

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА

МИКУЦЬКА ІРИНА ВОЛОДИМИРІВНА

Допускається до захисту  
завідувач кафедри біофізики і  
фізіології, к.х.н., доцент  
\_\_\_\_\_ Доценко О. І.  
« » \_\_\_\_\_ 2022 р.

**АКТИВНІСТЬ ЕРИТРОЦИТАРНИХ ФЕРМЕНТІВ КАТАБОЛІЗМУ  
СІРКОВМІСНИХ АМІНОКИСЛОТ В УМОВАХ ОКИСНОГО І  
МЕТАБОЛІЧНОГО СТРЕСУ**

Спеціальність 091 Біологія

Магістерська робота

Науковий керівник:  
Доценко О.І. завідувач кафедри  
Біофізики і фізіології,  
к.х.н., доцент

Оцінка: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
(бал/за шкалою ЄКТС/за національною шкалою)  
Голова Е.К.: \_\_\_\_\_  
(підпис)

## АНОТАЦІЯ

**Микуцька І.В.** Активність еритроцитарних ферментів катаболізму сірковмісних амінокислот в умовах окисного і метаболічного стресу. 091 «Біологія». Освітня програма «Біологія». Донецький національний університет імені Василя Стуса. Вінниця. 2022.

У кваліфікаційній роботі досліджено вплив метіоніну, перекису водню ( $H_2O_2$ ), метіоніну і перекису водню за сумісної присутності на активність каталази, глутатіонпероксидази, вміст позаклітинного та внутрішньоклітинного  $H_2O_2$  та активність  $Na^+-K^+$ -,  $Mg^{2+}$ - АТФ-аз та МАТ в еритроцитах.

Показано, що присутність метіоніну в середовищі інкубування впливає на метаболічні процеси еритроцитів. Встановлено, що наявність метіоніну в середовищі інкубування сприяє зростанню активності досліджуваних ферментів. Також збільшується вміст  $H_2O_2$  у позаклітинному та внутрішньоклітинному середовищах порівняно з відсутністю метіоніну. За високих концентрацій  $H_2O_2$  в середовищі інкубування ( $10^{-6} - 10^{-3}$  М) відбувається перехід мембранозв'язаної каталази у цитозоль. Встановлено, що при збільшенні концентрації метіоніну активність мембранозв'язаної каталази знижується, а цитоплазматичної – зростає.

Введення метіоніну в концентраціях  $10^{-6} - 10^{-4}$  М призводить до зростання активності  $Na^+-K^+$ -,  $Mg^{2+}$ - АТФ-аз та МАТ навіть в 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 вони залишаються низькими. Показано, що метіонін є додатковим енергетичним метаболітом, який підтримує клітини при нестачі природнього для еритроцитів метаболіту – глюкози.

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

**Mykutska I.** Activity of erythrocytes enzymes of catabolism of sulfur-containing amino acids under conditions of oxidative and metabolic stress. 091 "Biology". Educational program "Biology". Vasyl' Stus Donetsk National University. Vinnytsia. 2022.

In the qualifying work, the influence of methionine, hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), methionine and hydrogen peroxide in their combined presence on the activity of catalase, glutathione peroxidase, the content of extracellular and intracellular  $H_2O_2$ , and the activity of  $Na^+-K^+$ -,  $Mg^{2+}$ - ATPase and MAT in erythrocytes was investigated.

It was shown that the presence of methionine in the incubation medium affects the metabolic processes of erythrocytes. It was established that the presence of methionine in the incubation medium contributes to the growth of the activity of the studied enzymes. The content of  $H_2O_2$  in the extracellular and intracellular environments also increases compared to the absence of methionine. At high concentrations of  $H_2O_2$  in the incubation medium ( $10^{-6} - 10^{-3}$  M), membrane-bound catalase moves into the cytosol. It was found that with an increase in the concentration of methionine, the activity of membrane-bound catalase decreases, and that of cytoplasmic catalase increases.

Administration of methionine in concentrations of  $10^{-6} - 10^{-4}$  M leads to an increase in the activity of  $Na^+-K^+$ -,  $Mg^{2+}$ - ATP-ase and MAT 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  $Na^+-K^+$ -ATPase, but at high concentrations of  $H_2O_2$  ( $10^{-6}$ - $10^{-3}$  M) it promotes the growth of the activity of  $Mg^{2+}$ -ATPase and MAT, although they remain low. It has been shown that methionine is an additional energy metabolite that supports cells in the absence of a natural metabolite for erythrocytes - glucose.

Key words: human erythrocytes, oxidative stress, catalase, glutathione peroxidase,  $Na^+-K^+$ - ATPase,  $Mg^{2+}$ - ATPase, MAT, methionine.

**ЗМІСТ**

ПЕРЕЛІК ОСНОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	9
1.1 Антиоксидантні ферменти еритроцитів.....	9
1.2 Роль метіоніну у метаболічній мережі еритроцита.....	14
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	17
2.1 Перелік реактивів, що використовувались у роботі.....	17
2.2 Склад розчинів, що використовувались у роботі.....	18
2.3 Методика виконання досліду .....	20
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТУ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	29
3.1 Дослідження зміни активності каталази, глутатіонпероксидази та вмісту H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	29
3.2 Дослідження зміни активностей Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -АТФ-ази та Mg <sup>2+</sup> -АТФ-ази еритроцита.....	37
3.3 Дослідження зміни активності МАТ еритроцита.....	39
ВИСНОВКИ.....	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	42

**ПЕРЕЛІК ОСНОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

RBC	Еритроцити
Hb	Гемоглобін
OC	Окисний стрес
АФК	Активні форми кисню
SOD1	Супероксиддисмутаза
Cat	Каталаза
GPx1	Глутатіонпероксидаза
GSH	Глутатіон
Prx 2	Пероксиредоксин 2
Met	Метіонін
SAM	S-аденозилметіонін
MAT	Метіонін-аденозилтрансфераза
SAH	S-аденозилгомоцистеїн
Hcy	Гомоцистеїн
CBS	Цистатіонін- $\beta$ -синтаза
CGL	Цистатіонін- $\gamma$ -ліаза
Cys	Цистеїн

## ВСТУП

Завдяки своїй функції переносу кисню та високому вмісту заліза, еритроцити (RBC) постійно зазнають окисного стресу. Крім того, 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].

Первинною мішенню для дії перекису водню є ліпідний матрикс мембрани [1, 2]. Одним із чутливих показників впливу на мембрану еритроцита є зміна активності мембранозв'язаних ферментів, таких як  $Mg^{2+}$ -АТФаза та  $Na^+, K^+$ -АТФаза, 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 [2].

Для боротьби з окисним стресом червоні кров'яні клітини мають високоефективну антиоксидантну систему. Вона представлена неферментативними агентами, такі як глутатіон, аскорбат, та інші, і ферментативними – супероксиддисмутаза (SOD1), каталаза (Cat), глутатіонпероксидаза (GPx1) та пероксиредоксин 2 (Prx 2), які працюють разом для детоксикації клітини від активних форм кисню, що утворюються всередині або поза клітиною [1, 3, 4].

Метіонін та фолати, вміст яких у плазмі крові високий, могли б залучатися у метаболічні шляхи і бути додатковим джерелом як енергії так і глутатіону. Проте, є тільки окремі відомості про залученість метіоніну до метаболічної мережі еритроцитів [5]. Відомо, що метіонін є джерелом S-аденозилметіоніну (SAM), який у еритроцитах використовується для метилювання карбоксильного білка, метилювання катехоламінів і гістаміну, а також метилювання фосфоліпідів. SAM утворюється з метіоніну та АТФ у реакції, що каталізується метіонін-аденозилтрансферазою (MAT) еритроцитів [6]. 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.

**Мета роботи** полягала в проведенні експериментальних досліджень, на основі яких можна було б оцінити вплив метіоніну, перекису водню ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), метіоніну і перекису водню за сумісної присутності на активність антиоксидантних ферментів (каталази, глутатіонпероксидази), вміст позаклітинного та внутрішньоклітинного  $\text{H}_2\text{O}_2$  та активність  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-аз та МАТ в еритроцитах.

**Завдання дослідження.** Дослідити:

1. зміни активностей каталази,  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ - АТФ-аз та МАТ, вміст позаклітинного та внутрішньоклітинного  $\text{H}_2\text{O}_2$  в еритроцитах за умов присутності метіоніну (від  $10^{-10}$  до  $10^{-4}$  М) у середовищі інкубування.
2. зміни активності каталази, глутатіонпероксидази,  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ - АТФ-аз та МАТ, вміст позаклітинного та внутрішньоклітинного  $\text{H}_2\text{O}_2$  в еритроцитах за умов наявності перекису водню у діапазоні концентрацій  $10^{-8}$  –  $10^{-3}$  М в середовищі інкубування.
3. зміни активностей каталази,  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ - АТФ-аз та МАТ, вміст позаклітинного та внутрішньоклітинного  $\text{H}_2\text{O}_2$  в еритроцитах за умов сумісної присутності перекису водню (у діапазоні концентрацій  $10^{-8}$  –  $10^{-3}$  М) та присутності метіоніну у середовищі інкубування.

Дослідження проводили спектрофотометричними методами.

**Об'єкт дослідження:** еритроцити практично здорових донорів приблизно однієї вікової групи та однієї статі.

**Предметом дослідження** є активності каталази, глутатіонпероксидази,  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ - АТФ-аз та МАТ, вміст позаклітинного та внутрішньоклітинного  $\text{H}_2\text{O}_2$  в еритроцитах.

**Практичне значення.** Дослідження залученості метіоніну до метаболічної мережі еритроцитів при окисному навантаженні важливо не тільки з теоретичної, але і з практичної точки зору, зокрема для подовження терміну життя клітин при їх зберіганні.

**Апробація результатів дослідження:**

Микуцька І. В., Доценко О. І. Активності АТФ-аз та МАТ еритроцитів за умов одночасного впливу перекису водню і метіоніну. Вісник студент. наук. товариства ДонНУ ім. В. Стуса м. Вінниця. – 2022. – Т 2 № 14. – С. 280-284.

Микуцька І. В. Дослідження активності АТФ-аз та МАТ еритроцитів в умовах їх інкубування з метіоніном і  $H_2O_2$ . Матеріали VII Міжнародної наукової конференції здобувачів вищої освіти, аспірантів та молодих вчених «Актуальні питання розвитку біології та екології». м. Вінниця. 2022 р.

**Структура роботи.** Кваліфікаційна робота складається з анотації, змісту, переліку основних скорочень, вступу, трьох розділів, висновків та списку використаних джерел. Загальний обсяг роботи – 48 сторінок, обсяг основної роботи – 41 сторінка.



## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1 Антиоксидантні ферменти еритроцитів

Еритроцит ссавців функціонує як транспортер кисню і, отже, постійно зазнає окисного стресу (ОС) [1, 7]. Очевидно, що окисно-відновний стан клітини та активність захисних механізмів є ключовим фактором, що визначає життєздатність клітин [8].

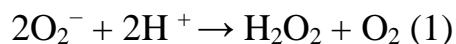
Еритроцит є особливою клітиною, в якій відсутні ядро та інші органели. Ця особливість робить їх вразливішими до дії АФК, ніж інші клітини людського тіла [1]. Основне навантаження при ОС зазнає гемоглобін (Hb) та мембрана еритроцитів [1].

АФК – це хімічно реактивні види, що містять кисень з одним або кількома неспареними електронами, що утворюються в результаті відновлення молекули  $O_2$  [1]. До них належать:  $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot-}$ .

Для протидії окисному навантаженню червоні кров'яні клітини мають високоефективну антиоксидантну систему, яка здатна захищати не тільки себе, а й інші клітини та тканини при циркуляції по судинній мережі. Захисні антиоксидантні механізми еритроцитів включають неферментативні антиоксиданти, такі як глутатіон (GSH), вітамін Е ( $\alpha$ -токоферол) та вітамін С (аскорбінова кислота) та ферментативні антиоксиданти, такі як супероксиддисмутаза (SOD1), каталаза (Cat), глутатіонпероксидаза (GPx1) та пероксиредоксин 2 (Prx 2). Вони працюють разом і модифікують АФК, що утворюються всередині або поза клітиною, у значно менш реакційноздатні проміжні продукти [1, 3, 4].

Першу лінію захисту від вільних радикалів забезпечує супероксиддисмутаза (SOD1) [1]. SOD1 – металофермент, з молекулярною масою 32 кДа, має дві субодиниці, кожна з яких пов'язує 1 атом Cu і 1 атом Zn. Фермент каталізує диспропорціонування супероксидного аніона наступним

чином (1):

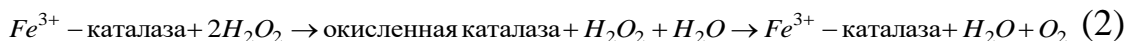


Хоча перекис водню є менш реакційноздатним, ніж супероксид, він все ще здатен окислювати, розгортати та інактивувати SOD1, принаймні *in vitro*. Втрата функції SOD1 призводить до збільшення супероксидних аніонів, що спричиняє негативні ефекти, включаючи загибель клітин в умовах кисневого стресу [9]. Відомо, що еритроцити з дефіцитом цього ферменту мають скорочений термін експлуатації, що зв'язано з підвищеним рівнем активних форм кисню, продуктів перекисного окислення ліпідів, підвищеною схильністю гемоглобіну до окислення і утворення тіл Хайнца [10].

Перекис водню не є вільним радикалом і є стабільнішим, ніж  $\text{O}_2^- \cdot$ , але він може легко перетинати клітинні мембрани та спричиняти пошкодження інших клітин та тканин [3]. Накопичення  $\text{H}_2\text{O}_2$  призводить до утворення інших більш потужних АФК, наприклад, він може відновлюватися до гідроксильного радикала ( $\text{OH}^\cdot$ ), найбільш шкідливого вільного радикала для біологічних систем, що має високу реакційну здатність.  $\text{H}_2\text{O}_2$  може розкладатися на воду та  $\text{O}_2$  за допомогою трьох різних пероксидаз еритроцитів: каталаза (Cat), глутатіонпероксидаза (GPx1) та пероксиредоксин (Prx 2) [1]. Вони запобігають накопиченню  $\text{H}_2\text{O}_2$  в еритроцитах.

**Каталаза** – хромопротеїд, який має молекулярну масу близько 240 кДа, та складається з 4 субодиниць, кожна з яких має по одній групі гема. Каталаза – це внутрішньоклітинний фермент, що локалізується в основному в пероксисомах, частково – в мікросомах і цитоплазмі. Еритроцити мають максимальну концентрацію каталази [1, 11]. Вважають, що каталаза не має високої спорідненості до перекису водню, тому при низьких концентраціях (наприклад в цитоплазмі) не може ефективно знешкоджувати її. Оскільки концентрація перекису водню у пероксисомах висока, каталаза активно її руйнує. Загальна реакція, що каталізується Cat, включає деградацію двох молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$  з утворенням двох молекул води і однієї  $\text{O}_2$ .

Каталаза розкладає перекис водню у два етапи:



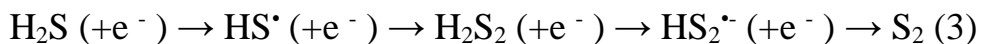
Каталаза також проявляє пероксидазну активність для елімінації  $H_2O_2$ . У цьому випадку фермент використовує перекисне окислення для елімінації молекул  $H_2O_2$  шляхом окислення таких речовин, як спирти. Порівняно з іншими пероксидазами, пероксидна активність Cat, як правило, незначна, слабка і обмежена меншими субстратами [12]. Крім того, Cat є надзвичайно специфічною до свого субстрату,  $H_2O_2$ , і не здатна елімінувати органічні пероксиди, на відміну від інших пероксидаз [1]. Каталаза є дуже важливим ферментом, оскільки здатна захищати клітини та тканини від токсичного впливу  $H_2O_2$ .

Існує думка про те, що відновлення пероксиду водню може служити додатковим джерелом молекулярного кисню [13]. Каталаза, виконуючи антиоксидантну функцію, компенсаторно підвищує коефіцієнт корисного використання екзогенного кисню в енергетичних цілях внаслідок часткового повернення в метаболічні ланцюги окисного фосфорилування того молекулярного кисню, який відновлюється в організмі по одноелектронному шляху. Розкладання  $H_2O_2$  до  $O_2$  і води в каталазній або пероксидазній реакції відбувається з викидом вільної енергії електронів, кінцевим акцептором яких є молекулярний  $O_2$ , який використовується в легенях для оксигенації гемоглобіну або дифундує в плазмі для компенсації гіпоксії в тканинах [13].

Таким чином, каталаза є одним із найперших відомих і найкраще охарактеризованих антиоксидантних ферментів, що каталізує дисмутацію пероксиду до води та кисню. Однак каталази розвинулися, коли метаболізм був здебільшого заснований на сірці, задовго до того, як  $O_2$  і активні форми кисню (АФК) стали надлишковими, що свідчить про те, що каталаза метаболізує активні сульфідні форми (RSS) [14].

Реакційноздатні сульфідні форми (RSS) хімічно, біохімічно та фізіологічно подібні до АФК і можуть бути отримані шляхом послідовного одноелектронного окислення сірководню ( $H_2S$ ) з утворенням тілового радикала ( $HS^\bullet$ ), персульфіду

водню ( $\text{H}_2\text{S}_2$ ) і персульфідного радикала ( $\text{HS}_2^{\cdot-}$ ) і закінчується з утворенням елементарної сірки ( $\text{S}_2$ ); остання зазвичай циклізується до  $\text{S}_8$  [14].



Результати отримані в роботі [14] показують, що каталаза справді здатна видаляти персульфіди з розчину, а також видаляти  $\text{H}_2\text{S}$  з розчину, що є несподівано, оскільки сірка в  $\text{H}_2\text{S}$  знаходиться в найбільш відновленому стані (-2), дисмутація  $\text{H}_2\text{S}$  неможлива, і найбільш логічним сценарієм є те, що  $\text{H}_2\text{S}$  окислюється. Також показано, що за певних умов каталаза здатна генерувати  $\text{H}_2\text{S}$  від інших молекул, що містять сірку. Таким чином, каталаза є «первинною» оксидоредуктазою сірки.

Отже, каталаза може діяти або як сульфідоксидаза, або як сіркоредуктаза, і, ймовірно, ці дії відігравали помітну роль у метаболізмі сірки під час еволюції та можуть продовжувати діяти так само в сучасних клітинах [14].

**Глутатіонпероксидаза (GPx)** – це внутрішньоклітинний антиоксидантний фермент, який сприяє запобіганню накопиченню у клітинах  $\text{H}_2\text{O}_2$  [1]. У клітинах ссавців ідентифіковано вісім GPx (GPx1 – GPx8), які відрізняються своїм каталітичним центром. GPx1 – це один із найпоширеніших типів GPx та є єдиним типом, який присутній в еритроцитах [1, 15, 16]. Вона є Se-вмісним ферментом, з молекулярною масою 84 – 88 кДа, складається з 4 ідентичних субодиниць, кожна з яких включає 1 атом Se [11]. Каталітична тетрада, утворена селеноцистеїном (Sec), глутаміном, триптофаном та аспарагіном, є важливою для активності GPx, оскільки ці залишки мають вирішальне значення для взаємодії фермент-субстрат та стабілізації взаємодії GSH-GPx [16].

Глутатіонпероксидаза каталізує реакцію відновлення  $\text{H}_2\text{O}_2$ , гідропероксидів ліпідів та інших низькомолекулярних гідропероксидів у воду або у відповідні спирти, за допомогою глутатіону, використовуючи його як відновник [1, 11]. Загальна каталітична реакція GPx1 задана рівнянням (4):

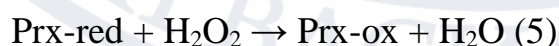


Глутатіонпероксидаза володіє вищою спорідненістю до перекису водню, ніж каталаза, тому при низьких концентраціях субстрату більш ефективно працює GPx1, а при високих концентраціях – ключова роль в захисті клітин від окисного стресу належить каталазі [11].

**Пероксиредоксини** – сімейство гомодимерних пероксидаз, що мають антиоксидантну роль у живих організмах [1]. Клітини ссавців експресують шість різних ферментів Prx, причому Prx 2 особливо багато в еритроцитах [15]. Prx1 і Prx6 також можна знайти в еритроцитах, хоча у значно менших кількостях [1]. Prx2 – третій за кількістю білок (15 мільйонів копій / клітину) у цитозолі еритроцитів [17].

Довгий час вважалося, що Cat і GPx1 відіграють головну роль в еритроцитах для детоксикації  $\text{H}_2\text{O}_2$  [1]. Про це повідомляється у великих дослідженнях [18, 19]. Однак є кілька досліджень [17, 20], які продемонстрували значну роль Prx2 в ефективній детоксикації  $\text{H}_2\text{O}_2$  в антиоксидантній системі еритроцитів.

У дослідженні з використанням нокаутів за геном Prx2 мишей, було показано, що у цих тварин розвинулася легка хронічна гемолітична анемія, що характеризувалася збільшенням кількості ретикулоцитів, нижчим рівнем Hb і гематокриту, формуванням тіл Хайнца, збільшенням вільних сульфгідрильних груп та збільшенням щільності клітини. Також їх еритроцити демонстрували значно менший термін життя порівняно з мишами дикої типу [17, 21], в той час, як нокаутівані миші за Cat і GPx1 демонстрували нормальний гематологічний профіль та нормальний розвиток. Дослідження [20] повідомило, що Prx2 реагує з  $\text{H}_2\text{O}_2$  із постійною швидкістю ( $1,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), яка близька до швидкості GPx. Загальна реакція пероксиредоксину визначається рівнянням (5):



Prx2 детоксикують  $\text{H}_2\text{O}_2$ , пероксинітрит та різні органічні гідропероксиди, підтримуючи тим самим внутрішньоклітинний окислювально-відновний баланс та захищаючи організми [21]. Prx2 відповідає за видалення низьких концентрацій ендогенно генерованого  $\text{H}_2\text{O}_2$ , оскільки тіоредоксин-тіоредоксинредуктазна

система має обмежену здатність до регенерації Prx2 у активну форму. Також було встановлено, що відповідно до рівнів  $H_2O_2$  Prx2 може виконувати подвійну функцію: антиоксидантного ферменту або шаперону гемоглобіну, внаслідок змін у його структурі. У еритроцитах, Prx2 може зв'язуватися з Hb в умовах ОС для стабілізації його структури та запобігання агрегації Hb [1].

Для живих клітин надзвичайно важливою є збалансованість активності SOD1, каталази і пероксидази. Її порушення може призвести до надмірного накопичення активних форм кисню і деструкції клітин [22].

## **1.2 Роль метіоніну у метаболічній мережі еритроцита**

Метіонін – незамінна амінокислота, яка відіграє винятково важливу роль у внутрішньоклітинному метаболізмі. Метіонін необхідний для ініціації трансляції та синтезу білкових молекул, а також є єдиним субстратом для синтезу S-аденозилметіоніну (SAM) [23].

SAM є основним метаболітом метіоніну, широко розподіленим у тканинах і спинномозковій рідині [6]. Він є донором метилу в більшості реакцій трансметилування, беручи участь у синтезі білків, моноамінів, фосфоліпідів, нейромедіаторів і нуклеїнових кислот [6, 23]. Крім того, декарбоксілований SAM бере участь у синтезі похідних путресцину поліамінів, спермідину та сперміну. Ці аміни вважаються маркерами диференціації та регенерації клітин [6].

Хоча S-аденозилметіонін і бере участь у різноманітних реакціях трансметилування в більшості клітин та є попередником для синтезу поліаміну, його роль у еритроцитах є набагато більш обмеженою. Частково це відображає простоту еритроцита [24]. У еритроцитах SAM використовується для метилування карбоксільного білка, метилування катехоламінів і гістаміну, а також метилування фосфоліпідів.

SAM утворюється з метіоніну та АТФ у реакції, що каталізується метіонін-аденозилтрансферазою (АТФ: Lметіонін-S-аденозилтрансфераза; EC 2.5.1.6, MAT). MAT присутній у всіх клітинах і демонструє високий

ступінь збереження між видами [25]. 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 [6]. Оскільки S-аденозилметіонін є важливим учасником процесів метилювання, а також процесів перенесенні сірки від метіоніну до цистеїну, підтримання активності МАТ є важливим для еритроцитів. Проте, про регуляторні властивості цього ферменту саме в еритроцитах відомо мало.

Втрачаючи метильну групу, SAM перетворюється на S-аденозилгомоцистеїн (SAH) і далі, шляхом ферментативного гідролізу, на гомоцистеїн (Hcy) і аденозин [23]. Відомо, що підвищені концентрації цієї цитотоксичної амінокислоти в плазмі є незалежним фактором ризику судинних захворювань [26]. Щоб уникнути перевантаження гомоцистеїном і його патофізіологічних наслідків, гомоцистеїн повинен швидко метаболізуватися [26]. Утилізація надлишку гомоцистеїну відбувається трьома шляхами: реметилювання, транссульфування та десульфування.

Реметилювання Hcy в реакції метіонін-синтази (MS) забезпечує повернення 5-метилтетрагідрофолату (МТНФ) в пул активних фолатів та утворення метіоніну *de novo*. Таким чином, у разі реметилювання Hcy метаболізм метіоніну перетворюється на цикл [23]. Другий шлях призводить до утворення цистеїну через цистатіонін. Перетворення здійснюється у двох послідовних незворотних реакціях, що каталізуються цистатіонін- $\beta$ -синтазою (CBS) і цистатіоназою. Цистеїн служить субстратом для синтезу глутатіону, основного внутрішньоклітинного антиоксиданту [23, 26]. Відомості про наявність CBS в еритроцитах відсутні, проте ці клітини також виробляють GSH у великій кількості. Тому ми припускаємо, що CBS присутня в еритроцитах і є певним посередником між циклами глутатіону і метіоніну. Таким чином, метаболізм метіоніну тісно пов'язаний з окисно-відновним метаболізмом [23].

Десульфуразний шлях обміну гомоцистеїну є досить важливим, оскільки з ним асоціюється продукція сигнальної газової молекули гідроген сульфїду ( $H_2S$ ) [27]. Відомо, що  $H_2S$  відіграє велику роль у регуляції судинного тонуусу та агрегації тромбоцитів, скоротливості міокарда, нейротрансмісії, секреції інсуліну, попереджує розвиток апоптозу клітин [27, 29]. Метаболізм  $H_2S$  тісно пов'язаний з тіолдисульфідним обміном та синтезом глутатіону. Синтез  $H_2S$  із цистеїну каталізується кількома ензимами: цистеїнамінотрансферазою (CAT), цистатіонін- $\gamma$ -ліазою (CGL) і цистатіонін- $\beta$ -синтазою (CBS) [27]. Отже, фізіологічні концентрації  $H_2S$  володіють цитопротекторними властивостями, тоді як надмірне продукування даного метаболіту виявляє цитотоксичну дію на клітини, що супроводжується активацією вільнорадикальних процесів, зниженням пулу відновленого глутатіону, а також індукцією шляхів мітоптозу [28].

Незалежне функціонування метаболічних систем, пов'язаних з метаболізмом метіоніну, потребує ефективної та жорсткої регуляції. Не дивно, що порушення метаболізму метіоніну пов'язані з цілою низкою серйозних патологій, таких як дефекти розвитку нервової трубки, онкологічні захворювання, серцево-судинні захворювання та нейродегенеративні захворювання [23].



## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1 Перелік реактивів, що використовувались у роботі

1. суспензія еритроцитів;
2. NaCl (М 58,14), чда;
3. калій фосфорнокислий 1-заміщений  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (М 136,09), ч, «Китай»;
4. натрій фосфорнокислий двозаміщений  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (М 358,14), фарм.;
5. натрій фосфорнокислий однозаміщений  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (М 119,98), чда, «Німеччина»;
6. сапонін, ч, «Appli Chem GmbH, Германия»;
7. аскорбінова кислота  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$  (М 176,13), фарм. Китай;
8. набір реактивів для визначення концентрації гемоглобіну в крові.
9. дистильована вода;
10. сорбіт,  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$  (М 182,18), харч. гранульований, Китай.
11. трихлороцтова кислота  $\text{Cl}_3\text{CCOOH}$  (М 163,39), CLARIANT, Німеччина;
12. ксиленоловий помаранчевий,  $\text{C}_{31}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{Na}_4\text{O}_{13}\text{S}$  (М 760,6), чда, Індія;
13. сіль Мора  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (М 392,12), чда, Україна;
14. 5,5'-дітіо-біс (2-нітро-бензойна кислота) (М 396,36), «LOBA, Австрія»;
15. L-глутатіон відновлений,  $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ , (М 307,303), «Німеччина»;
16. перекис водню 35%,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , (М 307,303), мед, Польща.;
17. трис- (оксиметил) -амінометан,  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ , (М 121,14), фарм, «Швейцарія»;
18. соляна кислота (0,1 н), стандарт-титри, «РІАП, Київ»;
19. етанол, 96%, мед.
20. Трилон Б (етилендіамінтетраоцтової кислоти динатрієва сіль 2 водний,  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , «Німеччина»);
21. калій хлорид, KCl, (М 74,5513);
22. магній хлорид гексагідрат,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , (М 203,3);
23. Аденозин 5'-трифосфат динатрієва сіль (М 507,18);
24. Метіонін,  $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$ , (149,21);

25. Строфантин-Г (розчин для ін'єкцій, 0,25 мг/мл).

## 2.2 Склад розчинів, що використовувались у роботі

### I. Буферні розчини:

1. Na-фосфатний буфер (0,015 моль, рН 7,4), що містить 0,15 моль NaCl;
2. 0,01 М Na-K-фосфатний буфер (рН 7,4) для приготування на його основі розчину сапоніну 0,02%.
3. Трис-HCl буфер, рН 7,4, 0,05 М: 250 мл 0,2 М трис-(оксиметил)-амінометан, 400 мл 0,1 М HCl розчиняли до 1 л дистильованої води;
4. Трис-HCl буфер, рН 7,4, 0,05 М, що містить 0,15 моль NaCl
5. 0,3 М Na-фосфатний буфер (рН 9,0), для приготування 53,7 г ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) розчиняли в 500 мл води.
6. Трис-HCl буфер, рН 8,5, 0,05 М: 50мл 0,2 М трис-(оксиметил)-амінометан, 30 мл 0,1 М HCl та 0,3722 г ЕДТА розчиняли в колбі об'ємом 200 мл і доводили до мітки дистильованою водою;
7. 0,001 М Na-фосфатний лізуючий буфер (рН 7,4)

### II. Робочі розчини:

1. *Розчини для визначення каталазної активності:*
  - 1.1 FOX-реактив: в 1 л 25 ммольної  $\text{H}_2\text{SO}_4$  розчиняли 100 мкмоль ксиленолового оранжевого, 250 мкмоль солі Мора і 100 ммоль сорбіту;
  - 1.2 Розчин сапоніну 0,02%. Наважку сапоніну 0,005 г розчиняли у 25 мл 0,01 М Na-K-фосфатному буфері (рН 7,4);
  - 1.3 0,9% розчин NaCl;
  - 1.4 Розчин трихлороцтової кислоти, 45%;
  - 1.5 Розчин  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0,01954 М. Концентрацію  $\text{H}_2\text{O}_2$  встановлювали шляхом титрування розчином перманганату калію ( $\text{KMnO}_4$ ) точної концентрації в кислому середовищі.
  - 1.6 Робочий розчин  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $2,3 \cdot 10^{-4}$  М (6 мл розчину  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0,01954 М розчиняли в колбі об'ємом 250 мл і доводили до мітки дистильованою водою).

2. Розчини для визначення активності глутатіонпероксидази:

- 2.1 Розчин глутатіону відновленого (GSH), 8,13 мкМ;
- 2.2 Розчин GSH і таурину: розчинення 0,00875 г GSH і 0,017 г таурину в 25 мл 0,05 М трис-НСl буфера, рН 8,5;
- 2.3 Розчин 5,5'-дітіо-біс-(2-нітро-бензойної) кислоти (ДТНБ) 4 г/л приготований на 96% етанолі
- 2.4 Розчин  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,01878 М. Концентрацію  $\text{H}_2\text{O}_2$  встановлювали шляхом титрування розчином перманганату калію ( $\text{KMnO}_4$ ) точної концентрації в кислому середовищі.
- 2.5 45% розчин ТХУ;
- 2.6 Розчин 5,5'-дітіо-біс-(2-нітро-бензойної) кислоти (ДТНБ) 4 г/л приготований на 96% етанолі;

3. Розчини для визначення активності  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-аз та МАТ:

- 3.1 Середовище для визначення сумарної АТФ-азної активності: 125 мМ NaCl, 25 мМ KCl, 3 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 мМ ЕДТА, 3 мМ АТФ, 50 мМ трис-НСl, рН 7,4;
- 3.2 Середовище для визначення активності МАТ: 50 мМ KCl, 40 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 мМ ЕДТА, 3 мМ АТФ, 5 мМ метіоніну, 50 мМ трис-НСl, рН 7,4;
- 3.3 Розчин метіоніну,  $10^{-3}$  М. Наважку 0,00373 г метіоніну розчиняли у 25 мл фізіологічного розчину (0,9% розчин NaCl);
- 3.4 Розчин  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 2,5 н;
- 3.5 Розчин  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2,5%;
- 3.6 Розчин аскорбінової кислоти, 1%.
- 3.7 Стандартний розчин  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , концентраціями  $3,52 \cdot 10^{-4}$  М та  $3,52 \cdot 10^{-5}$  М. Використовувався для побудови калібрувального графіка.

### 2.3 Методика виконання досліджу

Протокол експериментальної частини дослідження відповідає принципам біологічної етики та погоджений з 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 каталази, глутатіонпероксидази, вміст позаклітинного та внутрішньоклітинного  $H_2O_2$ , активність  $Na^+K^+$ -,  $Mg^{2+}$ -АТФ-аз та МАТ в еритроцитах, після години інкубування.

Під час експериментів використовували периферичну кров практично здорових донорів однієї статі та приблизно одного віку. Еритроцити тричі відмивали центрифугуванням при 3000 об/хв з Na-фосфатним буфером (0,015 моль, рН 7,4), що містив 0,15 моль NaCl (буферний розчин 1). Із еритроцитарної пасти готували суспензію. Для дослідження впливу метіоніну суспензія еритроцитів вводилася у 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 перекис водню у діапазоні концентрацій  $10^{-8}$  –  $10^{-3}$  М. В експериментах по дослідженню сумісної дії метіоніну і перекису водню суспензія еритроцитів вводилася у буферний розчин з 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 в середовищі інкубування підтримували на рівні вмісту гемоглобіну 3,0-3,2 г/л. Клітини інкубували протягом години при 20°C. Після інкубування еритроцити осаджували центрифугуванням, надосадову рідину видаляли.

Для подальших досліджень використовували: (1) відмиті від окисного середовища еритроцити у буферному розчині складу 1, (2) гемолізат еритроцитів, відмитих від окисного середовища.

Для отримання гемолізату, що у подальшому використовували для

визначення каталазної активності, до 0,6 мл суспензії еритроцитів додавали 0,2 мл 0,02% розчину сапоніну в 0,01 М Na–K–фосфатному буфері (pH 7,4). Гемоліз проводили в умовах холоду протягом 10 хв.

Отримання гемолізату для визначення активності глутатіонпероксидази здійснювали шляхом додавання до осаджених еритроцитів 0,001 М Na-фосфатного лізуючого буферу (pH 7,4) до 0,5 мл загального об'єму розчину.

Гемолізат еритроцитів, що використовувався для визначення активностей  $Mg^{2+}$ -,  $Na^+$ - $K^+$ -АТФ-ази та МАТ, отримували шляхом додавання до осаду еритроцитів, відмитих від середовища інкубування буфером Трис (pH 7,4), що містив 0,15 моль NaCl (буферний розчин 4), холодної дистильованої води (2,5 мл). Гемоліз проводили протягом 30 хв.

В якості контролю використовували активності ферментів еритроцитів, що не піддавалися впливу досліджуваних речовин і інкубувалися продовж однієї години у буферному розчині 1. Активність мембраноз'язаного ферменту визначали з використанням цілих еритроцитів, активність цитоплазматичної фракції – по різниці між активністю гемолізатів і активністю, що реєстрували на поверхні клітин.

**Активність каталази** визначали за швидкістю утилізації перекису водню. Кількість  $H_2O_2$ , що не розклався, визначали за допомогою Fox–реактиву [30]. При внесенні  $H_2O_2$  в розчин Fox–реактиву, відбувається окислення  $Fe^{2+}$  до  $Fe^{3+}$ , комплекс якого з ксиленоловим помаранчевим має максимум поглинання при 560 нм. За активність ферменту приймали кількість мкМ субстрату ( $H_2O_2$ ), що перетворювався ферментом в одиницю часу (хв), розрахованого на мг гемоглобіну (Hb) у пробі.

Відмиті еритроцити ресуспендували в вихідному об'ємі буферного розчину 1. Відбирали 2 проби по 0,6 мл суспензії еритроцитів. Одну пробу розбавляли Na-фосфатним буфером (pH 7,4) (0,2 мл), іншу - лізували 0,2 мл 0,01 М Na-K-фосфатним буфером (pH 7,4) з сапоніном 0,02%.

Реакцію запускали додаванням до 2 мл робочого розчину  $H_2O_2$ , ( $2,3 \cdot 10^{-4} M$ ) 0,1 мл проби (гемолізату/суспензії еритроцитів). Через 1 хв 0,1 мл отриманого

розчину вносили до суміші розчинів: 1,5 мл FOX-реактиву та 1,5 мл фізіологічного розчину. Пробу інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хв і потім вимірювали оптичну щільність розчину при 560 нм в кюветах, товщиною 1,0 см.

**Вміст  $H_2O_2$**  у позаклітинному середовищі визначали за допомогою Fox-реактиву, після осадження клітин шляхом центрифугування. Для цього 0,1 мл супернатанта додавали до суміші розчинів: 1,5 мл FOX-реактиву та 1,5 мл фізіологічного розчину. Вміст  $H_2O_2$  у клітинах визначали після лізису осаджених клітин у 0,5 мл холодної води і наступного осадження білків ТХУ (0,1 мл) [31, 32].

Осад білків відокремлювали центрифугуванням. 0,1 мл супернатанту використовували для визначення внутрішньоклітинного вмісту перекису водню. Кількість  $H_2O_2$  визначали за допомогою FOX-реактиву. Пробу інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хв і потім вимірювали оптичну щільність розчину при 560 нм в кюветах, товщиною 1,0 см. Кількість перекису водню в пробі визначали за допомогою калібрувальної залежності, побудованої для розчинів перекису водню відомої концентрації. Вміст  $H_2O_2$  в пробі виражали в мкМ і відносили до вмісту гемоглобіну в пробі, тобто в мкМ/мг Hb).

Калібрувальну залежність будували за допомогою серії розчинів  $H_2O_2$ , приготованих згідно з таблицею 2.3.1. Для цього 0,1 мл розчину  $H_2O_2$  вносили в суміш розчинів (1,5 мл FOX-реактиву та 1,5 мл 0,9% NaCl). Пробу інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хв і потім вимірювали оптичну щільність розчинів. Калібрувальну залежність і рівняння лінійної апроксимації показано на рис. 2.3.1.

Таблиця 2.3.1. Склад розчинів  $H_2O_2$  і оптична щільність розчинів, після його внесення в FOX-реактив. Вихідна концентрація розчину  $H_2O_2$  0,108 мкМ / мл.

№ п/п	V розчину $H_2O_2$ , мл	V води, мл	Концентрація $H_2O_2$ , мкМ/мл	Оптична густина розчину
1.	0,1	2,9	3,6334	0,0125
2.	0,2	2,8	7,2667	0,0204
3.	0,3	2,7	10,9	0,033
4.	0,4	2,6	14,5334	0,0448
5.	0,5	2,5	18,1667	0,0565
6.	0,6	2,4	21,8	0,0685
7.	0,7	2,3	25,4334	0,0785
8.	0,8	2,2	29,0667	0,0935
9.	0,9	2,1	32,7	0,1105
10.	1	2	36,3334	0,1285
11.	1,2	1,8	43,6	0,1485
12.	1,4	1,6	50,8664	0,1615
13.	1,6	1,4	58,1334	0,2005
14.	1,8	1,2	65,4	0,203
15.	2	1	72,6667	0,244
16.	2,2	0,8	79,9334	0,2665
17.	2,4	0,6	87,2	0,2865

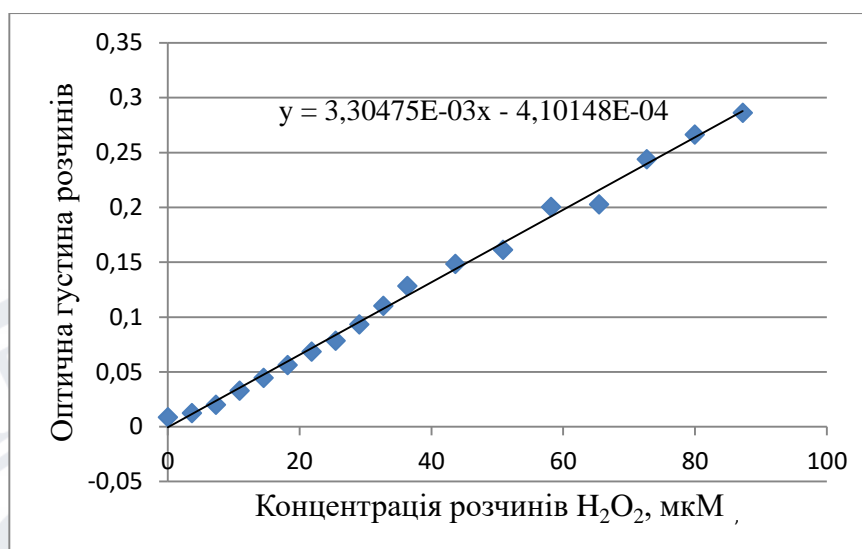


Рис. 2.3.1 Калібрувальна залежність концентрації розчинів H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> від оптичної густини розчинів.

Визначення загальної **активності глутатіонпероксидази (GPx)** здійснювали за швидкістю окислення відновленого глутатіону (GSH) в присутності перекису водню. Після зупинки реакції кількість GSH визначали спектрофотометрично (при довжині хвилі 412 нм) при використанні кольорової реакції з реактивом Елмана [33 - 36]. Активність ферменту виражали в мМ окисленого глутатіону за хвилину на 1 мг гемоглобіну.

Для визначення пероксидазної активності використовували розведений розчин гемолізату (до 0,05 мл гемолізату додавали 0,5 мл 0,001 М Na-фосфатного буферу, рН 7,4.)

0,1 мл отриманого гемолізату додавали до 0,4 мл 1,1389 мМ розчину GSH, що містив таурин. Реакцію запускали додаючи 0,1 мл H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,01878 М). Реакцію зупиняли через 1 хв додаванням 0,1 мл ТХУ. Пробу центрифугували, відбирали 0,1 мл надосадової рідини і вносили до 3 мл 0,3 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Після цього додавали 0,05 мл реактиву Елмана. Пробу витримували 1 годину, після чого вимірювали оптичну густина розчинів на спектрофотометрі при 412 нм. В якості розчину порівняння використовували 0,3 М розчин Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Паралельно готували холосту пробу, у якій до 0,4 мл розчину GSH (1,1389 мМ) додавали 0,2 мл буферного розчину і 0,1 мл ТХУ.



Вміст GSH в еритроцитах розраховували за допомогою калібрувальної залежності, яку будували для відновленого глутатіону з точно відомою концентрацією, та виражали в мкМ на мг гемоглобіну (Hb) в пробі. Серію стандартних розчинів готували згідно з таблицею 2.3.2. Калібрувальну залежність і рівняння лінійної апроксимації наведено на рис. 2.3.2.

Таблиця 2.3.2 Склад стандартних розчинів GSH для побудови калібрувальної залежності. Концентрація вихідного розчину відновленого глутатіону 8,13 мкМ. Об'єм реактиву Елмана в пробі 0,05 мл.

№ п/п	Об'єм розчину відновленого глутатіону (GSH), мл	Об'єм Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,3 М, мл	Концентрація глутатіону в точці, мкМ
1	0,025	2,975	0,0678
2	0,05	2,95	0,1356
3	0,1	2,9	0,2712
4	0,2	2,8	0,5420
5	0,3	2,7	0,8135
6	0,4	2,6	1,0847
7	0,5	2,5	1,3559
8	0,6	2,4	1,6271
9	0,7	2,3	1,8982
10	0,8	2,2	2,1694
11	0,9	2,1	2,4406
12	1	2	2,7118
13	1,1	1,9	2,9829
14	1,2	1,8	3,2541
15	1,3	1,7	3,5253
16	1,4	1,6	3,7965
17	1,5	1,5	4,06765

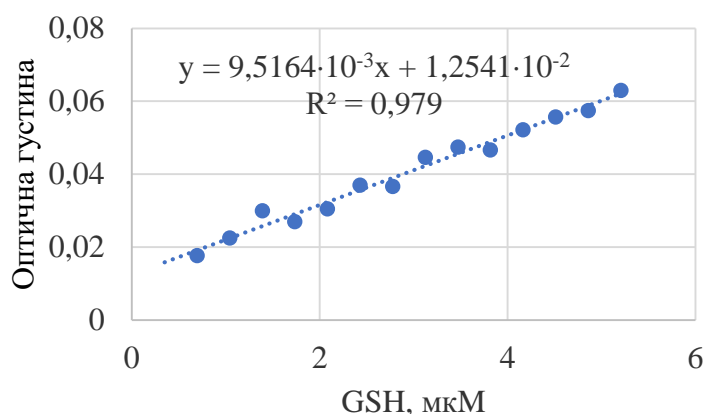


Рис. 2.3. 2 Калібрувальна залежність для визначення GSH.

*Активність  $Mg^{2+}$ -,  $Na^+$ - $K^+$ -АТФ-ази та МАТ* визначали за кількістю неорганічного фосфору, утвореного під час ферментативного гідролізу АТФ [2, 37–41]. Реакцію проводили додаванням 0,05 мл гемолізату до 0,8 мл інкубаційного середовища, що містить АТФ. Склад середовища для визначення сумарної АТФ-азної активності: 125 мМ NaCl, 25 мМ KCl, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ ЕДТА, 3 мМ АТФ, 50 мМ трис-НСl, рН 7,4. Склад середовища для визначення активності МАТ: 50 мМ KCl, 40 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ ЕДТА, 3 мМ АТФ, 5 мМ метіоніну, 50 мМ трис-НСl, рН 7,4. Активність  $Mg^{2+}$  -АТФ-ази визначали додаванням до 0,05 мл гемолізату специфічного інгібітора  $Na^+$ - $K^+$ - АТФ-ази – убаїну (строфантин-G) (0,05 мл). Проби інкубували 15 хвилин. Реакцію припиняли додаванням 0,1 мл холодної трихлороцтової кислоти. Осад білка відокремлювали центрифугуванням. У надосадовій рідині визначали кількість неорганічного фосфору (Рн) використовуючи кольорову реакцію з амонієм молібденовокислим. До 0,05 мл надосадової рідини додавали 0,55 мл дистильованої води, 0,1 мл суміші розчинів H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,5 н та Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> • 2H<sub>2</sub>O, 2,5% у співвідношенні 1:1 та додавали 0,05 мл розчину аскорбінової кислоти 1%. Проби залишали інкубуватися при кімнатній температурі на ніч. Оптичну щільність розчинів реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 590 нм у кюветах завтовшки 1 см. Вміст Рн визначали за допомогою калібрувального графіка, побудованого за допомогою серії розчинів KN<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> приготованих згідно з таблицею 2.3.3 Для цього до 0,6 мл розчину KN<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> додавали 0,1 мл суміші

розчинів  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 2,5 н та  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2,5% та 0,05 мл розчину аскорбінової кислоти 1%. Розчини залишали інкубуватися при кімнатній температурі на ніч і потім вимірювали оптичну щільність розчинів при 590 нм в кюветах, товщиною 1 см. Калібрувальну залежність і рівняння лінійної апроксимації показано на рис. 2.3.3.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазну активність розраховували за різницею між загальною АТФ-азною активністю і активністю у середовищі, яке містить убаїн. Активність маркерних ферментів виражали в мМ Рн, що утворюється протягом 1 хвилини, віднесеної до кількості білка (Нб) у пробі (мМ/хв·г Нб).

Таблиця 2.3.3 Склад стандартних розчинів  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  для побудови калібрувальної залежності. Вихідні концентрації розчинів  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $3,52 \cdot 10^{-4}$  М та  $3,52 \cdot 10^{-5}$  М. Об'єм стандартного розчину 0,6 мл. Об'єм суміші 0,2 мл. Об'єм аскорбінової кислоти 1% 0,05 мл.

№ п/п	V розчину $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , мл	V води, мл	Концентрація $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , мкМ/мл	Оптична густина розчинів
1.	0,05	2,95	0,587846	0,0825
2.	0,2	2,8	2,351385	0,0945
3.	0,4	2,6	4,70277	0,104333333
4.	0,6	2,4	7,054155	0,1185
5.	0,8	2,2	9,40554	0,13425
6.	1	2	11,75693	0,141
7.	1,3	1,7	15,284	0,168
8.	1,6	1,4	18,81108	0,1886
9.	2	1	23,51385	0,217666667
10.	2,4	0,5	28,21662	0,2475
11.	2,8	0,2	32,91939	0,2725
12.	0,4	2,6	47,0277	0,3895
13.	0,6	2,4	70,54155	0,47225
14.	0,8	2,2	94,0554	0,593

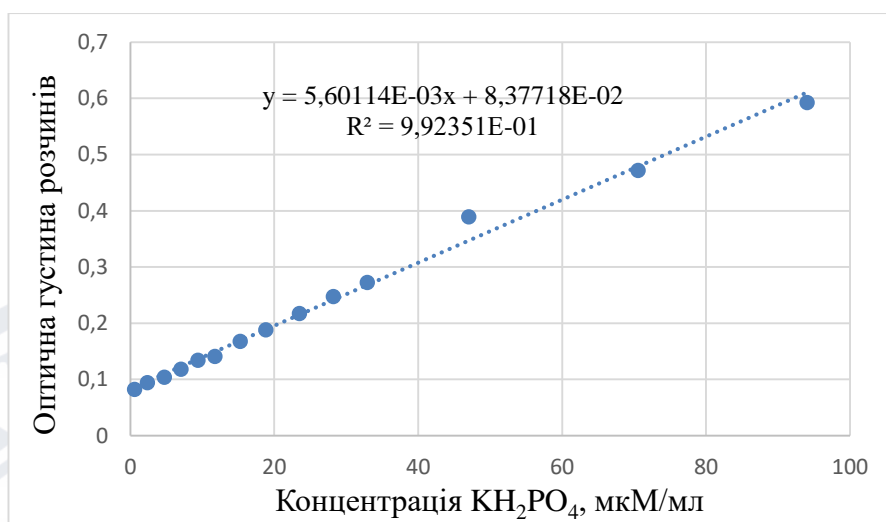


Рис. 2.3. 3 Калібрувальна залежність для визначення Рн.

Вміст гемоглобіну в еритроцитах визначали геміглобінціанідним уніфікованим методом за стандартним набором [42, 43]. 0,02 мл вихідної еритроцитарної суспензії вносили в 5 мл трансформуючого реактиву, витримували 15 хв і фотометрували проти трансформуючого реактиву при довжині хвилі 540 нм. Для визначення концентрації гемоглобіну використовували калібрувальну залежність, побудовану за стандартними розчинами гемоглобінціаніду.

Усі експерименти поведені у трьох повторюваностях. Експериментальні дані були проаналізовані у програмі Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA). Експериментальні дані представлені як  $\bar{x} \pm m$  ( $\bar{x}$  – середнє,  $m$  – відносна похибка). Достовірність відмінностей між середньогруповими показниками оцінювали за допомогою непараметричного рангового критерію Вілкоксона [44]. 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 з вагами, що залежать від відстані (вплив окремих точок зменшується з відстанню до поверхні).

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТУ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1 Дослідження зміни активності каталази, глутатіонпероксидази та вмісту $H_2O_2$

Каталаза є внутрішньоклітинним ферментом, який у високих концентраціях міститься в еритроцитах і пероксисомах печінки ссавців. Cat є дуже важливим ферментом, оскільки здатна захищати клітини і тканини від токсичної дії  $H_2O_2$ . Розкладання  $H_2O_2$  особливо важливе в еритроцитах, щоб запобігти окисленню гемоглобіну та інших компонентів еритроцитів. Cat є одним з найефективніших ферментів, оскільки демонструє одну з найбільших швидкостей обертання зі здатністю перетворювати мільйони молекул  $H_2O_2$  за секунду ( $k_{cat} = 4 \times 10^7 \text{ c}^{-1}$ ) [1].

Cat вважалася єдиним ферментом, що бере участь у антиоксидантному захисті еритроцитів шляхом видалення  $H_2O_2$ . Однак, сьогодні відомо, що GPx1 також відіграє важливу роль у антиоксидантному захисті еритроцитів, будучи необхідною для детоксикації низьких концентрацій  $H_2O_2$ , а також гідропероксидів ліпідів та інших низькомолекулярних гідропероксидів у воду або у відповідні спирти, використовуючи GSH як відновник [1].

На рисунку 3.1.1 показана зміна активності мембранозв'язаної каталази еритроцитів, що інкубувалися в умовах окисного навантаження і наявності/відсутності метіоніну у концентрації  $10^{-6}$  М. Видно, що за відсутності метіоніну в середовищі інкубування спостерігається ріст активності мембранозв'язаної каталази у діапазоні концентрацій  $H_2O_2$   $10^{-6}$  –  $10^{-3}$  М. Відомим фактом є те, що Cat має вирішальне значення для очищення високих рівнів екзогенного та ендогенного пероксиду [1]. Натомість активність цитоплазматичної каталази за цих умов знижується (рис. 3.1.2). Імовірно відбувається зв'язування каталази з мембраною еритроцита. Асоціація Cat з мембраною є наслідком метаболічного стресу, можливо, для захисту мембрани

еритроцитів та протидії впливу окисного стресу [1, 45]. Показано, що при зв'язуванні з мембраною каталаза зберігає свою активність [18].

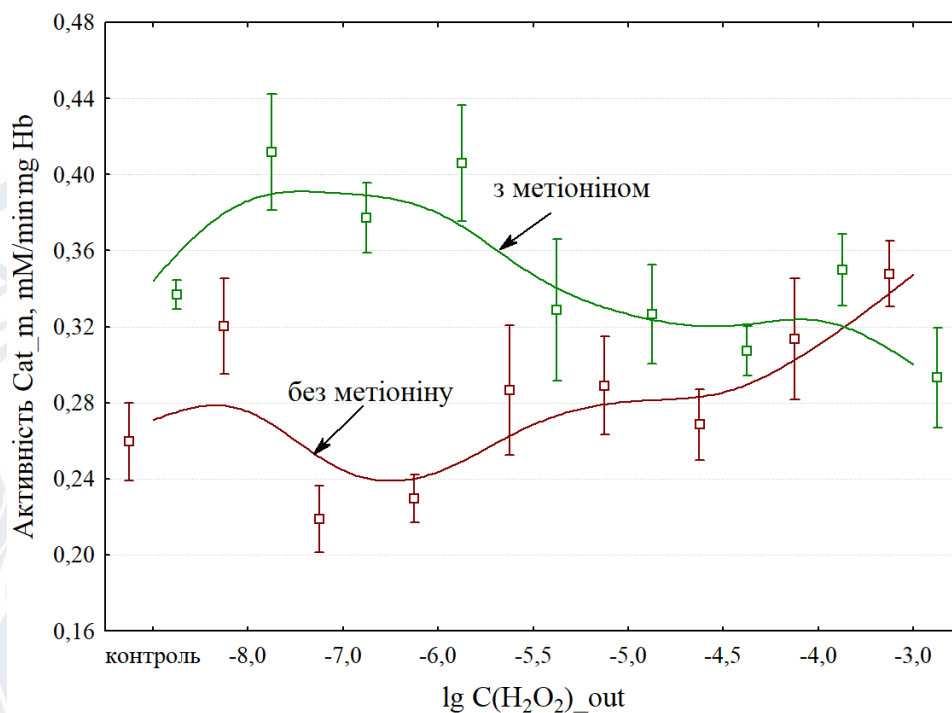


Рис 3.1.1 Зміна активності каталази (Cat) мембрани еритроцита у mM/хв mg Hb в умовах окисного навантаження і наявності метіоніну.

Видно, що введення метіоніну в середовище інкубування еритроцитів сприяє зростанню активності каталази мембрани при низьких концентраціях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10<sup>-8</sup> – 10<sup>-6</sup> M). Збільшення концентрації H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (у діапазоні 10<sup>-5,5</sup> – 10<sup>-3</sup> M) в середовищі інкубування, веде до зниження каталазної активності. Найімовірніше каталаза відщеплюється від мембрани та переходить в цитозоль клітини. На це вказує також приріст активності цитоплазматичної каталази у цій області концентрацій перекису (рис. 3.1.2). Мабуть це пов'язано з перебудовою метаболічних процесів у еритроцитах за участю метіоніну.

Метаболізм Met у людини, розділений на: трансметилування, реметилування, що веде до так званого «циклу Met», і етап необоротного утворення S<sub>уs</sub> на шляху транссульфурації. Цикл Met починається з утворенням S-аденозилметіоніну (SAM) з Met і АТФ за допомогою метіонаденозилтрансферази. Потім SAM втрачаючи метильну групу за допомогою метилтрансферази перетворюється на SAH, який, у свою чергу,

перетворюється на Hcy за допомогою ферменту S-аденозилгідролази. Виробництво Hcy може генерувати реакції транссульфурації до Cys або реметилювання до Met через взаємодію з метаболізмом фолієвої кислоти. Реакції транссульфурації необоротні, щоб Hcy не перетворювався знову на Met. Транссульфурація включає активність цистатіонін- $\beta$ -синтази (CBS), яка призводить до утворення цистатіоніну (Cyst) з Hcy і подальшої дії цистатіонін- $\gamma$ -ліази (CGL), яка перетворює Cyst в Cys шляхом вивільнення  $\alpha$ -кетобутирату та аміаку. Згодом цистеїн сприяє утворенню таурину (Tau), GSH, H<sub>2</sub>S або SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> [46].

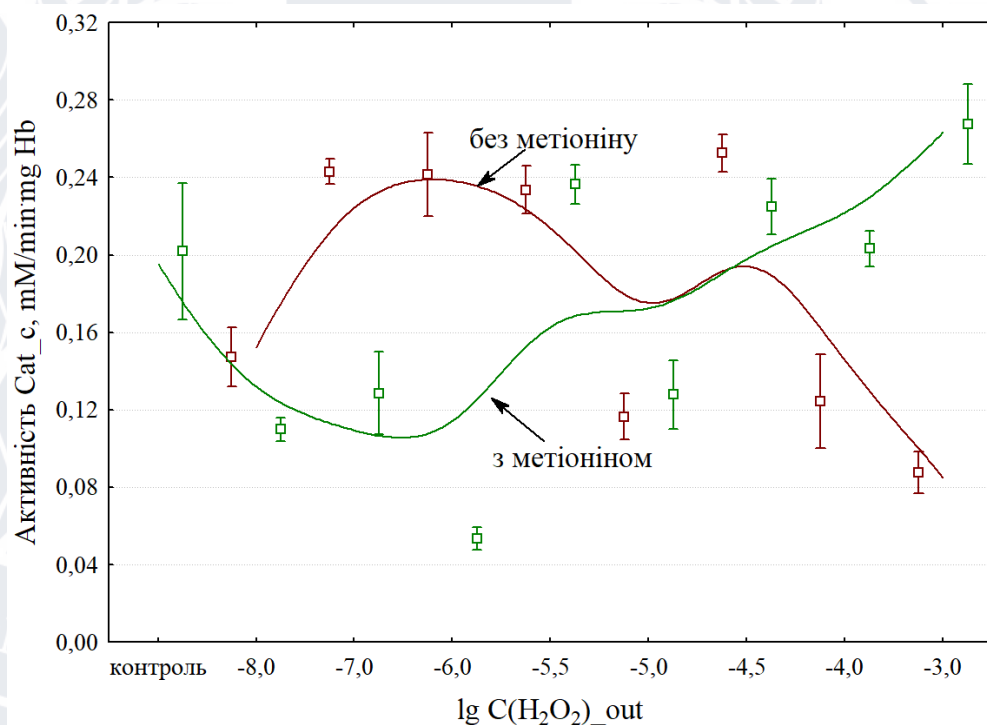


Рис 3.1.2 Зміна активності цитоплазматичної каталази еритроцита у мМ/хв·мг Нб в умовах окисного навантаження і наявності метіоніну.

Побічні реакції ферментів транссульфурації CBS і CGL є основними факторами утворення H<sub>2</sub>S у ссавців [47]. Ще одним шляхом синтезу H<sub>2</sub>S є утворення H<sub>2</sub>S за допомогою 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази (3MST) з використанням Cys як субстрату [46]. Низка досліджень свідчить про те, що еритроцити здатні продукувати H<sub>2</sub>S, оскільки в еритроцитах виявляється активність ферментів, що його утворюють [48-50]. Варто зазначити, що АФК і пероксидні форми, що утворюються в умовах стресу, сприяють транссульфурації

[46, 47]. Хоча  $H_2S$  відіграє важливу роль у багатьох клітинах і тканинах, його функція в еритроцитах залишається невідомою [51]. Дослідження [52] показало, що ендогенно вироблений  $H_2S$  стимулює виробництво енергії на основі гліколізу, внаслідок цього зростає рівень 2,3- DPG. Через підвищення рівнів 2,3- DPG відбувається зниження спорідненості гемоглобіну до кисню, тобто  $OxHb$  переходить в дезокси форму [52].  $DeoxuHb$  при цьому зв'язується з білком смуги 3 на мембрані еритроцита і, ймовірно, витісняє каталазу у цитозоль.

На рисунку 3.1.3 показана зміна активності мембранозв'язаної (а) та цитоплазматичної (б) каталази залежно від кількості метіоніну, введеного у середовище інкубування. Видно, що при збільшенні концентрації метіоніну активність мембранозв'язаної каталази знижується, а активність цитоплазматичної каталази зростає.

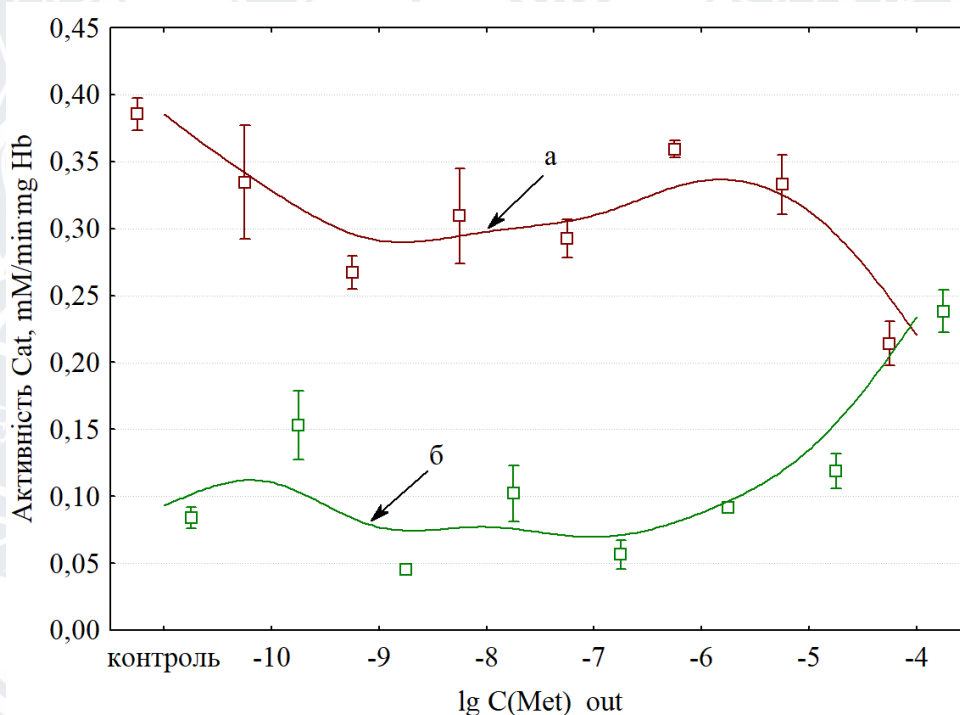


Рис. 3.1.3 Зміна активності каталази у мМ/хв/мг Hb в еритроцитах залежно від кількості метіоніну, введеного у середовище інкубування: а – мембранозв'язана, б – цитоплазматична каталаза.

Збільшення концентрації метіоніну у середовищі інкубування веде до підвищення рівня його основного метаболіту S-аденозилметіоніну. Підвищений рівень SAM сприяє окисненню Met шляхом транссульфурації, пригнічує



реметилювання Hcy до Met, приводячи цикл до синтезу Cys [46, 47]. При наступних перетвореннях цистеїну буде утворюватися  $H_2S$ , який за описаним зверху механізмом стриятиме переходу мембранозв'язаної каталази еритроцита у цитозоль.

Зміна вмісту позаклітинного  $H_2O_2$  залежно від кількості  $H_2O_2$ , введеного у середовище інкубування клітин і наявності або відсутності метіоніну показана на рисунку 3.1.4. Видно, що в присутності метіоніну вміст перекису водню у позаклітинному середовищі вищий ніж в експериментах без метіоніну. В обох дослідях вміст  $H_2O_2$  знижувався порівняно з контролем при низьких концентраціях  $H_2O_2$  в середовищі інкубування еритроцитів ( $10^{-8}$  –  $10^{-5}$  M).

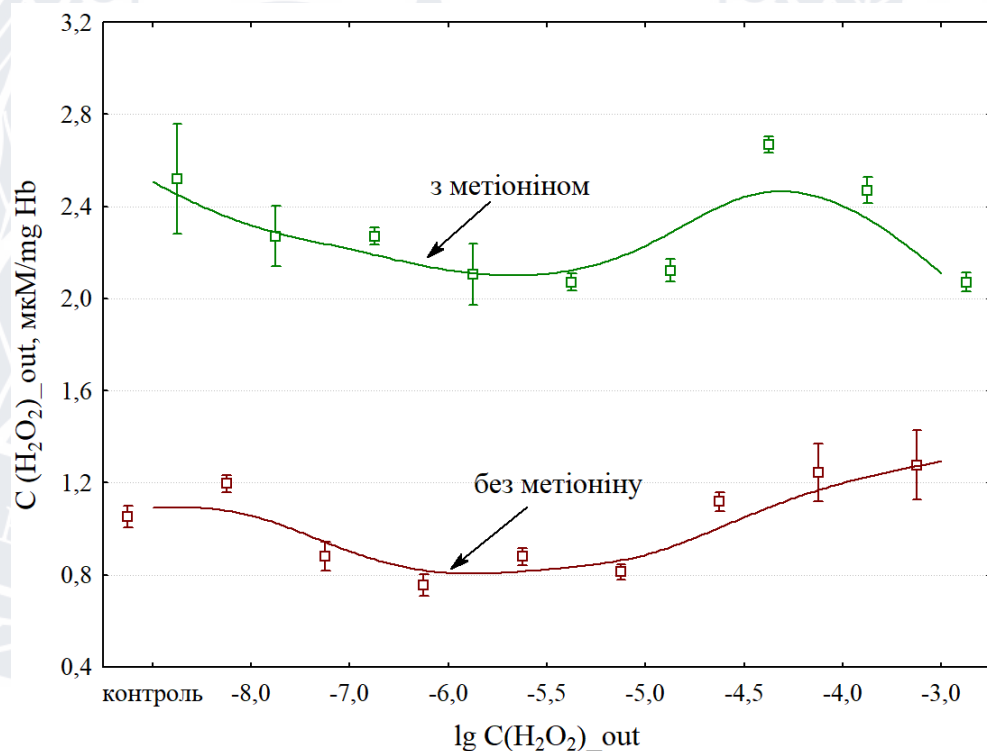


Рис. 3.1.4. Зміна вмісту позаклітинного  $H_2O_2$  залежно від кількості  $H_2O_2$ , введеного у середовище інкубування клітин і наявності метіоніну (у кількості  $10^{-6}$  M).

Імовірно мембранозв'язана каталаза, активність якої за цих умов висока (рис. 3.1.1) бере участь в інактивації екзогенного  $H_2O_2$ . Також можуть залучатися і інші антиоксидантні ферменти, такі як GPx1 та Prx2, які виконують важливу роль у антиоксидантному захисті еритроцитів, будучи необхідними для детоксикації низьких концентрацій  $H_2O_2$  і гідропероксидів [1]. Prx2 є третім за

поширеністю білком в еритроцитах (після Hb і глікофорину A), локалізований на мембрані еритроцитів і в основному бере участь у відновленні органічних пероксидів; тому Prx2 захищає мембрану еритроцитів від перекисного окислення ліпідів. Prx2 отримує свої електрони для відновлення  $H_2O_2$  з Trx. Ймовірно, через його велику кількість він має більший вплив на стабільність, цілісність і окислення мембрани еритроцитів у порівнянні з відсутністю GPx1 або Cat, як було показано у трансгенних мишей [53].

При високих концентраціях введеного перекису ( $10^{-4.5} - 10^{-3}$  M) вміст позклітинного  $H_2O_2$  зростає за відсутності метіоніну. Можливо, це пов'язано з інактивацією GPx1 високими концентраціями  $H_2O_2$ , адже відомо, що в за умов окисного стресу GPx1 зв'язується з мембраною еритроцита з втратою активності [1]. В присутності метіоніну також спостерігався незначний ріст концентрації позаклітинного  $H_2O_2$  в точках з концентрацією введеного  $H_2O_2$  перекису ( $10^{-4.5} - 10^{-4}$  M). Імовірно це зв'язано зі зниженням каталазної активності, яку ми спостерігали за цих умов (рис. 3.1.1).

На рисунку 3.1.5 представлена зміна вмісту внутрішньоклітинного  $H_2O_2$  залежно від кількості  $H_2O_2$ , введеного у середовище інкубування клітин і наявності метіоніну. Видно, що в присутності метіоніну вміст перекису водню у внутрішньоклітинному середовищі вищий ніж в дослідях без метіоніну. В інактивації цитоплазматичного перекису задіяні три антиоксидантні ферменти: Cat, GPx1, Prx2, яких у цитозолі багато. Cat здатна очищати екзогенні та високі ендогенні рівні перексиду, тоді як GPx1 і Prx2, здається, очищувати ендогенні та низькі рівні перексиду. Таким чином, усунення низьких рівнів  $H_2O_2$  здійснюється за допомогою GPx1 і Prx2, оскільки Cat не працює ефективно при низьких рівнях  $H_2O_2$  [1]. Вважається, що основним ферментом, відповідальним за деградацію  $H_2O_2$  в стаціонарних умовах, є GPx1, який використовує GSH як кофактор [53]. За відсутності метіоніну антиоксидантним ферментам вдається ефективно знешкоджувати внутрішньоклітинний  $H_2O_2$  (рис. 3.1.5).

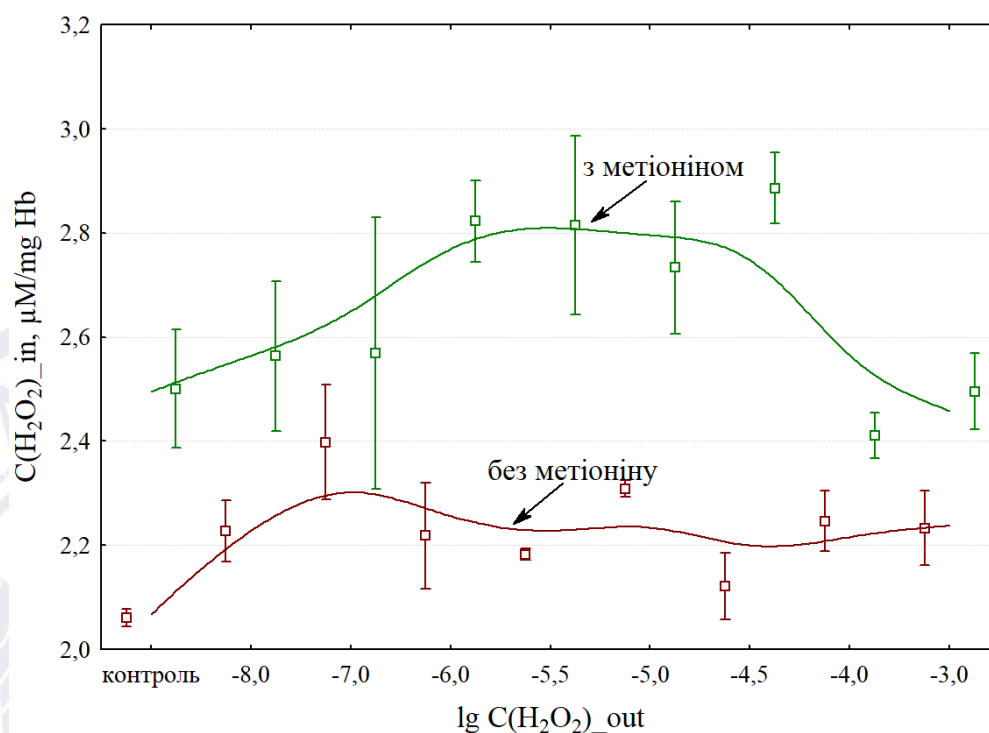


Рис. 3.1.5 Зміна вмісту внутрішньоклітинного  $\text{H}_2\text{O}_2$  залежно від кількості  $\text{H}_2\text{O}_2$ , введеного у середовище інкубування клітин і наявності метіоніну (у кількості  $10^{-6}$  М).

У дослідях з метіоніном, ми спостерігаємо зростання вмісту внутрішньоклітинного  $\text{H}_2\text{O}_2$  у діапазоні концентрацій введеного у середовище інкубування  $\text{H}_2\text{O}_2$   $10^{-8}$  –  $10^{-5,5}$  М. Можливо це пов'язано з продукуванням  $\text{H}_2\text{S}$  в присутності метіоніну. Оскільки відомо, що каталаза має давню еволюційну функцію знешкодження сірководню [14]. У роботі [53] було описано, що система глутатіону та антиоксидантні ферменти, такі як каталаза, SOD1 і Prx2, Trx та глутаредоксин (GRx), які беруть участь у окислювально-відновній фізіології еритроцитів, відіграють центральну роль у метаболізмі сульфідів/полісульфідів. Було показано, що SOD1, каталаза може метаболізувати сірководень, продукуючи полісульфід [53]. Було висунуте припущення, що SOD1 і каталаза еволюціонували з ферментів, що окиснюють сульфід, у ферменти, що відновлюють супероксид/пероксид, коли атмосфера стає багатою киснем [14]. Таким чином, можливо, що процес інактивації перекису йшов менш інтенсивно за рахунок переключення функції каталази на інактивацію  $\text{H}_2\text{S}$ .

При високих концентраціях введеного  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $10^{-4.5} - 10^{-3}$  М) спостерігається зниження вмісту внутрішньоклітинного  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Імовірно, у інактивації  $\text{H}_2\text{O}_2$  бере участь каталаза, активність якої у цитоплазмі зростала за цих умов (рис. 3.1.2). Також до інактивації може долучатися глутатіонпероксидаза, активність якої у цій області концентрацій введеного  $\text{H}_2\text{O}_2$  також зростає (рис.3.1.7).

На рисунку 3.1.6 показана зміна вмісту внутрішньоклітинного  $\text{H}_2\text{O}_2$  залежно від кількості метіоніну, введеного у середовище інкубування клітин. Ми бачимо, що введення метіоніну в середовище інкубування веде до зниження вмісту внутрішньоклітинного перекису порівняно з контролем. Але зміна концентрації метіоніну в середовищі достовірно не впливала на вміст  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

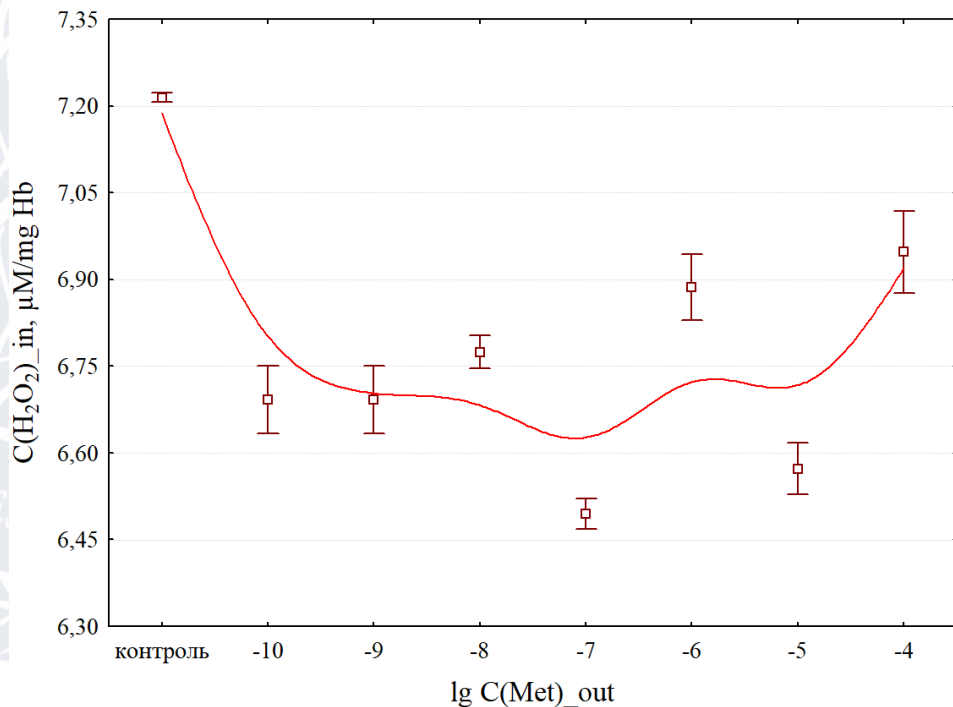


Рис. 3.1.6 Зміна вмісту внутрішньоклітинного  $\text{H}_2\text{O}_2$  залежно від кількості метіоніну, введеного у середовище інкубування клітин.

У роботі ми також подивилися зміну сумарної активності глутатіонпероксидази в еритроцитах в умовах окисного навантаження і наявності метіоніну (рис. 3.1.7). Глутатіонпероксидаза є внутрішньоклітинним антиоксидантним ферментом, який каталізує відновлення  $\text{H}_2\text{O}_2$ , гідропероксидів ліпідів та інших низькомолекулярних гідропероксидів у воду або у відповідні

спирти, використовуючи GSH як відновник. Таким чином, GPx1 запобігає як перекисному окисленню ліпідів, так і накопиченню  $H_2O_2$ . GPx1 має вищу спорідненість до перекису водню, ніж каталаза, тому є необхідною для детоксикації низьких концентрацій  $H_2O_2$  [1]. Із графіка видно, що при високих концентраціях перекису водню в середовищі інкубування сумарна активність GPx1 зростає.

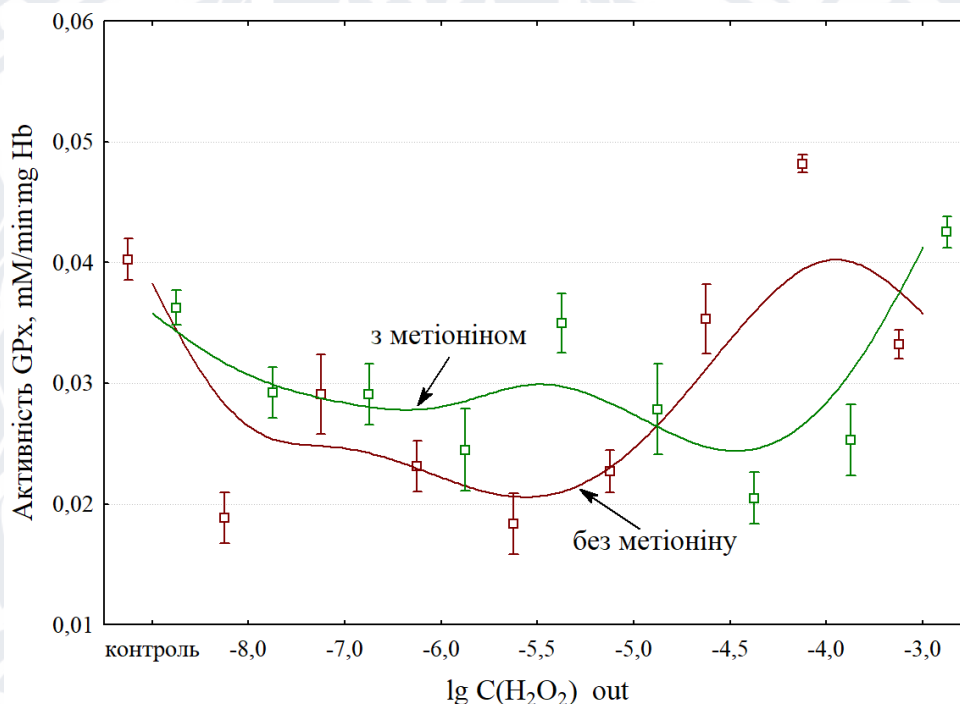


Рис. 3.1.7 Зміна сумарної активності глутатіонпероксидази (GPx) у мМ/хв·мг Hb в еритроцитах в умовах окисного навантаження і наявності метіоніну.

### 3.2 Дослідження зміни активностей $Na^+ - K^+ - АТФ$ -ази та $Mg^{2+} - АТФ$ -ази еритроцита

На рисунку 3.2 представлена зміна активностей  $Na^+ - K^+ - АТФ$ -ази (а) та  $Mg^{2+} - АТФ$ -ази (б) в залежності від концентрації метіоніну та кількості  $H_2O_2$  в середовищі інкубування еритроцитів. За відсутності метіоніну активність  $Na^+ - K^+ - АТФ$ -ази при високих концентраціях  $H_2O_2$  ( $10^{-3}$  М) знижується на  $78 \pm 17,3$  % порівняно з контролем. Імовірно, окисне середовище приводить до інактивації ферменту за рахунок перебудови мембрани еритроцита. Зміна ліпідного складу біологічних мембран розглядається як один з 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 [2]. Активність  $Mg^{2+}$ -АТФ-ази (рис. 3.2, б) за цих умов зростала, хоча все ще залишалася на низькому рівні порівняно з присутністю метіоніну.

Введення метіоніну в середовище інкубування призводить до зростання активностей  $Na^+K^+$ - (рис. 3.2, а) та  $Mg^{2+}$ -АТФ-ази (рис. 3.2, б). За концентрацій метіоніну  $10^{-6}$  –  $10^{-4}$  М активність ферментів зростає навіть в присутності  $H_2O_2$ .  $Na^+K^+$ -АТФ-аза та  $Mg^{2+}$ -АТФ-аз 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 [2, 54]. 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. SAH, утворений в цій реакції, залучається до циклу аденілатного метаболізму за участю SAH-гідролази [55], який далі внаслідок ряду реакцій перетворюється в рибулозо 5-фосфат, що залучається в гліколіз. Таким чином, метіонін може бути додатковим енергетичним метаболітом, який підтримує клітини при нестачі природнього для еритроцитів метаболіту – глюкози.

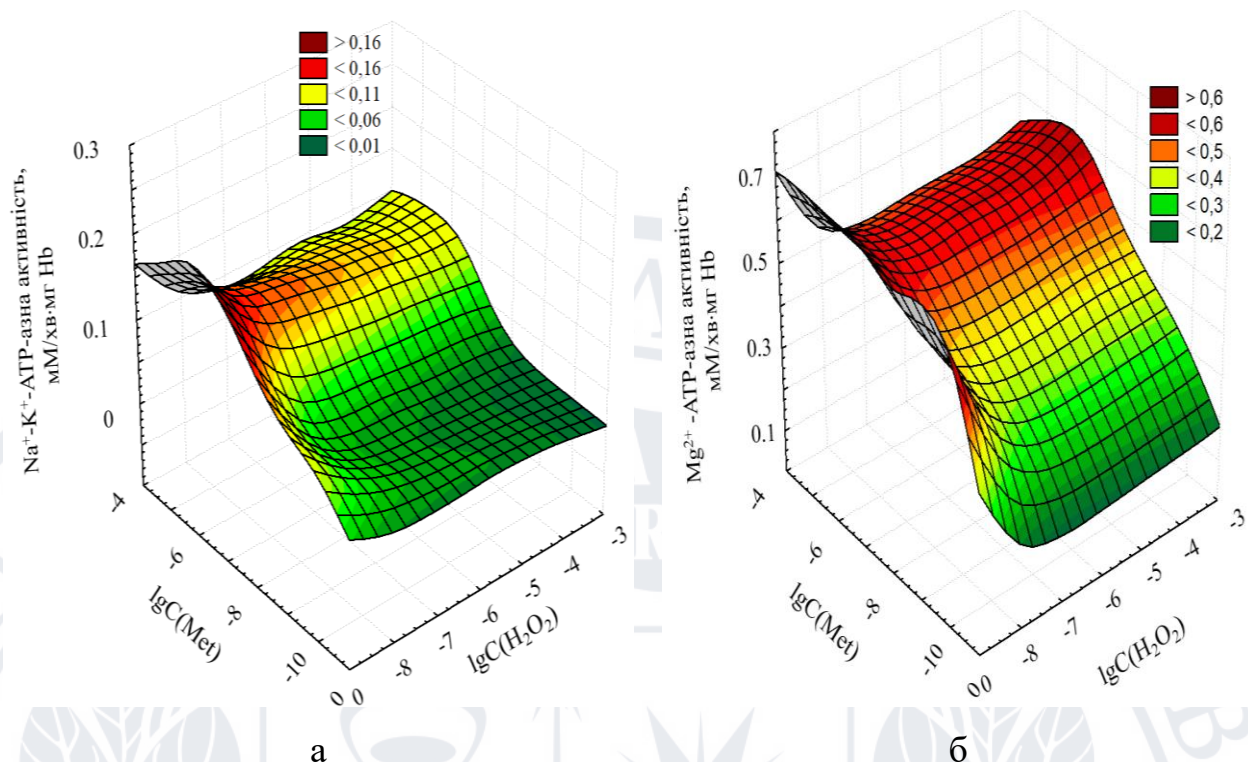


Рис. 3.2 Зміна активності  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -АТФ-ази (а) та  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-ази (б) еритроцита в залежності від двох факторів: концентрації метіоніну та кількості  $\text{H}_2\text{O}_2$ , введених в середовище інкубування еритроцитів

### 3.3 Дослідження зміни активності МАТ еритроцита

Зміна активності МАТ еритроцита в залежності від концентрації метіоніну та вмісту  $\text{H}_2\text{O}_2$  в середовищі інкубування показана на рис. 3.3. 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  метіонін в середовищі інкубування також призводить до зростання активності цього ферменту. Зі збільшенням концентрації метіоніну ( $10^{-6}$  –  $10^{-4}$  М) в середовищі, активність МАТ сильно зростає, це співпадає з літературними джерелами [23]. Введення метіоніну призводить до зростання активності ферменту навіть в присутності  $\text{H}_2\text{O}_2$ , але приріст значно нижчий. Імовірно окисне середовище викликає перебудови мембрани еритроцита, що ускладнює проникнення метіоніну в клітину, внаслідок дії на переносники цієї амінокислоти.

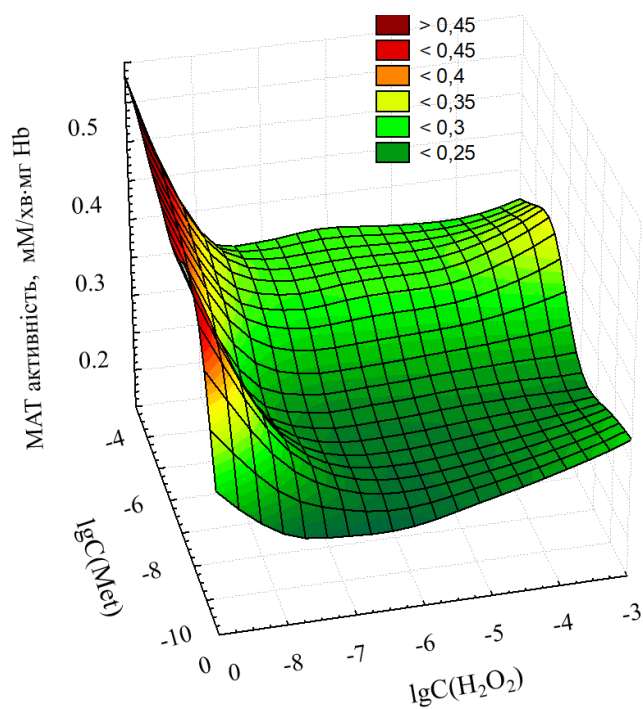


Рис. 3.3 Зміна активності МАТ еритроцита в залежності від двох факторів: концентрації метіоніну та кількості  $H_2O_2$ , введених в середовище інкубування еритроцитів.



## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що за присутності метіоніну в середовищі інкубування активність каталази мембрани вища. За високих концентрацій  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $10^{-6} - 10^{-3}$  М) активність мембранозв'язаної каталази падає, а цитоплазматичної – зростає. За відсутності метіоніну в середовищі інкубування та при високих концентраціях  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $10^{-6} - 10^{-3}$  М) активність мембранозв'язаної каталази росте, а цитоплазматичної – знижується.
2. Показано, що при збільшенні концентрації метіоніну активність мембранозв'язаної каталази знижується, а активність цитоплазматичної каталази зростає.
3. Встановлено, що в присутності метіоніну вміст перекису водню у позаклітинному та внутрішньоклітинному середовищах вищий ніж в експериментах без метіоніну.
4. Встановлено, що наявність метіоніну в середовищі інкубування сприяє зростанню активності  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ - АТФ-аз та МАТ.
5. Введення метіоніну в концентраціях  $10^{-6} - 10^{-4}$  М призводить до зростання активності  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ - АТФ-аз та МАТ навіть в присутності  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
6. За відсутності метіоніну окисне середовище інкубування призводить до падіння активності  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТФ-ази, але у високих концентраціях  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $10^{-6} - 10^{-3}$  М) сприяє зростанню активності  $\text{Mg}^{2+}$ - АТФ-ази та МАТ, хоча вони залишаються низькими.
7. Показано, що метіонін є додатковим енергетичним метаболітом, який підтримує клітини при нестачі природнього для еритроцитів метаболіту – глюкози.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Melo D., Rocha S., Coimbra S., Santos Silva A. Interplay between Erythrocyte Peroxidases and Membrane // In A. Tombak, (Ed.). Erythrocyte. IntechOpen, London, UK. – 2019. – P. 65–84. doi.org/10.5772/intechopen.83590.
2. Філінська О. М., Лозовий В. П., Яблонська С. В., Островська Г. В., Рибальченко Т. В., Зеленюк В. О., Рибальченко В. К. Вплив піридину на активність мембранозв'язаних ферментів клітин печінки. Доповіді Національної академії наук України. – 2008. – № 6. – С. 173 – 177.
3. Cimen M.Y.B. Free radical metabolism in human erythrocytes // Clinica Chimica Acta. 2008. – 390(1-2). – P. 1-11. DOI: 10.1016/j.cca.2007.12.025 8.
4. Rocha S., Gomes D., Lima M., Bronze-da-Rocha E., Santos-Silva A. Peroxiredoxin 2, glutathione peroxidase, and catalase in the cytosol and membrane of erythrocytes under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress // Free Radical Research. – 2015. – 49, №8. – P. 990-1003. DOI: 10.3109/10715762.2015.1028402
5. Reisz, J. A., Nemkov, T., Dzieciatkowska, M., Culp-Hill, R., Stefanoni, D., Hill, R. C., Yoshida, T., Dunham, A., Kanas, T., Dumont, L. J., Busch, M., Eisenmesser, E. Z., Zimring, J. C., Hansen, K. C., & D'Alessandro, A. Methylation of protein aspartates and deamidated asparagines as a function of blood bank storage and oxidative stress in human red blood cells // Transfusion. – 2018. – 58(12). – P. 2978–2991. doi: 10.1111/trf.14936
6. T. Ekegren, H. Askmark, S.-M. Aquilonius, C. Gomes-Trolin. Methionine adenosyltransferase activity in erythrocytes and spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis // Exp Neurol. – 1999. –V 158(2). – P. 422-427. doi: 10.1006/exnr.1999.7112.
7. Agnieszka Grzelak, Marcin Kruszewski, Ewa Macierzyńska, Łukasz Piotrowski, Łukasz Pułaski, Błazej Rychlik, Grzegorz Bartosz. The effects of superoxide dismutase knockout on the oxidative stress parameters and survival of mouse erythrocytes // Cell Mol Biol Lett. – 2009. – № 14(1). – P. 23-34. doi: 10.2478/s11658-008-0031-8.

8. Junichi Fujii, Theingi Myint, Ayako Okado, Hideaki Kaneto and Naoyuki Taniguchi. Oxidative stress caused by glycation of Cu,Zn-superoxide dismutase and its effects on intracellular components // *Nephrol Dial Transplant.* – 1996. – № 11. – P. 34-40.
9. Auclair J. R., Johnson J. L., Liu Q., Salisbury J. P., Rotunno M., Petsko G. A., Ringe D., Brown R. H., Bosco D. A., Agar J. N. Post-Translational Modification by Cysteine Protects Cu/Zn-Superoxide Dismutase From Oxidative Damage // *Biochemistry.* – 2013. – 52(36). – P. 6137–6144. doi: 10.1021/bi4006122.
10. Grzelak A., Kruszewski M., Macierzyńska E., Piotrowski Ł., Pułaski Ł., Rychlik B., Bartosz G. The effects of superoxide dismutase knockout on the oxidative stress parameters and survival of mouse erythrocytes // *Cellular & molecular biology letters.* – 2009. – 14, №1. – P. 23–34. doi.org/10.2478/s11658-008-0031-8
11. Чеснокова Н. П., Понукалина Е. В., Бизенкова М. Н. Молекулярноклеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах // *Успехи современного естествознания.* – 2006. – № 7. – С. 29-36.
12. Nicholls P., Fita I., Loewen P. C. Enzymology and structure of catalases // *Advances in Inorganic Chemistry.* – 2000. – 51. – P. 51–106. doi:10.1016/s0898-8838(00)51001-0
13. Сторожук П.Г. Ферменты прямой и косвенной антирадикальной защиты эритроцитов и их роля в инициации процессов оксигенации гемоглобина, антибактериальной защите и делении клеток // *Вестник интенсивной терапии.* – 2003. – № 3. – С. 8–13.
14. Olson K.R., Gao Y., DeLeon E.R., Arif M., Arif F., Arora N, Straub K.D. Catalase as a sulfide-sulfur oxido-reductase: An ancient (and modern?) regulator of reactive sulfur species (RSS) // *Redox Biol.* – 2017. –12. – P. 325–339. doi: 10.1016/j.redox.2017.02.021
15. Cho C. S., Lee S., Lee G. T, Woo H. A., Choi E. J., Rhee S. G. Irreversible inactivation of glutathione peroxidase 1 and reversible inactivation of peroxiredoxin II

- by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in red blood cells // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2010. – 12(11). – P. 1235–1246. DOI: 10.1089/ars.2009.2701
16. Brigelius-Flohe R., Maiorino M. Glutathione peroxidases // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*. – 2013. – 1830(5). – P. 3289–3303. doi:10.1016/j.bbagen.2012.11.020
17. Nagababu E., Mohanty J. G., Friedman J. S., Rifkind J. M. Role of peroxiredoxin-2 in protecting RBCs from hydrogen peroxide-induced oxidative stress // *Free Radical Research*. – 2013. – 47(3). – P. 164–171. doi:10.3109/10715762.2012.756138
18. Aviram I., Shaklai N. The association of human erythrocyte catalase with the cell membrane // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1981. – 212, №2. – P. 329–337. doi:10.1016/0003-9861(81)90373-8
19. Gaetani G. F., Kirkman H. N., Mangerini R., Ferraris A. M. Importance of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes // *Blood*. – 1994. – 84. – P. 325–330.
20. Peskin A. V., Low F. M., Paton L. N, Maghzal G. J., Hampton M. B, Winterbourn C. C. The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – 282(16). – P. 11885–11892. DOI: 10.1074/jbc.M700339200
21. Ogasawara Y., Ohminato T., Nakamura Y., Ishii K. Structural and functional analysis of native peroxiredoxin 2 in human red blood cells // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2012. – 44(7). – P. 1072–1077. DOI: 10.1016/j.biocel.2012.04.008
22. Chu H., Breite A., Ciruolo P., Franco R. S., and Low P. S. Characterization of the deoxyhemoglobin binding site on human erythrocyte band 3: implications for O<sub>2</sub> regulation of erythrocyte properties // *Blood*. – 2008. – 111(2). – P. 932–938. doi:10.1182/blood-2007-07-100180
23. Корендясева Т. К. Регуляция метаболизма метионина в суспензии свежесыводенных гепатоцитов. дис. на соискание уч. степени канд. био. наук: 03.01.02-биофизика. – Москва. – 2011. – 117 с.

24. Kristine L. Oden, Steven Clarke. S-Adenosyl-L-methionine synthetase from human erythrocytes: role in the regulation of cellular S-adenosylmethionine levels // *Biochemistry*. – 1983. – 22 (12). – P. 2978–2986. doi:10.1021/bi00281a030
25. T Ekegren, S M Aquilonius, C Gomes-Trolin. A comparative study of methionine adenosyltransferase activity and regional distribution in mammalian spinal cord // *Biochem Pharmacol*. – 2000. – V 60(3). – P. 441–445. doi: 10.1016/s0006-2952(00)00316-6.
26. Ditscheid B., Fünfstück R., Busch M., Schubert R., Gerth J, Jahreis G. Effect of L-methionine supplementation on plasma homocysteine and other free amino acids: a placebo-controlled double-blind cross-over study // *European Journal of Clinical Nutrition*. – 2005. – V 59. – P. 768–775.
27. Нечипорук В.М., Корда М.М. Метаболізм цистеїну при експериментальному гіпер- та гіпотиреозі в щурів // *Медицина та клінічна хімія*. – 2017. – Т. 19. – № 4. – С.32-39. DOI 10.11603/mcch.2410-681X.2017.v0.i4.8433
28. Копильчук Г. П., Бучковська І. М., Островська Ю. К. Особливості транссульфування гомоцистеїну в гепатоцитах щурів за умов білкової недостатності // *Biological systems*. – 2015. – 7 (2). – С. 156–162.
29. Chen W., Guo J.X., & Chang P. The effect of taurine on cholesterol metabolism // *Mol. Nutr. Food. Res*. – 2012. – 56 (5). – P. 681-690. doi: 10.1002/mnfr.201100799
30. Wolff S. P., Dean R. T. Monosaccharide autoxidation: A potential source of oxidative stress in diabetes? // *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. – 1987. – 18(1–3). – P. 283–293. doi:10.1016/0302-4598(87)85030-4
31. 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). – P. 1–15. doi:10.1016/j.ab.2008.02.029
32. Wolff S. P. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides // *Oxygen Radicals in Biological Systems Part C*. – 1994. – 233. – P. 182–189. doi:10.1016/s0076-6879(94)33021-2

33. Карпищенко А.И., Глушков С.И., Смирнов В.В. Методика определения показателей системы глутатиона в лимфоцитах человека // Токсикологический вестник. – 1997. – № 3. – С. 17–23.
34. Юсупова Л.Б. О повышении точности определения активности глутатионредуктазы эритроцитов // Лаб. дело. – 1989. – № 4. – С. 19–21.
35. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лабораторное дело. – 1986. – № 12. – С. 19–22.
36. Доценко О. И. Активность системы глутатиона крови мышей, находящихся в условиях вибрационного стресса // ScienceRise. - 2015. - №11/6(16). - С. 39–46.
37. Філінська О. М., Лозовий В. П., Яблонська С. В., Островська Г. В., Рибальченко Т. В., Зеленюк В. О., Рибальченко В. К. Вплив піридину на активність мембранозв'язаних ферментів клітин печінки. Доповіді Національної академії наук України. – 2008. – № 6. – С. 173 – 177.
38. Иващенко А.Т., Ли Т., Бушнева И.А. Свойства анионной АТФазы эритроцитов. Вопросы мед. Химии. – 1985. – №1.
39. Рязанцев Н.В., Новицкий В.В. Структурные нарушения и изменения активности Na-K-АТФазы в мембранах эритроцитов у пациентов с невротическими расстройствами. Бюл. эксп. биол. и мед. –2002. – Т. 134. – № 7. – С. 85–88.
40. Макаренко Е.В. АТФ-азная активность эритроцитов при хронических заболеваниях печени и желудка. Лаб. дело. –1987. – №2. – С. 14–17.
41. Якушева И.А., Орлова Л.И. Метод определения активности аденозинтрифосфатазы в гемолизатах эритроцитов крови человека. Лаб. дело. – 1970. – №8. – С. 497–501.
42. Кушаковский М.С. Клинические формы повреждения гемоглобина. –Л. – 1968. –324 с.
43. Пупкова В.И. Определение гемоглобина в крови. Информационно-методическое пособие. – Кольцове. – 2001. – С. 4–8.

44. Боровиков В. STATISTICA. Искусство анализа данных на компьютере: Для профессионалов. 2-е изд. СПб.: Питер. – 2003.
45. Dotsenko O. I., Mykutska I. V., Taradina G. V., Boiarska Z. O. Potential role of cytoplasmic protein binding to eryth-ocyte membrane in counteracting oxidative and metabolic stress // *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. – 2020. – 11(3). – P. 93–100. doi:10.15421/022071.
46. Palego L., Betti L., Giannaccini G. Sulfur Metabolism and Sulfur-Containing Amino Acids: I- Molecular Effectors // *Biochem Pharmacol*. – 2015. – Vol. 4. – Is. 7. – P. 1–8. DOI: 10.4172/2167-0501.1000158
47. Gregory J. F., DeRatt B.N., Rios-Avila L., Ralat M., Stacpoole P.W. Vitamin B<sub>6</sub> Nutritional Status and Cellular Availability of Pyridoxal 5'-Phosphate Govern the Function of the Transsulfuration Pathway's Canonical Reactions and Hydrogen Sulfide Production via Side Reactions // *Biochimie*. – 2016. – 126. – P. 21–26. doi: 10.1016/j.biochi.2015.12.020
48. Vitvitsky V., Yadav P. K., Kurthen A., Banerjee R. Sulfide oxidation by a noncanonical pathway in red blood cells generates thiosulfate and polysulfides // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2015. – Vol. 290. – №13. –P. 8310–8320.
49. Valentine W. N., Frankenfeld J. K. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase (EC 2.8.1.2): a simple assay adapted to human blood cells // *Clinica chimica acta*. – 1974. – Vol. 51. – №2. – P. 205–210.
50. Ogasawara Y., Ishii K., Tanabe S. Enzymatic assay of  $\gamma$ -cystathionase activity using pyruvate oxidase-peroxidase sequential reaction // *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. – 2002. – Vol. 51. – №2. – P. 139–150.
51. Wang G.,Huang Y., Zhang N., Liu W., Wang C., Zhu X., Ni X. Hydrogen Sulfide Is a Regulator of Hemoglobin Oxygen-Carrying Capacity via Controlling 2,3-BPG Production in Erythrocytes // *Oxid Med Cell Longev*. – 2021. DOI: 10.1155/2021/8877691
52. Wondimu E. T., Zhang Q., Jin Z., Fu M. Torregrossa R., Whiteman M., Yang G., Wu L., Wang R. Effect of hydrogen sulfide on glycolysis-based energy production in mouse erythrocytes // *J Cell Physiol*. 2021. – P. 1–11. DOI: 10.1002/jcp.30544

53. Cortese-Krott, Miriam M. Red Blood Cells as a "Central Hub" for Sulfide Bioactivity: Scavenging, Metabolism, Transport, and Cross-Talk with Nitric Oxide // *Antioxid Redox Signal.* – 2020. – 33(18). – P. 1332-1349. doi: 10.1089/ars.2020.8171.
54. Jack H. Kaplan. Biochemistry of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase // *Annu Rev Biochem.* – 2002. – 71. – P. 511-35. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.102201.141218.
55. 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.

