

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ H_2O_2 ТА МЕТІОНІНУ НА ЛІГАНДНІ ФОРМИ МЕМБРАНОЗВ'ЯЗАНОГО ГЕМОГЛОБІНУ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ

С. В. Федоров, О. І. Доценко

Анотація. Досліджено вплив H_2O_2 та метіоніну на стан мембранозв'язаного гемоглобіну еритроцитів людини. Показано, що метіонін суттєво впливає на розподіл і кількісне співвідношення лігандних форм гемоглобіну мембранозв'язаної фракції в умовах перекисного навантаження. Збільшення концентрації метіоніну приводить до накопичення met- і deoxy-форм гемоглобіну у мембранозв'язаній фракції. Отримані результати свідчать про залученість гемоглобіну до метаболічних процесів за участю метіоніну, зокрема у взаємодію з сірководнем.

Ключові слова: окисний стрес, метіонін, еритроцити, лігандні форми гемоглобіну; мембранозв'язаний гемоглобін.

Вступ. Постійна взаємодія еритроцитів із киснем зумовлює розвиток негативного накопичувального ефекту – окисного стресу – явища, яке може спричинити численні порушення у метаболічних процесах червоних клітин крові. Отже, метаболічна система еритроцитів має забезпечувати надійний антиоксидантний захист [1]. Наразі виявлено, що окислювальний стрес, спричинений додаванням перекису водню до інкубаційного середовища еритроцитів, має значний вплив на конформацію гематопорфірину і, як наслідок, – на зв'язування кисню гемоглобіном (Hb). В еритроцитах у відповідь на посилення перекисного окислення ліпідів активізуються антиоксидантні системи [2]. Одним із найважливіших компонентів антиоксидантного захисту є система глутатіону, що включає відновлений глутатіон (GSH) та ферменти: глутатіонредуктазу, глутатіонпероксидазу, глутатіонтрансферазу і глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу [3].

Відомо, що Hb проявляє високу пероксидазну активність і може каталізувати окислення біологічних молекул за участю перекису водню (H_2O_2). Hb здатний відновлювати перекис та ініціювати вільнорадикальне окислення під впливом H_2O_2 [4]. Важливим для наших досліджень є роль метіоніну в метаболізмі еритроцитів. Залучення метіоніну до метаболічного циклу S-аденозилметіоніну (SAM) підтверджується різними дослідженнями [5, 6]. Роль циклу SAM є досить різносторонньою. SAM залучається до циклу нуклетотидів та реакцій метилювання білків – і цитозольних, і мембранних [5, 7]. Установлено, що SAM через функцію метилювання може відновлювати мембранні, а також цитоскелетні білки еритроцитів [8, 9]. Досліджено, що молекула гемоглобіну також метилується із посередництвом SAM, і навіть більше: активність метилювання залежить від віку та рівню оксидантного стресу відповідно [10].

Відомо, що для більшості клітин, які підтримують метіоніновий цикл, показаний його зв'язок із циклом глутатіону посередництвом цистеїну, який за умов недостатнього зовнішнього надходження може синтезуватися внутрішньоклітинно із гомоцистеїну, який виробляється у циклі SAM за участі ферменту цистоціонін- β -синтази (CBS) [11]. Дані останніх років показують, що зв'язування гемоглобіну з мембранними компонентами має досить велике біологічного значення. Це і регуляція метаболізму глюкози та властивостей цитоскелету, формування сигналу про окисне ушкодження або старіння еритроциту. У разі оборотної взаємодії з мембранами просторовий перерозподіл Hb дає змогу змінювати рівень клітинного метаболізму, що особливо важливо для еритроцитів, у яких відсутній апарат біосинтезу. У цьому разі утворення мембранозв'язаного гемоглобіну може бути одним із механізмів формування швидкої адаптивної відповіді на умови, що змінюються [1, 12].

Мета роботи полягає у дослідженні впливу H_2O_2 , поєднаного впливу H_2O_2 і метіоніну на стан мембранозв'язаного гемоглобіну в еритроцитах.

З огляду на вищезазначене ми обрали перекис водню чинником, який має створювати оксидативний стрес в еритроциті, впливаючи цим на вміст лігандних форм Hb. Метіонін був обраний нами для дослідження циклу SAM у метаболічній мережі червоних клітин та його ролі у протидії окисному навантаженню еритроцита. Основним методом аналізу впливу зазначених факторів ми обрали спектрофотометричний метод, який використовується для дослідження різних форм гемоглобіну [13].

Завдання дослідження: провести спектрофотометричний аналіз мембранозв'язаної фракції гемоглобіну еритроцитів, які інкубувалися у присутності H_2O_2 та сумісної присутності H_2O_2 і метіоніну.

Предмет дослідження: окислювальний стрес та метіонін, в якості факторів впливу на еритроцит.

Об'єкт дослідження: мембранозв'язаний гемоглобін.

Методи досліджень. Експериментальна частина дослідження відповідає принципам біологічної етики. Для експериментів використовувалася периферична кров практично здорових донорів однієї статі та одного віку.

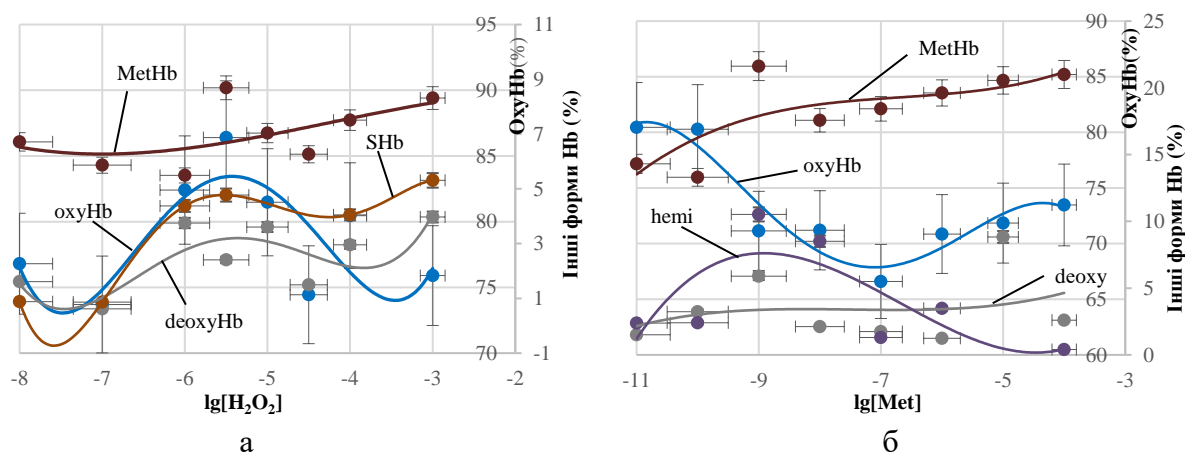
Для дослідження впливу метіоніну на вміст лігандних форм мембранозв'язаного гемоглобіну суспензія еритроцитів вводилася у Na-фосфатний буфер (0,015 М, pH 7,4), що містив 0,15 М NaCl (буферний розчин 1). Концентрацію метіоніну в середовищі варіювали від 10^{-10} до 10^{-4} М. Для дослідження впливу перекису водню суспензія еритроцитів вводилася у буферний розчин 1, що містив останній у діапазоні концентрацій 10^{-8} – 10^{-3} М. В експериментах із дослідження сумісної дії метіоніну і перекису водню суспензія еритроцитів вводилася у буферний розчин із додаванням фіксованої кількості метіоніну у концентрації 10^{-4} та 10^{-6} М. Вміст H_2O_2 варіювали в діапазоні 10^{-8} – 10^{-3} М.

Кількість еритроцитів у середовищі інкубування підтримували на рівні 3,0–3,2 г/л ($\sim 10^8$ клітин/л). Клітини інкубували протягом години при 20 °С впродовж години. Після інкубування еритроцити осаджували центрифугуванням, надосадову рідину видаляли. Для подальших досліджень використовували тіні, відмиті від гемолізату еритроцитів. До осаду тіней еритроцитів додавали 0,5 мл 5 % розчину тритону X-100 [14, 15]. Пробу витримували протягом 5 хв до повного прояснення розчину, потім додавали 0,2 мл буферу 1.

Порівняння проводили з контрольними пробами, які готувалися в тих самих умовах, але без перекису і без метіоніну в середовищі інкубування. Одна контрольна проба аналізувалася одразу після приготування, інша – після години інкубування. Спектри поглинання мембранозв'язаного гемоглобіну еритроцитів реєстрували на Spekol® 1500 UV/Vis в інтервалі довжин хвиль 340–650 нм в кюветах із товщиною 1 мм. Як розчин порівняння для спектрофотометричних вимірів під час вивчення мембранозв'язаного гемоглобіну використовували розчин, що містив 0,5 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 [14]. Вміст лігандних форм гемоглобіну (у моль/л) обчислювали за допомогою рівнянь, наведених у [16, 17]. 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, обговорення. На рис. 1 показано розподіл лігандних форм мембранозв'язаного гемоглобіну в еритроцитах, які були інкубовані у присутності різних концентрацій H_2O_2 (а), у присутності різних концентрацій метіоніну (б), а також за одночасної присутності H_2O_2 і метіоніну (в, г).



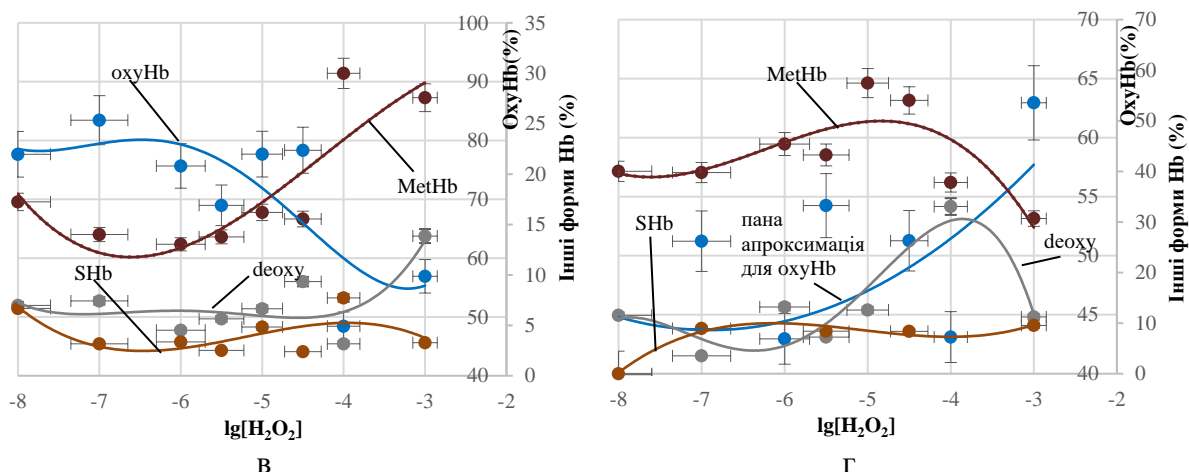


Рис. 1 – Розподіл лігандних форм мембранозв’язаного гемоглобіну (%) у складі еритроцитів, що інкубували: (а) з додаванням H_2O_2 в діапазоні 10^{-8} – 10^{-3} М; (б) у середовищі з метіоніном у діапазоні концентрацій 10^{-10} до 10^{-4} М; (в, г) у середовищі за фіксованої кількості метіоніну у концентрації 10^{-6} та 10^{-4} М. Вміст H_2O_2 варіювали в діапазоні 10^{-8} – 10^{-3} М

Установлено, що збільшення концентрації H_2O_2 в середовищі інкубування впливає на рівень оксигемоглобіну мембранозв’язаної фракції так (рис. 1а): у діапазоні концентрацій перекису 10^{-8} – 10^{-5} М оксигемоглобін зростає від 75 % (приблизно така його кількість і в контрольних пробах) до 80–85 %, але в діапазоні 10^{-5} – 10^{-3} М рівень охуHb знижується до рівня контролю. Вміст метгемоглобіну (metHb), порівняно з діапазоном мінімальних концентрацій H_2O_2 і контрольними пробам без перекису (частка 5,8 %), зростає до 8–9 %. Досить вираженим є приріст сульфгемоглобіну (SHb) до 5 % (порівняно з контролем, де рівень складає до 1 %). Також спостерігався приріст дезоксигемоглобіну – його рівень збільшувався в дослідженому діапазоні H_2O_2 від 1 до 3 %.

В експериментах, у яких досліджувався вплив виключно метіоніну, показаний значний приріст метгемоглобіну (із 14 % до 21 %) у складі мембранозв’язаної фракції в кореляції з ростом концентрації метіоніну. Рівень MetHb майже вдвічі перевищував показники експерименту, де був виключно перекис водню в середовищі інкубування. Також у складі мембранозв’язаного гемоглобіну фіксується геміхром у діапазоні концентрацій метіоніну 10^{-11} – 10^{-6} М. Рівень охуHb знизився приблизно на 10 %, порівняно з показниками проб, де метіонін був у мінімальних концентраціях або відсутній. Вміст дезоксигемоглобіну тримався в межах 5 % і за мінімальних, і за максимальних концентрацій метіоніну. Сульфгемоглобіну у складі мембранозв’язаної фракції не було виявлено.

На рис. 1в і 1г показаний розподіл лігандних форм мембранозв’язаного гемоглобіну еритроцитів, які інкубувалися з різною кількістю H_2O_2 і метіоніном фіксованої концентрації 10^{-6} М і 10^{-4} М відповідно. За даними літературних джерел оптимальна концентрація метіоніну у плазмі крові та еритроцитах знаходиться в межах 10^{-6} – 10^{-8} М/л [17]. За наявності метіоніну у середовищі інкубування у концентрації 10^{-6} М спостерігали суттєве збільшення вмісту метгемоглобіну (до 30 %) за підвищення концентрації H_2O_2 . Цей показник істотно більший, ніж у досліді окремо з перекисом (збільшення вмісту metHb до 9 %) чи метіоніном (збільшення вмісту metHb до 20 %) (рис. 1в). Отже, рівень охуHb знижувався від 80 до 60 % за умов зростання концентрації H_2O_2 . Підвищення концентрації метіоніну в середовищі інкубування еритроцитів до 10^{-4} М привело до збільшення рівня metHb до 45–50 % за умов високих концентрацій перекису. Отримані результати показують певні закономірності, пояснити які буде нашою подальшою задачею.

В усіх пробах, де метіонін присутній у поєднанні з перекисом (рис. 1в, 1г), вміст дезоксигемоглобіну у складі мембранозв’язаної фракції є більшим майже в 2 рази, ніж в еритроцитах, які інкубувалися виключно з перекисом або метіоніном. Вміст SHb у складі мембранозв’язаного гемоглобіну за цих умов інкубування (концентрація метіоніну 10^{-6} М) перебував у межах 3–5 % (рис. 1в, 1г), тобто його рівень майже не змінився, порівняно з показниками дослі-

дів, де еритроцити інкубувалися без метіоніну. Проте рівень сульфгемоглобіну у складі мембранозв'язаної фракції гемоглобіну за умов інкубування з метіоніном у концентрації 10^{-4} М майже вдвічі більший (рис. 1г).

Висновки. Проведені дослідження показують, що метіонін суттєво впливає на розподіл і кількісне співвідношення лігандних форм гемоглобіну мембранозв'язаної фракції в умовах перекисного навантаження. Збільшення концентрації метіоніну приводить до накопичення мет- і деоку-форм гемоглобіну у мембранозв'язаній фракції. Отримані результати свідчать про залученість гемоглобіну до метаболічних процесів за участю метіоніну, зокрема у взаємодію з сірководнем. Метіонін та його метаболічні похідні використовуються у зрілих еритроцитів під час окисного навантаження.

Abstract. We investigated influence of H_2O_2 and methionine on the state of membrane-bound hemoglobin of human erythrocytes. It is rotined that a methionine substantially influences on distributing and quantitative correlation of ligandnikh forms of haemoglobin of membrane-bound faction in the conditions of the perekisnogo loading. The increase of concentration of methionine results in the accumulation of met- and deoxy-forms of haemoglobin in membrane-bound faction. The obtained results indicate involvement of hemoglobin to the metabolic processes with participation of methionine, in particular in co-operating with the sulphuretted hydrogen (H_2S).

Keywords: oxidizing stress, methionine, erythrocytes, ligandni forms of hemoglobin; membrane-bound hemoglobin.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H_2O_2 levels in erythrocytes / R. M. Johnson, G. Jr. Goyette, Y. Ravindranath, Y. S. Ho. *Free Radical Biology & Medicine*. 2005. Vol. 39. P. 1407–1417.
2. The Influence of Oxidative Stress and Natural Antioxidants on Morphometric Parameters of Red Blood Cells, the Hemoglobin Oxygen Binding Capacity, and the Activity of Antioxidant Enzymes / V. V. Revin, N. V. Gromova, E. S. Revina, A. Y. Samonova, A. Y. Tychkov, S. S. Bochkareva, A. A. Moskovkin, T. P. Kuzmenko. *BioMed Research International*. 2019.
3. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. Система глутатиона I. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы. *Биомедицинская химия*. 2009. Т. 55. Вып. 3. С. 255–277.
4. Космачевская О. В., Топунов А. Ф. Гемоглобины – разнообразие структур и функций (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*. 2009. Т. 45. № 6. С. 627–653.
5. Increase of atp level in human erythrocytes induced by s-adenosyl-l-methionine / M. Nobuji, K. Kazunori, S. Misuzu, S. Takeshi. Department of Physiology, School of Medicine, Ehime University, Shigenobu, Omen-gun, Ehime, Japan. 1986. P. 791–802.
6. 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. Iss. 2. P. 422–427.
7. Metabolism of Sadenosyl-L-methionine in intact human erythrocytes / J. R. Barber, B. H. Morimoto, L. S. Brunauer, S. Clarke. *Biochimica et Biophysica Acta*. Department of Chemistry and Biochemistry and the Molecular Biology Institute, University of California, Los Angeles, CA 90024 (U.S.A.). 1986. Vol. 887. P. 361–372.
8. Lou L. L., Clarke S. Carboxyl methylation of human erythrocyte band 3 in intact cells. Relation to anion transport activity. *Biochemical Journal*. Department of Chemistry and Biochemistry and the Molecular Biology Institute, University of California, Los Angeles, CA 90024, U.S.A. 1986. Vol. 235. Iss. 1. P. 183–187.
9. Chen H.-J. C., Ip S. W. Age-Associated Methylation in Human Hemoglobin and its Stability on the Dried Blood Spots as Analyzed by Nanoflow Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*. 2018. Vol. 31. Iss. 11. P. 1240–1247.
10. Filip C., Zamosteanu N., Albu E. Homocysteine in Red Blood Cells Metabolism – Pharmacological Approaches. *Blood Cell – An Overview of Studies in Hematology* / edited by Terry E. Moschandreu, IntechOpen. 2012. DOI: 10.5772/47795. URL: <https://www.intechopen.com/books/blood-cell-an-overview-of-studies-in-hematology/homocysteine-in-red-blood-cells-metabolism-pharmacological-approaches>
11. Диагностика гемоглобинопатий с помощью компьютерных медицинских систем / Э. И. Насыбуллина, В. Г. Никитаев, А. Н. Проничев, В. Н. Блиндарь, О. В. Космачевская, А. Ф. Топунов. Москва: Институт новых информационных технологий. 2015. 408 с.
12. Attia A. M. M., Aboulthana W. M., Aziz S. W. A simple accurate multi-component spectrophotometric method for simultaneous determination of total hemoglobin and four clinically significant hemoglobin derivatives in human and rat blood. *Romanian Journal of Biophysics*. Bucharest. 2019. Vol. 29. Iss. 4. P. 123–140.
13. Dissection of the radical reactions linked to fetal hemoglobin reveals enhanced pseudoperoxidase activity / K. Ratanasopa, M. B. Strader, A. I. Alayash, L. Bulow. *Frontiers in physiology*. 2015. DOI: 10.3389/fphys.2015.00039
14. Peroxiredoxin 2, glutathione peroxidase, and catalase in the cytosol and membrane of erythrocytes under H_2O_2 -induced oxidative stress / S. Rocha, D. Gomes, M. Lima, E. Bronze-da-Rocha, A. Santos-Silva. *Free Radical Research*. 2015. Vol. 49. Iss. 8. P. 990–1003.
15. Determination of Human Hemoglobin Derivatives / A. M. M. Attia, F. A. A. Ibrahim, N. A. Abd El-Latif, S. W. Aziz, S. A. Abdelmottaleb, Moussa, Mohsen Elalfy S. *Hemoglobin*. 2015. Vol. 39. Iss. 5. P. 371–374.