

## ДОСЛІДЖЕННЯ СТАНУ ГЕМОГЛОБІНУ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ В УМОВАХ ОКИСНОГО ОСТРЕСУ РІЗНОЇ ІНТЕНСИВНОСТІ

*А. Л. Вознюк*

*Анотація.* Окисний стрес створювали шляхом введення перекису водню (діапазон концентрацій  $10^{-6}$  – 0,1 М) в середовище інкубування еритроцитів. Методом спектрофотометрії та подальшим аналізом спектрів поглинання гемоглобіну у діапазоні 350–650 нм досліджено вплив різних концентрацій перекису водню на вміст мембранозв'язаного гемоглобіну, лігандних форм гемоглобіну цитоплазматичної фракції, склад мембранозв'язаного гемоглобіну в еритроцитах. Досліджено кількісні зміни внутрішньоклітинного і позаклітинного перекису водню. Показано, що перекис водню у діапазоні концентрацій  $5 \cdot 10^{-3}$  до 0,1 М негативно впливає на стан поверхні клітин, викликаючи перебудову ліпідного бішару. Наслідком цих процесів є перехід оксигемоглобіну у геміхром і незворотно зв'язування останнього з ліпідами мембрани.

*Ключові слова:* мембранозв'язаний гемоглобін, оксигемоглобін, метгемоглобін, геміхром, спектри поглинання гемоглобіну, смуга Соре.

*Вступ.* В еритроцитах гемоглобін знаходиться в розчинній і мембранозв'язаних формах, співвідношення між якими змінюється в залежності від стану молекул гемоглобіну і мембрани. Оборотно зв'язування гемоглобіну з мембраною носить регуляторний характер і є інструментом налаштування властивостей мембрани і вуглеводного метаболізму при зміні умов функціонування, наприклад, при зміні  $pO_2$  [1–4].

Оборотний просторовий перерозподіл гемоглобіну дозволяє швидко змінювати рівень клітинного метаболізму, що особливо важливо для еритроцитів, у яких через відсутність генетичного апарату неможлива регуляція через індукцію експресії генів. У цьому випадку утворення мембранозв'язаного гемоглобіну може бути одним з механізмів формування швидкої адаптивної відповіді на мінливі умови [1].

Відомо, що окислений гемоглобін, особливо його низькоспінові форми (геміхром) мають підвищену здатність до зв'язування з мембраною. У процесі взаємодії можуть виникати додаткові способи зв'язування цитоплазматичних білків з мембраною еритроциту, такі як ковалентне зв'язування за рахунок дисульфідних зв'язків та гідрофобні взаємодії. Показано, що стан окислення гемоглобіну (від Fe (III) - Fe (V)), корелює з інтенсивністю зв'язування, при цьому приблизно 50 % цього зв'язування потребує реакційноздатних сульфідрильних груп [5]. Метгемоглобін (metHb), що не відновлюється мембранозв'язаними метгемоглобінредуктазами, деградує з утворенням геміхромів, що накопичуються в мембрані з утворенням тілець Хайнца, викликаючи агрегацію білка полоси 3 та додаткову перебудову мембрани. Підвищену кількість мембранозв'язаного Hb останнім часом зв'язують з багатьма хворобами системи крові, викликаними порушеннями антиоксидантного захисту та дією різних ксенобіотиків [5–8]. Ряд дослідників вважає, що підвищення вмісту мембранозв'язаного гемоглобіну сприяє порушенню структурно-функціонального стану ліпідного бішару мембран еритроцитів [7]. На думку інших авторів, еритроцитарні мембрани з малим вмістом зв'язаного з ними гемоглобіну більш схильні до дегідратації і руйнування ліпопротеїнової структури. У зв'язку з цим незначні зміни вмісту мембранозв'язаного гемоглобіну у відповідь на дію стресового чинника свідчать про слабку адаптивну реакцію мембрани.

Мета роботи полягала в дослідженні стану гемоглобіну еритроцитів людини, змінення лігандних форм його цитоплазматичної фракції в умовах окисного стресу.

*Матеріали і методи дослідження.* У експериментах використовували периферичну кров практично здорових донорів однієї статі та приблизно одного віку. Еритроцити тричі відмивали центрифугуванням з Na-фосфатним буфером (0.015 моль, pH 7.4), що містив 0.15 моль NaCl (буферний розчин 1). Суспензія еритроцитів вводилася у буферний розчин 1, що містив різну кількість  $H_2O_2$ . Кількість еритроцитів в середовищі інкубування підтримували на рівні вмісту гемоглобіну 3,0–3,2 мг/мл. Концентрацію  $H_2O_2$  в дослідних

точках варіювали від  $10^{-6}$  до 0,1 М. Клітини інкубували протягом години при 20°C. У якості контролю використовували клітини, що не піддавали впливу окисного середовища і інкубуванню. Після інкубування еритроцити осаджували центрифугуванням, надосадову рідину видаляли.

Лізис еритроцитів проводили додаючи 3 мл 0.01 М Na-фосфатного буферу (pH 7,4)  $T = 4^{\circ}\text{C}$  продовж 20 хв. Тіні осаджували центрифугуванням (10 мин, 3000 об/с). У надосадовій рідині визначали загальний вміст гемоглобіну і досліджували вміст лігандних форм гемоглобіну. Тіні еритроцитів відмивали буферним розчином 1. До осаду тіней еритроцитів додавали 0,2 мл 5 % розчину тритону X-100 [9]. Пробу витримували протягом 5 хв до повного прояснення розчину, потім додавали буфер 1.

Спектри поглинання цитоплазматичного та мембранозв'язаного гемоглобіну еритроцитів реєстрували в інтервалі довжин хвиль 350–650 нм в кюветах з товщиною 1 см. В якості розчину порівняння для спектрофотометричних вимірів при вивченні мембранозв'язаного гемоглобіну використовували розчин, що містив 0.2 мл 5% тритону X-100 і буферний розчин 1.

Загальний вміст цитоплазматичної та мембранозв'язаної фракцій гемоглобіну, визначали за поглинанням на довжині хвилі 523 нм з використанням коефіцієнту екстинції 7120 М/см [9].

Для визначення вмісту лігандних форм гемоглобіну, використовували поглинання при 540, 560, 576 і 630 нм [10]. Вміст лігандних форм гемоглобіну (в моль/л) обчислювали за допомогою рівнянь, наведених у [11]:

$$C_{\text{OxyHb}} = (1.4747 \cdot A_{576} - 0.6820 \cdot A_{560} - 0.5329 \cdot A_{540}) \cdot 10^{-4},$$

$$C_{\text{MetHb}} = (4.5852 \cdot A_{540} - 0.8375 \cdot A_{560} - 3.7919 \cdot A_{576}) \cdot 10^{-4},$$

$$C_{\text{deoxyHb}} = (1.4749 \cdot A_{560} + 0.2141 \cdot A_{576} - 1.1042 \cdot A_{540}) \cdot 10^{-4}.$$

$$C_{\text{HemiCr}} = ((1.8787 \cdot A_{560} - 1.0406 \cdot A_{576} - A_{630}) / 8.6888) \cdot 10^{-4},$$

де  $A_{540}$ ,  $A_{560}$ ,  $A_{576}$  і  $A_{630}$  - поглинання, виміряні експериментально на відповідних довжинах хвиль для досліджуваних розчинів Hb. Вміст кожної з форм виражали у відсотках по відношенню до загального вмісту гемоглобіну у цитоплазматичній (мембранозв'язаній) фракції. Загальний вміст гемоглобіну в еритроцитах визначали геміглобінціанідним уніфікованим методом за стандартним набором при довжині хвилі 540 нм.

Вміст  $\text{H}_2\text{O}_2$  у позаклітинному середовищі визначали за допомогою Fox-реактиву, після осадження клітин шляхом центрифугування. Вміст  $\text{H}_2\text{O}_2$  у клітинах визначали після лізису осаджених клітин у 0,5 мл холодної води і наступного осадження білків ТХУ [12, 13].

Усі експерименти поведені у трьох повторностях. Експериментальні дані були проаналізовані у програмі Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA). Експериментальні дані представлені як  $x \pm m$  ( $x$  – середнє,  $m$  – відносна похибка). Для побудови кривих розподілу лігандних форм гемоглобіну використовували апроксимацію даних за методом найменших квадратів відповідно до рівняння поліноміальної регресії 6-го ступеню.

*Результати та їх обговорення.* На рис. 1 показано змінення вмісту  $\text{H}_2\text{O}_2$  у позаклітинному середовищі і в еритроцитах після години їх інкубування у окисному середовищі. Раніше було показана здатність еритроцитів ефективно нейтралізувати позаклітинний перекис водню за рахунок зв'язування з мембраною ферментів антиоксидантного захисту, таких як каталаза, глутатіонпероксидаза (GPx) та пероксиредоксин (Prx2) [11]. Проте, при навантаженні  $\text{H}_2\text{O}_2$  від  $5 \cdot 10^{-3}$  до 0,1 М, залишкова кількість перекису водню в середовищі інкубування зростала експоненціально (рис. 1, а), що свідчить про те, що у цьому діапазоні концентрацій клітини втрачають здатність повністю інактивувати останній у поверхні. У клітинах реєструється приріст вмісту  $\text{H}_2\text{O}_2$  в інтервалі вихідних концентрацій  $\text{H}_2\text{O}_2$  від  $10^{-6}$  до  $10^{-3}$  М, проте подальше збільшення вмісту  $\text{H}_2\text{O}_2$  в середовищі інкубування приводить до зниження внутрішньоклітинного вмісту останнього (рис. 1, б).

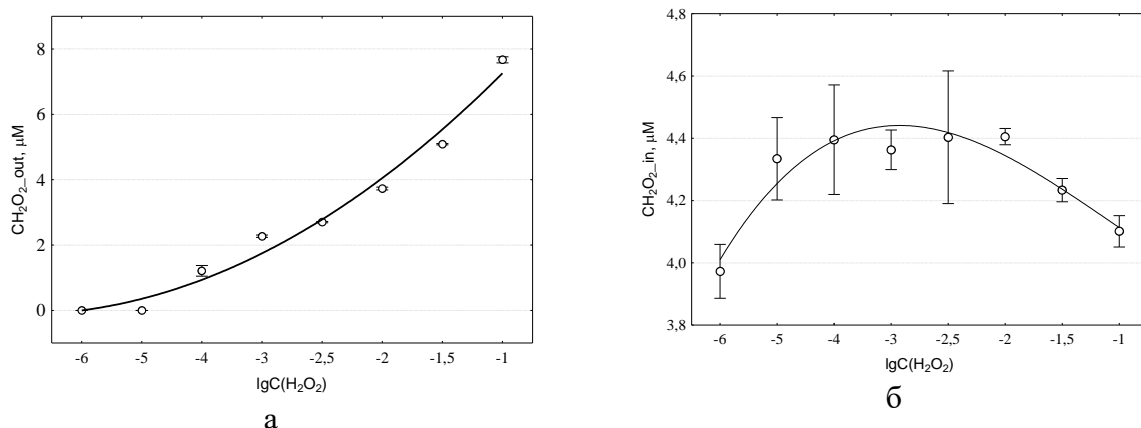


Рис. 1. Змінення вмісту перекису водню у позаклітинному середовищі (а) і цитозолі клітини (б) залежно від кількості  $H_2O_2$  у середовищі інкубування

Вміст лігандних форм гемоглобіну у цитоплазматичній фракції визначали з використанням спектрів поглинання в області 500–650 нм. У точках з початковим вмістом  $H_2O_2$  від  $10^{-6}$  до  $10^{-3}$  М, концентрація оксигемоглобіну (oxyHb) у цитоплазматичній фракції гемоглобіну була максимальною і досягала  $98.7 \pm 3.8$  %. За впливу  $H_2O_2$  у концентраціях 0,01–0,1 М у клітинах знижувався вміст oxyHb і зростав вміст deoxy- і metHb (рис. 2, а).

Змінення вмісту мембранозв'язаного гемоглобіну залежно від кількості  $H_2O_2$  у середовищі інкубування показано на рис. 2, б. Кількість мембранозв'язаного гемоглобіну у контрольних еритроцитах знаходилась на рівні  $17,4 \pm 4,2$  %. За наявності  $H_2O_2$  в середовищі інкубування в діапазоні  $10^{-6}$  –  $10^{-3}$  М кількість мембранозв'язаного гемоглобіну була нижчою за контрольний рівень. Збільшення рівня  $H_2O_2$  приводить до достовірного підвищення рівня мембранозв'язаного гемоглобіну (за виключенням концентрацій  $H_2O_2$  0,01 та 0,1 М) (рис. 2).

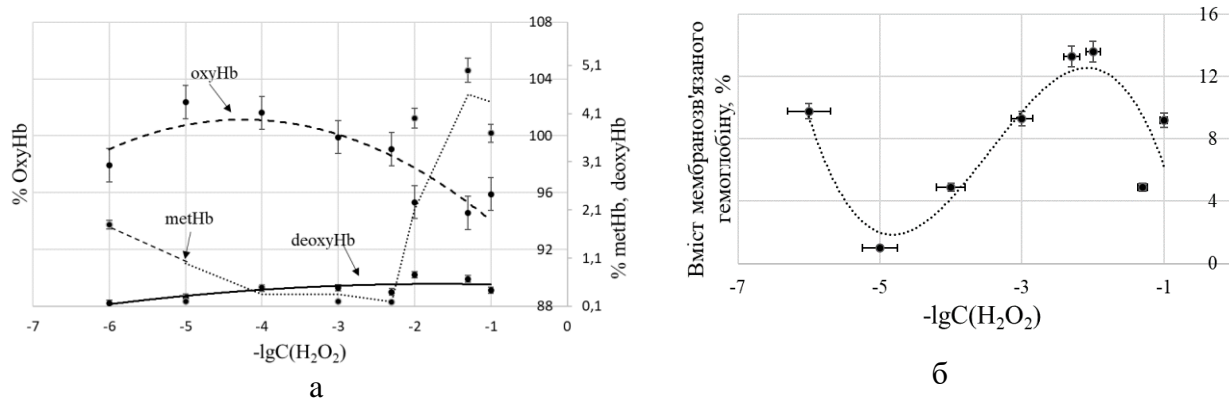


Рис. 2. а – розподіл лігандних форм гемоглобіну у цитоплазматичній фракції, б – змінення вмісту мембранозв'язаного гемоглобіну залежно від кількості  $H_2O_2$  у середовищі інкубування

Поглинання в області смуги Соре використовували для аналізу складу мембранозв'язаного гемоглобіну (рис. 3). Коливання спектра в області смуги Соре обумовлено конфігурацією простетичної групи в гемоглобіні в залежності від знаходження його в окси- або деокси-формі. Оксигемоглобін характеризується максимальним поглинанням на довжинах 410–420 нм, для деоксигемоглобіну на довжинах 425–430 нм, метгемоглобіну на 400–405 нм.

Розчини мембранозв'язаного гемоглобіну еритроцитів, що інкубувалися в присутності  $H_2O_2$  від  $10^{-6}$  до  $10^{-3}$  М дають спектральну полосу з максимум поглинання 414 нм, що відповідає оксигемоглобіну (рис. 3). Зниження інтенсивності полоси поглинання співпадає зі зниженням вмісту мембранозв'язаного гемоглобіну. Вплив  $H_2O_2$  у більш високій концентрації приводить до зниження інтенсивності смуги Соре і зміщенню

максимуму поглинання смуги з 414 нм на 412 нм. Сама спектральна смуга розширюється в області 370–400 нм. Подібні зміни характерні для переходу оксигемоглобіну у геміхром у присутності фосфоліпідів [5, 14].

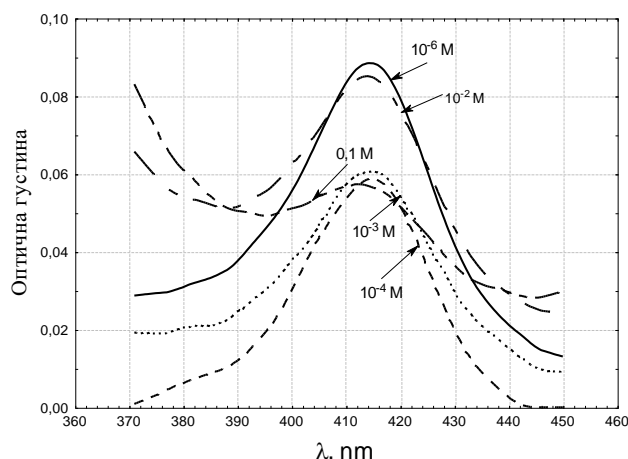


Рис. 3. Спектри поглинання розчинів мембранозв'язаного гемоглобіну в області смуги *Soret*. Біля кожного спектру наведена концентрація  $H_2O_2$  у середовищі інкубування клітин

Вважається, що перетворення  $oxyHb$  в геміхром відбувається через стадію окислення гемового заліза з утворенням  $metHb$  як проміжної нестабільної форми гемопротеїну. Для перетворення нормального гемоглобіну в геміхром *in vitro* зазвичай потрібні або денатуруючі умови, або наявність негативно заряджених лізофосфоліпідів, що можуть діяти як ендogenous ефектори перетворення гемоглобіну в геміхром. Денатуруючі умови виникають, так як клітини знаходяться у стресових умовах [15]. Також, цілком можна припустити, що високі концентрації  $H_2O_2$  викликають окиснення ліпідів і їх переміщення у внутрішній шар мембрани. Лізофосфатидна кислота після транслокації на внутрішню поверхню мембрани і взаємодії з гемоглобіном може призводити до утворення активних форм кисню і накопичення геміхрому. Результатом індукованих лізофосфоліпідами конформаційних змін в  $oxyHb$  може бути витіснення кисню у вигляді супероксидного радикала азотом аксіального ліганду з переходом  $oxyHb$  безпосередньо в геміхром [14].

Форма смуги *Soret* [5] (у випадку концентрацій  $H_2O_2$  0,05, 0,1 М) свідчить про те, що гемоглобін залишається зв'язаним з ліпідами після обробки тіней детергентом. Це вказує на незворотній характер зв'язування геміхрому з ліпідами мембрани.

**Висновки.** За умов впливу  $H_2O_2$  у діапазоні концентрацій  $10^{-6}$  до  $10^{-3}$  М в еритроцитах відбувається збільшення вмісту оксигемоглобіну і зниження вмісту метгемоглобіну у його цитоплазматичній фракції. Кількість мембранозв'язаного гемоглобіну є нижчою, ніж у контрольних клітинах. Підвищення рівня  $H_2O_2$  приводить до достовірного підвищення рівня мембранозв'язаного гемоглобіну.  $H_2O_2$  у діапазоні концентрацій  $5 \cdot 10^{-3}$  до 0,1 М негативно впливає на стан поверхні клітин, викликаючи перебудову ліпідного бішару. Наслідком цих процесів є перехід оксигемоглобіну у геміхром і незворотне зв'язування останнього з ліпідами мембрани.

**Аннотація.** Окислительный стресс создавали путем введения перекиси водорода (диапазон концентраций  $10^{-6}$  – 0,1 М) в среду инкубирования эритроцитов. Методом спектрофотометрии с последующим анализом спектров поглощения гемоглобина в диапазоне 350–650 нм исследовано влияние различных концентраций перекиси водорода на содержание мембраносвязанного гемоглобина, лигандных форм гемоглобина цитоплазматической фракции, состав мембраносвязанного гемоглобина в эритроцитах. Исследованы количественные изменения внутриклеточной и внеклеточной перекиси водорода. Показано, что перекись водорода в диапазоне концентраций  $5 \cdot 10^{-3}$  до 0,1 М негативно влияет на состояние поверхности клеток, вызывая перестройку липидного бислоя. Следствием этих процессов является переход оксигемоглобина в гемихром и необратимое связывание последнего с липидами мембраны.

**Ключевые слова:** мембраносвязанный гемоглобин, оксигемоглобин, метгемоглобин, гемихром, спектры поглощения гемоглобина, полоса *Soret*.

**Abstract.** Oxidative stress was created by introducing hydrogen peroxide (concentration range  $10^{-6}$  - 0.1 М) into the erythrocyte incubation medium. The different concentrations effect of hydrogen peroxide to the content of membrane-bound

hemoglobin, ligand forms of the cytoplasmic fraction hemoglobin and the composition of membrane-bound hemoglobin were studied by spectrophotometry and subsequent analysis of hemoglobin absorption spectra in the range of 350 - 650 nm. Quantitative changes of intracellular and extracellular hydrogen peroxide were tested. It is shown that hydrogen peroxide in the concentration range  $5 \cdot 10^{-3}$  to 0.1 M has a negative effect on the cell surface state, causing the rearrangement of the lipid bilayer. These processes result in the conversion of oxyhemoglobin to hemichrome and its irreversible binding to membrane lipids.

**Key words:** membrane-bound hemoglobin, oxyhemoglobin, methemoglobin, hemichrome, hemoglobin absorption spectra, Soret band.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Космачевская О. В., Насыбуллина Э. И., Блиндарь В. Н., Топунов А. Ф. Связывание эритроцитарного гемоглобина с мембраной как способ осуществления сигнально-регуляторной функции (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*. 2019. Т. 55, № 2. С. 107–123.
2. Rifkind J. M., Nagababu E. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. *Antioxid. Redox Signal.* 2013. Vol. 18. P. 2274–2283.
3. Mohanty J. G., Nagababu E., Rifkind J. M. Red blood cell oxidative stress impairs delivery and induces red blood cell aging. *Frontiers in Physiology*. 2014. Vol. 5. e84.
4. van Zwieten R., Verhoeven A. J., Roos D. Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells. *Free. Radic. Biol. Med.* 2014. Vol. 67. P. 377–386.
5. Welbourn E. M., Wilson M. T., Yusof A., Metodieva M. V., Cooper C. E. The mechanism of formation, structure and physiological relevance of covalent hemoglobin attachment to the erythrocyte membrane. *Free Radical Biology and Medicine*. 2017. 103. С. 95–106.
6. Carelli-Alinovi C., Misiti F. Erythrocytes as potential link between diabetes and Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2017. 9. 276.
7. Космачевская О. В., Топунов А. Ф. Альтернативные и дополнительные функции эритроцитарного гемоглобина. *Обзор. Биохимия*. 2019. Т. 84 (1). С. 3–23.
8. Tharaux P.-L. Posttranslational modifications of sickle hemoglobin in microparticles may promote injury. *Kidney International*. 2019. 95(6). С. 1289–1291.
9. Ratanasopa K., Strader M. B., Alayash A. I., Bulow L. Dissection of the radical reactions linked to fetal hemoglobin reveals enhanced pseudoperoxidase activity. *Frontiers in physiology*. 2015. 6. P. 39.
10. Attia A. M. M., Aboulthana W. M., Hassan G. M., Aboelezz E. Assessment of absorbed dose of gamma rays using the simultaneous determination of inactive hemoglobin derivatives as a biological dosimeter. *Radiation and Environmental Biophysics*. 2020. 59(1). С. 131–144.
11. Dotsenko O. I., Mykutska I. V., Taradina G. V., Boiarska Z. O. Potential role of cytoplasmic protein binding to erythrocyte membrane in counteracting oxidative and metabolic stress. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2020. 11(3). С. 455–462.
12. Wolff S. P. [18] Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Oxygen Radicals in Biological Systems Part C*. 1994. С. 182–189.
13. Bou R., Codony R., Tres A., Decker E. A., Guardiola F. Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation–xylenol orange method: A review of the factors that influence the method's performance. *Analytical Biochemistry*. 2008. 377(1). С. 1–15.
14. Андрюк Г. М., Кисель М. А. Превращение гемоглобина в гемихром под действием лизофосфолипидов. *Биохимия*. 1999. Т. 64, 8. С. 1034–1042.
15. Matveev V. V. Cell theory, intrinsically disordered proteins, and the physics of the origin of life. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2019. 149. P. 114–130.

УДК 004.89

## ПРОГНОЗУВАННЯ ЕПІДЕМІЙ МЕТОДАМИ МАТЕМАТИЧНОГО МОДЕЛЮВАННЯ ТА МАШИННОГО НАВЧАННЯ

*О. В. Воронюк, О. Ю. Кульчицька, А. В. Баєв*

**Анотація.** У даному дослідженні розглядається побудова математичної моделі епідемії інфекційної хвороби, знаходиться розв'язок отриманої системи звичайних диференціальних рівнянь методом Рунге-Кутти, а також апроксимується функція динаміки процесу шляхом машинного навчання на спостережених даних. Метою дослідження є створення системи прогнозування епідемії методами математичного моделювання та методами машинного навчання.

**Ключові слова:** математичне моделювання, епідемії, аналіз даних, машинне навчання, диференціальні рівняння.

**Вступ.** Математичне моделювання є одним з найпопулярніших напрямків у наукових дослідженнях теперішнього часу. Враховуючи те, що багато явищ у фізиці та хімії описуються математичними моделями достатньо повно, маємо у результаті те, що ці науки