

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Крамарьов С. О., Закордонєць Л. В. Гельмінтози в дітей: підходи до лікування. *Клінічна педіатрія*. 2018. Т. 13. № 3. С. 79–86.
2. Семченко К. В. Теоретичне та наукове обґрунтування фармацевтичної розробки комбінованих лікарських препаратів для комплексного лікування гельмінтозів системи травлення: дис. ... д-ра фарм. наук за спец. 15.00.01 «Технологія ліків, організація фармацевтичної справи та судова фармація». Харків, 2020. Національний фармацевтичний університет. 325 с.
3. Гельмінтози – як уникнути безпеки? *Раціональна фармакотерапія*. 2018. № 2. С. 43–49.

УДК 577.2, 577.352

АКТИВНОСТІ АТФ-аз ТА МАТ ЕРИТРОЦИТІВ ЗА УМОВ ОДНОЧАСНОГО ВПЛИВУ ПЕРЕКИСУ ВОДНЮ І МЕТІОНІНУ

І. В. Микуцька, О. І. Доценко

Анотація. У роботі досліджено вплив метіоніну, перекису водню (H_2O_2), метіоніну і перекису водню за сумісної присутності на активність Na^+-K^+ -, Mg^{2+} -АТФ-аз та МАТ в еритроцитах людини. Установлено, що наявність метіоніну в середовищі інкубування сприяє зростанню активності досліджуваних ферментів. Уведення метіоніну в концентраціях 10^{-6} – 10^{-4} М призводить до зростання активності усіх ферментів навіть за присутності H_2O_2 . За відсутності метіоніну окисне середовище інкубування призводить до падіння активності Na^+-K^+ -АТФ-ази, але у високих концентраціях H_2O_2 (10^{-6} – 10^{-3} М) сприяє зростанню активності Mg^{2+} -АТФ-ази та МАТ, хоча рівень активності останніх залишається низьким.

Ключові слова: еритроцити людини, окисний стрес, Na^+-K^+ -АТФ-аза, Mg^{2+} -АТФ-аза, МАТ, метіонін.

Вступ. Завдяки своїй функції переносу кисню та високому вмісту заліза еритроцити постійно зазнають окисного стресу. До того ж вони можуть тимчасово відчувати окислювальний стрес, коли піддаються впливу АФК, перетинаючи запальні тканини або взаємодіючи з окислювачем, що міститься у ліках або продуктах харчування [1]. Концентрація H_2O_2 в крові знаходиться в мікромольному діапазоні. Берперечно, основним поглиначем H_2O_2 у судинній системі є еритроцити [2]. Очевидно, що окисно-відновний стан клітини та активність захисних механізмів є ключовим фактором, що визначає життєздатність клітин [3].

Основне навантаження під час окисного стресу зазнає гемоглобін (Hb) та мембрана еритроцитів. Мембрана еритроцитів людини виконує ключову роль у забезпеченні і регуляції фізіологічної активності цих клітин [1]. Одним із чутливих показників впливу на мембрану еритроцита є зміна активності мембраноз'язаних ферментів, як-от Mg^{2+} -АТФ-аза та Na^+ , K^+ -АТФ-аза, що регулюють іонний гомеостаз у клітині. Порушення їх роботи призводить до змін внутрішньоклітинної концентрації іонів Mg^{2+} , Na^+ й K^+ , що може спричинити низку метаболічних змін у клітині [4]. Велика система ферментативних і неферментативних антиоксидантів функціонує для видалення АФК у фізіологічних процесах і під час патологічних станів [5].

Метіонін та фолати, вміст яких у плазмі крові високий, могли б залучатися у метаболічні шляхи і бути додатковим джерелом енергії та глутатіону. Проте є тільки окремі відомості про залученість метіоніну до метаболічної мережі еритроцитів [6]. Відомо, що метіонін є джерелом S-аденозилметіоніну (SAM), який є основним біологічним донором метильної групи одновуглецевого циклу у клітині. Він бере участь у реакціях трансметилування, як-от синтез білків, моноамінів, фосфоліпідів, нейромедіаторів і нуклеїнових кислот [7, 8]. До того ж декарбоксильований SAM бере участь у синтезі похідних путресцину поліамінів, спермідину та сперміну. Ці аміни вважаються маркерами диференціації та регенерації клітин [8].

У еритроцитах SAM використовується для метилування карбоксильного білка, метилування катехоламінів і гістаміну, а також метилування фосфоліпідів. SAM утворюється з метіоніну та АТФ у реакції, що каталізується метіонін-аденозилтрансферазою (АТФ: L-метіонін-S-аденозилтрансфераза; EC 2.5.1.6, МАТ). МАТ присутній у всіх клітинах і демонструє високий ступінь збереження між видами [7]. Існує три основні ізоферменти МАТ у ссавців, тобто МАТ I, МАТ II і МАТ III. Усі ізоформи МАТ знаходяться в печінці. Ізоформа МАТ II, яка має відносно високу спорідненість до метіоніну (K_m 2–20 мкМ), також є переважною ізоформою,

присутньою в центральній нервовій системі та еритроцитах [8]. Оскільки S-аденозилметіонін є важливим учасником процесів метилювання, а також процесів перенесення сірки від метіоніну до цистеїну, підтримання активності МАТ є важливим для еритроцитів. Проте про регуляторні властивості цього ферменту саме в еритроцитах відомо мало.

Отже, метою роботи є проведення експериментальних досліджень, на основі яких можна було б оцінити вплив метіоніну, перекису водню (H_2O_2), метіоніну і перекису водню за сумісної присутності на активність $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -, Mg^{2+} -АТФ-аз та МАТ в еритроцитах.

Методи досліджень. Протокол експериментальної частини дослідження відповідає принципам біологічної етики та погоджений із Локальним етичним комітетом Донецького національного університету імені Василя Стуса, факультету хімії, біології і біотехнологій (м. Вінниця, Україна).

Досліджено вплив метіоніну, перекису водню (H_2O_2), метіоніну і перекису водню за сумісної присутності на активність $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -, Mg^{2+} -АТФ-аз та МАТ в еритроцитах після години інкубування. 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, рН 7,4), що містив 0,15 моль NaCl (буферний розчин 1). Відмиті від плазми і упаковані еритроцити ресуспендували в цьому самому буфері.

Для дослідження впливу метіоніну на вказані вище показники суспензії еритроцитів уводилася у буферний розчин 1. Концентрацію метіоніну в середовищі варіювали від 10^{-10} до 10^{-4} М. Для дослідження впливу перекису водню суспензії еритроцитів уводилася у буферний розчин 1, що містив перекис водню у діапазоні концентрацій 10^{-8} – 10^{-3} М. В експериментах із дослідження сумісної дії метіоніну і перекису водню суспензії еритроцитів уводилася у буферний розчин із додаванням фіксованої кількості метіоніну. Концентрація введеного метіоніну складала 10^{-4} , 10^{-6} та 10^{-8} моль, вміст H_2O_2 варіювали в діапазоні 10^{-8} – 10^{-3} М.

Кількість еритроцитів у середовищі інкубування підтримували на рівні вмісту гемоглобіну 3,0–3,2 г/л. Клітини інкубували протягом години при 20 °С. Після інкубування еритроцити осаджували центрифугуванням, надосадову рідину видаляли. Пробі відмивали центрифугуванням із буфером Трис (рН 7,4), що містив 0,15 моль NaCl (буферний розчин 2). Для подальших досліджень використовували гемолізат еритроцитів, відмитих від середовища інкубування. Для контролю використовували активності ферментів еритроцитів, що не піддавалися впливу досліджуваних речовин і інкубувалися впродовж однієї години у буферному розчині 1.

Активність Mg^{2+} -, $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -АТФ-ази та МАТ визначали за кількістю неорганічного фосфору, утвореного під час ферментативного гідролізу АТФ [4, 9–12]. Реакцію проводили додаванням гемолізату до інкубаційного середовища, що містить АТФ. Склад середовища для визначення сумарної АТФ-азної активності: 125 мМ NaCl , 25 мМ KCl , 3 мМ MgCl_2 , 0,5 мМ ЕДТА, 3 мМ АТФ, 50 мМ трис- HCl , рН 7,4. Склад середовища для визначення активності МАТ: 50 мМ KCl , 40 мМ MgCl_2 , 0,5 мМ ЕДТА, 3 мМ АТФ, 5 мМ метіоніну, 50 мМ трис- HCl , рН 7,4. Активність Mg^{2+} -АТФ-ази визначали додаванням до гемолізату специфічного інгібітора $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -АТФ-ази – убаїну (строфантин-Г). Пробі інкубували 15 хвилин. Реакцію припиняли додаванням холодної трихлороцтової кислоти. Осад білка відокремлювали центрифугуванням. У надосадовій рідині визначали кількість неорганічного фосфору (Рн), використовуючи кольорову реакцію з амонієм молібденовокислим. Оптичну щільність розчинів реєстрували спектрофотометрично за довжини хвилі 590 нм у кюветах завтовшки 1 см. Вміст Рн визначали за допомогою калібрувального графіка, побудованого для стандартного розчину KH_2PO_4 точної концентрації. $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -АТФ-азну активність розраховували за різницею між загальною АТФазною активністю і активністю у середовищі, яке містить убаїн. Активність маркерних ферментів виражали в мМ Рн, що утворюється протягом 1 хвилини, віднесеної до кількості білка (Hb) у пробі (мМ/хв г Hb). Вміст гемоглобіну в еритроцитах визначали гемігلوبінціанідним уніфікованим методом за стандартним набором [13, 14].

Усі експерименти поведені у трьох повторностях. Експериментальні дані було проаналізовано у програмі Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA). Експериментальні дані представлені як $x \pm m$ (x – середнє, m – відносна похибка). Достовірність відмінностей між середньогруповими показниками оцінювали за допомогою непараметричного рангового критерію Вілкоксо-

на [15]. Для виявлення взаємозв'язку між досліджуваними величинами на основі отриманих експериментальних даних були побудовані тривимірні графіки розсіювання (Statistica 8.0); діаграми апроксимувались методом найменших квадратів із вагами, що залежать від відстані (вплив окремих точок зменшується з відстанню до поверхні).

Результати експерименту. На рис. 1 представлена зміна активностей $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТФ-ази}$ (а) та $\text{Mg}^{2+}\text{-АТФ-ази}$ (б) залежно від концентрації метіоніну та кількості H_2O_2 в середовищі інкубування еритроцитів. За відсутності метіоніну активність $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТФ-ази}$ за високих концентрацій H_2O_2 (10^{-3} М) знижується на $78 \pm 17,3$ %, порівняно з контролем. Імовірно, окисне середовище приводить до інактивації ферменту через перебудову мембрани еритроцита. Зміна ліпідного складу біологічних мембран розглядається як один із важливих молекулярних механізмів порушення їх специфічних властивостей. Так, чутливість мембранозв'язаних АТФ-аз до будь-яких хімічних агентів може визначатися тісним структурно-функціональним зв'язком між цими ферментами та ліпідним матриксом мембрани – первинною мішенню для дії речовин різної природи [4]. Активність $\text{Mg}^{2+}\text{-АТФ-ази}$ (рис. 1б) за цих умов зростала, хоча все ще залишалася на низькому рівні, порівняно з присутністю метіоніну.

Введення метіоніну в середовище інкубування призводить до зростання активностей $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (рис. 1а) та $\text{Mg}^{2+}\text{-АТФ-ази}$ (рис. 1б). За концентрацій метіоніну 10^{-6} – 10^{-4} М активність ферментів зростає навіть у присутності H_2O_2 . $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТФ-аза}$ та $\text{Mg}^{2+}\text{-АТФ-аза}$ є білками, відповідальними за активне транспортне перекачування іонів Na^+ , K^+ та Mg^{2+} через плазматичні мембрани більшості вищих еукаріотів. Енергія для цієї роботи надходить від гідролізу кінцевого фосфатного зв'язку АТФ [4, 16]. Очевидно, що метіонін слугує додатковим джерелом енергії АТФ. Відомо, що метіонін є джерелом S-аденозилметіоніну (SAM), який є важливим донором метилу в багатьох реакціях трансметилування. SAM, утворений у цій реакції, залучається до циклу аденілатного метаболізму за участю SAM-гідролази [17], який далі внаслідок низки реакцій перетворюється в рибулозо-5-фосфат, що залучається у гліколіз. Отже, метіонін може бути додатковим енергетичним метаболітом, який підтримує клітини за умов нестачі природного для еритроцитів метаболіту – глюкози.

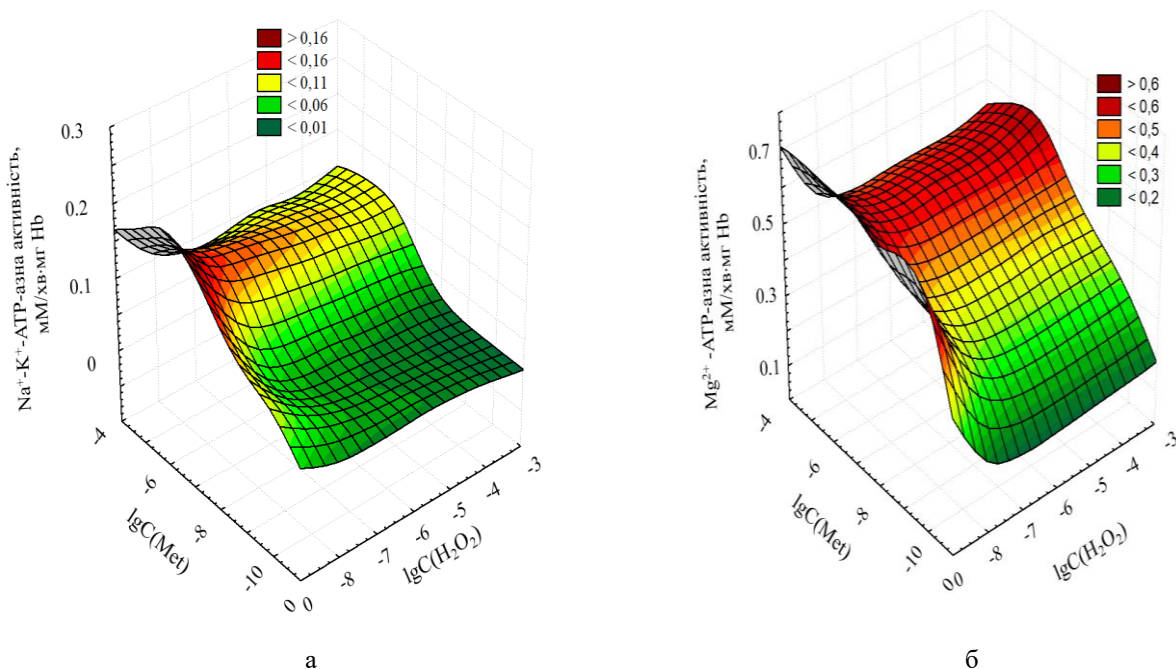


Рис. 1 – Зміна активності $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТФ-ази}$ (а) та $\text{Mg}^{2+}\text{-АТФ-ази}$ (б) еритроцита залежно від двох факторів: концентрації метіоніну та кількості H_2O_2 , введених у середовище інкубування еритроцитів

Зміна активності МАТ еритроцита залежно від концентрації метіоніну та вмісту H_2O_2 в середовищі інкубування показана на рис. 2. Видно, що присутність перекису водню у високих концентраціях (10^{-6} – 10^{-3} М) сприяє зростанню активності МАТ на $36 \pm 6,4$ %, порівняно з контролем. За відсутності H_2O_2 метіонін у середовищі інкубування також призводить до зростання активності цього ферменту. Зі збільшенням концентрації метіоніну (10^{-6} – 10^{-4} М) у сере-

довищі активність МАТ сильно зростає, це співпадає з даними у літературних джерелах [18]. Уведення метіоніну призводить до зростання активності ферменту навіть у присутності H_2O_2 , але приріст значно нижчий. Імовірно, окисне середовище викликає перебудови мембрани еритроцита, що ускладнює проникнення метіоніну у клітину внаслідок дії на переносників цієї амінокислоти.

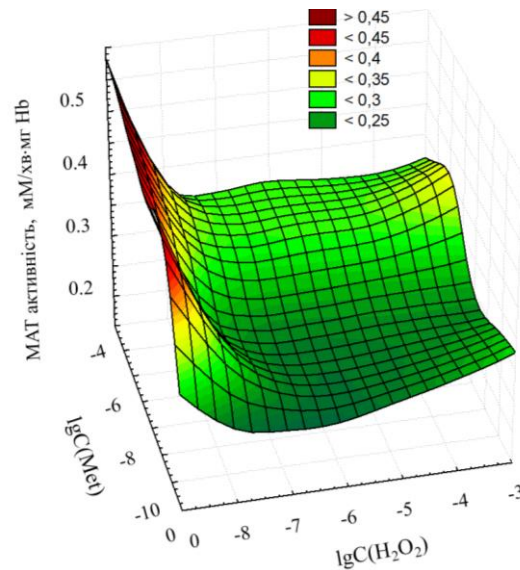


Рис. 2 – Зміна активності МАТ еритроцита залежно від двох факторів: концентрації метіоніну та кількості H_2O_2 , введених у середовище інкубування еритроцитів

Висновки:

1. Установлено, що наявність метіоніну в середовищі інкубування сприяє зростанню активності досліджуваних ферментів.
2. Уведення метіоніну в концентраціях 10^{-6} – 10^{-4} М призводить до зростання активності Na^+ - K^+ -, Mg^{2+} -АТФ-аз та МАТ навіть у присутності H_2O_2 .
3. За відсутності метіоніну окисне середовище інкубування призводить до падіння активності Na^+ - K^+ -АТФ-ази, але у високих концентраціях H_2O_2 (10^{-6} – 10^{-3} М) сприяє зростанню активності Mg^{2+} -АТФ-ази та МАТ, хоча вони залишаються низькими.
4. Показано, що метіонін є додатковим енергетичним метаболітом, який підтримує клітини за умов нестачі природного для еритроцитів метаболіту – глюкози.

Abstract. The influence of methionine, hydrogen peroxide (H_2O_2), methionine and hydrogen peroxide in their simultaneous presence on the activity of Na^+ - K^+ -, Mg^{2+} -ATP-ase and MAT in human erythrocytes was studied. It was established that the presence of methionine in the incubation medium contributes to the growth of the activity of the studied enzymes. The introduction of methionine in concentrations of 10^{-6} – 10^{-4} M leads to an increase in the activity of all enzymes even in the presence of H_2O_2 . In the absence of methionine, the oxidizing medium of incubation leads to a drop in the activity of Na^+ - K^+ -ATP-ase, but at high concentrations of H_2O_2 (10^{-6} – 10^{-3} M) it promotes the growth of the activity of Mg^{2+} -ATP-ase and MAT, although the activity level of the latter remains low.

Keywords: human erythrocytes, oxidative stress, Na^+ - K^+ -ATP-ase, Mg^{2+} -ATP-ase, MAT, methionine.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Interplay between Erythrocyte Peroxidases and Membrane / D. Melo, S. Rocha, S. Coimbra, A. Santos Silva; in A. Tombak (ed.). *Erythrocyte*. IntechOpen, London, UK. 2019. P. 65–84. DOI: 10.5772/intechopen.83590.
2. Forman H. J., Bernardo A., Davies K. J. A. What is the concentration of hydrogen peroxide in blood and plasma? *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2016. № 603. P. 48–53. DOI:10.1016/j.abb.2016.05.005.
3. Oxidative stress caused by glycation of Cu,Zn-superoxide dismutase and its effects on intracellular components / F. Junichi, M. Theingi, O. Ayako, K. Hideaki, T. Naoyuki. *Nephrol Dial Transplant*. 1996. № 11. P. 34–40.
4. Вплив піридину на активність мембраноз'язаних ферментів клітин печінки / О. М. Філінська, В. П. Лозовий, С. В. Яблонська, Г. В. Островська, Т. В. Рибальченко, В. О. Зеленюк, В. К. Рибальченко. *Доповіді Національної академії наук України*. 2008. № 6. С. 173–177.
5. Evaluation of erythrocyte Na^+ , K^+ -ATP-ase and superoxide dismutase activities and malondialdehyde level alteration in coal miners / A. Gürel, F. Armutçu, Ş. Damatoğlu, M. Unalacak, N. Demircan. *Eur J Gen Med*. 2004. 1(4). P. 22–28.

6. Methylation of protein asparates and deamidated asparagines as a function of blood bank storage and oxidative stress in human red blood cells / J. A. Reisz, T. Nemkov, M. Dzieciatkowska, R. Culp-Hill, D. Stefanoni, R. C. Hill, T. Yoshida, A. Dunham, T. Kanias, L. J. Dumont, M. Busch, E. Z. Eisenmesser, J. C. Zimring, K. C. Hansen, A. D'Alessandro. *Transfusion*. 2018. № 58(12). P. 2978–2991. DOI: 10.1111/trf.14936.
7. Ekegren T., Aquilonius S. M., Gomes-Trolin C. A comparative study of methionine adenosyltransferase activity and regional distribution in mammalian spinal cord. *Biochem Pharmacol*. 2000. Vol. 60(3). P. 441–445. DOI: 10.1016/s0006-2952(00)00316-6.
8. Methionine adenosyltransferase activity in erythrocytes and spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis / T. Ekegren, H. Askmark, S.-M. Aquilonius, C. Gomes-Trolin. *Experimental Neurology*. 1999. Vol. 158(2). P. 422–427. DOI: 10.1006/exnr.1999.7112.
9. Иващенко А. Т., Ли Т. Т., Бушнева И. А. Свойства анионной АТФазы эритроцитов. *Вопросы медицинской химии*. 1985. Т. 31. № 1. С. 117–121.
10. Рязанцев Н. В., Новицкий В. В. Структурные нарушения и изменения активности Na-K-АТФазы в мембранах эритроцитов у пациентов с невротическими расстройствами. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2002. Т. 134. № 7. С. 85–88.
11. Макаренко Е. В. АТФ-азная активность эритроцитов при хронических заболеваниях печени и желудка. *Лабораторное дело*. 1987. № 2. С. 14–17.
12. Якушева И. А., Орлова Л. И. Метод определения активности аденозинтрифосфатаз в гемолизатах эритроцитов крови человека. *Лабораторное дело*. 1970. № 8. С. 497–501.
13. Кушаковский М. С. Клинические формы повреждения гемоглобина. Ленинград: Медицина. 1968. 324 с.
14. Пупкова В. И. Определение гемоглобина в крови: информационно-методическое пособие. Кольцово. 2001. С. 4–8.
15. Боровиков В. Statistica. Искусство анализа данных на компьютере: для профессионалов. 2-е изд. СПб.: Питер. 2003. 688 с.
16. Kaplan J. H. Biochemistry of Na⁺, K⁺-ATPase. *Annual Review of Biochemistry*. 2002. Vol. 71. P. 511–535. DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.102201.141218.
17. Schuster S., Kenanov D. Adenine and adenosine salvage pathways in erythrocytes and the role of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *A theoretical study using elementary flux modes. The FEBS Journal*. 2005. 272(20). P. 5278–5290. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.04924.x.
18. Корендясева Т. К. Регуляция метаболизма метионина в суспензии свежевыделенных гепатоцитов: дис. ... канд. биол. наук: 03.01.02-биофизика. Москва. 2011. 117 с.

УДК 685.648.683

КОМПЕНСАЦІЯ ТЕМПЕРАТУРНОЇ ЗАЛЕЖНОСТІ У ТРЕНАЖЕРІ «БОКСЕРСЬКА ГРУША»

Ю. В. Сіряк, Д. В. Чернов

Анотація. У дослідженні реалізовано температурну компенсацію даних датчика, які є залежними від температури. Побудовано експериментальний графік залежності показників гіроскопа від температури. За допомогою метода найменших квадратів отримано коефіцієнти лінійної апроксимації для лінійної області цієї залежності.

Ключові слова: Wi-Fi, компенсація, апроксимація, ESP32, MPU6050.

Існує безліч різновидів бездротового зв'язку, але найважливішою особливістю бездротових мереж є те, що зв'язок здійснюється між комп'ютерними пристроями. Це забезпечує свободу пересування та можливість використання додатків, що знаходяться в інших частинах будинку, міста або у віддаленому куточку світу [1].

Боксерська груша – це тренажер для боксу та інших видів єдиноборств, який стосується спорту і конструкції навчально-тренувальних снарядів для контролю і відпрацювання ударів у боксі та інших видах силових єдиноборств [1].

Під час вимірювання різноманітних показників стану об'єкта завжди є температурна залежність, яку мають типові датчики. Цю залежність необхідно компенсувати, оскільки температура ніколи не буває постійною, тому потрібно врахувати цю залежність під час вимірювання даних.

Метою дослідження є компенсація температурної залежності в датчику положення MPU6050.

У роботі обрано технологію Wi-Fi для передачі параметрів удару боксера по терміналу. Отримано некомпенсовані (сірі) дані, які є досить неточними. Побудовано графік залежності