дихлорфлуоресцеиндиацетат (2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетат, DCF-DA, Sigma), кальцеин-AM (кальцеина ацетоксиметилловый эфир, Molecular Probes, США).

**Подготовка суспензии эритроцитов.** Венозную кровь аутобредных крыс линии Вистар собирали в пробирки с антикоагулянтом (гепарин). Образцы суспензии эритроцитов получали после двукратной промывки изотоническим буфером pH 7.4, 300 мОсм, содержащим (мМ): 150 NaCl, 5 KCl, 3 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 5 D-глюкоза, при центрифугировании по 3 мин при 350 g (центрифуга ЕС-50, Elmi, Латвия). Контроль параметров инкубационной среды: pH-метр (Mettler Toledo, США) и криоскопический осмометр Osmomat 030 (Gonotec, Германия). При подготовке суспензии эритроцитов контролировали концентрацию клеток - RBC и объем эритроцита – MCV (гематологический анализатор Medonic-M20, Boule Medical A.B., Швеция). Инкубацию суспензии эритроцитов с конечной концентрацией клеток  $0.5 \times 10^{12}/л$  проводили в термошейкере TS-100 Biosan при температуре 37°C, в режиме встряхивания с частотой 450/мин, в кальциевой (2 мМ CaCl<sub>2</sub>) или бескальциевой (2 мМ EGTA) изотонической среде. Растворы POX и tBH в буфере готовили непосредственно перед экспериментом. Исследование выполнено с учетом требований Хельсинской декларации о гуманном отношении к лабораторным животным.

**Спектроскопия.** Оценку форм гемоглобина проводили на основании спектров после лизиса клеток в воде. Спектр гемоглобинов анализировали на сканирующем спектрофотометре СПЕКС ССП-715-М (ООО «Спектроскопические системы», Россия) в

диапазоне от 400 до 700 нм. Концентрацию оксигемоглобина (oxyHb) и метгемоглобина (metHb) рассчитывали по абсорбции при 560, 576, 630 и 700 нм, согласно уравнениям (Benesch et al., 1973).

**Проточная цитометрия.** Анализ флуоресценции образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Процент аннексин-положительных клеток оценивали по экспозиции фосфатидисерина во внешнем монослое мембраны по связыванию с аннексином V-FITC. Общую жизнеспособность клеток оценивали по активности внутриклеточных эстераз в тесте с кальцеином АМ (возбуждение 495 нм, эмиссия 515 нм). Интенсивность образования свободнорадикальных продуктов оценивали по степени флуоресценции с DCF-DA. Клетки нагружали DCF-DA после инкубации с РОХ или tВН, что позволяло оценивать развитие оксидативного стресса. Пробоподготовку клеток для проточной цитометрии проводили для всех зондов одинаковым образом. Для окрашивания отбирали аликвоту суспензии инкубированных эритроцитов  $0.5 \times 10^{12}/л$  через выбранные промежутки времени, и разводили в буфере до концентрации  $0,6 \times 10^6$  кл/200мкл. Подготовленные клетки инкубировали с рабочими растворами флуоресцентных красителей (аннексин V-FITC 0.5 мкг/пробу, 15 мин; кальцеин-АМ 0.5 мкМ/пробу, 30 мин при 37°C; DCF-DA 50 мкМ/пробу, 20 мин), все образцы окрашивали в темноте. Инкубацию останавливали внесением 200 мкл буфера, и пробирки сразу переносили на счет цитометра.

**Определение осмотической резистентности эритроцитов** проводили на лазерном анализаторе «ЛАСКА» (ООО «БиоМедСистем», Россия). В условиях гипоосмотической нагрузки одновременно регистрировали динамику интенсивности светорассеяния в диапазоне углов 1-12 градусов. Метод позволяет хорошо различать процессы изменения объема клеток от их лизиса. Для частиц размером 1-10 мкм при увеличении объема характерно увеличение интенсивности светорассеяния в диапазоне углов 1-5 градусов и уменьшение интенсивности светорассеяния в диапазоне углов 8-12 градусов. При лизисе все сигналы снижаются во всем диапазоне углов до фона кюветы (Миндукшев и др., 2010; Mindukshev et al., 2010). Зависимость процента лизированных клеток (*Lysis%*) от осмотичности среды (*osmol*, мОсм) носит сигмоидный характер и хорошо подчиняется уравнению Хилла:  $Lysis\% = 100 \frac{Osm50^h}{Osm50^h + osmol^h}$  (1), где *Osm50* – осмотичность среды, при которой лизируют 50% клеток, *h* – коэффициент Хилла. Параметр *Osm50* характеризует ригидность клеток: чем меньше его величина, тем клетки более жесткие (снижение способности к деформации) и более устойчивы к

гипосмотической нагрузке. Коэффициент Хилла характеризует гетерогенность популяции: при низком значении  $h$  диапазон гемолитической реакции популяция эритроцитов значительно расширен.

**Токсикологические и биохимические исследования** проводили на крысах-самцах аутбредной линии Вистар массой 200-240 г в соответствии с положениями «Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (Хабриев, 2005) и требованиями Приказа Минздравсоцразвития РФ №708н от 23.08.2010. Интактных животных содержали в отдельных клетках. Параоксон вводили п.к. в область холки в объеме из расчета 100 мкл на 100 г веса крысы, двукратно с интервалом 1 час (РОХ2х, дозы 0.45+0.6ЛД<sub>50</sub>) и через час после СВDP в дозе 0.6ЛД<sub>50</sub> (группа СВРОХ). СВDP вводили внутрибрюшинно в дозе 3.3 мг/кг. Измерение показателей проводили через 3 и 24 ч, 1, 2, 4, 6 и 12 недель после воздействия. На каждую временную точку было взято не менее 6 животных. Кровь собирали в охлажденные гепаринизированные пробирки, центрифугировали 3 мин при 800g и отбирали плазму для анализа. Эритроциты отмывали дважды в охлажденном растворе 145 mM NaCl, центрифугируя суспензию эритроцитов при 800g по 3 мин. Надосадок и верхний слой эритроцитов (10% от общего объема) отбрасывали. Отмытые эритроциты и плазму хранили при -70°C. Определение концентрации метгемоглобина (metHb) проводили, используя непрямой метод Evvelyn и Malloy в модификации Кушаковского (Покровский, 1969). Концентрацию общего глутатиона определяли по методу Вудворда и Фрая (Woodward, Fry, 1932), восстановленной формы глутатиона (GSH) – по методу Элмана (Ellman, 1959). Активность глутатионпероксидазы 1 типа (GP) в эритроцитах определяли по методу Разыграева (2013). Общую концентрацию гемоглобина (Hb) в отмытых эритроцитах определяли гемиглобинцианидным методом (наборы фирмы Синтакон, Россия). Активность каталазы оценивали по методу Королюка и др. (1988), глутатионредуктазы (GP) – по Юсуповой (1989), глутатион-S-трансферазы (GST) – по (Карпищенко, 1999), активность лактатдегидрогеназы (LDH) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (GPDH) – с использованием наборов RANDOX (Великобритания).

**Статистический анализ** данных, полученных в экспериментах *in vitro*, выполняли с помощью программы IBM SPSS 22.0. Данные представлены в виде средних величин и их стандартных отклонений, полученных по результатам как минимум 6 отдельных экспериментов, пробы в эксперименте готовили в дубле. Статистическую значимость результатов определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Значения  $p < 0.05$  принимали как значимые. Статистическая обработка данных, полученных в

экспериментах *in vivo*, включала в себя расчет среднего значения и стандартной ошибки среднего ( $m \pm SEM$ ), а также медианы, 1 и 3 квартиля. Оценку значимости различий между сформированными группами проводили по критерию Стьюдента и Манна-Уитни, для оценки различий зависимых выборок использован Т-критерий Вилкоксона. Уровень корреляции рассчитывали по Спирмену (значение  $\rho$ , 2-сторонняя). Различия считали значимыми при уровне достоверности 95% ( $p < 0.05$ ). Расчеты проводили в двух совместимых средах Excel 2016 и IBM SPSS 23.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

***Исследование действия параоксона и трет-бутилгидропероксида (tBH) на уровень АФК и активность эстераз в эритроцитах.*** tBH является низкомолекулярным соединением – стабильным аналогом активных форм кислорода (АФК), которое легко проникает в клетку. При умеренных дозах tBH вызывает в эритроцитах комплекс следующих реакций: снижение эстеразной, в том числе карбоангидразной, активности; окисление Hb до metHb и гемихрома; активацию каспазы 3; экстернализацию фосфатидилсерина; кластеризацию полосы 3; везикуляцию эритроцитов с образованием микрочастиц (Миндукшев и др., 2013; Скверчинская и др., 2015). При инкубации эритроцитов с параоксоном (POX) эти реакции практически не проявляются. В отличие от tBH, POX не вызывал изменение спектральных характеристик Hb. Так, через 24 ч уровень metHb в пробах с POX не отличался значимо от контрольных показателей ( $4.7 \pm 0.9\%$  в контроле и  $5.1 \pm 0.8\%$  при действии 330 нМ POX). POX не индуцирует образование АФК и не увеличивает их уровень при действии tBH (рис. 1а). tBH уже в первый час воздействия статистически значимо подавлял эстеразную активность в эритроцитах, в то время как POX не оказывал самостоятельного эффекта и не изменял эффект tBH (рис. 1б).

***Исследование действия параоксона и tBH на осмотическую устойчивость эритроцитов.*** Следствием развития оксидативного стресса в эритроцитах является ухудшение их деформационных характеристик, которые могут быть оценены тестом на осмотическую нагрузку. Базовым параметром разработанного теста является величина *Osm50*, характеризующая эластичность клеток: чем она меньше, тем клетки более жесткие (ригидные) и более устойчивы к гипоосмотической нагрузке. Мы провели серию экспериментов, в которых варьировали дозу POX ( $10 \div 330$  нМ) и tBH ( $10 \div 330$  мкМ) при их самостоятельном и совместном действии. В отличие от tBH, POX практически не влиял на ригидность клеток, статистически значимый результат отмечен только через 24 ч при

максимальной концентрации 330 нМ (рис. 2а). tBH достоверно повышал ригидность эритроцитов, начиная с концентрации 33 мкМ через 24 ч (рис. 2б). При концентрации 330 мкМ значимый эффект tBH проявляется уже через 3ч после воздействия. При совместном действии POX и tBH (рис. 2в,г) прослеживается тенденция к потенцированию действия tBH параоксоном, наибольший эффект ожидаемо наблюдается при максимальных концентрациях POX и tBH (330 нМ и 330 мкМ соответственно) через 24 ч после воздействия: величина *Osm50* снижается почти в 2 раза.

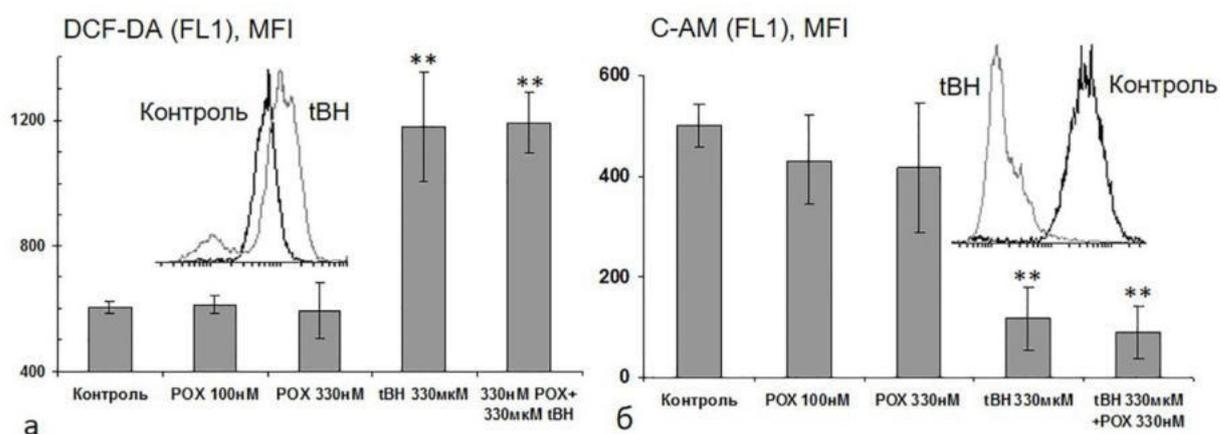


Рисунок 1. Действие tBH и POX на уровень АФК и ингибирование внутриклеточной эстеразной активности. Данные проточной цитометрии, MFI – значение интенсивности флуоресценции.

Отличия от контроля: \*-  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ . Слева: зависимость интенсивности флуоресценции дихлорофлуоресцеиндиацетата (DCF-DA) через 1 ч после добавления POX (100 нМ, 330 нМ), tBH (330 мкМ) и обоих веществ (POX 330 нМ + tBH 330 мкМ). Справа: зависимость интенсивности флуоресценции кальцеин АМ через 1ч после добавления POX (100 нМ, 330 нМ), tBH (330 мкМ) и обоих веществ (POX 330 нМ + tBH 330 мкМ). На врезках – гистограммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции, FL1.

Кроме изменения величины *Osm50*, POX уменьшает коэффициент Хилла, что свидетельствует о "расслоении" популяции эритроцитов на ряд неоднородных по своим морфофункциональным характеристикам субпопуляций. Через 24 ч после сочетанного воздействия POX 330 нМ и tBH 330 мкМ клетки настолько ригидны, что лизис 50% клеток наблюдается лишь при снижении осмотичности среды в 6 раз (от 300 до 50 мОсм). Мы определили эффект усиления ригидности клеток при действии tBH 0.5 мМ и потенцировании эффекта параоксоном (концентрации 100 и 330 нМ). Через 3ч tBH вызывает половинный эффект усиления ригидности ( $EC_{50} = 457 \text{ мкМ}$ ), при совместном действии POX (100 и 330 нМ)  $EC_{50}$  уменьшается до 336 мкМ и 133 мкМ соответственно. Таким образом, концентрация POX 330 нМ вызывает снижение  $EC_{50}$  более чем в 3 раза,

что предполагает развитие оксидативного стресса и гибели клеток при меньших концентрациях tBH.

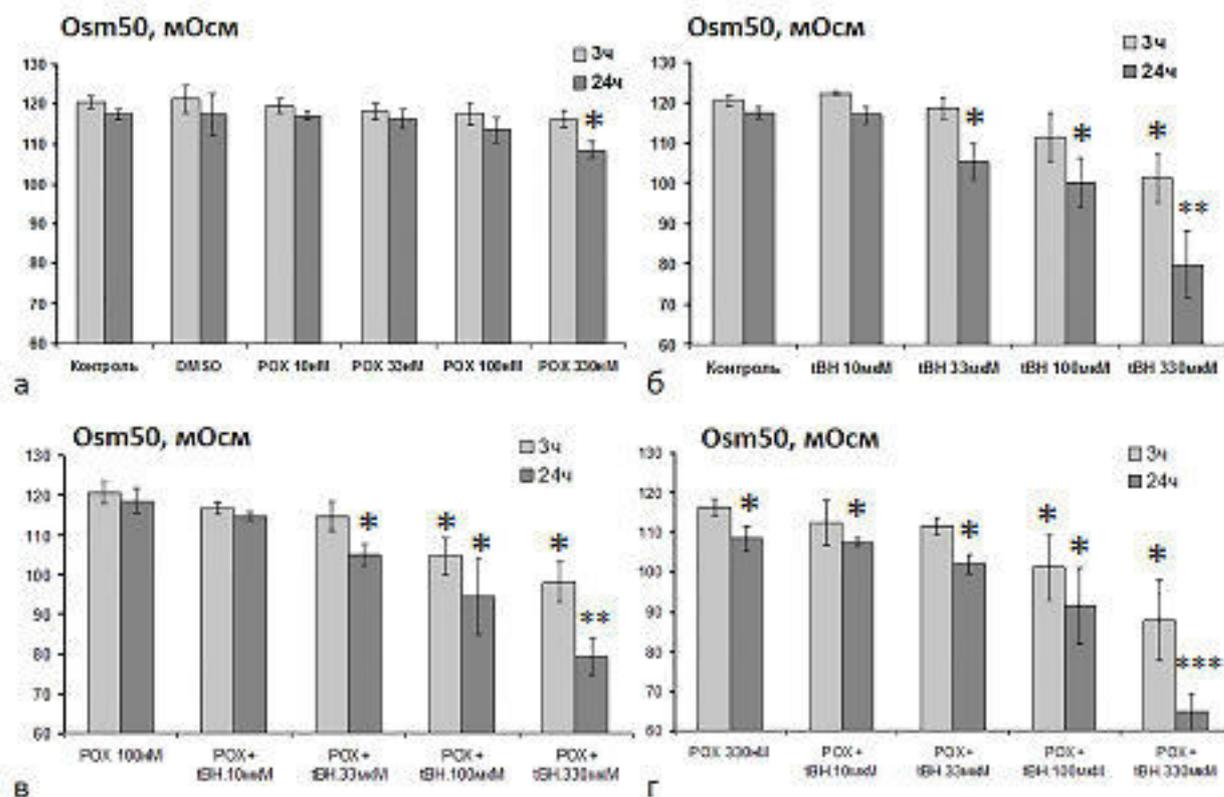


Рисунок 2. Индекс осмотической устойчивости (*Osm50*) эритроцитов крыс при действии POX, tBH и их совместном действии через 3 и 24 ч (данные лазерного анализатора частиц «ЛаСка», метод малоуглового светорассеяния).

Отличия от контроля: \*-  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ , \*\*\* -  $P < 0.001$ .

а – Значения *Osm50* (мОсм) для контрольных клеток, при действии DMSO (0.01%) и при действии POX в диапазоне концентраций 10÷330 нМ.

б – Значения *Osm50* для контрольных клеток при действии tBH в диапазоне концентраций 10÷330 мкМ.

в – Значения *Osm50* при сочетанном воздействии POX 100 нМ и tBH в диапазоне концентраций 0÷330 мкМ.

г – Значения *Osm50* при сочетанном воздействии POX 330 нМ и tBH в диапазоне концентраций 0÷330 мкМ.

Ранее было установлено, что весь комплекс реакций, связанных с оксидативным стрессом при действии tBH, протекает как в кальциевой, так и в бескальциевой средах, т.е. является кальций-независимым (Миндукшев и др., 2013). Однако потенцирующий эффект POX проявляется только в кальциевой среде. На рис.3 показано изменение величины *Osm50* при сочетанном действии tBH (330 мкМ) и POX (330 нМ) через 3 ч инкубации в среде с присутствием 2 мМ CaCl<sub>2</sub> и в бескальциевой среде с 2мМ EGTA.

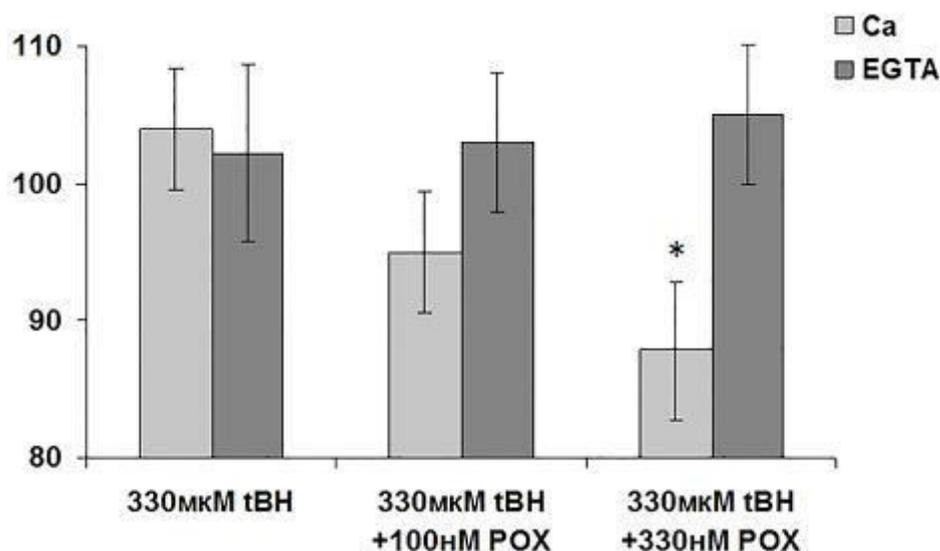


Рисунок 3. Индекс осмотической устойчивости (*Osm50*) эритроцитов крысы при совместном действии POX 330 нМ и tBH 330 мкМ через 3 ч в кальциевой (2мМ) и в бескальциевой средах с 2 мМ EGTA (данные лазерного анализатора частиц «ЛаСка», метод малоуглового светорассеяния).

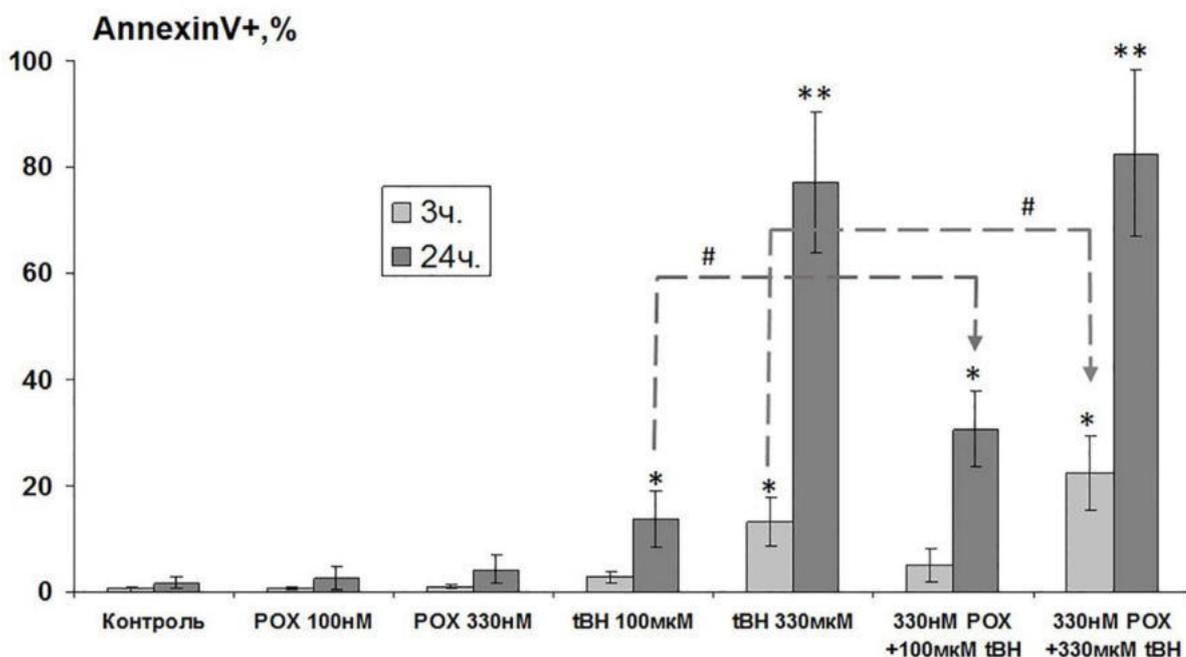
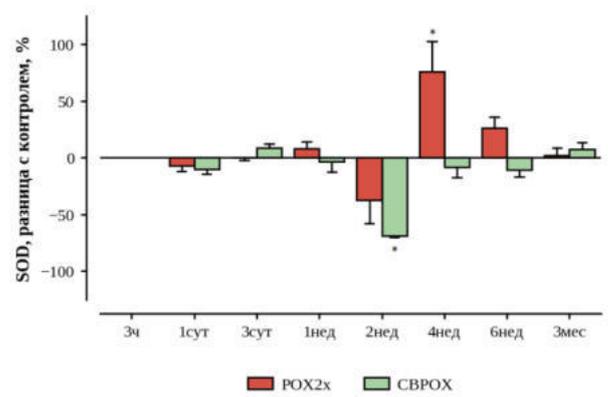
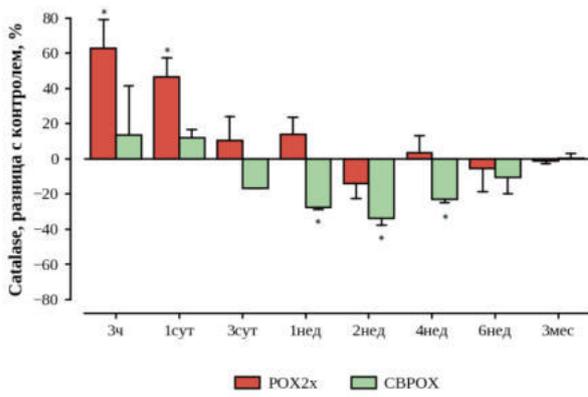


Рисунок 4. Трансформация мембран эритроцитов при действии POX в условиях оксидативного стресса, индуцированного tBH. Данные проточной цитометрии. Процент аннексин-положительных (AnnexinV+) клеток через 3 и 24 ч после добавления в суспензию эритроцитов крыс ( $0.5 \times 10^{12}/L$ ) tBH (100 и 330 мкМ), POX (100 и 330 нМ) и их сочетаний в кальциевой среде (2 мМ  $CaCl_2$ ). Отличия от контроля: \* -  $P < 0.05$ , \*\* -  $P < 0.01$ . Отличия между действием tBH и сочетанным действием tBH + POX: # -  $P < 0.05$ .

**Исследование действия параоксона и tBH на экстернализацию фосфатидилсерина в эритроцитах.** Действие tBH в эритроцитах вызывает активацию каспазы 3 и экстернализацию на поверхность клетки фосфатидилсерина, одного из базисных маркеров апоптоза (Mandal et al., 2002; Миндукшев и др., 2013). В наших экспериментах наибольшее значение аннексин-положительных клеток отмечено через сутки инкубации эритроцитов крыс с tBH 330 мкМ. Результаты показали, что POX при концентрации до 1 мкМ в течение 24 ч не индуцирует экстернализацию фосфатидилсерина, но потенцирует его экстернализацию при совместном действии с tBH. На рис. 4 стрелками показано потенцирование эффекта tBH в концентрации 330 мкМ через 3 ч и tBH в концентрации 100 мкМ через 24 ч.

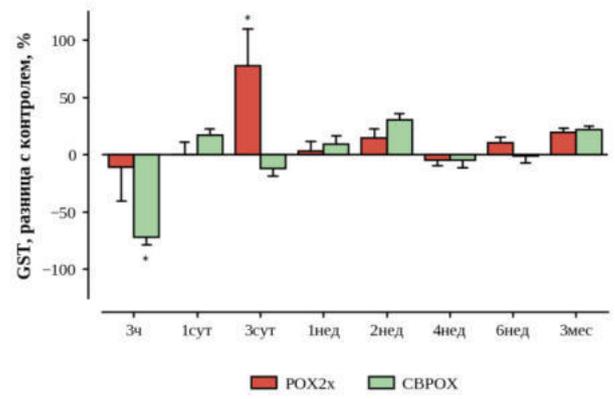
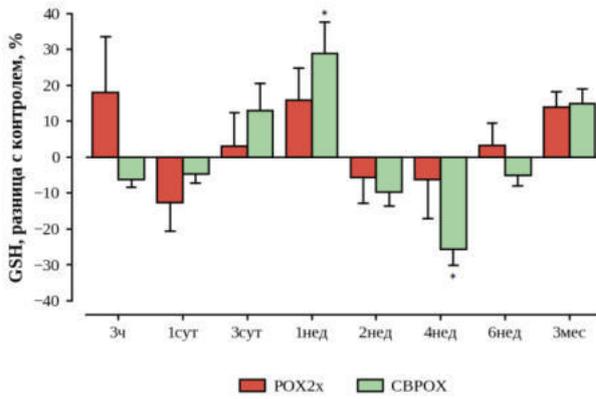
**Исследование биохимического статуса эритроцитов крысы после острого отравления.** Проведено биохимическое исследование эритроцитов, полученных от крыс на разных сроках (от 3 часов до 3 месяцев) после отравления параоксоном по двум схемам без ингибирования и с предварительным ингибированием КЭ плазмы крови (группы POX2x и СВРОХ, соответственно). Определяли уровень или активность следующих показателей метаболизма и системы антиоксидантной защиты эритроцитов: глутатион (GSH), глутатионтрансфераза (GST), глутатионпероксидаза (GP), глутатионредуктаза (GR), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (GPDH), каталаза, супероксиддисмутаза (SOD), лактатдегидрогеназа (LDH), метгемоглобин (MetHb), а также гемоглобин, по отношению к которому были нормированы все показатели, за исключением MetHb. Отметим достоверные изменения в двух группах по отношению к контролю. Активность каталазы повышена в группе POX2x на 60 и 45% через 3 и 24 ч, соответственно, но снижена в группе СВРОХ на 25, 35 и 20% через 1, 2 и 4 нед, соответственно (рис. 5а). Активность SOD снижена на 70% в группе СВРОХ через 2 нед, но повышена на 70% в группе POX2x через 4 нед (рис. 5б). В эритроцитах крыс группы СВРОХ уровень GSH повышен на 30% через 1 нед, но снижен на 25% через 4 нед (рис. 6а). Активность GST снижена на 70% через 3 ч в группе СВРОХ, но повышена на 75% в группе POX2x (рис. 6б). Активность GP достоверно снижена на 10% лишь в группе СВРОХ и только через 4 нед (рис. 6в). Активность GR повышена в группе POX2x через 3 ч на 70% и через 3 сут на 30%, тогда как в группе СВРОХ снижена на 40% через 2 нед (рис. 6г).



а

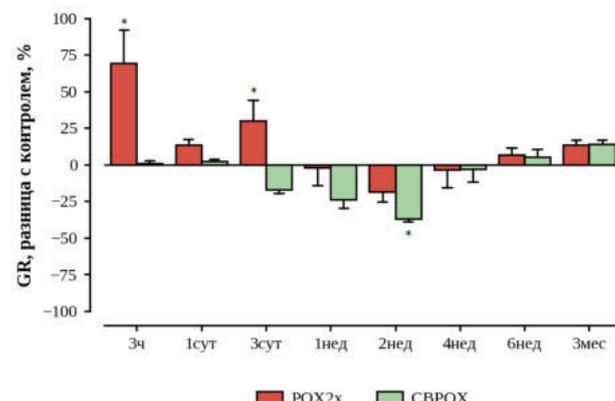
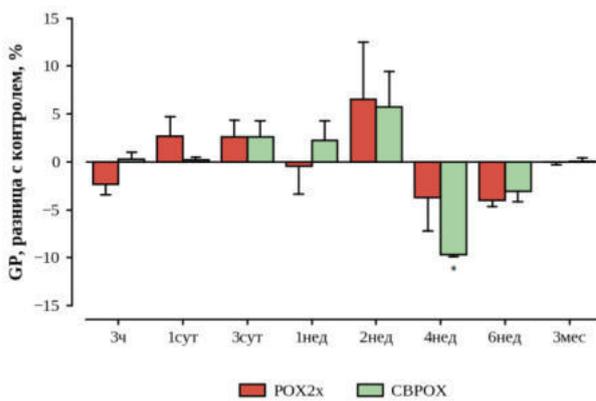
б

Рисунок 5. Динамика активности каталазы (а) и супероксиддисмутазы (б) в эритроцитах крыс на разных сроках после отравления параоксоном в группах РОХ2х и СВРОХ.



а

б

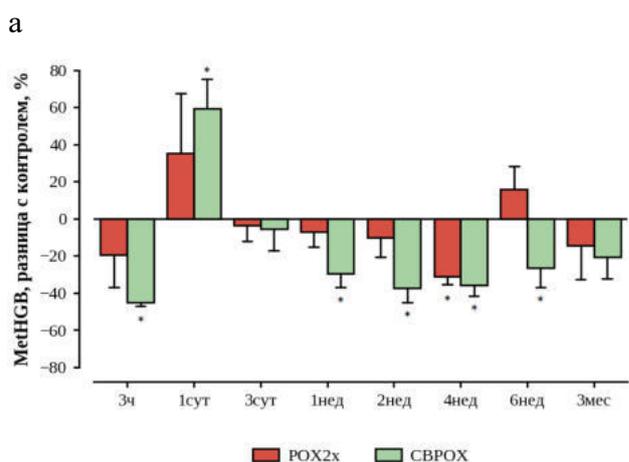
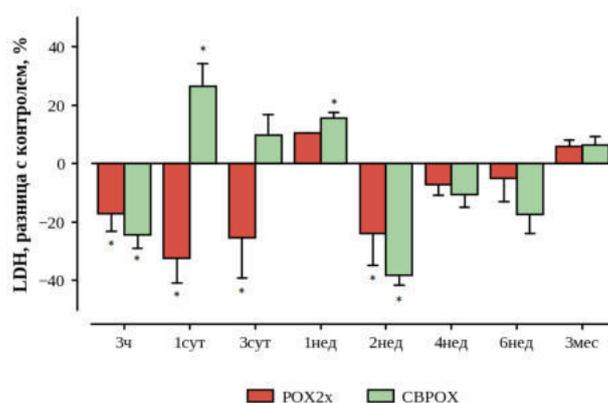
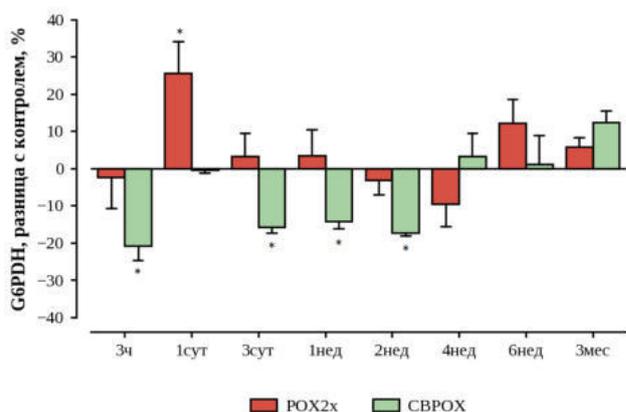


в

г

Рисунок 6. Динамика уровня восстановленного глутатиона (а) и активности сопряженных с ним ферментов: глутатионтрансферазы (б), глутатионпероксидазы (в) и глутатионредуктазы (г) в эритроцитах крыс на разных сроках после отравления параоксоном в группах РОХ2х и СВРОХ.

Активность GPDH снижена в группе СВРОХ на 20% через 3 ч и на 14-16% через 3 сут, 1 и 2 нед. В группе РОХ2х отмечено повышение активности GPDH на 25% через 1 сут (рис. 7а). Активность LDH в группе РОХ2х снижена на 15, 30, 25 и 20% через 3ч, 1, 3 сут и 2 нед, соответственно, тогда как в группе СВРОХ изменения имеют отчетливо выраженный фазовый характер: за снижением на 25% через 3 ч следует повышение на 25% через 1 сут, далее через 3 сут и 1 нед LDH повышена на 10-15%, а через 2 нед снижается на 40%, полностью восстанавливаясь лишь к 12 неделе после отравления (рис. 7б). Направленность (но не степень) изменений уровня MetHb максимально совпадает в эритроцитах двух экспериментальных групп животных, по сравнению с другими показателями. При этом более значительно выражены изменения MetHb в группе СВРОХ: снижение на 45% через 3ч, затем повышение на 60% через 1 сут, но снова снижение на 30-35% в период от 1 до 6 нед включительно. В группе РОХ2х отмечено достоверное снижение на 30% лишь через 4 нед (рис. 7в).



б

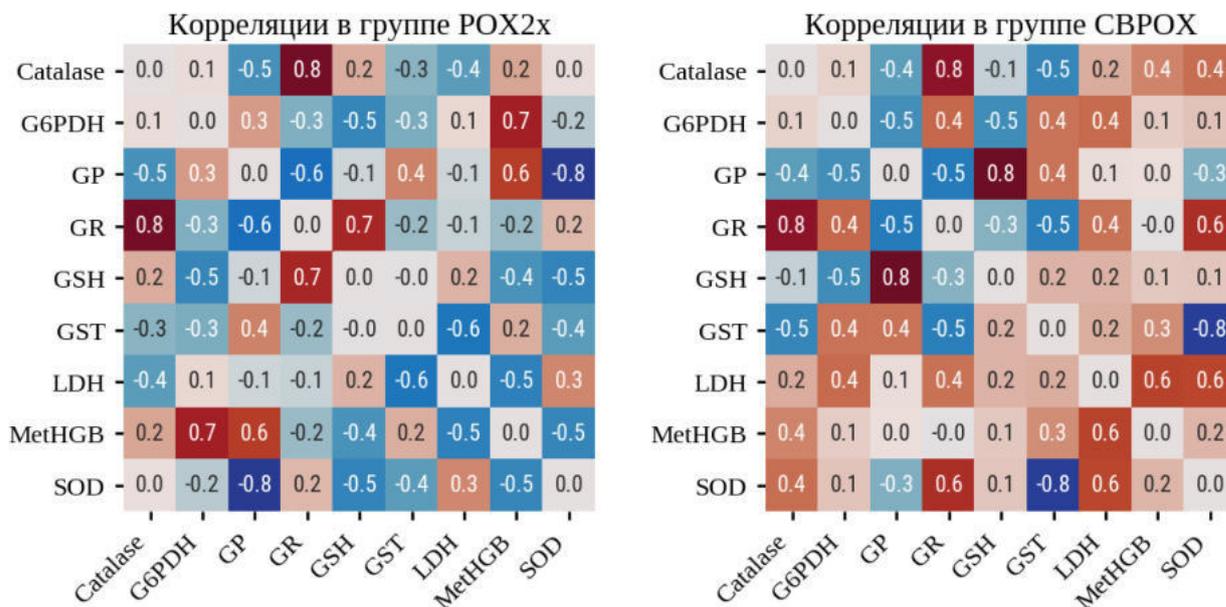
Рисунок 7. Динамика активности некоторых ферментов метаболизма глюкозы и лактата (а – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, б – лактатдегидрогеназа) и уровня метгемоглобина (в) в эритроцитах крыс на разных сроках после отравления параоксоном в группах РОХ2х и СВРОХ.

в

В порядке обобщения отметим характерные тенденции: в группе СВРОХ изменения уровня или активности исследованных показателей выражены сильнее по сравнению с группой РОХ2х, особенно на средних сроках (1-4 нед), тогда как в группе

РОХ2х максимальные изменения наблюдаются на близких сроках (3ч – 3сут), за исключением SOD и MetHb. Максимальные по амплитуде изменения, независимо от групповой принадлежности, выявлены в системе глутатиона, активности каталазы и SOD, уровне MetHb, тогда как изменения активности ферментов метаболизма глюкозы и лактата выражены не столь ярко по амплитуде, но зато имеют место на протяжении всего периода наблюдений вплоть до 3 мес.

Корреляционный анализ показателей эритроцитов в группе РОХ2х выявил максимальные положительные корреляции (теснота связи 0,7-0,8) между активностью GR и каталазы, GR и GSH, GPDH и уровнем MetHb, максимальная отрицательная корреляция (теснота связи -0,8) выявлена между активностями GP и SOD (рис. 8а). Корреляционный анализ показателей эритроцитов в группе СВРОХ выявил максимальные положительные корреляции (теснота связи 0,6-0,8) между активностями GR и каталазы, GP и GSH, LDH и уровнем MetHb, LDH и SOD, GR и SOD, максимальная отрицательная корреляция (теснота связи -0,8) выявлена между GST и SOD (рис. 8б).



а

б

Рисунок 8. «Теплокарты» демонстрируют результаты корреляционного анализа биохимических показателей эритроцитов крыс после острого отравления параоксоном в группах РОХ2х (а) и СВРОХ (б)

## ОБСУЖДЕНИЕ

Димерная сплайсированная АХЭ эритроцитов является неотъемлемым белковым компонентом их мембраны, количество которого составляет от 3000 до 5000 молекул на клетку, и который, помимо собственно ферментативной активности, определяет группу крови Yt с двумя изоформами a/b (Spring et al., 1992). АХЭ эритроцитов участвует в регуляции уровня не-нейронального ацетилхолина, который синтезируется многими клетками, в том числе эндотелиальными и лейкоцитами, выполняя трофические и противовоспалительные функции (Wessler et al., 1999; 2003). Помимо АХЭ, в мембранах эритроцитов имеются мускариновые M1 рецепторы, активация которых ацетилхолином обуславливает повышение уровня окиси азота и его производных в клетках (Wessler et al., 1999; 2003), снижение уровня оксигемоглобина, активности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, но повышение лактата и соотношения cGMP/cAMP (Carvalho et al., 2004; 2008). Функциональная взаимосвязь АХЭ с другими мембранными и внутриклеточными структурами эритроцитов практически не изучена, однако имеются основания считать, что АХЭ выполняет не только ферментативные функции на внешней стороне мембраны, но и связана с внутриклеточными структурами эритроцитов. В связи с этим интерес представляет работа (Teixeira et al., 2015), в которой показано снижение уровня внутриклеточного s-нитрозоглутатиона (показатель мобилизации внутриклеточного оксида азота) в эритроцитах человека как под влиянием ингибитора протеинкиназы С хелетрина, так и посредством конформационных изменений АХЭ с использованием специфических антител. В то же время, внеклеточный кальций несколько повышает активность АХЭ, предположительно за счет стабилизации конформации фермента (Santos et al., 2002).

Исследованная у людей активность АХЭ имеет естественные колебания, связанные с возрастом циркулирующих эритроцитов. Так, во фракции старых (тяжелых) эритроцитов активность АХЭ снижается в 1.5-2 раза, с 25-26 до 12-16 Ед/г\_Нв, при этом отмечены гендерные отличия - у женщин снижение активности в старых эритроцитах выражено сильнее, чем у мужчин (Prall et al., 1998). В отличие от естественных колебаний активности, острая интоксикация ФОС сопряжена с резким подавлением активности АХЭ и повышением уровня ацетилхолина, что является главной причиной нервнопаралитического эффекта с летальным исходом или развитием отставленной патологии (Гончаров и др., 2010; Шмурак и др., 2012). Кроме того, в период интоксикации происходит активация систем генерации АФК в эритроцитах и клетках иммунной системы, что является дополнительным стрессорным фактором, усугубляющим их

состояние с последующим повышением уровня МДА, активности каталазы, супероксиддисмутазы и глутатион-пероксидазы (Hundekari et al., 2013).

Несмотря на многочисленные публикации, посвященные токсикологии ФОС, остаются неизученными вопросы, связанные с физиологией эритроцитов в условиях сочетанного действия АФК на фоне ингибиторов АХЭ в токсикологически релевантных концентрациях. Ранее было показано, что метод малоуглового светорасеяния позволяет в динамике оценивать различные виды трансформации эритроцитов, соответствующие некрозу и апоптозу (эриптозу) (Mindukshev et al., 2007). Полученные нами данные по сочетанному действию ФОС и АФК позволили установить, что действие РОХ на эритроциты в нормальных условиях не сказывается на уровне АФК и активности внутриклеточных эстераз. Однако в условиях индуцированного оксидативного стресса ингибирование АХЭ потенцирует эффекты, связанные с ухудшением деформационных характеристик эритроцитов и провоцирует клеточную гибель, сопряженную с экстернализацией фосфатидилсерина. Эффекты РОХ не связаны с DMSO, так как в наших экспериментах уровень DMSO соответствовал разведению РОХ их маточного раствора, не превышая 180 мкМ. Так как эти эффекты РОХ наблюдаются только в кальциевой среде, очевидно, что потенцирующий эффект связан с избыточным потоком ионов кальция внутрь клетки и(или) ослабленной активностью  $Ca^{2+}$ -АТФазы эритроцитов. Повышение уровня внутриклеточного кальция обуславливает диссоциацию тирозиновой фосфатазы от полосы 3 и усиливает фосфорилирование полосы 3 тирозиновыми киназами p72syk, p53/56lyn и p59/61hck (Carvalho et al., 2008; Zipser et al., 2002). Кроме того, повышенный уровень кальция в эритроцитах обуславливает снижение уровня АТФ, повышение уровня церамида вследствие высокой активности сфингомиелиназы, стимулирует каспазу 3 и киназу p38 (Shaik et al., 2012). Кальций активирует кальпаины, скрамблазу и Гардос-каналы, ингибирует флиппазу, – эти и другие процессы приводят к экстернализации фосфатидилсерина и гибели эритроцитов по апоптотическому механизму (Bogdanova et al., 2013).

Эффекты сочетанного воздействия на эритроциты первичного специфического фактора в токсикогенную фазу и вторичных неспецифических факторов в соматогенную фазу интоксикации необходимо учитывать при разработке или совершенствовании комбинированных средств терапии и предупреждения оставленных последствий. В связи с этим, выявленный нами механизм потенцирования оксидативного стресса в эритроцитах заслуживает дальнейшего изучения. Особый интерес представляет модуляция ригидности эритроцитов при сочетанном воздействии ФОС, ацетилхолина и АФК.

Специфика отличий наблюдаемой динамики уровня GSH и MetHb, а также активности исследованных ферментов эритроцитов между группами POX2x и СВРОХ после острого отравления крыс параоксоном во многом обусловлена степенью ингибирования карбоксилэстераз плазмы крови посредством СВDP, в результате чего изменяется спектр мишеней вводимой через 1 час дозы POX. Кроме того, отрицательные межгрупповые корреляции показателей эритроцитов в группах POX2x и СВРОХ дополнительно могут быть обусловлены ингибирующим действием СВDP на эстеразу D эритроцитов в группе СВРОХ, с последующим ингибированием АХЭ, тогда как в группе POX2x параоксон ингибирует преимущественно АХЭ. Наблюдаемая динамика изменений и корреляции показателей свидетельствует о том, что в эритроцитах группы СВРОХ возмущение гомеостаза эритроцитов выражено в большей степени по сравнению с эритроцитами группы POX2x, а восстановление протекает дольше, связано с системными эффектами и сопряжено, по-видимому, с более масштабным и неоднократным обновлением пула эритроцитов после отравления (срок их жизни у крыс, как известно, 8-10 суток, т.е. в 10-15 раз меньше, чем у человека). Так, в эритроцитах группы POX2x наблюдается высокая положительная корреляция между уровнем GSH, активностью GR и каталазы, что свидетельствует о согласованной и успешной нейтрализации пероксида водорода каталазой в цитозоле без перенапряжения системы глутатиона. Активность GP повышается, если повышается уровень MetHb вследствие снижения активности SOD. В эритроцитах группы СВРОХ активность каталазы также хорошо коррелирует с активностью GR, но это не связано с восстановлением GSH, т.к. от уровня GSH зависит активность GP (теснота связи 0,8). Активность SOD в группе СВРОХ связана с другим кластером показателей: ее снижение сопряжено со снижением активности LDH и повышением активности GST, что означает высокий уровень оксидативного стресса и необходимость нейтрализации гидроперекисей липидов в гидрофобной фазе, при этом снижение активности LDH способствует сохранению NADH, который идет на восстановление MetHb посредством NADH-зависимой MetHb-редуктазы.

## ВЫВОДЫ

- 1) Параоксон не вызывает изменение спектральных характеристик гемоглобина, не индуцирует образование АФК и не увеличивает их уровень при оксидативном стрессе, вызванном tВН.
- 2) Осмотическая устойчивость эритроцитов повышается через сутки после воздействия параоксона лишь в максимальных токсикологически релевантных концентрациях, но параоксон в меньших концентрациях усиливает действие оксидативного стресса на осмотическую устойчивость эритроцитов.
- 3) Усиление осмотической устойчивости эритроцитов параоксоном в условиях оксидативного стресса является кальций-зависимым процессом.
- 4) Параоксон не индуцирует развитие апоптоза эритроцитов (эриптоза), но усиливает экстернализацию фосфатидилсерина в условиях оксидативного стресса.
- 5) Максимальные отклонения биохимических показателей эритроцитов, обусловленные острым отравлением крыс параоксоном, выявлены в системе глутатиона, активности каталазы и SOD, уровне MetHb, тогда как изменения активности ферментов метаболизма имеют место на протяжении всего периода наблюдений.
- 6) Специфическое ингибирование карбоксилэстеразы плазмы крови крыс (группа СВРОХ) обуславливает более значительные изменения уровня или активности исследованных биохимических показателей эритроцитов по сравнению с группой РОХ2х, особенно на средних сроках после отравления (1-4 нед), тогда как в группе РОХ2х максимальные изменения наблюдаются преимущественно на ближних сроках (3ч – 3сут).

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *В реферируемых журналах, рекомендованных ВАК.*

Миндукшев И.В., Скверчинская Е.А., **Хмелевской Д.А.**, Добрылко И.А., Гончаров Н.В. Ингибитор ацетилхолинэстеразы параоксон усиливает индуцированный *in vitro* оксидативный стресс в эритроцитах крыс. Биологические мембраны, 2017. – С. 147-154.

### *Глава в монографии*

Mindukshev I., I.Kudryavtsev, M.Serebriakova, A.Trulioff, S.Gambaryan, J.Sudnitsyna, **D.Khmelevskoy**, N.Voitenko, P.Avdonin, R.Jenkins, N.Goncharov. Flow cytometry and light scattering technique in evaluation of nutraceuticals // In: R.C. Gupta (Ed.) (2016) Nutraceuticals: efficacy, safety and toxicity. Amsterdam: Elsevier. Chapter 24.

### *Материалы научных конференций*

**Хмелевской Д.А.**, Миндукшев И.В., Гончаров Н.В. Влияние сульфорганических соединений чеснока и полифенолов зеленого чая на эритроциты человека и гемоглобин *in vitro* / Биоантиоксидант: тезисы докладов IX Международной конференции. Москва, 29 сентября – 2 октября 2015 г.: сб. статей.: 218, 2015.

Goncharov N.V., **Khmelevskoy D.A.**, Voitenko N.G., Avdonin P.V. Organosulfur compounds: metabolic and signaling aspects // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Том 1 (ред. В.П. Зинченко, А.В. Бережнов). – Пущино: «Fix-Print», 2015. – С.745-752.

Скверчинская Е.А., Миндукшев И.В., Добрылко И.А., **Хмелевской Д.А.**, Гончаров Н.В. Ингибитор ацетилхолинэстеразы параоксон повышает осмотическую устойчивость эритроцитов крысы *in vitro* // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Том 1. / Под редакцией В.П. Зинченко, А.В. Бережнова – Пущино: цифровая типография Fix-Print, 2017. – С. 800-805

Скверчинская Е.А., Миндукшев И.В., Добрылко И.А., **Хмелевской Д.А.**, Гончаров Н.В. Ингибитор ацетилхолинэстеразы параоксон повышает экспрессию фосфатидилсерина в мембранах эритроцитов крысы *in vitro* // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Том 1. / Под редакцией В.П. Зинченко, А.В. Бережнова – Пущино: цифровая типография Fix-Print, 2017. – С. 805-809

## СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Гончаров Н.В., Прокофьева Д.С., Войтенко Н.Г., Бабаков В.Н., Глашкина Л.М. 2010. Молекулярные механизмы холинергической регуляции и дисрегуляции. Токсикол. вестник. 2, 5-10.

Карпищенко А.И. (ред.) Медицинские лабораторные технологии: справочник. СПб: Интермедика. 1999

Королюк М.А., Иванова А.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. 1988. Метод определения активности каталазы. Лабораторное дело. (1): 16-19.

Миндукшев И.В., В.В. Кривошлык, И.А. Добрылко, Н.В. Гончаров, Е.В. Вивуланец, С.В. Кузнецов, А.И. Кривченко. 2010. Нарушение деформационных и транспортных характеристик эритроцитов при развитии у них апоптоза. Биол. мембраны. 27(1), 28-38.

Миндукшев И.В., Рукояткина Н.И., Добрылко И.А., Скверчинская Е.А., Никитина Е.Р., Кривошлык В.В., Гамбарян С.П., Кривченко А.И. 2013. Особенности апоптоза безъядерных клеток: тромбоцитов и эритроцитов. Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 99 (1), 92-110.

Надеев А.Д., Зинченко В.П., Авдонин П.В., Гончаров Н.В. 2014. Токсические и сигнальные эффекты активных форм кислорода. Токсикол. вестник. 2, 22-27.

Покровский А.А. (ред.) Биохимические методы исследования в клинике. Справочник. М. Медицина. 1969.

Разыграев А.В. 2013. Гомоцистеинпероксидазная активность плазмы крови крыс. Стехиометрия и ферментативный характер реакции. Биомедицинская химия. 59 (6): 636-643.

Скверчинская Е.А., Никитина Е.Р., Судницына Ю.С., Кривченко А.И., Гамбарян С.П., Миндукшев И.В. 2015. Гемолиз эритроцитов или образование микрочастиц при апоптозе в условиях окислительного стресса? В сб. статей: Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. 2, 564-569.

Хабриев Р.У. (ред.) Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / М., 2005.

Шмурак В.И., Курдюков И.Д., Надеев А.Д., Войтенко Н.Г., Глашкина Л.М., Гончаров Н.В. 2012. Биохимические маркеры интоксикации фосфорорганическими отравляющими веществами. Токсикол. вестник. 4, 30-34.

Юсупова Л.Б. 1989. О повышении точности определения активности глутатионредуктазы эритроцитов. Лабораторное дело. (4): 19-21.

Benesch R.E., Benesch R., Yung S. 1973. Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures. Anal. Biochem. 55, 245-248.

Bogdanova A., Makhro A., Wang J., Lipp P., Kaestner L. 2013. Calcium in red blood cells-a perilous balance. Int J Mol Sci. 14(5): 9848-9872.

Borlinghaus, J., Albrecht, F., Gruhlke, M.C. et al. 2014. Allicin: chemistry and biological properties. Molecules 19(8): 12591-1618.

Carvalho F.A., Mesquita R., Martins-Silva J., Saldanha C. 2004. Acetylcholine and choline effects on erythrocyte nitrite and nitrate levels. J Appl Toxicol. 24(6): 419-27

Carvalho F.A., Almeida J.P., Fernandes I.O., Freitas-Santos T., Saldanha C. 2008. Non-neuronal cholinergic system and signal transduction pathways mediated by band 3 in red blood cells. Clin. Hemorheol. Microcirc. 40(3): 207-227.

Daniels G. 2007. Functions of red cell surface proteins. Vox Sang. 93(4): 331-340.

Duysen E.G., Cashman J.R., Schopfer L.M., Nachon F., Masson P., Lockridge O. 2012. Differential sensitivity of plasma carboxylesterase-null mice to parathion, chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon, but not to diazinon, dichlorvos, diisopropylfluorophosphate, cresylsaligenin

- phosphate, cyclosarin thiocholine, tabun thiocholine, and carbofuran // *Chem. Biol. Interact.* 195(3): 189-198.
- Ellman G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70-77.
- Hundekari I.A., Suryakar A.N., Rathi D.B. 2013. Acute organophosphorus pesticide poisoning in North Karnataka, India: oxidative damage, haemoglobin level and total leukocyte. *Afr. Health Sci.* 13 (1), 129-136.
- Iuchi Y. 2012. Anemia Caused by Oxidative Stress, Anemia. Dr. Donald Silverberg (Ed.), InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/anemia/anemia-caused-byoxidative-stress>.
- Lang E, Lang F. 2015. Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Semin Cell Dev Biol.* 39: 35-42.
- Li B., Sedlacek M., Manoharan I., Boopathy R., Duysen E.G., Masson P., Lockridge O. 2005. Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma // *Biochem. Pharmacol.* V. 70. P. 1673-1684.
- Mandal D., Moitra P.K., Saha S., Basu J. 2002. Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS Lett.* 513(2-3), 184-188.
- Martin-Ventura J.L., Madrigal-Matute J., Martinez-Pinna R., Ramos-Mozo P., Blanco-Colio L.M., Moreno J.A., Tarin C., Burillo E., Fernandez-Garcia C.E., Egido J., Meilhac O., Michel J.B. 2012. Erythrocytes, leukocytes and platelets as a source of oxidative stress in chronic vascular diseases: detoxifying mechanisms and potential therapeutic options. *Thromb Haemost.* 108(3): 435-442.
- Maxwell D.M., Brecht K.M., O'Neill B.L. 1987. The effect of carboxylesterase inhibition on interspecies differences in soman toxicity // *Toxicol. Lett.* 39(1): 35-42.
- Maxwell D.M. 1992. The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 114(2): 306-312.
- Mindukshev I.V., V.V. Krivoslyk, E.E. Ermolaeva, I.A. Dobrylko, E.V. Senchenkov, N.V. Goncharov, R.O. Jenkins and A.I. Krivchenko. 2007. Necrotic and apoptotic volume changes of red blood cells investigated by low-angle light scattering technique. *Spectroscopy Int. J.* 21 (2), 105-120.
- Mindukshev I.V., Senchenkova E.Y., Goncharov N.V., Vivulanets E.V., Krivoslyk V.V. 2010. New methods for studying platelets and red blood cells, based upon the low-angle light scattering technique. In: *Hemorheology: Blood Flow, Disturbance and Prognosis*. Ed. F. Columbus, N.Y.: Nova Science Publishers, p.87-124.
- Officioso A., Manna C., Alzoubi K., Lang F. 2016. Bromfenvinphos induced suicidal death of human erythrocytes. *Pestic Biochem Physiol.* 126, 58-63.
- Prall Y.G., Gambhir K.K., Ampy F.R. 1998. Acetylcholinesterase: an enzymatic marker of human red blood cell aging. *Life Sci.* 63 (3), 177-184.
- Santos N.C., Figueira-Coelho J., Saldanha C., Martins-Silva J. 2002. Biochemical, biophysical and haemorheological effects of dimethylsulphoxide on human erythrocyte calcium loading. *Cell Calcium.* 31(4), 183-188.
- Shaik N., Lupescu A, Lang F. 2012. Sunitinib-sensitive suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem.* 30 (3), 512-522.
- Sosnowska B., Huras B., Bukowska B. 2015. Oxidative stress in human erythrocytes treated with bromfenvinphos and its impurities. *Pestic Biochem Physiol.* 118, 43-49.
- Spring F.A., Gardner B., Anstee D.J. 1992. Evidence that the antigens of the Yt blood group system are located on human erythrocyte acetylcholinesterase. *Blood.* 80 (8), 2136-2141.
- Szatkowska B., Bukowska B., Huras B. 2011. The effect of bromfenvinphos and its impurities on human erythrocyte. *Food Chem Toxicol.* 49(2), 502-507.

Teixeira P., Duro N., Napoleão P., Saldanha C. 2015. Acetylcholinesterase conformational states influence nitric oxide mobilization in the erythrocyte. *J. Membr. Biol.* 248 (2), 349-354.

Walski T., Chludzińska L., Komorowska M., Witkiewicz W. 2014. Individual osmotic fragility distribution: a new parameter for determination of the osmotic properties of human red blood cells. *Biomed Res Int.* doi: 10.1155/2014/162102.

Wessler I., Kilbinger H., Bittinger F., Unger R., Kirkpatrick C.J. 2003. The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology. *Life Sci.* 72(18-19), 2055-2061.

Wessler I., Kirkpatrick C.J., Racké K. The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. 1999. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26(3), 198-205.

Woodward G.E., Fry E.G. 1932. The determination of blood glutathione. *J. Biol. Chem.* 97: 465-482.

Zipser Y., Piade A., Barbul A., Korenstein R., Kosower N.S. 2002. Ca<sup>2+</sup> promotes erythrocyte band 3 tyrosine phosphorylation via dissociation of phosphotyrosine phosphatase from band 3. *Biochem J.* 368 (1), 137-144.

### **Список сокращений.**

АФК - активные формы кислорода; АХЭ –ацетилхолинэстераза; КЭ - карбоксилэстераза; ПОЛ - перекисное окисление липидов; ФБ – фосфатный буфер; ФОС – фосфорорганические соединения;

СВDP - 2-(о-крезил)-4Н-1,3,2-бензодиоксафосфорин-2-оксид; DCF-DA - 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетат; DMSO – диметилсульфоксид; EGTA - этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N'-тетрауксусная кислота; GP – глутатионпероксидаза; GPDH - глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; GR - глутатионредуктаза, GSH - восстановленный глутатион; GST - глутатионтрансфераза, Hb – гемоглобин; LDH – лактатдегидрогеназа; metHb – метгемоглобин; tBH - трет-бутилгидропероксид; SOD – супероксиддисмутаза.