

Г. П. Зубрицкая¹, А. С. Скоробогатова¹, Л. М. Лукьяненко¹,
Г. П. Горбенко², Е. И. Слобожанина¹

¹Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина, Харьков, Украина

МЕМБРАННЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРИ СОЧЕТАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ НА ЭРИТРОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ И АЦЕТАТА СВИНЦА

Аннотация. Изучено влияние сочетанного воздействия на эритроциты человека полученных из лизоцима амилоидных фибрилл и ацетата свинца. Установлено, что комплексное воздействие этих двух компонентов на эритроциты приводит к снижению активности мембраносвязанных ферментов ацетилхолинэстеразы и NADH-метгемоглобинредуктазы, изменению микровязкости липидного бислоя мембран и усилению везикуляции эритроцитов. Полученные результаты свидетельствуют о более значительной модификации структурно-функционального состояния мембран эритроцитов при совместном воздействии амилоидных фибрилл и ионов свинца на эритроциты человека по сравнению с контролем.

Ключевые слова: амилоидные фибриллы, ацетат свинца, эритроцитарная мембрана, мембраносвязанные ферменты, флуоресцентные зонды

Для цитирования: Мембранные эффекты при сочетанном воздействии на эритроциты человека амилоидных фибрилл и ацетата свинца / Г. П. Зубрицкая [и др.] // Вест. Нац. Акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 4. – С. 13–20.

G. P. Zubritskaya¹, A. S. Skarabahatava¹, L. M. Lukyanenko¹, G. P. Gorbenko², E. I. Slobozhanina¹

¹Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkov, Ukraine

MEMBRANE EFFECTS IN COMBINED IMPACT ON HUMAN ERYTHROCYTES OF AMYLOID FIBRILS AND LEAD IONS

Abstract. The effect of the combination of amyloid fibrils and lead acetate derived from lysozyme on human erythrocytes was studied. It was established that the complex effect of these two components on erythrocytes leads to a decrease in the activity of membrane-bound enzymes of acetylcholinesterase and NADH-methemoglobinreductase, a change in the microviscosity of the lipid bilayer of membranes, and an increase in the vesiculation of erythrocytes. The results indicate a more significant modification of the structural and functional state of erythrocyte membranes under the combined action of amyloid fibrils and lead ions on human erythrocytes compared with the control.

Keywords: amyloid fibrils, lead acetate, erythrocyte membrane, membrane-bound enzymes, fluorescent probes

For citation: Zubritskaya G. P., Skarabahatava A. S., Lukyanenko L. M., Gorbenko G. P., Slobozhanina E. I. Membrane effects in combined impact on human erythrocytes of amyloid fibrils and lead ions. *Vesti Natsyonal'nai akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 13–20 (in Russian).

Введение. Известно, что многие заболевания человека, в частности болезни Альцгеймера и Паркинсона, сахарный диабет второго типа (инсулиннезависимый) и др. [1], связаны со структурными дефектами белков и отложением нерастворимых белковых фибрилл (амилоидов) в различных органах и тканях. Большинство белков, ассоциированных с развитием таких патологических состояний, способны образовывать фибриллярные агрегаты *in vitro* [2, 3].

Считается, что одним из ключевых факторов развития болезни Альцгеймера являются амилоидные отложения (экспериментально подтверждено участие ионов металлов в этом процессе). В исследованиях, проведенных *in vivo* на *Macaca mulatta*, показано, что у животных, которые в раннем возрасте получали обогащенную свинцом пищу, в старости образуются скопления бета-амилоидного белка в тканях головного мозга [4]. На основании этого авторы пришли к выводу о том, что воздействие свинца в раннем возрасте является эпигенетическим фактором риска развития нейродегенеративных заболеваний в будущем из-за его влияния на уровень экспрессии

генов и кодируемых ими белков. Установлено, что в лабораторных условиях ионы определенных металлов влияют на структуру и темпы роста фибрилл амилоидогенных белков [5]. Так, Cu^{2+} , Fe^{3+} и Co^{3+} способствуют образованию вторичной структуры α -синуклеина и значительно ускоряют образование фибрилл [3]. Исследования *in vitro* показали, что ионы металла могут выступать посредником при взаимодействии между амилоидными белками и мембранами [5].

Имеются данные о том, что в нейронных бляшках пациентов с болезнью Альцгеймера скапливаются Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} [5–7]. В связи с этим предполагается, что ионы металлов могут влиять на агрегацию и токсичность амилоидогенных белков [7].

Учитывая, что амилоидные структуры являются цитотоксичными [1–3], а механизмы клеточной токсичности амилоидных фибрилл остаются до сих пор не ясными, целью нашей работы являлось выявление особенностей модификации мембранотропной активности амилоидов ионами тяжелых металлов.

Материалы и методы исследования. Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования крови при 2000 g в течение 5 мин, а затем трижды отмывали в 155 мМ растворе NaCl. Эритроцитарные мембраны (тени эритроцитов) выделяли по методу Доджа с сотр. [8].

Амилоидные структуры были получены из растворенного в 10 мМ HCl (pH 2,0) лизоцима куриного яйца (Fluka) по методу, приведенному в работе [9], при 65 °C в течение 7 сут при постоянном перемешивании. Образование амилоидных структур отслеживали с помощью специфического зонда тиофлавина T, интенсивность флуоресценции которого определяли ежедневно.

Активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) определяли спектрофотометрически по методу Элмана [10]. О везикуляции эритроцитов при их метаболическом истощении судили также по активности АХЭ в микровезикулах, находящихся в супернатантах после центрифугирования суспензии эритроцитов. Определение активности мембраносвязанной метгемоглобинредуктазы (NADH-цитохром *b* редуктазы, диафоразы) проводили по скорости окисления NADH [11].

Оценку состояния липидного бислоя мембран эритроцитов осуществляли по параметрам флуоресценции липофильных зондов – 1-(4-триметиламмоний-фенил)-6-фенил-1,3,5-гексатриена *p*-толуенсульфоната (ТМА-ДФГ) и 6-додеканол-2-диметиламинонафталена (лаурдана), встроенных в мембраны эритроцитов [12, 13]. Показатели зондовой флуоресценции мембран эритроцитов определяли на люминесцентном спектрофотометре CM2203 («Солар», Беларусь), спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Specord M-40 (Германия).

В работе использовали следующие реактивы: 1-(4-триметиламмоний-фенил)-6-фенил-1,3,5-гексатриен *p*-толуенсульфоната (ТМА-ДФГ), 2,2-динитро-5,5-дифенилпропановую кислоту (ДТНБ), ацетилхолинбромид, лизоцим куриного яйца фирмы Sigma (США); лаурдан фирмы Carl Roth (Германия); $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, NaCl, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaHCO_3 , NADH, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ фирмы «Реахим» (Россия).

Приведены средние значения 6–12 независимых экспериментов. Для анализа полученных результатов использовали метод вариационной статистики и параметрический критерий Стьюдента [14]. Статистически значимыми считали значения *p* менее 0,05. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение.

Результаты и их обсуждение. Плазматические мембраны играют огромную роль как в структурной организации, так и в функционировании клеток, участвуя в осуществлении большинства жизненно важных функций. Мембрана эритроцитов человека чутко реагирует на внутренние и внешние сигналы и служит посредником в передаче регуляторных сигналов между клеткой и внешней средой, обеспечивая выполнение основной функции эритроцитов [15]. Одним из ферментов, характеризующих структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов, является мембраносвязанная АХЭ. Поскольку функциональные свойства АХЭ напрямую зависят от структурного состояния мембраны, показатель уровня ее активности используют в качестве структурного маркера для оценки различного рода модификаций мембранных компонентов под влиянием физико-химических факторов [16, 17].

Ранее нами показано, что в эритроцитах человека, подвергшихся воздействию амилоидных фибрилл, происходит увеличение активности мембраносвязанной АХЭ (максимальной скорости реакции $V_{\text{макс}}$) по сравнению с таковой в клетках, обработанных лизоцимом, что свидетельствует

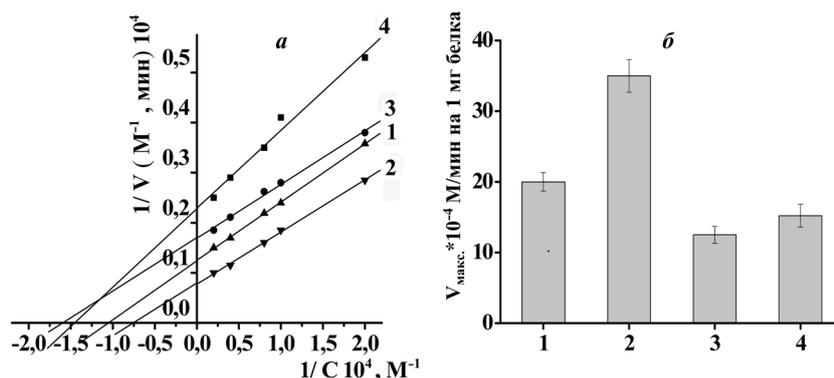


Рис. 1. Кривые зависимости Лайнуивера–Берка для ацетилхолинэстеразы (а) и среднее значение активности ацетилхолинэстеразы (V_{max}) в мембранах, полученных из эритроцитов человека, обработанных амилоидными структурами и ацетатом свинца (b): 1 – контроль (мембраны, выделенные из интактных эритроцитов); 2 – мембраны, выделенные из эритроцитов, подвергшихся воздействию амилоидных структур в течение 3 ч; 3 – мембраны, выделенные из эритроцитов, подвергшихся инкубации в течение 3 ч в среде, содержащей 5 мкМ ацетата свинца; 4 – мембраны, выделенные из эритроцитов, подвергшихся инкубации с полученными из лизоцима амилоидными структурами и 5 мкМ ацетата свинца в течение 3 ч

Fig. 1. Relations Lineweaver–Burk for acetyl cholinesterase (a) and mean observation activity of acetyl cholinesterase (V_{max}) in membranes taken from human erythrocytes treated with amyloid structures and lead acetate (b): 1 – control (membranes isolated from intact erythrocytes); 2 – membranes isolated from erythrocytes exposed by amyloid structures for 3 h; 3 – membranes isolated from erythrocytes exposed by 5 μM of lead acetate for 3 h; 4 – membranes isolated from erythrocytes exposed by amyloid structures from lysozyme and 5 μM of lead acetate for 3 h

об изменении структурно-функционального состояния мембран эритроцитов после предварительного воздействия на клетки амилоидных фибрилл [18].

В литературе отсутствуют сведения о сочетанном влиянии амилоидных структур и ионов тяжелых металлов на активность мембраносвязанных ферментов. Поэтому нами изучено влияние белковых олигомеров, полученных из лизоцима, и ацетата свинца на активность АХЭ и метгемоглобинредуктазы.

На рис. 1, а представлены кривые зависимости Лайнуивера–Берка для мембран, выделенных из нативных эритроцитов (кривая 1), а также эритроцитов, обработанных амилоидными структурами (кривая 2), 5 мкМ ацетата свинца (кривая 3) и совместно амилоидными структурами и 5 мкМ ацетата свинца (кривая 4). Обнаружено, что предварительная инкубация эритроцитов человека с 5 мкМ ацетата свинца и белковыми олигомерами в течение 3 ч при 37 °С вызывает изменение параметров активности АХЭ в полученных из них мембранах. Так, наблюдалось значительное снижение среднего значения V_{max} по сравнению с аналогичным показателем в мембранах, полученных из клеток, предварительно проинкубированных 3 ч только с амилоидными структурами и 5 мкМ ацетата свинца (рис. 1, b).

Известно, что, присутствуя в клетке, свинец снижает цитозольную концентрацию АТФ. При воздействии в течение 24 ч ионов свинца на эритроциты *in vitro* провоцируется энергетическое истощение последних, что также приводит к сокращению продолжительности жизни и в итоге – к эриптозу [19]. При свинцовом отравлении также снижается количество NADH и NADP. Кроме того, в зрелых эритроцитах ионы свинца снижают активность 5'-нуклеотидазы [20].

В эритроцитах процессам метгемоглобинообразования противостоит система ферментов – метгемоглобинредуктаз, которые восстанавливают метгемоглобин до гемоглобина. Дисбаланс в антиоксидантной системе эритроцитов приводит к снижению активности метгемоглобинредуктазы, что может вызывать усиление накопления метгемоглобина внутри мембран, образования телец Гейнца и приводить к гемолизу [21].

Ранее нами показано, что активность NADH-метгемоглобинредуктазы в мембранах, изолированных из эритроцитов, проинкубированных в течение 3 ч с 2–10 мкМ ацетата свинца, практически не изменялась по сравнению с нормой [22]. Кроме того, по результатам экспериментов, проведенных на эритроцитах человека, подверженных влиянию амилоидных структур *in vitro*, не выявлено изменения концентрации мембраносвязанного метгемоглобина [23].

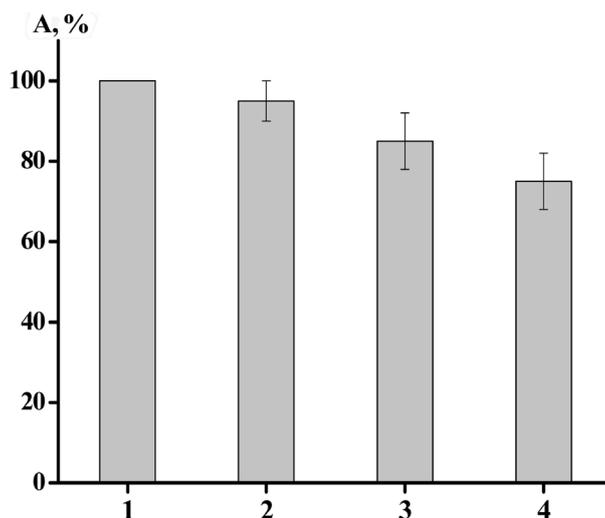


Рис. 2. Активность мембраносвязанной NADH-метгемоглобинредуктазы (A, %) в эритроцитах, обработанных амилоидными структурами и ацетатом свинца: 1 – контроль (мембраны, выделенные из интактных эритроцитов); 2 – мембраны, выделенные из эритроцитов, подвергшихся воздействию амилоидных структур в течение 3 ч; 3 – мембраны, выделенные из эритроцитов, подвергшихся инкубации в течение 3 ч в среде, содержащей 5 мкМ ацетата свинца; 4 – мембраны, выделенные из эритроцитов, подвергшихся инкубации в течение 3 ч в среде, содержащей амилоидные структуры и 5 мкМ ацетата свинца. За 100 % принято среднее значение активности фермента в интактных эритроцитах

Fig. 2. Activity of membrane bond NADH-methemoglobin reductase (A, %) in erythrocytes exposed by amyloid structures and lead acetate: 1 – control (membranes isolated from intact erythrocytes); 2 – membranes isolated from erythrocytes exposed by amyloids structures for 3 h; 3 – membranes isolated from erythrocytes exposed by 5 μM of lead acetate for 3 h; 4 – membranes isolated from erythrocytes exposed by amyloids structures and 5 μM of lead acetate for 3 h. 100 % is mean observation of enzyme activity in intact erythrocytes

Установлено, что предварительная инкубация эритроцитов человека с 5 мкМ ацетата свинца и амилоидными фибриллами в течение 3 ч при 37 °С, а также предварительная инкубация эритроцитов с 5 мкМ ацетата свинца в течение того же времени снижала активность мембраносвязанной метгемоглобинредуктазы по сравнению с таковой у эритроцитов, обработанных только амилоидами (рис. 2).

Полученные результаты позволяют заключить, что воздействие амилоидных фибрилл в сочетании с субгемолитическими концентрациями ионов свинца на эритроциты человека *in vitro* нарушает структурно-функциональное состояние их мембран, что отражается в снижении активности мембраносвязанных ферментов.

Известно, что в условиях метаболического истощения от мембраны эритроцитов отделяются содержащие белок полосы 3 бесспектриновые везикулы, о количестве которых можно судить по активности АХЭ в супернатантах, полученных после осаждения клеток [24]. В зависимости от природы действующего на эритроциты агента скорость отделения от клеток мембранного материала, размер, форма и химический состав везикул сильно варьируются. Везикуляцию можно рассматривать как следствие изменения физико-химического состояния мембранных белков, вызванного в первую очередь окислением тиоловых групп белков свинцом и, возможно, изменением взаимодействия окисленного гемоглобина с мембраной.

Ранее нами показано, что выдерживание эритроцитов в безглюкозной среде, содержащей ацетат свинца в субгемолитических концентрациях, приводит к повышению скорости отделения от клеток микровезикул по сравнению с контролем [22]. Кроме того, установлено, что после 48-часового выдерживания клеток в безглюкозной среде уровень везикуляции эритроцитов, подвергшихся воздействию полученных из лизоцима амилоидных структур, на 25–30 % выше по сравнению с его уровнем у эритроцитов, предварительно проинкубированных с раствором лизоцима [25].

Как видно из рис. 3, предварительная инкубация эритроцитов человека в течение 48 ч в присутствии амилоидных фибрилл и ацетата свинца (5 мкМ) ускоряет везикуляцию эритроцитов по сравнению с таковой у эритроцитов, подвергшихся воздействию только амилоидов или ацетата свинца, что указывает на наличие различий в скорости отделения от мембран микровезикул при сочетанном воздействии субгемолитических концентраций ацетата свинца и амилоидов.

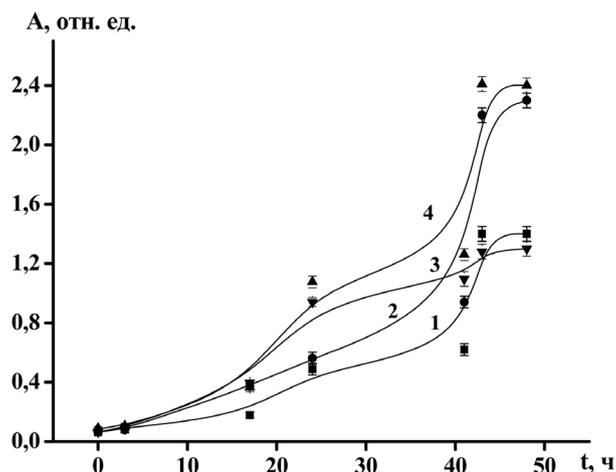


Рис. 3. Зависимость активности АХЭ (А, отн. ед.) в супернатантах, полученных после осаждения проинкубированных в различных средах эритроцитов, от времени выдерживания их в безглюкозной среде: 1 – 10 %-ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана в 0,155 М растворе NaCl + 10 мМ Na-фосфатного буфера, рН 7,4 (контроль); 2 – 10 %-ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана 3 ч в 0,155 М растворе NaCl + 10 мМ Na-фосфатного буфера, рН 7,4, содержащем амилоидные структуры из лизоцима, затем отмыта и повторно суспензирована в этом же буфере; 3 – 10 %-ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана 3 ч в 0,155 М NaCl + 10 мМ Na-фосфатного буфера, рН 7,4, содержащем 5 мкМ ацетата свинца, затем эритроциты отмыты и повторно суспензированы в этом же буфере; 4 – 10 %-ная суспензия эритроцитов предварительно выдержана 3 ч в 0,155 М NaCl + 10 мМ Na-фосфатного буфера, рН 7,4, содержащем белковые олигомеры и 5 мкМ ацетата свинца, затем эритроциты отмыты и повторно суспензированы в этом же буфере

Fig. 3. Relationship of activity AChE (A, r. u.) from time of incubation in medium without glucose in supernatants, which was taken after precipitation of erythrocytes previously, incubated in different solutions: 1 – 10 %-suspension of erythrocytes preliminary exposed by 0.155 M NaCl solution + 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 for 3 h (control); 2 – 10 %-suspension of erythrocytes exposed by 0.155 M NaCl solution + 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 containing amyloid structures from lysozyme for 3 h, after washed and again resuspended in these buffer; 3 – 10 %-suspension of erythrocytes exposed by 0.155 M NaCl solution + 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 containing 5 μM lead acetate for 3 h, after washed and again resuspended in these buffer; 4 – 10 %-suspension of erythrocytes exposed by 0.155 M NaCl solution + 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 containing amyloid structures from lysozyme and 5 μM lead acetate for 3 h, after washed and again resuspended in these buffer

Известно, что физико-химическое состояние компонентов клеточных мембран и происходящие в них процессы часто играют важную роль в формировании ответа клетки на действие токсического агента. Имеющиеся в литературе данные о действии свинца на клетки свидетельствуют о том, что клеточная мембрана является одной из главных мишеней повреждающего действия свинца и других тяжелых металлов [15, 22, 26].

Ранее нами установлено, что полученные из лизоцима амилоидные структуры вызывают изменение параметров флуоресценции липидных зондов – генерализованную поляризацию

Флуоресцентные параметры ТМА-ДФГ и лаурдана, включенных в изолированные из эритроцитов мембраны, после инкубации их с амилоидными фибриллами и ионами свинца в течение 3 ч при 37 °С

Parameters of fluorescence TMA-DPH and laurdan incorporated into erythrocyte membranes isolated after incubation with amyloid fibrils and lead ions for 3 h under 37 °C

Серия экспериментов (среда инкубации эритроцитов)	ТМА-ДФГ	Лаурдан
	<i>p</i>	GP, отн. ед.
Контроль (мембраны выделены из интактных эритроцитов)	0,42 ± 0,02	0,33 ± 0,007
Мембраны выделены из эритроцитов, подвергшихся инкубации с амилоидными структурами в течение 3 ч	0,46 ± 0,03	0,35 ± 0,009
Мембраны выделены из эритроцитов, подвергшихся инкубации с 5 мкМ ацетата свинца в течение 3 ч	0,4 ± 0,04	0,34 ± 0,01
Мембраны выделены из эритроцитов, подвергшихся воздействию амилоидных структур и 5 мкМ ацетата свинца в течение 3 ч	0,32 ± 0,03*	0,27 ± 0,008*

Примечание. * – достоверность различий ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

флуоресценции лаурдана и поляризацию ТМА-ДФГ, встроенных в изолированные мембраны эритроцитов, по сравнению с таковыми в мембранах клеток, предварительно проинкубированных с раствором лизоцима [27, 28].

Обнаружено, что предварительная инкубация эритроцитов человека с амилоидными структурами и субгемолитическими концентрациями ацетата свинца (5 мкМ) в течение 3 ч при 37 °С вызывает достоверное снижение поляризации флуоресценции ТМА-ДФГ и генерализованной поляризации флуоресценции лаурдана, встроенных в мембраны эритроцитов, по сравнению с таковой в клетках, обработанных только амилоидными структурами или ацетатом свинца в тех же условиях (см. таблицу).

Заключение. Полученные результаты позволяют заключить, что по сравнению с действием отдельно амилоидов или ионов тяжелых металлов сочетанное воздействие ионов свинца и амилоидных структур на эритроциты человека *in vitro* усиливает модификацию физического состояния липидного бислоя мембран, а также их структурно-функционального состояния, проявляющегося в изменении активности мембраносвязанных ферментов – ацетилхолинэстеразы и метгемоглибинредуктазы, в повышении количества отделившегося от эритроцитов части мембранного материала. Аналогичные процессы могут происходить и *in vivo* при патологических состояниях, связанных с образованием амилоидных белков, и в случаях повышения концентрации ионов свинца в организме.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Белорусского Республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б13-К115).

Acknowledgements. Work supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (Project no. B13-K115).

Список использованных источников

1. Нижников, А. А. От патогенеза к функции / А. А. Нижников, К. С. Антонец, С. Г. Инге-Вечтамов // Биохимия. – 2015. – Т. 80, вып. 9. – С. 1356–1375.
2. A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology / M. Neumann [et al.] // Brain. – 2009. – Vol. 32, pt. 11. – P. 2922–2931.
3. Greenwald, J. Biology of amyloid: structure, function, and regulation / J. Greenwald, R. Riek // Structure. – 2010. – Vol. 18, N 10. – P. 1244–1260.
4. Bihaghi, S. W. Enhanced tauopathy and AD-like pathology in aged primate brains decades after infantile exposure to lead (Pb) / S. W. Bihaghi, N. H. Zawia // Neurotoxicology. – 2013. – Vol. 39. – P. 95–101.
5. Cellular membrane disruption by amyloid fibrils involved intermolecular disulfide cross-linking / B. Huang [et al.] // Biochemistry. – 2009. – Vol. 48. – P. 794–800.
6. Amyloid- β peptide disruption of lipid membranes and the effect of metal ions / T. L. Lau [et al.] // J. Mol. Biol. – 2006. – Vol. 356, N 3. – P. 759–770.
7. Duce, J. Biological metals and Alzheimer's disease: implications for therapeutics and diagnostics / J. Duce, A. Bush // Prog. Neurobiol. – 2010. – Vol. 92, N 1. – P. 1–18.
8. Dodge, G. T. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes / G. T. Dodge, C. Mitchell, D. J. Hanahan // Arch. Biochem. Biophys. – 1963. – Vol. 100. – P. 119–130.
9. Cellular membrane disruption by amyloid fibrils involved intermolecular disulfide cross-linking / Bo Huang [et al.] // Biochemistry. – 2009. – Vol. 48. – P. 5794–5800.
10. Erythrocyte membrane AChE, Na⁺, K⁺-ATPase and Mg²⁺ ATPase activities in mothers and their premature neonates in relation to the mode of delivery / D. G. Vlachos [et al.] // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 2010. – Vol. 70, N 8. – P. 568–574.
11. Papandreou, P. Determination of NADH2-ferricyanide oxidoreductase (cytochrome b5 reductase, diaphorase) activity of human erythrocytes by an analysis of the time-dependence of NADH2 oxidation / P. Papandreou, E. T. Rakitzis // Clin. Chim. Acta. – 1989. – Vol. 181, N 2. – P. 189–196.
12. Is the glutathione S-conjugate pump a flippase? / A. Sokal [et al.] // Biochem. Mol. Biol. Int. – 1998. – Vol. 44, N 1. – P. 97–105.
13. Harris, F. M. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order / F. M. Harris, K. B. Best, J. D. Bell // Biochim. Biophys. Acta. – 2002. – Vol. 1565. – P. 123–128.
14. Гланц, С. Медико-биологическая статистика : пер. с англ. / С. Гланц. – М. : Практика, 1998. – 459 с.
15. Lead induced changes in human erythrocytes and lymphocytes / E. I. Slobozhanina [et al.] // J. of Appl. Toxicol. – 2005. – Vol. 25, N 2. – P. 109–114.
16. Aloni, B. Acetylcholinesterase as a probe for erythrocyte membrane intactness / B. Aloni, A. Livne // Biochim. Biophys. Acta. – 1974. – Vol. 339. – P. 359–366.
17. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами : учеб. пособие / В. Г. Артюхов, М. А. Наваксина. – Воронеж : Изд-во Воронеж. гос. ун-та. – 2000. – 296 с.

18. Зубрицкая, Г. П. Биофизические характеристики клеток крови и биологических жидкостей как показатели патологических состояний человека : автореф. ... дис. канд. биол. наук : 03.01.02 / Г. П. Зубрицкая ; Ин-т биофизики и клеточ. инженерии Нац. акад. наук Беларуси. – Минск, 2016. – 26 с.
19. Baranowska-Bosiacka, I. The effect of lead ions on the energy metabolism of human erythrocytes *in vitro* / I. Baranowska-Bosiacka, A. J. Hlynyczak // *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 134, N 6. – P. 403–416.
20. Grabowska, M. The effect of lead on lactate formation, ATP level and membrane ATPase activities in human erythrocytes *in vitro* / M. Grabowska, M. Gumińska // *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.* – 1996. – Vol. 9, N 3. – P. 265–274.
21. Hjelt, K. Methemoglobinaemia among neonates in neonatal intensive care unit / K. Hjelt, J. T. Lung, B. Scherling // *Acta Paediatr.* – 1995. – Vol. 84, N 4. – P. 365–370.
22. Олексюк, О. Б. Мембранные механизмы действия свинца в субгемолитических концентрациях на эритроциты человека : автореф. ... дис. канд. биол. наук : 03.00.02 / Олексюк О. Б. ; Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т биофизики и клеточ. инженерии. – Минск, 2004. – 22 с.
23. Взаимодействие фибриллярного лизоцима с гемоглобином и мембранными белками эритроцитов / О. К. Куценко [и др.] // Актуальные проблемы химии и биологии : [всерос. молодеж. конф., 30 июля – 3 авг. 2012 г., Пущино] : сб. тез. / Пущин. науч. центр Рос. акад. наук, Ин-т ПНЦ, Тюмен. гос. ун-т. – Пущино, 2012. – С. 91–92.
24. Козлова, Н. М. Окисление мембранных белков и изменение поверхностных свойств эритроцитов / Н. М. Козлова, Е. И. Слободжанина, Е. А. Черницкий // *Биофизика.* – 1998. – Т. 43, № 3. – С. 480–483.
25. Влияние амилоидных структур на везикуляцию эритроцитов человека / Л. М. Лукьяненко [и др.] // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы : материалы X Междунар. конф., 6–7 апр. 2012 г., Минск / М-во образования Респ. Беларусь, Белорус. гос. ун-т ; [В. А. Прокашева (отв. ред.) и др.] – Минск, 2012. – С. 185–188.
26. Куценко, С. А. Основы токсикологии / С. А. Куценко. – М. : Фолиант, 2004. – 570 с.
27. Fluorescence study of the membrane effects of aggregated lysozyme / O. K. Kutsenko [et al.] // *J. Fluorescence.* – 2013. – Vol. 23, N 6. – P. 1229–1237.
28. Влияние амилоидов на физико-химическое состояние липидного бислоя мембран эритроцитов / Л. М. Лукьяненко [и др.] // *Новости мед.-биол. наук.* – 2013. – Т. 7, № 1. – С. 9–13.

References

1. Nizhnikov A. A., Antonets K. S., Inge-Vechtamov S. G. From pathogenesis to function. *Biokhimiia* [Biochemistry], 2015, vol. 80, no. 9, pp. 1356–1375 (in Russian).
2. Neumann M., Rademakers R., Roeber S., Baker M., Kretzschmar H. A., Mackenzie I. R. A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain: a Journal of Neurology*, 2009, vol. 32, pt. 11, pp. 2922–2931. DOI: 10.1093/brain/awp214
3. Greenwald J., Riek R. Biology of amyloid: structure, function, and regulation. *Journal of Structure*, 2010, vol. 18, no. 10, pp. 1244–1260. DOI: 10.1016/j.str.2010.08.009
4. Bihagi S. W., Zawia N. H. Enhanced tauopathy and AD-like pathology in aged primate brains decades after infantile exposure to lead (Pb). *Neurotoxicology*, 2013, vol. 39, pp. 95–101. DOI: 10.1016/j.neuro.2013.07.010
5. Huang B. L., He J., Ren J., Yan X. Y., Zeng C. M. Cellular membrane disruption by amyloid fibrils involved intermolecular disulfide cross-linking. *Biochemistry*, 2009, vol. 48, pp. 794–800.
6. Lau T. L., Ambroggio E. E., Tew D. J., Cappai R., Masters C. L., Fidelio G. D., Barnham K. J., Separovic F. Amyloid- β peptide disruption of lipid membranes and the effect of metal ions. *Journal of Molecular Biology*, 2006, vol. 356, no. 3, pp. 759–770.
7. Duce J., Bush A. Biological metals and Alzheimer's disease: implications for therapeutics and diagnostics. *Progress in Neurobiology*, 2010, vol. 92, no. 1, pp. 1–18.
8. Dodge G. T., Mitchell C., Hanahan D. J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1963, vol. 100, pp. 119–130.
9. Huang Bo, He Jing, Ren Jing, Yan Xiang-Yang, Zeng Cheng-Ming. Cellular membrane disruption by amyloid fibrils involved intermolecular disulfide cross-linking. *Biochemistry*, 2009, vol. 48, no. 25, pp. 5794–5800.
10. Vlachos D. G., Schulpis K. H., Antsaklis A., Mesogitis S., Biliatis I., Tsakiris S. Erythrocyte membrane AChE, Na⁺, K⁺-ATPase and Mg²⁺ ATPase activities in mothers and their premature neonates in relation to the mode of delivery. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation*, 2010, vol. 70, no. 8, pp. 568–574.
11. Papandreou P., Rakitzis E. T. Determination of NADH2-ferricyanide oxidoreductase (cytochrome b5 reductase, diaphorase) activity of human erythrocytes by an analysis of the time-dependence of NADH2 oxidation. *Clinica Chimica Acta*, 1989, vol. 181, no. 2, pp. 189–196.
12. Sokal A., Pułaski L., Rychlik B., Fortuniak A., Bartosz G. Is the glutathione S-conjugate pump a flippase? *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1998, vol. 44, no. 1, pp. 97–105.
13. Harris F. M., Best K. B., Bell J. D. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, vol. 1565, pp. 123–128.
14. Glants S. *Medico-biological statistics*, Translated from English. Moscow, Praktika Publ., 1998. 459 p. (in Russian).
15. Slobozhanina E. I., Kozlova N. M., Lukyanenko L. M., Oleksiuk O. B., Gabbianelli R., Fedeli D., Caulini G. C., Falcioni G. Lead induced changes in human erythrocytes and lymphocytes. *Journal of Applied Toxicology*, 2005, vol. 25, no. 2, pp. 109–114. DOI: 10.1002/jat.1043
16. Aloni B., Livne A. Acetylcholinesterase as a probe for erythrocyte membrane intactness. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1974, vol. 339, pp. 359–366.

17. Artukhov V. G., Navaksina M. A. *Biological membranes: structural organization, functions, modification by physico-chemical agents*. Voronezh, Publishing house of Voronezh State University, 2000. 296 p. (in Russian).
18. Zubritskaya G. P. *Biophysical parameters of blood cells and biological fluids as indicators of human pathological states*, Abstract of Ph. D. diss., Biophysics, Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus. Minsk, 2016. 26 p. (in Russian).
19. Baranowska-Bosiacka I., Hlynzack A. J. The effect of lead ions on the energy metabolism of human erythrocytes *in vitro*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology*, 2003, vol. 134, no. 3, pp. 403–416.
20. Grabowska M., Gumińska M. The effect of lead on lactate formation, ATP level and membrane ATPase activities in human erythrocytes *in vitro*. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental*, 1996, vol. 9, no. 3, pp. 265–274.
21. Hjelt K., Lung J. T., Scherling B. Methemoglobinemia among neonates in neonatal intensive care unit. *Acta Paediatrica*, 1995, vol. 84, no. 4, pp. 365–370.
22. Oleksiuk O. B. *Membrane mechanisms of action of lead in subhemolytic concentrations on human erythrocytes*, Abstract of Ph. D. diss., Biological Sciences, Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus. Minsk, 2004. 21 p. (in Russian).
23. Kutsenko O. K., Trusova V. M., Gorbenko G. P., Zubritskaya G. P., Lukyanenko L. M., Slobozhanina E. I. Interaction of fibrillary lysozyme with hemoglobin and membrane proteins of erythrocytes. *Aktual'nye problemy khimii i biologii: [vserossiiskaia molodezhnaia konferentsiia] : sbornik tezisov* [Actual problems of chemistry and biology: All-Union Youth Conference: a collection of abstracts], Pushchino Research Center of the Russian Academy of Sciences. Pushchino, Institute of PSC, Tyumen State University, 2012, pp. 91–92 (in Russian).
24. Kozlova H. M., Slobozhanina E. I., Chernitskiy E. A. Oxidation of membrane proteins and changes in surface properties of erythrocytes. *Biofizika* [Biophysics], 1998, vol. 43, no. 3, pp. 480–483 (in Russian).
25. Lukyanenko L. M., Zubritskaya G. P., Venskaya E. I., Slobozhanina E. I. Influence of amyloid structures on the vesiculation of human erythrocytes. *Mediko-sotsial'naiia ekologiia lichnosti: sostoiatie i perspektivy: materialy X Mezhdunarodnoi konferentsii* [Mediko-social ecology of the person: a condition and prospects: materials of X international conference], Ministry of Education of the Republic of Belarus, Belarusian State University, in Prokasheva V. A. (ed.) et al. Minsk, 2012, pp. 185–188 (in Russian).
26. Kutsenko S. A. *Fundamentals of Toxicology*. Moscow, Foliant Publ., 2004. 570 p. (in Russian).
27. Kutsenko O. K., Trusova V. M., Gorbenko G. P., Lipovaya A. S., Slobozhanina E. I., Lukyanenko L. M., Deligeorgiev T., Vasilev A. Fluorescence study of the membrane effects of aggregated lysozyme. *Journal of Fluorescence*, 2013, vol. 23, no. 6, pp. 1229–1237. DOI: 10.1007/s10895-013-1254-2
28. Lukyanenko L. M., Zubritskaya G. P., Venskaya E. I., Skorobogatova A. S., Kut'ko A. G., Slobozhanina E. I. The effect of amyloids on the physical and chemical state of the lipid bilayer of erythrocyte membranes. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk* [News of Biomedical Sciences], 2013, vol. 7, no. 1, pp. 9–13 (in Russian).

Информация об авторах

Зубрицкая Галина Петровна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: petro371@mail.ru.

Скоробогатова Александра Сергеевна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sas.alesya@gmail.com.

Лукьяненко Людмила Михайловна – канд. биол. наук, зам. директора. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lukyanenko@gmail.com.

Горбенко Галина Петровна – д-р физ.-мат. наук, профессор. Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина (майдан Свободы, 4, 61000, г. Харьков, Украина). E-mail: galyagor@yahoo.com.

Слобозханина Екатерина Ивановна – член-корреспондент, профессор, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: slobozhanina@ibp.org.by.

Information about the authors

Galina P. Zubritskaya – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: petro371@mail.ru.

Aliaksandra S. Skarabahatava – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sas.alesya@gmail.com.

Lyudmila M. Lukyanenko – Ph. D. (Biol.), Deputy Director. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). lukyanenko@gmail.com.

Galina P. Gorbenko – D. Sc. (Phys. and Math.), Professor. V. N. Karazin Kharkiv National University (4, Maydan of Freedom, 61000, Kharkov, Ukraine). galyagor@yahoo.com.

Ekaterina I. Slobozhanina – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: slobozhanina@ibp.org.by.